

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA**

**FACOLTA' DI AGRARIA**

**Dipartimento di Produzione Vegetale**

Tesi di Dottorato di Ricerca in Ortoflorofrutticoltura  
e Genetica Molecolare XVII Ciclo (2002 – 2005)

**SALVAGUARDIA E CARATERIZZAZIONE MORFOLOGICA  
E MOLECOLARE DI ECOTIPI DI CARCIOFO DI TIPO  
ROMANESCO**

Dottorando

Ing. Agr. Nestor Alonso Rey Muñoz

Coordinatore

Prof. Francesco Saccardo

Relatore

Prof. Mario Augusto Pagnotta

Agli autori dei miei giorni,  
ombre dei mie sacrifici, complici delle mie gioie.

A Lucilla, mia sposa,  
innesco del mio traguardo, sorriso del mio tempo.

# INDICE

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| I – Introduzione generale.....                                         | 7  |
| 1. IL CARCIOFO .....                                                   | 7  |
| 1.1 Cenni storici.....                                                 | 7  |
| 1.2 Cenni tassonomici e botanici.....                                  | 9  |
| 1.3 Importanza economica.....                                          | 13 |
| 1.4 Impiego industriale e sottoprodotti.....                           | 14 |
| 1.5 Importanza alimentare .....                                        | 17 |
| 1.6 Situazione della coltura nel mondo .....                           | 20 |
| 1.6.1 Situazione della coltura in Italia .....                         | 25 |
| 1.6.2 Situazione della coltura nel Lazio .....                         | 28 |
| 1.7 Panorama varietale italiano .....                                  | 29 |
| 1.8 Cenni agronomici .....                                             | 35 |
| 1.9 Tecnica colturale .....                                            | 38 |
| 1.10 Avversità.....                                                    | 42 |
| 1.11 Propagazione della specie.....                                    | 44 |
| 1.11.1 Metodi convenzionali .....                                      | 44 |
| 1.11.1.1 Carducci.....                                                 | 45 |
| 1.11.1.2 Ovoli .....                                                   | 46 |
| 1.11.1.3 Zampe .....                                                   | 46 |
| 1.11.2 Metodi innovativi .....                                         | 47 |
| 1.11.3 Propagazione gamica.....                                        | 50 |
| 1.12 Miglioramento genetico.....                                       | 52 |
| 1.12.1 Risorse genetiche.....                                          | 52 |
| 1.12.2 Pool genetico coltivato .....                                   | 53 |
| 1.12.3 Pool genetico selvatico .....                                   | 53 |
| 1.12.4 Tecniche e obiettivi del miglioramento genetico .....           | 54 |
| 1.12.5 Conseguenze dell'inbreeding .....                               | 56 |
| 1.12.6 Eterosi.....                                                    | 56 |
| 1.12.7 Controllo genetico di caratteri economicamente importanti ..... | 57 |
| 2. MASCHIOSTERILITÀ .....                                              | 57 |

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Introduzione.....                                                                                                                                                                                 | 57 |
| 2.2 Classificazione.....                                                                                                                                                                              | 58 |
| 2.2.1 Maschiosterilità genetica .....                                                                                                                                                                 | 60 |
| 2.2.2 Maschiosterilità non genetica .....                                                                                                                                                             | 62 |
| 2.3 Origini e reperimento della maschiosterilità .....                                                                                                                                                | 63 |
| 2.4 Utilizzo della maschiosterilità .....                                                                                                                                                             | 64 |
| 3. I MARCATORI GENETICI .....                                                                                                                                                                         | 65 |
| 3.1 Marcatori morfologici.....                                                                                                                                                                        | 65 |
| 3.2 Marcatori biochimici .....                                                                                                                                                                        | 66 |
| 3.3 Marcatori molecolari .....                                                                                                                                                                        | 66 |
| 3.3.1 Marcatori molecolari basati su tecniche di restrizione e ibridazione .....                                                                                                                      | 69 |
| 3.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) .....                                                                                                                                         | 70 |
| 3.3.1.2 VNTR (Variable Number of Tandem Repeats).....                                                                                                                                                 | 71 |
| 3.3.2 Marcatori molecolari basati su tecniche di amplificazione .....                                                                                                                                 | 72 |
| (PCR – derivati).....                                                                                                                                                                                 | 72 |
| 3.3.2.1 RAPD (Random Amplified polymorphic DNA).....                                                                                                                                                  | 73 |
| 3.3.2.2 SSR (Simple Sequence Repeat).....                                                                                                                                                             | 73 |
| 3.3.2.3 ISSR (Inter - Simple Sequence Repeat) .....                                                                                                                                                   | 75 |
| 3.3.2.4 AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) .....                                                                                                                                           | 77 |
| 3.3.2.5 SAMPL (Selective Amplification of microsatellite Polymorphic Loci).....                                                                                                                       | 78 |
| 3.3.2.6 S-SAP (Sequence – Specific Amplification Polymorphism) .....                                                                                                                                  | 79 |
| 3.3.2.7 STS (Sequence – Tagged Sites) .....                                                                                                                                                           | 80 |
| 3.3.2.8 SNP (Single Nucleotide Polymorphism).....                                                                                                                                                     | 80 |
| 3.4 Utilizzo dei marcatori molecolari nello studio del genoma di carciofo .....                                                                                                                       | 81 |
| II. Obiettivi della ricerca.....                                                                                                                                                                      | 82 |
| 1. Studio della variabilità genetica in popolazioni di carciofo tipo Romanesco. ....                                                                                                                  | 82 |
| 2. Studio della quota di alloincrocio e/o autoincompatibilità (sistema di incrocio).....                                                                                                              | 82 |
| 3. Costituzione di una mappa genetica. ....                                                                                                                                                           | 82 |
| 4. Confronto di una popolazione “Virosata” e una “Risanata da virus”, attraverso la<br>caratterizzazione molecolare utilizzando come punto di partenza l’RNA: .....                                   | 82 |
| III. Analisi della variabilità genetica in popolazioni di <i>Cynara cardunculus</i> Var. <i>scolymus</i><br>mediante la caratterizzazione molecolare di ecotipi di carciofo romanesco nel Lazio ..... | 83 |
| 1. INTRODUZIONE .....                                                                                                                                                                                 | 83 |

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2. MATERIALI E METODI .....                                                         | 84  |
| 2.1 Collezione e caratterizzazione del materiale .....                              | 84  |
| 2.2 Estrazione del DNA.....                                                         | 84  |
| 2.3 Analisi AFLP .....                                                              | 85  |
| 2.3.1 Preparazione del DNA stampo .....                                             | 86  |
| 2.3.2 Preamplificazione .....                                                       | 86  |
| 2.3.3 Amplificazione selettiva.....                                                 | 86  |
| 2.3.3 Elettroforesi .....                                                           | 87  |
| 2.4 Analisi ISSR .....                                                              | 87  |
| 2.4.1 Amplificazione .....                                                          | 88  |
| 2.4.2 Elettroforesi .....                                                           | 88  |
| 2.5 Analisi statistica.....                                                         | 88  |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONI .....                                                    | 89  |
| 4. CONCLUSIONI .....                                                                | 93  |
| IV. Produzione di ibridi F1 puri di carciofo per sviluppare una mappa genetica..... | 94  |
| 1. INTRODUZIONE .....                                                               | 94  |
| 2. MATERIALI E METODI .....                                                         | 95  |
| 2.1 Selezione dei cloni MS ed ecotipi locali (cultivar considerati).....            | 95  |
| 2.2 Tecnica di impollinazione .....                                                 | 96  |
| 2.3 Semina .....                                                                    | 97  |
| 2.4 Collezione e caratterizzazione del materiale .....                              | 98  |
| 2.5 Estrazione del DNA.....                                                         | 99  |
| 2.6 Analisi ISSR .....                                                              | 99  |
| 2.7 Analisi AFLP .....                                                              | 100 |
| 2.8 Analisi statistica.....                                                         | 100 |
| 2.9 Campo di interincrocio (libera impollinazione). .....                           | 100 |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONI .....                                                    | 101 |
| 4. CONCLUSIONI .....                                                                | 104 |
| V. Analisi di materiale Risanato da virus verso Non risanato.....                   | 105 |
| 1. INTRODUZIONE .....                                                               | 105 |
| 2. MATERIALI E METODI .....                                                         | 105 |
| 2.1 Collezione e caratterizzazione del materiale .....                              | 105 |
| 2.2 Estrazione del RNA .....                                                        | 105 |

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.3 Retrotrascrittasi per la sintesi del cDNA .....                                                                                                                        | 105 |
| 2.4 Analisi ISSR .....                                                                                                                                                     | 106 |
| 2.5 Analisi AFLP .....                                                                                                                                                     | 106 |
| 2.6 Analisi statistica.....                                                                                                                                                | 106 |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONI .....                                                                                                                                           | 107 |
| 4. CONCLUSIONI .....                                                                                                                                                       | 109 |
| VI. Analisi della variabilità genetica e morfologica tra 25 cloni di Carciofo Romanesco<br>collezionate (selezionate) nel Lazio. ....                                      |     |
| 1. INTRODUZIONE .....                                                                                                                                                      | 110 |
| 2. MATERIALI E METODI .....                                                                                                                                                | 110 |
| 2.1 Collezione e caratterizzazione del materiale .....                                                                                                                     | 111 |
| 2.2 Estrazione del DNA.....                                                                                                                                                | 111 |
| 2.3 Analisi AFLP .....                                                                                                                                                     | 111 |
| 2.4 Analisi ISSR .....                                                                                                                                                     | 111 |
| 2.5 Analisi statistica.....                                                                                                                                                | 112 |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONI .....                                                                                                                                           | 112 |
| 3.1 Correlazioni altamente significative fra caratteristiche morfologiche (dati primo e<br>secondo anno 2004-2005).....                                                    | 112 |
| 3.2 Raggruppamento dei cloni sulla base di differenti caratteristiche morfologiche e<br>qualitative. ....                                                                  | 114 |
| 3.2.1 Cluster utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno, e<br>caratteristiche qualitative.....                                                        | 114 |
| 3.2.2 Cluster utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno, e<br>caratteristiche qualitative:.....                                                       | 116 |
| 3.2.3 Cluster utilizzando Marcatori Molecolari AFLP e ISSR (GDA) .....                                                                                                     | 117 |
| 3.3 Analisi dei principali componenti, utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II<br>(2005) anno, e caratteristiche qualitative.....                               | 120 |
| 3.3.1 Analisi dei principali componenti, utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II<br>(2005) anno, caratteristiche qualitative e Marcatori più significativi..... | 120 |
| 3.4 Regressione Stepwise fra caratteristica morfologica e Marcatori molecolari che hanno<br>mostrato correlazione positiva con caratteri morfologici. ....                 | 121 |
| 4. CONCLUSIONI .....                                                                                                                                                       | 122 |



## **I – Introduzione generale**

Specie: *Cynara cardunculus* Var. *scolymus*, Asteraceae, (Compositae)  $2n=2x=34$ .

Il genere *Cynara* comprende il carciofo (*Cynara cardunculus* Var. *scolymus*), il cardo selvatico *C. cardunculus* var. *sylvestris* che produce ibridi completamente fertili in natura ed è il probabile antenato del carciofo; ed altre sei specie selvatiche con affinità genetiche al carciofo. Gli incroci sono difficili da fare e gli ibridi hanno una fertilità ridotta, sono: *C. baetica*, *C. algarbiensis*, *C. syriaca*, *C. cornigera*, *C. sibthorpiana* e *C. humilis*.

### **1. IL CARCIOFO**

#### **1.1 Cenni storici**

Come attestano degli scritti d'alcuni autori dell'antichità (*De Rustica* di Columella e *Naturalis Historia* di Plinio), il carciofo (*Cynara scolymus*) era già conosciuto all'epoca dei Romani. Notizie più certe sulla sua coltivazione in Italia risalgono al XV secolo, quando dalla zona di Napoli, dove era stata introdotta da Filippo Strozzi, la coltura del carciofo si diffuse in Toscana (Caterina dei Medici ne fu una grande consumatrice) e, successivamente, in molte altre regioni. Circa la botanica della sua origine sono possibili solo congetture. Secondo Hehn

la pianta sarebbe apparsa in Europa nel Medioevo con nome derivato dall'arabo "alakrshuf" e sarebbe dunque d'origine orientale. Secondo Montelucci, però il carciofo era ignoto sia agli egizi che agli ebrei, mentre Teofrasto lo indica come coltivato in Sicilia ma non in Grecia: la pianta sarebbe quest'autore di origine occidentale.

Le imponenti popolazioni selvatiche di Cynara cardunculus sulle colline tra Civitavecchia e i monti di Tolfa, vicino all'insediamento etrusco di Cerveteri, farebbero supporre l'origine delle varietà coltivate da queste zone per opera degli etruschi stessi. In questa zona ancora oggi sono intense le coltivazioni di carciofo, così come molto presenti sono le popolazioni della specie selvatica infestanti dei pascoli. L'ultima frase del testo di Pignatti, (1982), merita di essere interamente riportata: "oggi il carciofo è largamente coltivato in Italia, soprattutto nell'area degli ulivi, più raramente nell'area della vite". Carciofi e ulivi, due colture gemellate; un binomio che sembra tipicamente caratterizzante di un clima e di un consumo alimentare.

E' oggi largamente condivisa l'idea che il carciofo (*Cynara scolymus* L.) è una specie orticola diffusa nel bacino del Mediterraneo fin dai tempi dei Greci e dei Romani che ne apprezzavano le caratteristiche gastronomiche e curative, è originario dei paesi del bacino del Mediterraneo, comprese le isole Egge e Cipro, e dell'Africa settentrionale, compresa l'Etiopia e l'Egitto (Bianco *et al.*, 1990), dove tuttora sono presenti diverse specie spontanee di *Cynara*. Soltanto a partire dal XV secolo si è diffuso come coltura ed è stato apprezzato per le sue caratteristiche organolettiche, nutrizionali e terapeutiche (corroboranti, diuretiche, depurative). Per merito di giardinieri italiani, sono state selezionate le prime cultivar idonee all'alimentazione umana che hanno portato all'affermazione del carciofo nel Nord Italia e in Toscana. 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 in Stati Uniti (Oliaro, 1967).

Le prime descrizioni di varietà di carciofo risalgono comunque al XVIII secolo, ma già prima erano probabilmente noti tipi diversi. Ai tempi di Plinio si faceva distinzione tra i carciofi provenienti dalla Numidia (attualmente Algeria) e quelli importati dalla Libia, 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" (Viani, 1929).

Secondo Columnella, il nome del genere *Cynara* potrebbe derivare da "cinis", al momento che il terreno dedicato 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.

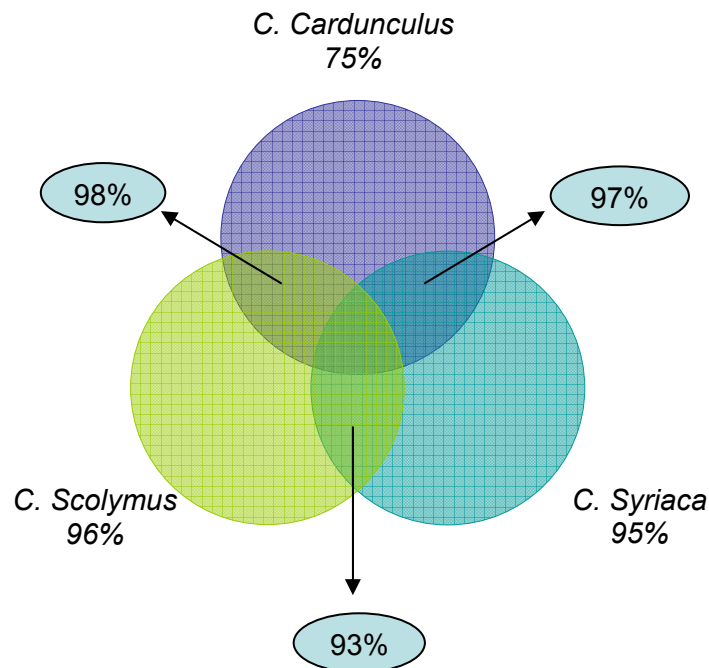
Secondo la mitologia greca, il nome potrebbe derivare da Cynara, una bella fanciulla dai capelli color cenere trasformata in carciofo da Giove innamorato. In greco il termine “Kinara” sembra comune a molte piante spinose, mentre quello di “scolymus” significa appuntito, spinoso e potrebbe alludere proprio alla forma appuntita di alcuni tipi di carciofo o alla presenza di spine. E’ più probabile, invece, che il termine carciofo derivi dal neolatino “articactus” da cui la parola italiana, attualmente in disuso di “articiocco”, quella francese di “artichaut”, quell’inglese di “artichoke” (Oliaro, 1967).

## 1.2 Cenni tassonomici e botanici

Il carciofo (termine di derivazione araba: kharshuf) *Cynara cardunculus* L. var *scolymus* (L.) Fiori, è una angiosperma dicotiledone appartenente all’ordine delle Asterales che, con le due famiglie Asteraceae e Cichoriaceae, raggruppa circa 19000 specie, sottofamiglia *Tubiflorale* e la tribù *Cynareae* (Bianco, 1990). Altre specie di interesse agronomico appartenenti alla famiglia delle *Asteraceae* sono: *Cynara cardunculus* (cardo), *Helianthus annuus* (girasole), *Carthamus tinctorius* (cartamo), *Matricharia camomilla* (camomilla), *Chamaemelum nobile* (camomilla romana), *Achillea millefolium* (certofoglio), *Dalia variabilis* (dalia). La famiglia è caratterizzata dalla presenza di: fiori tubulosi e spesso anche ligulati, con ligula formata da tre petali e presenza di ghiandole schizogene oleifere, ricche di olii eteri (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).

Per la prima volta l’origine del carciofo è stata studiata, nel 1848, da De Candolle il quale, basandosi su caratteristiche morfologiche, concluse che il carciofo deriva dalla specie *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori ( $2n=2x=34$ ) (*Cynareae* selvatiche della regione Mediterranea). Basnizki invece, nel 1981, dopo ripetuti incroci fra due specie selvatiche ed una coltivata, è riuscito a dimostrare l’affinità genetica tra il carciofo coltivato var. “Gros Camuse Bretagne” (cultivar di carciofo coltivata in Bretagna, Francia) e le specie selvatiche di *Cynara*, *C. cardunculus* L e *C. syriaca* Boiss (*Figura 1*) (Basnizki, 1981; Bianco *et al.*, 1990).



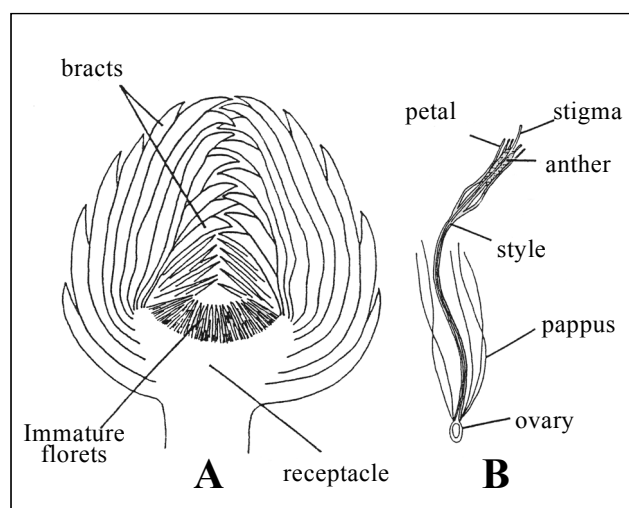
**Figura 1.** Fertilità del polline di tre *Cynareae* e dei loro ibridi F1 (Basnizki, 1981).

Sulla base di questi risultati, Basnizki (1981), ha dimostrato che le tre specie incrociate sono da ritenere razze geo-ecologiche di una stessa specie ecologica 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;
- 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 florale e numerose gemme laterali che svilupperanno i “carducci” e da questi gli “ovoli” (organi di propagazione vegetativa).
- 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 monoculare, che dà origine ad un achenio (frutto), da uno stilo e da uno stigma bifido le cui parti ricettive rimangono aderenti nella parte longitudinale mentre è libera per la germinazione del polline solo la parte laterale;

- androceo composta 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;
- allogamia dovuta all'asincronia tra la maturazione del polline e la recettività dello stigma (proterandria);
- 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 bruno marmorizzato di bruno, con una gran quantità di papo formato da setole piumose pluriseriate, riunite alla base e caduche con essi (Jacoboni, 1958);
- produzione di 9-40 grammi di seme per capolino; peso di 1000 semi 30-70 g (Pignatti, 1982).



**Figura 2.** Struttura del capolino.

Il capolino principale si trova all'apice del fusto principale (detto cimarolo) e quelli secondari, si formano all'ascella delle foglie (detti braccioli); i primi capolini presentano uno sviluppo maggiore rispetto ai secondari.

L'involucro d'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. (Fig. 2).

Il ricettacolo è carnoso, piatto, discoidale, setoloso nella parte superiore. Sul ricettacolo sono inseriti i fiori ermafroditi, di colore azzurro intenso o violetto: essi prendono il nome di flosculi (Jacoboni, 1958). (Fig 3).

Inframmezzate fra i flosculi e direttamente inserite sul talamo, si notano numerose setole bianche e traslucide, assai rigide, esse misurano circa 200  $\mu\text{m}$  di spessore e la loro superficie appare irregolarmente striata in senso longitudinale (Jacoboni, 1958). I flosculi sono provvisti di un ovario infero monoculare, di forma tendenzialmente parallelepipeda asimmetrica, sormontato da un lungo tubo corollino la cui base è circondata da un cerchio di peli che costituiscono il papo. Tale organo, che misura circa 130  $\mu\text{m}$  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 e quindi si restringe per poi dividersi in cinque petali canalicolati ed arrotondati all'apice, tutti d'uguale lunghezza meno uno che è 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 dell'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 grani 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. Ciascun fiore produce un'elevata quantità di polline che, in gran parte, viene rapidamente bottinaio 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 enterico, 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".



*Figura 3* Capolino fiorito.

### **1.3 Importanza economica**

La coltura del carciofo in Italia occupa, tra le colture ortive da pieno campo, la terza posizione, preceduta dal pomodoro (131 mila ha) e dalla patata (83 mila ha) (ISTAT, 2002). La PLV complessiva, pari a circa 500 milioni di euro l'anno, supera quella della stessa patata (ISMEA 1999).

La produzione italiana è destinata prevalentemente al consumo fresco, anche se è in crescita la quantità destinata all'industria di trasformazione, soprattutto per la produzione di prodotti sott'olio. L'Italia risulta quindi il primo produttore mondiale di carciofo ed il secondo esportatore dopo la Spagna, ma è anche il secondo paese importatore. Nei mesi invernali, da

novembre a marzo, vengono infatti acquistate circa 4000-5000 t di prodotto fresco, per l'80% di provenienza spagnola (ISTAT, 2002).

A causa degli elevati costi di produzione la cinaricoltura sta vivendo attualmente una fase di stasi. Una possibile ripresa di questa coltura non dovrebbe prescindere da un'attenta promozione di mercato, basata non solo su un'adeguata presentazione commerciale del prodotto, ma anche su un efficace *marketing* che faccia leva su alcune caratteristiche qualitative capaci di influenzare fortemente le scelte del consumatore (Graifenberg *et al.*, 2001). Tra di esse dovrebbero essere considerate l'alto valore nutrizionale, le proprietà antiossidanti di numerose sostanze contenute quali acidi dicaffeolchinici e luteolina, tali da farlo considerare un alimento funzionale con proprietà farmacologiche e la sicurezza igienico-sanitaria. L'interesse per questa specie sta diffondendosi all'estero ed è probabile che in futuro nuovi paesi europei ed extra-europei si affacceranno sul mercato come produttori ed esportatori (Graifenberg *et al.*, 2001).

Esistono pertanto motivazioni valide non solo per un consolidamento delle superfici investite, ma anche per un ulteriore sviluppo della coltura, la quale potrebbe contribuire a valorizzare le aree irrigue del Mezzogiorno. Tale obiettivo può essere raggiunto attraverso una maggiore regolazione del calendario d'afflusso del prodotto sul mercato sia del consumo fresco che dell'industria di trasformazione conseguente sia ad un arricchimento del patrimonio varietale sia ad una migliore distribuzione territoriale della coltura e, soprattutto, ad un sostanziale ammodernamento dei metodi di propagazione (Mauromicale *et al.*, 2000).

## **1.4 Impiego industriale e sottoprodotti**

Un buon carciofo deve avere le seguenti caratteristiche: punta chiusa, foglie esterne di colore verde scuro, interne tenere, assenza di peluria, gambo tenero e senza ammaccature. Le qualità più apprezzate sono quelle degli ecotipi: romani, di Chioggia, campani, sardi. Nella prima raccolta si ottengono una decina di carciofi per pianta, che in seguito rigenera producendo un certo numero di carciofi più piccoli e teneri.

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). 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.

Erasmus". 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 sottolio, con comparsa di efflorescenza bianca su "cuori" di carciofo. Così anche la gran 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 d'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).

Numerose ricerche sono state condotte sull'utilizzazione dei sottoprodotti della lavorazione del carciofo (Fig. 4). La produzione dei capolini in Puglia si aggira sulle 167 mila tonnellate. Circa il 25% della produzione viene destinato all'industria di salamoia, al naturale, sottolio, sottaceto, surgelati. Considerata una resa media del 35%, lo scarto ammonterebbe a 15 mila tonnellate. Tale prodotto (come suggerisce Bianco), potrebbe essere utilmente impiegato come materia prima per la produzione di inulina e per ossidasi da utilizzare 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).



**Figura 4** Utilizzo nell'alimentazione, industria e medicina.

## 1.5 Importanza alimentare

Per quanto riguarda l'utilizzazione delle diverse componenti possiamo dire che ogni parte della pianta trova una sua giusta utilizzazione:

- **Capolino:** fresco, crudo o cotto, essiccato, surgelato, liofilizzato, deidrocongelato, al naturale, in salamoia, marinato, creme, composizione di fiori secchi.
- **Foglie:** bevande simili al thè, liquori, prodotti farmaceutici, creme di bellezza, dolcificanti non calorici, concentrati proteici da impiegare in bevande e biscotti, prodotti per la coagulazione del latte, coloranti per tingere tessuti e filati, cotte in varie ricette.
- **Semi:** olio (fluido, resa 40-45%, colore giallo, si solidifica a  $-13^{\circ}\text{C}$ ; peso specifico a  $15^{\circ}\text{C}$  = 0,925; indice di rifrazione 1,477 e indice di iodio 119, produzione di piantine.
- **Radici e rizoma:** infusi.
- **Pianta intera:** motivo ornamentale nei giardini, biomassa.

L'importanza della coltivazione del carciofo è da ricercarsi nelle caratteristiche qualitative del prodotto, non solo dal punto di vista nutrizionale, ma anche per quanto concerne l'aspetto farmaceutico. Il carciofo è un alimento tonico e digestivo, contiene molto ferro, le attività farmacologiche più note sono:

- **Coleretica**, la Cinarina contenuta nel carciofo provoca un aumento del flusso biliare e della diuresi.
- **Epato-protettrice**, è l'azione più conosciuta e utilizzata. Anche il Cardo Mariano precursore del carciofo è utilizzato allo stesso scopo.
- **Ipocolesterolemizzante**, allo stato attuale è l'azione più importante e più studiata. La Cinarina contenuta nel carciofo in una buona quantità è risultata avere un importante ruolo nell'abbassare il livello del colesterolo. Tale effetto farmacologico è stato dimostrato da numerosi studi scientifici. Le dosi terapeutiche di Cinarina variano da 100 mg a 1,5 g. Le sostanze contenute nel carciofo sono assolutamente prive di tossicità. Per trarre beneficio di queste straordinarie qualità curative, bisognerebbe assumere una quantità di carciofo fresco pari a 100-300 g al dì per un periodo abbastanza prolungato. I benefici di quest'ortaggio non devono essere vanificati con una scorretta cottura, vanno eliminate le tradizionali e succulente ricette: carciofi alla giudea o giudia, carciofi fritti, carciofini sott'olio, ecc.
- **Cosmetico:** dal punto di vista cosmetico il decotto di carciofo ha dimostrato un'azione bioattivante cutanea attraverso applicazioni esterne, per rinormalizzare pelli gialle con foruncoli dei soggetti epatici.

Il carciofo aiuta il fegato nell'eliminazione dei prodotti tossici ed abbassa il colesterolo ed i trigliceridi nel sangue; è inoltre un toccasana per la digestione e per i problemi di ritenzione idrica. Sarebbe quindi consigliabile aggiungerlo alla dieta in quantità discrete, oppure acquistarne gli estratti o la tintura madre in farmacia. E' possibile preparare anche dei decotti di carciofo utilizzando le sue foglie, amarissime, ma ricche di principi medicinali. L'unica nota stonata nelle molteplici proprietà benefiche del carciofo è che la sua assunzione, sia in estratto che in decotto o come semplice alimento, è controindicato durante la gravidanza e l'allattamento poiché sembrerebbe diminuire la produzione mammaria di latte.

I cuori di carciofo hanno un eccellente profilo aminoacidico e proteico (Lopez *et al.*, 1999): tra gli aminoacidi sono particolarmente rappresentati l'acido aspartico, l'acido glutammico, l'arginina, la prolina, la leucina, la lisina e l'alanina (Lattanzio *et al.*, 1979).

I carboidrati totali rappresentano il 6,8% della sostanza fresca; tra questi è importante il contenuto di inulina (2,5%), che tende ad aumentare con la conservazione del capolino a basse temperature. L'inulina, carboidrato appartenente al gruppo dei frutto-oligosaccaridi (FOS), è un composto endogeno di notevole interesse dietetico e farmacologico, in quanto funziona fisiologicamente come fibra dietetica prebiotica, ossia è resistente agli attacchi enzimatici nello stomaco e passa come tale nell'intestino dove svolge un'azione equilibratrice sulla microflora intestinale. Il consumo di inulina non comporta l'incremento del tasso di glicemia e ciò rende il carciofo una specie ortiva che può essere consumata senza rischio dai diabetici (Causey *et al.*, 2000; Ernst e Feldheim, 2000).

La coltura del carciofo si presta ad essere valorizzata dal punto di vista della concentrazione endogena di principi bioattivi ad attività chemioprotettiva, in quanto la parte edule, oltre che le foglie, contiene sostanze polifenoliche notoriamente bioattive (Kroon e Williamson, 1999).

Il contenuto di composti fenolici, subisce variazioni anche notevoli durante l'accrescimento e lo sviluppo dei capolini. E' stato osservato che allo stadio di maggior edibilità l'acido caffeico costituisce il 97% della componente fenolica totale. Il restante 3% è costituito dall'acido siringico, dalla luteolina, dall'apigenina, dall'acido ferulico, dall'acido cumarico e dall'acido vanillico. Il contenuto di acido caffeico diminuisce sostanzialmente con l'aumentare dell'età dei capolini.

**Tabella 1.** Composizione chimica qualitativa della parte edule del carciofo.

| <b>Composizione chimica qualitativa</b>            |       |
|----------------------------------------------------|-------|
| Sostanza secca (%)                                 | 15    |
| Protidi (% s.f.*)                                  | 2.09  |
| Carboidrati totali (% s.f.)                        | 6.08  |
| Zuccheri riduttori                                 | 0.06  |
| Inulina                                            | 2.05  |
| Grassi (% s.f.)                                    | 0.05  |
| Fibra grezza (% s.f.)                              | 1.04  |
| Vitamine (mg per 100 g di s.f.)                    |       |
| vitamina B1 (tiamina)                              | 0.08  |
| vitamina B2 (riboflavina)                          | 0.05  |
| vitamina B3 (acido nicotinico o niacina)           | 1.00  |
| vitamina C (acido ascorbico)                       | 10.00 |
| vitamina A (U.I./100 g di s.f.)                    | 160   |
| Sali minerali (mg/100 g di s.f.)                   |       |
| Ca                                                 | 42    |
| P                                                  | 14    |
| K                                                  | 280   |
| Fe                                                 | 1.03  |
| Mg                                                 | 29    |
| Cu                                                 | 0.25  |
| Contenuto in aminoacidi (mg/100 g di s.f.)         |       |
| Acido aspartico                                    | 394   |
| Acido glutammico                                   | 362   |
| Arginino                                           | 210   |
| Prolina                                            | 202   |
| Leucina                                            | 168   |
| Lisina                                             | 161   |
| Alanina                                            | 135   |
| Valina                                             | 122   |
| Glicina                                            | 110   |
| Fenilalanina                                       | 101   |
| Altri (triptofano, tirosina, istidina, ecc.)       |       |
| Valore energetico (cal./100 g di s.f.)             | 65    |
| <b>Contenuto in principi ad attività biologica</b> |       |
| Composti ortodifenoli (% della s.s.*)              |       |
| Cinarina                                           | 0.11  |
| Acido clorogenico                                  | 3.38  |
| Cinaroside (glicoside della luteolina)             | 0.19  |
| Scolimoside (glicoside della luteolina)            | 0.38  |
| Totale ortodifenoli (come acido clorogenico)       | 6.30  |
| Presenza di sostanze amare (% della s.f.**)        | 0.20  |

\* Sostanza secca

\*\* Sostanza fresca

A partire dagli anni 50 è stato identificato un gruppo di composti polifenolici: gli idrossicinnamati, appartenenti al gruppo degli acidi clorogenici (acido clorogenico e acidi dicaffeolchinici) ed i flavonoidi (la luteolina ed i suoi coniugati cinaroside e scolimoside). Una consistente letteratura biomedica ha dimostrato che queste sostanze possiedono marcati effetti epatoprotettivi, coleretici (aumento del flusso biliare) e ipocolesterolemici (abbassamento del tasso di colesterolo ematico) (Gebhardt e Fausel, 1997; Kraft, 1997).

L'estrazione dei principi attivi avviene dalle foglie con acqua e miscele idroalcoliche. Il contenuto dei principi attivi varia in relazione all'organo, all'età della pianta, alla cultivar, all'epoca di raccolta, alla tecnica adoperata nell'essiccamento del materiale fresco.

Sia gli acidi clorogenici che i flavonoidi sono, inoltre, sostanze naturali dotate di forte attività antiossidante, capaci di svolgere sinergicamente azione protettiva nei confronti di radicali liberi e quindi potenzialmente efficaci nella prevenzione di gravi patologie coronariche, ed arteriosclerotiche (Kono *et al.*, 1997). I metaboliti degli acidi clorogenici, inoltre, svolgono azione anticancerogena (Walgovich, 2000). Estratti di carciofo si sono anche rivelati in grado di inibire la biosintesi di colesterolo in colture cellulari di epatociti di ratto, un effetto riconducibile in particolare alla presenza di cinaroside ed in particolare del suo agl'icone luteolina.

Recenti studi indicano che alcuni composti presenti nel carciofo esercitano un'attività inibitoria sulla HIV-integrasi che regola un passo essenziale della replicazione dell'HIV e del suo inserimento nel DNA ospite (Slanina *et al.*, 2001).

Dal punto di vista nutritivo e dietetico il carciofo è un alimento molto energetico per l'abbondanza di sostanze azotate e per il contenuto di carboidrati.

## **1.6 Situazione della coltura nel mondo**

Il carciofo è una specie ortiva tipicamente mediterranea per cui il 70% circa dell'intera superficie mondiale (106.000 ha) (Fig. 6, 7 e 8) è sostanzialmente concentrata nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (Fig. 5): soprattutto Italia, Spagna, Francia, Grecia, mentre poco più del 30% interessa Tunisia, Algeria, Marocco, Turchia e Israele. Da almeno 30 anni la coltura si è estesa alla California, all'Argentina e alla Nuova Zelanda (Tab. 3).

Tra i paesi produttori di carciofo, l'Italia occupa una posizione preminente (*Figura 9*), con una superficie investita di 49.324 ettari pari al 49% del totale (dati FAO, 2001) (Tab. 2). Tra i paesi produttori, segue quindi la Spagna (19%), la Francia (14%) e gli stati dell'Africa e dell'Asia mediterranea (Pirazzoli, 1999).

La Spagna, secondo produttore mondiale, attualmente dispone di un'offerta dell'ordine di 300.000 tonnellate annue (Tab. 4): La coltura è localizzata soprattutto nelle regioni prospicienti il Mediterraneo e in particolare nelle province di Alicante, Murcia e Valencia, sono anche interessate l'Andalusia e la Catalogna (Pirazzoli, 1999). 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 la stessa Italia, che importa carciofo nei mesi più freddi. Infatti è proprio in inverno che Spagna dispone della maggior quantità di produzione, grazie soprattutto al particolare clima mite presente nelle sue coste orientali (Pirazzoli, 1999).



**Figura 5.** Paesi produttori di carciofo nel bacino del Mediterraneo durante il 1998.

**Tabella 2.** Andamento delle superfici coltivate a carciofo nel mondo nel 1990, 1995 e 2001 (ha) FAO, 2001.

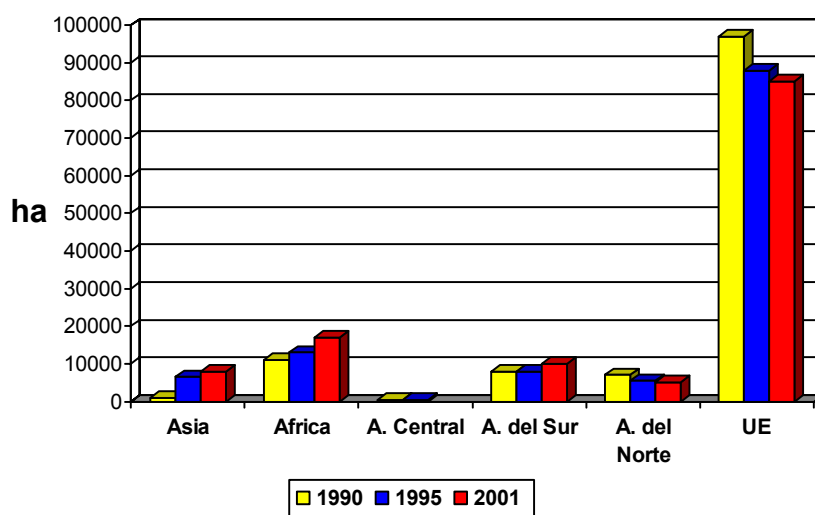
| <b>Nazione</b>   | <b>1990</b> | <b>1995</b> | <b>2001</b> |
|------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Italia</b>    | 48172       | 51723       | 49324       |
| <b>Spagna</b>    | 31100       | 18400       | 19300       |
| <b>Francia</b>   | 15068       | 13899       | 12500       |
| <b>Cina</b>      | 0           | 4000        | 6500        |
| <b>Algeria</b>   | 1170        | 860         | 4800        |
| <b>Argentina</b> | 3600        | 3900        | 4500        |
| <b>USA</b>       | 4015        | 3602        | 3840        |
| <b>Egitto</b>    | 3049        | 2948        | 3512        |
| <b>Cile</b>      | 2767        | 2479        | 3200        |
| <b>Marocco</b>   | 1344        | 2230        | 3000        |
| <b>Tunisia</b>   | 1500        | 2630        | 2800        |
| <b>Grecia</b>    | 3202        | 2200        | 2300        |
| <b>Messico</b>   | 76          | 227         | 400         |
| <b>Perù</b>      | 106         | 200         | 380         |

**Tabella 3.** Andamento del rendimento della coltivazione del carciofo nel mondo nel 1990,1995 e 2001.(t/ha) FAO, 2001.

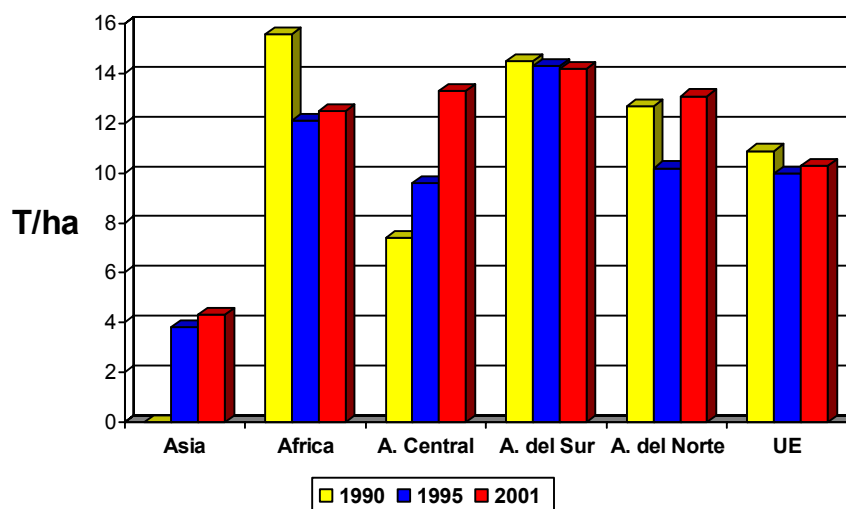
| <b>Nazione</b>   | <b>1990</b> | <b>1995</b> | <b>2001</b> |
|------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Egitto</b>    | 24,27       | 13,57       | 20,23       |
| <b>Argentina</b> | 20          | 19,23       | 18,89       |
| <b>Spagna</b>    | 13,76       | 13,63       | 15,31       |
| <b>Marocco</b>   | 12,75       | 15,58       | 14,83       |
| <b>Perù</b>      | 8,38        | 9,41        | 14,47       |
| <b>Messico</b>   | 7,18        | 9,4         | 13,25       |
| <b>USA</b>       | 12,59       | 10,31       | 12,91       |
| <b>Grecia</b>    | 10,49       | 11,32       | 10          |
| <b>Italia</b>    | 10,11       | 10,09       | 9,42        |
| <b>Algeria</b>   | 5,34        | 8,34        | 8,13        |
| <b>Cile</b>      | 7,5         | 7,02        | 7,7         |
| <b>Tunisia</b>   | 8           | 8,37        | 7,14        |
| <b>Francia</b>   | 6,45        | 4,54        | 5,2         |
| <b>Cina</b>      | 0           | 3,5         | 4,62        |

**Tabella 4.** Andamento delle produzioni di carciofo nel mondo nel 1990,1995 e 2001 (t)  
FAO, 2001.

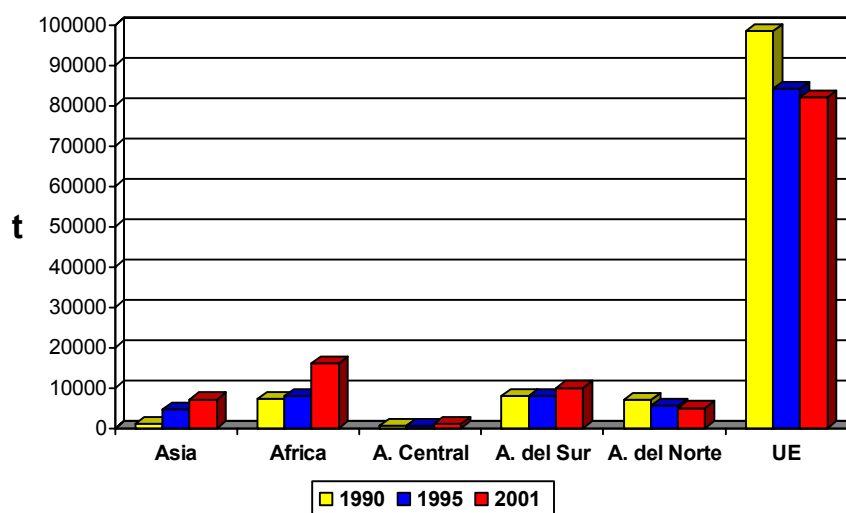
| Nazione   | 1990    | 1995    | 2001    |
|-----------|---------|---------|---------|
| Italia    | 487.000 | 517.200 | 464.783 |
| Spagna    | 427.900 | 250.700 | 295.500 |
| Argentina | 72.000  | 75.000  | 85.000  |
| Egitto    | 74.000  | 40.000  | 71.052  |
| Francia   | 97.118  | 63.190  | 65.000  |
| USA       | 50.547  | 37.149  | 49.580  |
| Marocco   | 17.137  | 34.750  | 44.500  |
| Algeria   | 6250    | 7.169   | 39.000  |
| Cina      | 0       | 14.000  | 30.000  |
| Cile      | 20.753  | 17.400  | 24.650  |
| Grecia    | 33.594  | 24.900  | 23.000  |
| Tunisia   | 12.000  | 22.000  | 20.000  |
| Perù      | 888     | 1.881   | 5.500   |
| Messico   | 546     | 2.133   | 5.300   |



**Figura 6.** Andamento delle superfici coltivate a carciofo nel mondo nel 1990,1995 e 2001 (ha) FAO, 2001.



**Figura 7** Andamento del rendimento del coltivo del carciofo nel mondo nel 1990,1995 e 2001 (t/ha) FAO, 2001.



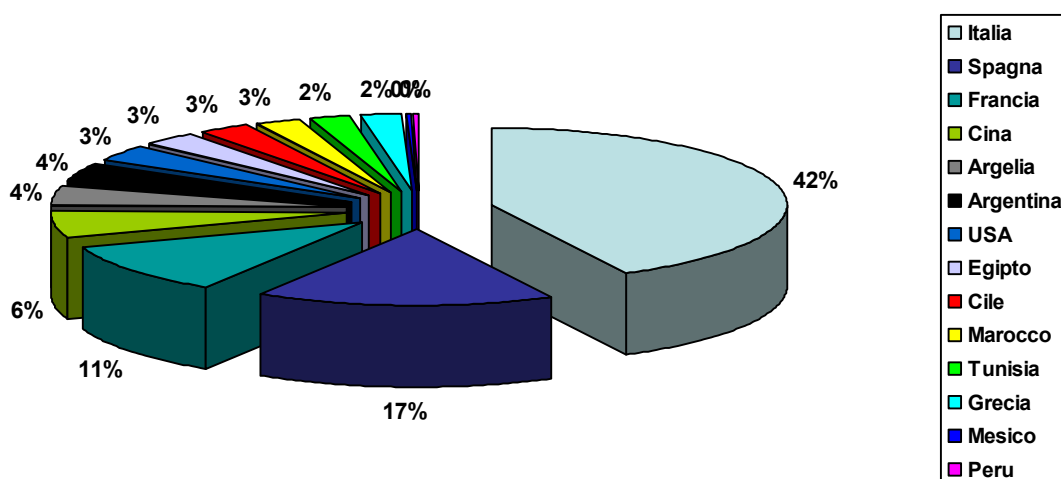
**Figura 8.** Andamento della produzione di carciofo nel mondo nel 1990,1995 e 2001 (t) FAO, 2001.

La Francia rappresenta il terzo paese produttore mondiale, con raccolti dell'ordine di 75.000 tonnellate annue. Le migliori coltivazioni sono dislocate in Bretagna, dove la produzione è raccolta da maggio a ottobre (con punte a giugno-luglio), nel Sud-Est e Sud-Ovest dove si ottengono produzioni più precoci (aprile-giugno). L'offerta interna non consente di soddisfare

il fabbisogno del paese, per cui la Francia è costretta a ricorrere a cospicue importazioni (mediamente 30.000 tonnellate annue), provenienti soprattutto dalla Spagna e, in minor misura, dall'Italia (Pirazzoli,1999). Sia in Francia che in Spagna, una parte del prodotto (circa il 10%) è destinato all'utilizzazione industriale.

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).



**Figura 9.** Superfici coltivate a carciofo nei principali paesi produttori (dati FAO, 2001).

### 1.6.1 Situazione della coltura in Italia

La coltura del carciofo in Italia occupa, tra le colture ortive da pieno campo, la terza posizione, preceduta dal pomodoro (131 mila ha) e dalla patata (83 mila ha) (ISTAT, 2002). La PLV complessiva, pari a circa 500 milioni di euro l'anno, supera quella della stessa patata (ISMEA, 1999).

La produzione italiana è destinata prevalentemente al consumo fresco, anche se è in crescita la quantità destinata all'industria di trasformazione, soprattutto per la produzione di prodotti sott'olio. L'Italia risulta quindi il primo produttore mondiale di carciofo ed il secondo esportatore dopo la Spagna, ma è anche il secondo paese importatore. Nei mesi invernali, da novembre a marzo, vengono infatti acquistate circa 4000-5000 t di prodotto fresco, per l'80% di provenienza spagnola (ISTAT, 2002). (*Figura 6*).

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 seconda nazione esportatrice dopo la Spagna (Magnifico, 2000).

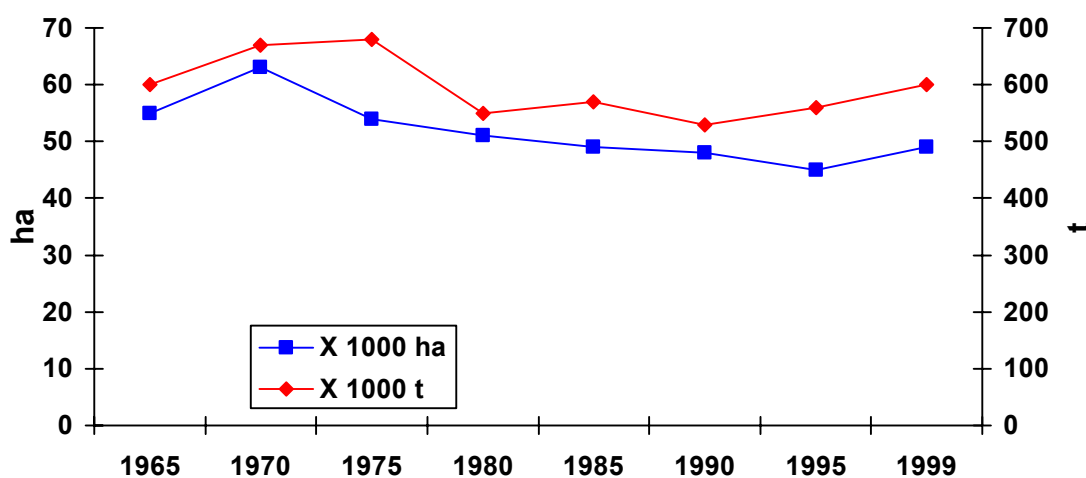
In Italia, la coltivazione è principalmente concentrata nelle isole, al Centro-Sud e nelle regioni costiere della penisola. La distribuzione regionale (*Tabella 5*) vede la Puglia al primo posto con 18.254 ettari e 173.379 t di produzione, seguita dalla Sardegna (13.546 ha e 117.052 t) e dalla Sicilia (12.945 ha e 174.719 t). Altre regioni come Campania (2.958 ha e 37.334 t), Lazio (1.395 ha e 25.209 t), Toscana (927 ha e 12.626 t) rappresentano circa il 13% e il 12% rispettivamente della superficie investita e della produzione totale in Italia.

**Tabella 5.** Coltivazione del carciofo nelle regioni italiane (dati ISTAT, 1998).

| <b>Regioni</b>        | <b>Superfici (ha)</b> | <b>Produzione (q)</b> |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Puglia</b>         | 18.254                | 1.733.790             |
| <b>Sardegna</b>       | 13.546                | 1.170.515             |
| <b>Sicilia</b>        | 12.945                | 1.747.191             |
| <b>Campania</b>       | 2.958                 | 373.340               |
| <b>Lazio</b>          | 1.395                 | 252.090               |
| <b>Toscana</b>        | 927                   | 126.258               |
| <b>Abruzzo</b>        | 439                   | 40.763                |
| <b>Marche</b>         | 409                   | 27.776                |
| <b>Calabria</b>       | 210                   | 40.663                |
| <b>Basilicata</b>     | 200                   | 16.170                |
| <b>Emilia Romagna</b> | 159                   | 8.424                 |
| <b>Liguria</b>        | 94                    | 12.705                |
| <b>Umbria</b>         | 36                    | 2.340                 |
| <b>Veneto</b>         | 30                    | 1.550                 |

La Puglia emerge per il costante aumento delle superfici investite (oltre 19.000 ettari soprattutto nel foggiano e nel brindisino, dove esistono condizioni climatiche favorevoli e terreni idonei alla coltivazione) che sono passate da circa il 6% della superficie totale registrata nel 1954 al 34% del 1998. Viceversa, nel Lazio, si è passati nello stesso periodo dal

26% circa al 3% della superficie totale. Il totale della superficie investita in Italia a carciofo è andato tuttavia diminuendo negli anni (*Figura 10*), passando dai 55.000 ettari nel 1965 ai 48.165 nel 1999 (dati ISTAT). Ciò è dovuto principalmente al fatto che al Sud sono utilizzate varietà rifioventi, di più facile propagazione, e con un ciclo vegetativo in grado di coprire un vasto periodo di produzione (novembre-aprile). Nel Centro-Nord, l'uso di varietà primaverili che coprono soltanto brevi periodi produttivi, e la difficoltà d'approvvigionamento di materiale qualificato per la propagazione, hanno portato progressivamente ad un minore interesse verso la coltura.



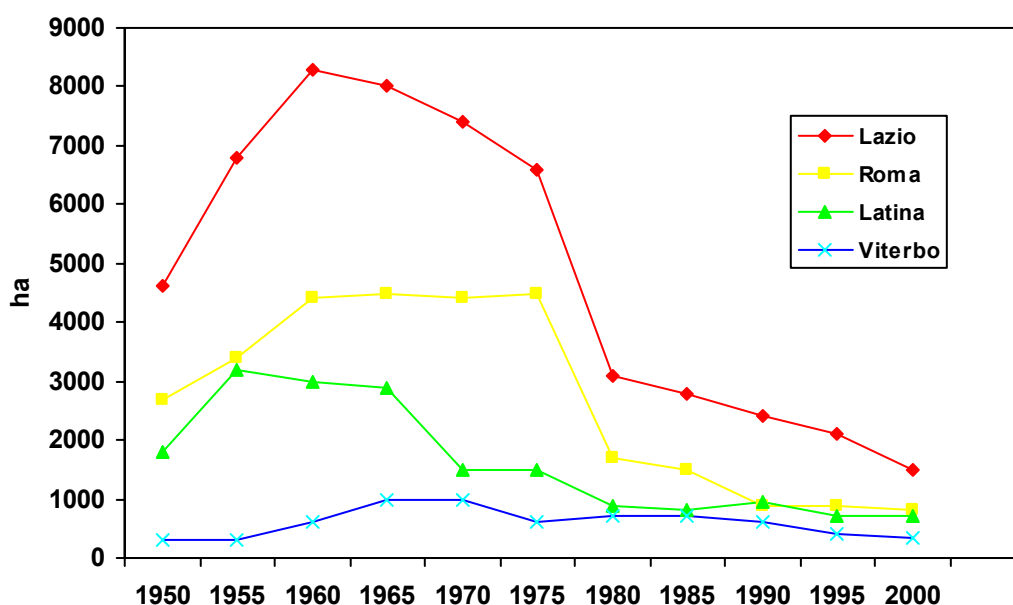
**Figura 10.** Andamento negli anni della superficie investita a carciofo e della relativa produzione in Italia (dati ISTAT).

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 10 t ha<sup>-1</sup> nel 1965 a 11,15 t ha<sup>-1</sup> nel 1998), mantenendo inalterato il livello complessivo dei raccolti a fronte dei minori investimenti complessivi. 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.

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 *procapite* è attualmente di circa 9 Kg anno<sup>-1</sup>. Il 10% della produzione è destinata all'industria di trasformazione, mentre ai carciofini sott'olio sono destinate le code della produzione. L'esportazione del prodotto è diretta soprattutto alla Francia (80%), alla Germania (8%) e ai Paesi Bassi (2%).

### 1.6.2 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 ad esso coltivato si sia notevolmente contratta. Tra le ortive di pieno campo, infatti, si colloca all'ottavo posto (1.115 ha), dopo la patata (4.252 ha), pomodoro (3.485 ha), cocomero (1.947 ha), finocchio (1.923 ha), melone (1.690), lattuga (1.665 ha), zucchina (1.205 ha). Le province interessate da questa coltura (*Figura 8*) sono state nell'anno 2000: Roma (500 ha), Latina (433 ha) e Viterbo (222 ha) (Temperini *et al.*, 2001).



**Figura 11.** Andamento delle superfici investite a carciofo nel Lazio e in particolare nelle province di Roma, Latina e Viterbo dal 1950 al 2000.

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, ma costante diminuzione. Mentre 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. Come si può rilevare, sempre dalla *Figura 11*, le province de 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 nella 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 podologiche diventate meno

favorevoli per la coltura, come la diminuzione dell'acqua, il deteriorarsi del suolo e l'effetto serra, etc. (Temperini *et al.*, 2001).

### 1.7 Panorama varietale italiano

Per molto tempo la costituzione di nuove varietà di carciofo è stata realizzata mediante selezione clonale effettuata nell'ambito delle popolazioni locali propagate per via agamica. Successivamente sono stati intrapresi studi genetici che, forse a causa della difficoltà di propagare rapidamente il materiale genetico selezionato, hanno raramente dato origine a nuove varietà. L'analisi della situazione varietale rileva infatti una situazione stagnante.

Malgrado l'importanza economica della coltura, il carciofo è una specie sostanzialmente trascurata dalla ricerca. L'INRA, in Francia, ha indirizzato alcune ricerche alla creazione di varietà propagate da seme, attraverso la selezione di linee sufficientemente stabili e la costituzione di ibridi F<sub>1</sub>. In Italia sono invece mancati adeguati programmi di ricerca che potessero considerare la necessità e le prospettive di utilizzazione di questo ortaggio, assieme al problema del rinnovamento varietale del carciofo.



**Figura 12.** Capolini di diversi cultivar italiani.

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, 1986). 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 (*Figura 12*) quali la forma, il colore delle brattee, la presenza o assenza di spine (Dellacecca *et al.*, 1974). I criteri d'identificazione varietale possono essere comunque unificati sulla base di cinque parametri principali:

1. Epoca d'inizio di raccolta (autunnali, primaverili);
2. Presenza o assenza di spine:
  - inermi (foglie o capolini inermi);
  - poco spinescenti (foglie inermi e capolini spinescenti);
  - spinescenti (foglie e capolini spinescenti);
3. Precocità rispetto all'epoca di inizio di 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).

**Tabella 6.** Varietà di carciofo più coltivate in Italia, aree prevalenti di coltivazione ed epoca di produzione, (Mauromicale e Ierna, 2000).

| <b>Varietà</b>                                                                                        | <b>Incidenza sulla produzione nazionale(%)</b> | <b>Aree prevalenti di coltivazione</b> | <b>Epoca di produzione</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|
| <b>Violetto di Sicilia (Niscemese, V. di Ramacca, V. di San Ferdinando, Baresano, Locale di Mola)</b> | 56                                             | Sicilia sud-orientale, Puglia          | ottobre-aprile             |
| <b>Romaneschi (Castellamare, Campagnano ed altri cloni di ricente costituzione)</b>                   | 13                                             | Campania, Lazio                        | marzo-giugno               |
| <b>Spinoso sardo</b>                                                                                  | 15                                             | Sardegna                               | novembre-aprile            |
| <b>Violetto di Provenza</b>                                                                           | (*)                                            | Puglia, Sicilia                        | ottobre-aprile             |
| <b>Violetto spinoso di Palermo</b>                                                                    | 5                                              | Sicilia occidentale                    | dicembre-aprile            |
| <b>Violetto di Toscana (incluso Terom)</b>                                                            | 03-apr                                         | Toscana                                | aprile-giugno              |
| <b>Blanc Hyèrois (Macau)</b>                                                                          | (**)                                           | Sardegna, Sicilia                      | aprile-maggio              |

(\*)Produzione non ancora ufficialmente stimata ma in sensibile espansione.

(\*\*) Produzione non ancora ufficialmente stimata ma in lieve contrazione.

Le varietà autunnali, dette anche rifioventi o precoci (es.: Violetto di Sicilia, Spinoso Sardo, Spinoso di Palermo, Violetto di Provenza, Tudela, Catanese, Locale di Mola), coltivate principalmente nelle regioni del Sud e nelle isole, assicurano una produzione pressoché continua tra l'autunno e la primavera e riguardano l'80% del patrimonio varietale nazionale (*Tabella 6*). Le varietà primaverili o tardive (es. tipo Romanesco, e Violetto di Toscana diffuse in Campania, Lazio e Toscana, Camus di Bretagna e Blanca de Spagna, coltivate rispettivamente nel Nord della Francia e in Spagna), presenti nelle regioni del centro Italia, forniscono solo produzioni nel periodo marzo-giugno (*Tabella 6*).

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

Recentemente varietà a propagazione per seme (Talpiot) e ibridi F<sub>1</sub> francesi e israeliane sono state oggetto di accurate sperimentazione agronomiche sia in Sicilia che in Puglia. Tuttavia queste costituzioni, sebbene in qualche caso interessanti per la produzione che si concentra in un breve periodo di tempo rendendo in tal modo possibile una riduzione dei costi di raccolta, hanno tuttavia una produzione tardiva e qualitativamente inferiore a quella delle cultivar tradizionali.

Carciofo "Romanesco".- Nel Lazio sono soprattutto diffuse cultivar primaverili del tipo "Romanesco" quali Campagnano e Castellamare, non sempre peraltro chiaramente definite. La cultivar Campagnano è il discendente diretto delle colture che un tempo si praticavano nei paesi più interni del Lazio (Campagnano, Sezze, Priverno) e che, arrivando nei dintorni di Roma verso la fine dell'800, hanno contribuito a stabilire la fama che attualmente ha il carciofo Romanesco. La cultivar Castellamare, è stata invece introdotta più tardi dal sud, con lo spostarsi e l'affinarsi della coltura verso gli areali litoranei indubbiamente più adatti alla coltivazione della specie, caratteristica di zone a clima temperato-caldo (Jacoboni, 1958). L'unica differenza tra le due cultivar consiste nella maggiore precocità di "Castellamare" (anticipo di venti giorni), ma il carciofo "Campagnano" oggi viene considerato il tipico romanesco (*Figura 13*).

Le piante di romanesco hanno un'altezza di circa 1,20 m, con l'inserzione del capolino principale, chiamato cimarolo, intorno a 1m 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 e si ergono verso l'alto avvicinandosi ai capolini, mentre quelle sottostanti e basali sono tutte bipennatifide. I capolini sono sfericiglobosi, con depressioni in corrispondenza delle due estremità, e grandi (lungi mediamente 10,5 cm e larghi anche 10,5 cm) (Bianco, 1990); le brattee sono di colore verde con sfumature violette, serrate e disposte in modo da lasciare un foro al centro del capolino. Il peso medio del capolino è di 300-450 g.



**Figura 13.** Capolini di cultivar diverse: Catanese, Spinoso Sardo, Violetto di Toscana e Romanesco (Bianco *et al.*, 1990).

Esistono tuttavia recenti costituzioni come ad esempio la cv. “Terom”, una varietà di tipo primaverile più precoce del “Violetto di Toscana” e caratterizzata da un capolino notevolmente più grande (Tesi, 1981) che, ottenuta presso l’Università di Pisa, e tuttora coltivata nelle aree tipiche del “Violetto di Toscana”; la cv. “Tema 2000”, una varietà di tipo autunnale, isolata da una popolazione di semi derivati dalla cv “Terom” (Tesi, 1994); le nuove cultivar “Grato 1” e “Grato 2” (Figura 14), entrambe di tipo “Romanesco” e selezionate da semi derivati da libera impollinazione di piante della cv. “Castellamare e “Campagnano”. “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). Recentemente Papalini *et al.* (1997) hanno realizzato due nuove varietà, “Moro di Corneto” ed “Etrusco”, derivati rispettivamente da incroci tra le cv. Terom e Castellamare tra il clone A4 israeliano e la cv. Castellamare.



**Figura 14.** Cultivar (a) Grato 1 e (b) Grato2.

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.



**Figura 15.** Cultivar C3 del tipo “romanesco”.

Il clone C3 è una varietà precoce di carciofo “Romanesco”, ottenuto mediante selezione clonale e che ultimamente si sta diffondendo notevolmente sia nell’area del romanesco che nel Sud Italia, grazie anche alla metodologia di propagazione *in vitro* utilizzata dalla Invitroplant (ditta distributrice). E’ una pianta di media vigoria con foglie di colore verde cinereo; il capolino è di forma subsferica schiacciata, con brattee molto serrate di colore verde con sfumature violacee, disposte in modo da lasciare un incavo nel centro (*Figura 15*).

Un obiettivo che l’ENEA, ha portato a termine, è stata la valorizzazione e l’acquisizione della tutela comunitaria, tramite la “Denominazione d’Origine Protetta” (DOP) per il Carciofo Violetto di S. Erasmo. Questo carciofo rientra tra i prodotti tipici locali. Sotto il profilo organolettico e biochimico si rileva un elevato contenuto di fruttosio che rende molto dolci i capolini, nella minore quantità di inulina e acido clorogenico (*Tabella 7*). La sua resa di lavorazione come produzione di “cuori”, è apprezzabile.

Si sta acquisendo invece l’IGP (Indicazione Geografica Tipica) per il carciofo di tipo “Romanesco”.

**Tabella 7.** Caratteristiche qualitative del Carciofo Violetto di S. Erasmo in confronto con le cultivar più importanti per il mercato italiano (Enea, 2000).

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

## 1.8 Cenni agronomici

Il carciofo è una pianta d'origine Mediterranea per cui predilige un clima mite. In condizioni naturali, la pianta va in riposo vegetativo nel periodo estivo, in concomitanza delle alte temperature e della scarsa disponibilità idrica (*Tabella 8*). Le migliori condizioni per lo sviluppo si hanno in autunno e in primavera; in autunno con il sopraggiungere delle prime piogge la pianta riprende la sua attività vegetativa (Bianco, 1990). (Fig 16, 17).

Il carciofo si adatta bene a diversi tipi di terreno, ma preferisce quelli di medio impasto e ben drenati, con un pH compreso tra 6,4 e 7,0 e con esposizione a sud e sud est. Se coltivato in terreni calcarei e in quelli sabbiosi molto sciolti, produce dei capolini che risultano più piccoli e con brattee poco carnose. Nei terreni molto argillosi, invece, si ha un ritardo della produzione di circa 10-15 giorni. E' una pianta che tollera moderata salinità; per la coltura del carciofo è molto importante assicurare un buon drenaggio del terreno, poiché l'eccesso idrico porta a danni molto gravi come l'ingiallimento della parte aerea, l'asfissia radicale e la marcescenza degli organi di moltiplicazione. Per la notevole massa vegetativa, il carciofo necessita di grandi apporti idrici, i quali per la maggior parte vengono soddisfatti dagli apporti naturali che si verificano nel periodo di coltivazione. L'irrigazione si effettua nel periodo estivo per la forzatura della coltura e in autunno come intervento di soccorso (Bianco, 1990). L'irrigazione viene utilizzata nelle carciofaie del Centro Nord, per favorire l'attecchimento dei carducci e degli ovoli al fine di anticipare l'entrata in produzione. Al contrario, al Sud e nelle isole, viene utilizzata per avere un risveglio anticipato delle carciofaie nelle cultivar precoci.

I metodi d'irrigazioni più utilizzati sono quelli per aspersione e a goccia, con dei volumi d'adacquamento stagionale di circa 4.000-5.000 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> 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 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.

La raccolta dell'ortaggio si fa generalmente da gennaio ad aprile cogliendo i capolini molto prima della fioritura e in tempi diversi: dapprima quelli apicali, che si sviluppano per primi

(mamme), quindi quelli laterali (figli), e infine quelli basali (nipoti), ricavando complessivamente ca. 10 carciofi da ciascuna pianta.

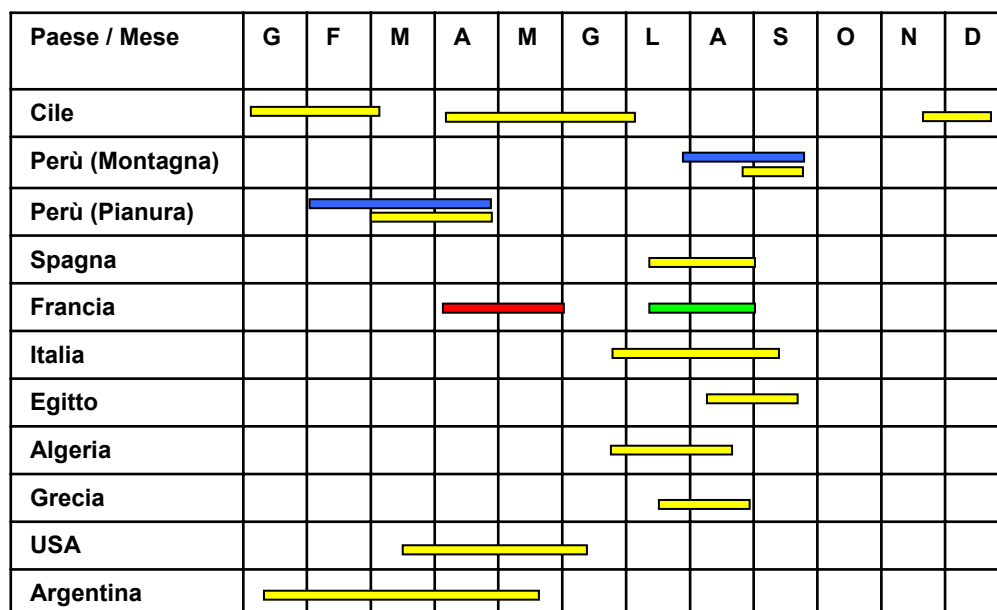
**Tabella 8** Il calendario del carciofo in Italia.

|                             | GEN. | FEB. | MAR. | APR. | MAG. | GIU. | LUG. | AGO. | SET. | OTT. | NOV. | DIC. |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Epoca di raccolta</b>    | √.   | √.   | √.   | √.   | √.   | √.   |      |      |      | √.   | √.   | √.   |
| <b>Presenza sul mercato</b> | √.   | √.   | √.   | √.   | √.   | √.   |      |      |      |      | √.   | √.   |

In termini nutrizionali il carciofo necessita di elevate quantità di elementi nutritivi, sia perché deve far fronte alla considerevole produzione di capolini che si verifica nel corso del protratto periodo del raccolto, sia perché deve fronteggiare il notevole sviluppo che interessa la parte aerea della pianta. Per questo motivo la coltivazione del carciofo richiede frequenti concimazioni che apportino costanti quantità di elementi nutritivi alla pianta. In particolare l'azoto ed il fosforo sono indispensabili per favorire lo sviluppo vegetativo della pianta, mentre, il potassio è necessario sia per migliorare la resistenza della pianta alle avversità climatiche, sia per favorire una produzione qualitativamente più buona di prodotto. Durante la coltivazione del carciofo la concimazione azotata viene ripetuta in copertura (2-3 interventi) durante il periodo di maggior sviluppo della pianta.

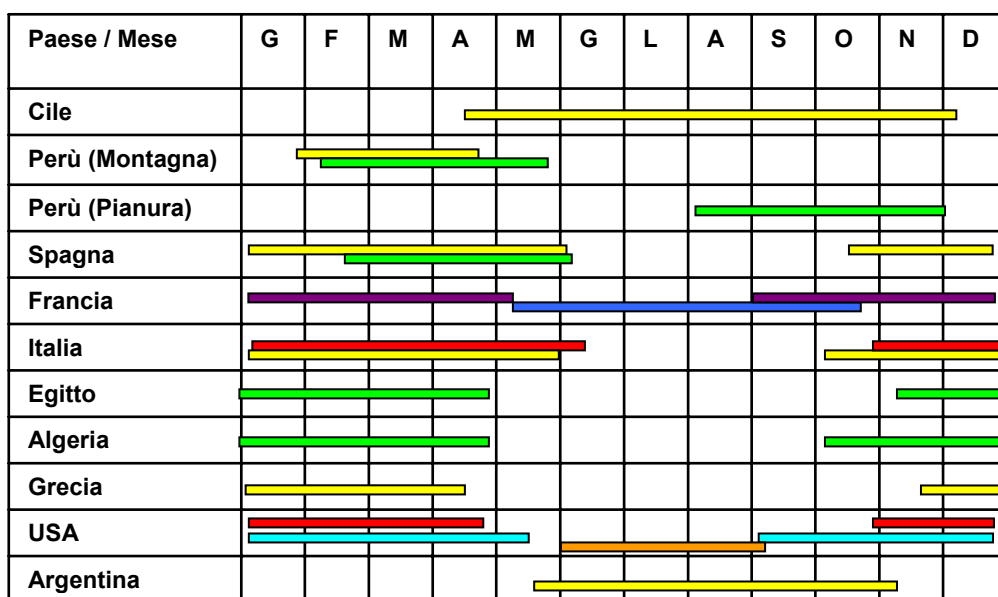
Il carciofo gradisce particolarmente le concimazioni a base di letame maturo o altri concimi organici naturali le cui somministrazioni migliorano sia la qualità del prodotto, sia la qualità del materiale di propagazione che la pianta genera. Le esigenze in termini d'elementi nutritivi, sempre in relazione alla quantità di biogas prodotta, sono elevate; infatti per produrre un quintale di capolini, il carciofo asporta dal terreno 1,9 Kg di N, 0,3 Kg di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 2,4 Kg di K<sub>2</sub>O (Magnifico e Lattanzio, 1981). I valori d'asportazione del carciofo in Kg/ha, sono, Azoto: 170-220 Kg/ha; Fosforo: 100-150 Kg/ha; Potassio: 20-170 Kg/ha.

Per aiutare la pianta a fronteggiare l'elevato sviluppo della parte fogliare, si suggerisce, in occasione dei trattamenti antiparassitari, di miscelare a questi ultimi anche concimi fogliari. E' importante precisare che, prima dell'impianto della carciofaia è opportuno effettuare l'analisi chimica del terreno interessato, onde conoscere l'esatta dotazione naturale di fertilità del terreno nonché il pH. Le quantità dei concimi da somministrare, infatti, dipendono dall'effettiva fertilità naturale del suolo.



Propagazione vegetativa  Camus Bretaña   
 Propagazione via seme  Violetto di Provenza 

**Figura 16.** Periodo di coltivazione di carciofo nel mondo.



Coltivazione annuale  Camus Bretaña   
 Coltivazione pluriennale  Violetto di Provenza   
 Primo anno delle Colt. pluriennale  Raccolta Agos-Sett (USA)   
 Raccolta Maggio (USA) 

**Figura 17.** Periodo di raccolta di carciofo nel mondo.

## 1.9 Tecnica culturale

Il carciofo è una pianta da rinnovo per le sue esigenze culturali, quali lavorazioni profonde all'impianto, ricche concimazioni organico-minerali, ripetuti interventi culturali. Il posto che occupa nelle rotazioni aziendali può variare da 1-2 anni fino a 8-10 anni o più, in funzione dell'ordinamento produttivo aziendale e della durata del ciclo della carciofaie. In Sicilia, Puglia e Sardegna, la carciofaie viene spiantata ogni 1-2 anni, mentre nel Lazio ed in Toscana, la sua durata può variare dai 3-4 anni agli 8-10 anni. In genere il carciofo precede una coltura come il frumento, ma non mancano casi in cui viene seguito da colture quali la barbietola da zucchero, il mais, il pomodoro. La consociazione è quasi del tutto sparita in favore di una sempre maggior diffusione della specializzazione della coltura (Bianco, 1990).

La fase di impianto della carciofaie prevede l'esecuzione di tutti quei lavori preparatori del terreno come l'aratura, la cui profondità dipende dalla durata prevista della carciofaie; nel caso di carciofaie di breve durata (1-2 anni) generalmente si effettua un'aratura di 35-45 cm di profondità, con la quale vengono interrati i concimi fosfo-potassici. Se la carciofaie è poliennale, l'aratura è profonda e si può arrivare a 50-60 cm. Pochi giorni prima dell'impianto, si effettuano le lavorazioni superficiali, allo scopo di sminuzzare il terreno e renderlo idoneo ad ospitare la coltura, attraverso attrezzi come frangizolle ed erpici. I concimi azotati vengono distribuiti in parte all'impianto, in parte all'atto dell'ultima erpicatura ed il resto frazionato in tre successivi interventi: 1) alla fase di differenziazione dell'apice florale (da vegetativo a riproduttivo); circa sessanta giorni dopo l'impianto o il risveglio; 2) in concomitanza con la ricalcatura dopo la scarducciatura e 3) subito dopo il taglio del capolino principale.

L'impianto della carciofaie può essere attuato con ovoli, carducci, parti di ceppo, piantine ottenute da colture 'in vitro' e seme (achenio), in relazione alle varietà ed alle condizioni climatiche (Bianco, 1990).

**La propagazione tramite ovoli** è largamente utilizzata nelle regioni dove si pratica la forzatura (es. Sardegna). Gli ovoli sono porzioni legnose inserite sul rizoma, muniti sia da gemma apicale che di gemme laterali; presentano forma cilindrica, con altezza che può variare da 1-2 cm fino a 13-14 cm e diametro compreso fra 1,0 e 3,5 cm. Alla ripresa vegetativa danno origine a carducci.

Ogni pianta può portare sino a 20 ovoli, ma non tutti raggiungono le dimensioni ottimali per l'impiego. Gli ovoli vengono prelevati dal rizoma in estate da piante che sono entrate in riposo vegetativo nella tarda primavera. Se nel mese di maggio, a causa di particolari

condizioni climatiche le piante non sono ancora entrate in riposo vegetativo si può prevedere l'utilizzo di dissecanti (e.g. Diquat). La scelta degli ovoli deve necessariamente ricadere su quelli posti più in profondità in posizione distale rispetto al colletto della pianta, essendo questi di dimensioni maggiori, più ricchi di sostanze di riserva ed in grado di dare origine a piante più precoci e più produttive. Prima di essere messi a dimora in campo, gli ovoli subiscono un trattamento di pregermogliamento: vengono posti in starti di paglia o sabbia e fatti pregermogliare in ambiente caldo-umido quindi vengono bagnati per 1-2 volte al giorno per 2-3 giorni e dopo una settimana sono pronti per l'impianto (Bianco, 1990).

**La propagazione per carducci** è tipica delle regioni centro-settentrionali, dove in estate per effetto del clima più fresco, non si ha un vero e proprio arresto vegetativo e la maggior parte delle varietà coltivate differenziano pochi ovoli.

I carducci sono germogli o polloni in grado di radicare, che si sviluppano dalle gemme presenti sul rizoma, sia alla ripresa vegetativa che durante tutto il ciclo colturale, e dal cui disseccamento derivano gli ovoli. Per ottenere un buon attecchimento dei carducci, questi devono essere ben sviluppati, lunghi circa 20-40 cm, a base larga, presentare un certo numero di radici ed essere provvisti di almeno 4-5 foglie visibili. Per il trapianto dei carducci è consigliabile scegliere quelli emersi più tardivamente, in quanto derivano da gemme situate sulla parte mediana o basale del rizoma e risultano fisiologicamente più maturi e in grado di dare piante più precoci e più produttive. Carducci si possono prelevare dalla pianta madre poco prima dell'impianto della carciofaie, oppure possono essere messi precedentemente a radicare in vivaio. Questo metodo di propagazione può applicarsi a partire dall'autunno fino alla primavera. Il carduccio vegeta fino a maggio e successivamente si disseca con la carenza idrica, lasciando sul terreno soltanto un piccolo rizoma quiescente; in autunno con la ripresa delle piogge si sviluppa un germoglio dalla gemma del rizoma, che da origine alla pianta che produrrà nell'inverno seguente (Bianco, 1990).

In conclusione mentre la carciofaie impiantata con gli ovoli è risvegliata in estate si comporta come una coltura annuale, quella impiantata in autunno e fino alla primavera, si comporta come una coltura biennale.

**La propagazione per parti di ceppo** è utilizzata per impianti estivi precoci, in varietà dotate di rizoma molto sviluppato che differenziano pochi ovoli, o quando, in annate particolari a causa di squilibri, le piante che normalmente producono ovoli non riescono a differenziarli. All'atto dell'espanto della carciofaie, le ceppaie vengono divise in frazioni chiamate zampe, in modo che ciascuna di esse contenga un certo numero di gemme (almeno 2-3 gemme). I

problemi legati a questa tecnica consistono in un più difficile attecchimento e in una minor uniformità della coltivazione (Bianco, 1990).

Le condizioni pedoclimatiche, l'indirizzo produttivo aziendale, la varietà e gli organi di propagazione utilizzati sono i fattori primari che influiscono sul metodo e sull'epoca d'impianto e sulla durata economica della carciofaie.

Le epoche d'impianto di una carciofaie in genere sono tre:

- L'impianto autunnale, diffuso nelle regioni ad inverno mite, viene realizzato utilizzando carducci appena prelevati dalle piante madri, i quali vengono successivamente posti nel terreno precedentemente preparato e sistemato. Il trapianto è generalmente seguito a mano, in buchette o solchetti distanti fra loro 0,90 -1,20 m sulla fila e 1,00-1,40 tra le file. Grazie alle favorevoli condizioni climatiche dell'autunno, la percentuale di attecchimento è in genere buona (circa il 90%), e la produzione utile dal punto di vista commerciale si avrà a partire dal secondo anno.
- L'impianto primaverile, diffuso nelle zone della Toscana con inverni rigidi, effettuato per mezzo di carducci prelevati dalla pianta madre in piena vegetazione. In seguito al trapianto, effettuato con le stesse modalità viste precedentemente, la percentuale di attecchimento risulta più bassa (60-65%).
- L'impianto estivo tipico delle zone irrigue delle regioni meridionali, si basa sull'utilizzo degli ovoli quali materiale di propagazione; vengono impiantati su terreno previamente preparato e sistemato, disponendoli buchette o solchetti distanti fra loro 0,80-1,00 m sulla fila e 0,90-1,20 m tra le file. L'impianto può essere eseguito anche mediante l'ausilio di macchine, come le normali trapiantatrici, opportunamente modificate. I sesti d'impianto più idonei per il trapianto meccanico di ovoli e carducci variano tra 1,80-2,00 m tra le file e 0,60-0,70 m sulla fila. La trapiantatrice predisposta per ovoli ha una capacità operativa di almeno quattro ettari al giorno (Bianco, 1990).

Una volta eseguito l'impianto e fino la raccolta, vengono fatti una serie di operazioni come scarducciatura, sarchiatura, controllo delle infestanti, concimazione di copertura, irrigazioni, eventuali trattamenti ormonali, difesa sanitaria. In tutti i casi, la prima operazione che segue l'impianto, è la sostituzione degli organi di propagazione che non hanno attecchito.

**La scarducciatura** consiste nell'eliminazione dei carducci superflui, che altrimenti porterebbero ad una riduzione delle dimensioni dei capolini. L'intensità di questa operazione è diversa in relazione alla varietà, alla fertilità del suolo e alla densità delle piante; le varietà precoci sono quelle più soggette all'emissione di polloni. Con la scarducciatura si ha una

riduzione del numero di capolini per pianta ma una maggior precocità di raccolta e un maggior peso dei capolini. E' un'operazione che incide fortemente sui costi di produzione, ecco perché si cerca di limitarla al massimo, con 2-3 interventi (Bianco, 1990).

**La scarducciatura** ha lo scopo di eliminare le infestanti, di rompere la crosta superficiale per facilitare l'arieggiamento del terreno e limitarne la perdita di umidità per risalita capillare. Queste operazioni, seguono solitamente la distribuzione dei concimi azotati in copertura, per facilitarne l'interramento (Bianco, 1990).

**La lotta alle erbe infestanti** è di primaria importanza nella carciofaia per poter ottenere un prodotto qualitativamente e quantitativamente valido; è stato infatti accertato che la presenza di malerbe in una carciofaia di nuovo impianto può ritardare l'emissione del primo capolino, ridurre le rese a dare un prodotto con peso unitario minore. E' sempre più diffuso l'utilizzo degli erbicidi chimici come mezzo valido nel contrastare le erbe infestanti (D'Alessandro e Agosta, 1984).

**La pratica dell'irrigazione** è il più importante mezzo agronomico con il quale si ottiene un anticipo delle produzioni nelle carciofaie ad impianto estivo. La tecnica consiste in somministrare un volume di adacquamento sufficiente a portare lo strato di terreno interessato dalle radici alla capacità idrica di campo. Per terreni profondi e tendenzialmente argillosi il quantitativo di acqua da apportare è di circa  $800-1000 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , mentre in terreni superficiali questi volumi possono oscillare tra  $500$  e  $600 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . La frequenza e il volume delle irrigazioni devono essere tali da garantire alla coltura un accrescimento continuo. In particolare, durante l'intero ciclo della carciofaia, i consumi idrici sono influenzati dalla richiesta evapotraspirativa che dipende dallo stadio di sviluppo della coltura. La richiesta evapotraspirativa, durante il passaggio dal periodo estivo (risveglio con l'irrigazione), a quello autunnale-invernale ed al periodo primaverile, tende prima ad aumentare e successivamente a decrescere. Questo andamento è dovuto all'aumento della superficie fogliare dal periodo autunnale fino al periodo tardo primaverile quando, in relazione ai fenomeni di senescenza e progressivo disseccamento della pianta, si osserva una graduale riduzione della superficie traspirante (Bianco, 1990).

Il fabbisogno idrico totale della coltura si aggira intorno ai  $5000-5500 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Nelle zone dell'Italia meridionale ed insulare il fabbisogno, in termini di intervento irriguo dal risveglio alle prime piogge autunnali, si stima intorno ai  $3000-4000 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Questi quantitativi possono variare in funzione delle piogge utili nel periodo invernale-primaverile, dell'efficienza del sistema d'irrigazione. Il sistema d'irrigazione maggiormente diffuso è quello per aspersione

(con impianti fissi o mobili), ma si stanno espandendo anche i sistemi localizzati a goccia a bassa pressione (Tarantino, 1984).

**L'utilizzo di fitoregolatori**, come acido gibberellico, nel periodo di transizione dell'apice da vegetativo a riproduttivo, stimola la fioritura con conseguente anticipo della produzione (Bianco, 1990).

**La raccolta dei capolini** ha inizio ai primi dell'autunno, per le carciofaie risvegliate precocemente in estate, e si conclude verso fine maggio; in genere la carciofaia può produrre dai 50.000 ai 100.000 capolini per ettaro, ed una singola pianta può produrre da 4-5 capolini fino a 16-18. La raccolta viene effettuata a mano.

L'ultima operazione è la diciocatura, effettuata in estate su piante ormai essiccate, con la quale si elimina la parte aerea. Lo scopo è quello di predisporre la carciofaia al successivo risveglio con le irrigazioni. La diciocatura va effettuata con estrema cautela, ad una profondità di 3-5 cm sotto la superficie del terreno; a profondità maggiori infatti potrebbero essere danneggiate diverse gemme, mentre se fatta troppo superficiale comporterebbe lo sviluppo di un elevato numero di carducci determinando un incremento dei costi di produzione legati alla costosa operazione della scarducciatura. Tale operazione viene effettuata manualmente mediante zappe, oppure con l'ausilio di una speciale macchina operatrice collegata alla trattrice, la cui capacità operativa è di oltre 3 ha al giorno (Bianco, 1990).

## 1.10 Avversità

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 "nebbia" (*Leveillula taurica*), l'antracnosi (*Ascochyta cinarae*), le macchie fogliari (*Ramularia cynarae*), la peronospora (*Bremia lactucae*) e la muffa grigia (*Botrytis cinerea*). L'apparato radicale ed il colletto, sono soggetti agli attacchi di *Verticillium albo-atrum*, di *Sclerotinia sp.*, *Sclerotium sp.* e *Rhizoctonia solani* in condizioni di elevata temperatura ed umidità (Tesi, 1994).

Particolare importanza riveste la lotta contro l'avvizzimento del carciofo 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). In Puglia, soprattutto lungo il litorale adriatico, che si estende da Bari a Brindisi, sono stati osservati numerosissime carciofaie

affette da avvizzimento (Cirulli *et al.*, 1984; Ciccicarese e Cirulli, 1985). Generalmente le piante colpite da questo patogeno presentano uno sviluppo stentato, una taglia ridotta e una perdita generalizzata di turgore (Ciccicarese *et al.*, 1985). Attualmente la lotta si basa sull'accertamento della sanità del terreno, sull'impiego di carducci derivati da piante madre certificate sane e sull'adozione di lunghe rotazioni con specie non suscettibili (Ciccicarese *et al.*, 1985). La strategia per il controllo del patogeno è soprattutto basata sul trapianto in terreno non infetto, nell'impiego di piante sane e di rotazione con specie non ospiti; l'uso di resistenze genetiche al fungo consentirebbe un controllo economico ed ecologicamente sostenibile (Cirulli *et al.*, 1984). Numerosi sono i virus isolati nel carciofo (circa 16), trasmessi soprattutto attraverso afidi, nematodi ed il materiale di propagazione infetto (Martelli *et al.*, 1979). 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. I danni non sono stati mai effettivamente quantificati, ma è richiesto un efficiente metodo di controllo a livello del materiale di propagazione.

Per quanto riguarda i parassiti animali, si devono ricordare i notevoli danni provocati dai topi campagnoli e le lumache .

Fra gli insetti ricordiamo gli afidi e soprattutto le larve del 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 .

Altri parassiti animali risultano le altiche, le casside, il punteruolo (*Larynus scolyni*), la mosca (*Agromyza andalusiaca*) (Tesi, 1994).

Fra le fisiopatie ricordiamo 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).

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 adacquata), 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.

### **1.11 Propagazione della specie**

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 obiettivo ancora da realizzare, 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.

#### **1.11.1 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. L'uso di un metodo invece dell'altro dipende dalla tradizione che si è venuta creando nelle regioni di coltivazione.

Per la produzione di ovoli e carducci non si fa generalmente ricorso a tecniche particolari. Questi infatti vengono di norma prelevati da piante destinate alla 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).

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 disetaneità 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 (Pecaut *et al.*, 1979). Alcuni aspetti della biologia florale (Foury, 1967), tra cui la proterandria, rappresentano degli ostacoli all'uso del seme, comportando elevata eterogeneità nella discendenza di una pianta.

Si stima che il fabbisogno di piantine da parte del mercato in Italia è di 10 milioni annui.

#### **1.11.1.1 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 perché 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. E' opportuno scegliere carducci emersi più tardivamente in quanto derivano da gemme situate sulla parte basale o mediana del rizoma e quindi soggetti ad un più lungo periodo di dormienza e in grado di originare piante più precoci e produttive.

Questo metodo di propagazione è largamente utilizzato dall'autunno alla primavera e la percentuale di attecchimento varia a seconda del materiale di partenza. Con il trapianto autunnale, la produzione inizia generalmente ad aprile ed il primo anno è molto scarsa (Bianco *et al.*, 1990). Le piante entrano in produzione soltanto al secondo anno della coltura.

#### **1.11.1.2 Ovoli**

Gli ovoli sono rami quiescenti inseriti sul rizoma che non hanno completato lo sviluppo a causa delle temperature elevate e del 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 venti unità, anche se le diverse dimensioni non li rendono tutti prontamente utilizzabili. E' stato osservato inoltre, che con la ricalcatura e l'eliminazione dell'apice vegetativo aumenta sia il numero di ovoli differenziati per pianta che la loro dimensione.

L'ovolo viene prelevato dalla pianta madre in riposo tra la fine di luglio e meta agosto (Miccolis, 1996), dopo aver trascorso un periodo di quiescenza abbastanza lungo (circa due mesi). 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.

Gli ovoli prelevati dalla metà di luglio fino alla metà di agosto, vengono messi in strati di paglia e fatti pregermogliare in ambiente caldo-umido dove si svilupperà anche l'apparato radicale. Nel giro di una settimana sono pronti per il trapianto, che deve avvenire su terreno umido (Bianco *et al.*, 1990).

Lo sviluppo delle piante provenienti da ovolo, oltre ad essere condizionato dall'ambiente di coltivazione, dipende anche dal grado di evoluzione raggiunto dall'ovolo sulla pianta madre. A questo riguardo, ricerche effettuate in Sicilia (Iannaccone, 1967) hanno dimostrato che gli ovoli inseriti più profondamente germogliano per primi con conseguente anticipo di entrata in produzione. Pregio di questo metodo è quello di ottenere una buona produzione a partire dal primo anno di impianto, dovuto alla precocità di produzione. Va ricordato, infine, che gli ovoli vanno prelevati da carciofaie di un anno di età scegliendo piante sane, precoci, produttive e quanto più possibili uniformi per caratteri morfo-biologici.

#### **1.11.1.3 Zampe**

Le ceppaie, in corrispondenza all'estirpamento della carciofaie, vengono divise in frazioni (dette "zampe"), tali che in ciascuna 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 difformità di produzione, ad una maturazione più tardiva, ad un elevato polimorfismo fogliare e a problemi fitosanitari. Tale metodo di impianto viene tuttavia

utilizzato nei piccoli appezzamenti, soprattutto nelle zone più fredde, dove i pezzi di ceppo vengono fatti svernare interrati al coperto e trapiantati in aprile (Tesi, 1994).

### 1.11.2 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 (Fig 18). Tale metodo avrebbe potuto favorire il miglioramento genetico, la rapida moltiplicazione e il facile mantenimento del germoplasma, la disponibilità di carciofaie uniformi ed il risanamento da virus (Saccardo *et al.*, 1985). L'applicazione della coltura *in vitro* a scopo propagativi, diffusasi enormemente negli ultimi dieci anni, ha riscosso molto interesse.



**Figura 18.** Propagazione *in vitro*.

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. Già nel 1973 si è cominciato a studiare la tecnica della coltura *in vitro* a scopo propagativo, Devos *et al.* (1975), hanno studiato la possibilità di propagare il carciofo mediante colture continue di callo, ottenendo solo occasionalmente differenziazione di gemme e di radici, mentre invece, Scaramella *et al.* (1979), partendo da porzioni di rizoma, hanno ottenuto un tasso di moltiplicazione di 4-5 germogli accompagnanti anche da radici. Ulteriori lavori partendo da capolini o apici vegetativi sono stati realizzati da

Ancora *et al.* (1979), che hanno ottenuto nel primo caso solo callo e, nel secondo caso, un tasso di proliferazione da 3,25 a 4,50 (riducendo la concentrazione di chinetina) in 20 giorni.

Morone Fortunato *et al.* (1981), partendo da espianti di ricettacolo e da apici vegetativi di carducci primaverili, hanno ottenuto, dopo 4-5 trasferimenti, callo esente da virus ed una percentuale del 10% di gemme rigenerate (*Tabella 8*).

Per le cultivar primaverili “Romanesco”, Saccardo ed Ancora (1984) hanno evidenziato che le carciofaie costituite con piante micropropagate si caratterizzano per la loro uniformità, vegeto-produttiva, la loro maggiore produttività e l’entrata in produzione già al primo anno di impianto. La micropropagazione viene effettuata utilizzando apici vegetativi prelevati da carducci nel periodo febbraio- marzo.

Rossi e De Paoli (1986), hanno lavorato su cultivar precoci, che presentavano un tasso di moltiplicazione basso e una radicazione non del tutto soddisfacente. L’applicazione della tecnica di micropropagazione alle cultivar precoci appare limitata dalla bassa percentuale di radicazione *in vitro*, che determina bassi indici di attecchimento al trapianto, Pecaut e Martin, (1993), tale tecnica risulta, tuttavia, piuttosto costosa, inoltre a seguito di micropropagazione *in vitro* dei tipi rifioranti viene persa la capacità di reagire alla forzatura e quindi la possibilità di anticipare la produzione dei capolini in autunno-inverno. Nella *Tabella 9* sono sintetizzati i risultati sinora ottenuti in letteratura.

**Tabella 9.** Risposta dei diversi espianti di carciofo alla coltura *in vitro* (Ancora, 1986).

| Tipo di espianto                 | Risposta in vitro                               | Referenze                                              |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Brattee</b>                   | Callo                                           | Toponi (1960)                                          |
| <b>Segmenti fogliari, radici</b> | Callo                                           | Harbaoui (1982)                                        |
| <b>Ricettacolo</b>               | Callo, sviluppo dei fiori                       | Ancora <i>et al</i> (1979), Moncousin (1979),          |
| <b>Ricettacolo</b>               | Callo, radici avventizie                        | Morone Fortunato <i>et al</i> (1979), Harbaoui (1982). |
| <b>Scapo fogliare</b>            | Callo, embrioidi                                | Scaramella e Ricci (1979)                              |
| <b>Tessuti del rizoma</b>        | Germogli e radici                               | Scaramella e Ricci (1979)                              |
| <b>Cotiledoni</b>                | Callo, radici, strutture verdi globulari        | De Leo e Greco (1973)                                  |
| <b>Semi</b>                      | Crescita e proliferazione di germogli           | (Benoit e Ducreux (1981)                               |
| <b>Meristemi apicali</b>         | Crescita e proliferazione di germogli, piantine | Harbaoui (1982), Morone Fortunato <i>et al</i> (1979). |

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 che è decisamente migliorata, anche se non del tutto risolta. Dei laboratori privati sono in grado di immettere oggi sul mercato decine di migliaia di piantine 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 presso i laboratori dell'ENEA, almeno nel caso delle varietà primaverili (Ancora, 1986), ha reso possibile la propagazione di materiale risanato, moltiplicare cloni selezionati e disporre di carciofaie uniformi. La disponibilità di piantine micropropagate, che 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 carciofaie) (Saccardo e Ancora, 1984). Al contrario, per le cultivar rifioranti, l'impiego delle tecniche di coltura *in vitro* ha determinato la perdita di precocità nei cloni, fenomeno di fatto limitante per la produzione di piantine micropropagate. Questo fenomeno merita 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 che potrebbero derivare dall'identificazione di condizioni per la propagazione *in vitro*, mantenendo le caratteristiche di precocità.

La produzione di cv. tardive *in vitro*, realizzata ormai su scala industriale, ha dimostrato che è possibile produrre rapidamente grandi quantità di piantine ed ha risolto molti dei problemi legati alle tradizionali tecniche di propagazione. Le piantine ottenute sono omogenee, esenti da patogeni, ad eccezione dei virus per i quali sono necessari interventi aggiuntivi specifici (es. termoterapia *in vitro*), ed è possibile rapidamente coltivare genotipi selezionati in un ambiente specifico. E' tuttavia ancora necessario individuare o ottimizzare i substrati per la proliferazione *in vitro* e la radicazione, entrambi specifici per ogni cultivar. Va infine sottolineato che l'elevato costo delle piantine (€ 0,80 – 1,00 cad.) scoraggia gli agricoltori nell'impiego delle stesse per la costituzione di nuove carciofaie.

Concludendo due sono gli aspetti principali della propagazione *in vitro* del materiale: 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, ecc); il secondo consiste nel fatto che le piante micropropagate (soprattutto cultivar di "Romanesco") entrano in produzione già nel 1° anno dal trapianto.

### 1.11.3 Propagazione gamica

Un sostanziale miglioramento in termini sia quantitativo che qualitativo della produzione potrebbe essere ottenuto mediante la propagazione per seme (Fig. 19)(achenio, sotto il profilo botanico). Infatti in questo modo si potrebbero avere i seguenti vantaggi:

- Ridurre i costi di impianto a seguito della possibilità di meccanizzare la semina,
- Migliorare lo stato fito-sanitario delle colture, in particolare ridurre l'incidenza di virosi e di infezioni fungine di norma non trasmesse via seme,
- Ridurre l'uso di fertilizzanti e la necessità di irrigazione, in quanto la pianta propagata per seme sviluppa un apparato radicale più profondo con maggiore rapidità ed in grado di utilizzare più efficacemente le risorse idriche e nutritive del terreno,
- Permette l'espressione della piena capacità produttiva della pianta già durante il primo anno d'età, che consentirebbe la durata annuale della carciofaie, agevolandone l'avvicendamento e limitando quindi l'impatto ambientale,
- Costituire varietà sintetiche,
- Ottenere linee *inbred*, frutto da ripetuti cicli di autofecondazione, per la produzione di ibridi  $F_1$ ,
- Ampliare le informazioni sulla base genetica dei caratteri di importanza agronomica, commerciale e industriale.



**Figura 19.** Propagazione via seme.

La propagazione per seme è basata sulla costituzione di nuovi genotipi (linee *inbred*, ibridi  $F_1$ , 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. 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 circa 15 anni sono state messe in commercio cultivar moltiplicate per seme: la maggior parte di queste è stata prodotta in Israele e una (“Imperia Star”) negli Stati Uniti; altre cultivar hanno un’origine sconosciuta, anche se la ditta che le distribuisce in Italia le definisce molto simili a quelle israeliane.

La prima cultivar da seme, costituita in ordine di tempo, è stata la “Talpiot”, ad impollinazione aperta, dai capolini globosi, di pezzatura medio-grossa, di colore verde, che matura tardivamente 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 ottanta si sono costituiti diversi ibridi di carciofo quali “044”, “1’H137”, “1’H223”, “Orlando”, “Santa Rosa”, con brattee di colore verde, con il capolino allungato e produzioni molto simili alla “Talpiot”. L’ultima ad essere stata registrata è la cultivar “271”. Si tratta di un ibrido F<sub>1</sub> dalle dimensioni medio-piccole, di forma allungata quasi conica e di un bel colore violetto. Questa cultivar è fra le più precoci oggi disponibili.

Il limite sostanziale alla diffusione su larga scala delle varietà da seme, è rappresentato dalla loro scarsa reattività all’azione precoccizzante dell’acido gibberelico (AG<sub>3</sub>), per cui esse non si prestano a sostanziali modifiche del loro calendario di produzione (Mauromicale, 1994). Questo limite era presente anche nei primi ibridi F<sub>1</sub> (H137 e H223) i quali, però, presentavano capolini con caratteristiche più idonee alle esigenze dei mercati italiani.

Negli ultimi anni sono stati realizzati i primi ibridi F<sub>1</sub> molto reattivi all’azione dell’acido gibberelico (AG<sub>3</sub>) tra cui “Orlando” può considerarsi il capofila. Questi ibridi, seminati in epoca precoce ed opportunamente trattati con AG<sub>3</sub>, sono in grado di maturare i capolini fin dal mese di novembre, assicurando un calendario di produzione simile a quello delle varietà autunnali (Mauromicale *et al.*, 2000). La tecnica, che è stata messa a punto su “Orlando”, consiste in una semina diretta effettuata in campo o in contenitori alveolati nelle prime tre settimane di luglio, seguita da due o tre trattamenti alla parte epigea della pianta con AG<sub>3</sub>, alla

concentrazione di 60 ppm, eseguiti il primo alla differenziazione della 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> foglia e gli altri a distanza di due settimane. In tal modo si è ottenuto un anticipo fino a cinque mesi della maturazione e un calendario di produzione simile a quello del violetto di Sicilia, ma con più levati ritmi di emissione di capolini. Attualmente, presso il “Centro di Studio sulle Colture Erbacee Strategiche per l’Ambiente Mediterraneo” del CNR, sono in corso di valutazioni di interessanti ibridi F<sub>1</sub>, costituiti dalla ditta sementiera olandese Nunhems, con colorazione dei capolini viola intenso ed a elevata capacità di risposta all’AG<sub>3</sub>. Su questi ibridi sono in corso ricerche volte a studiare la possibilità di ridurre la concentrazione di AG<sub>3</sub> nella soluzione e il numero dei trattamenti AG<sub>3</sub> attraverso la vernalizzazione del seme e/o delle plantule prima del trapianto con temperature minori uguali a 7°C.

L’assortimento varietale disponibile ha raggiunto, obiettivi ragguardevoli in termini di uniformità (soprattutto nelle cultivar F<sub>1</sub>), qualità del prodotto e differenziazione dei tipi.

Una linea di ricerca portata avanti dal Dipartimento di Biologia delle Piantе Agrarie dell’Università di Pisa, in collaborazione con il Dipartimento di Produzione Vegetale dell’Università della Tuscia di Viterbo, è quella di realizzare cultivar primaverili propagabili per seme, precoci e con caratteristiche analoghe a quelle delle cultivar tradizionali richieste dal consumatore italiano (Graifenberg *et al.*, 1997).

La riproduzione per seme consentirebbe di superare i problemi legati alla propagazione vegetativa. Il passaggio dalle forme tradizionali di produzione a quella via seme, che rendono annuale la coltura, dà 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.

## **1.12 Miglioramento genetico**

### **1.12.1 Risorse genetiche**

Il centro di domesticazione del carciofo è nei paesi che circondano il Bacino del Mar Mediterraneo (Rottenberg e Zohary 1996), in Italia si è sviluppato un ampio germoplasma primario coltivato (GP-1c), che manifesta adattamenti a specifici ambienti locali. Tale GP-1c rappresenta un’ampia fonte di germoplasma anche per altri paesi dove ne è diffusa la coltivazione (Bianco 1990; Mauromicale *et al.*, 2000)

### 1.12.2 Pool genetico coltivato

Non è facile determinare il numero delle cultivar di carciofo propagate vegetativamente nel bacino del Mediterraneo anche perché, a volte a materiale diverso ci si riferisce con la stessa denominazione o materiale uguale viene chiamato con nomi diversi (es.: circa 14 denominazioni per indicare il carciofo “Catanese”; Bianco, 1990) Inoltre vi sono molti ecotipi locali. 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 maggior importanza commerciale. In base alla affinità tra i cloni (Porceddu *et al.*, 1976; Vannella *et al.*, 1981), è stato suddiviso il germoplasma nei seguenti gruppi principali:

- Spinosi: comprendente tipi varietali con spine lunghe ed acuminate presenti sia sulle brattee che sulle foglie;
- Violetti: comprende tipi varietali che producono capolini di medie dimensioni e caratterizzate da pigmentazione più o meno diffusa sui capolini;
- Romaneschi: comprendente tipi varietali con capolini sferici o sub-sferici;
- Catanesi: comprendente tipi varietali con capolini di medie dimensioni e di forma allungata.

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

### 1.12.3 Pool genetico selvatico

Il genere *cynara* è relativamente piccolo e comprende, oltre al carciofo, 6-7 specie selvatiche perenni e tutte originarie del bacino del Mediterraneo (Wiklund, 1992). Quella più vicina al carciofo è il cardo selvatico (*C. cardunculus* L. var. *sylvestris*), distribuito dal Portogallo alla Turchia. Sulla base di studi citogenetici e isoenzimatici è ritenuto il progenitore sia del carciofo che del cardo coltivato, le forme spontanee e coltivate di *Cynara cardunculus* sono infatti interincrociabili e gli ibridi ottenuti sono completamente fertili (Rottenberg e Zohary 1996; Rottenberg *et al.* 1996). Il cardo selvatico è diffuso in terreni aridi incolti sia aridi che profondi e argillosi. Non è in grado di sopravvivere a inverni rigidi. Il cardo è una specie perenne, ad impollinazione entomofila compiuta prevalentemente da api (Quagliotti, 1996). Si

tratta di una pianta robusta e ramificata, con tipica rosetta di foglie grandi e spinose e fiori di colore blu-violetto (*Figura 20*).

Altre 5 specie selvatiche hanno mostrato affinità genetica con il carciofo e 3 specie ( $2n=2x=34$  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 genetica con il carciofo ma i loro ibridi  $F_1$  sono risultati parzialmente fertili (Basnizky e Zohary, 1994).



**Figura 20.** Il cardo selvatico.

#### **1.12.4 Tecniche e obiettivi del miglioramento genetico**

Il miglioramento genetico del carciofo ha una storia piuttosto limitata. Alcuni studi sono stati condotti sulla ereditabilità dei caratteri di maggior interesse agronomico quali il numero di capolini prodotti, il peso dei capolini primari e secondari, il peso del ricettacolo e il periodo di raccolta (Pècaut 1993; Lòpez Anido *et al.*, 1998; Mauromicale *et al.*, 2000). I programmi di breeding, per lo più rivolti all'incremento della precocità e della produttività o alla contemporaneità di emissione dei capolini, sono stati, finora, realizzati attraverso le seguenti vie:

- La selezione clonale è stata applicata con successo in popolazioni locali caratterizzate da discreta eterogeneità biologica e morfologica (Deidda 1967; Abbate e Noto 1981; Trigo Colina 1981; Pècaut 1983; Mauromicale e Copani 1989).
- La selezione clonale in progenie provenienti da autofecondazione, libero incrocio od incrocio intervarietale: sfrutta l'elevato livello di eterozigoti che caratterizza la coltura. Le progenie ottenute mediante il seme hanno, infatti, evidenziato una amplissima segregazione (Miller 1975; Scarascia Mugnozza e Pacucci 1976; Tesi 1976; Mauromicale 1987; Graifenberg e Giustiniani 1997; Papalini *et al.*, 1997). Il limite sostanziale di queste due strategie, basate sulla selezione e la successiva moltiplicazione mediante le tecniche di propagazione vegetativa tradizionale, è stato finora rappresentato dal ridotto tasso di moltiplicazione (da 5 a 10 piante ottenibili per anno da un capostipite) che ha impedito o fortemente limitato la diffusione in coltura dei cloni isolati. La micropropagazione "in vitro" potrebbe aumentare considerevolmente il tasso di moltiplicazione, tuttavia, non è utilizzabile per le varietà precoci a causa della formazione, ad elevata frequenza, di "mutanti" tardivi. Negli ultimi anni sono stati diffusi con successo cloni del tipo varietale primaverile "Romanesco" (come il clone C3) che hanno beneficiato del contributo determinante della micropropagazione "in vitro" in quanto non sono caratterizzati dalla formazione di piante "mutanti" nelle successivi sub-colture.
- La selezione di linee inbred e la costituzione di seme ibrido  $F_1$  direttamente da cultivar: è possibile perché il sistema riproduttivo, prevalentemente allogamo del carciofo, non è conseguenza di autoincompatibilità genetica, ma di proterandria; pertanto non è preclusa la possibilità di ottenere progenie da autofecondazione. Tale metodologia, messa a punto nell'ultimo ventennio, è basata sulla creazione di nuovi genotipi con struttura genetica uniforme e sostanzialmente differenti dai cloni attualmente coltivati. Tale pratica presenta non poche difficoltà oggettive, tra le quali: i) la necessità di effettuare autofecondazione manuali ripetute attraverso l'isolamento dei capolini prima dell'antesi per evitare inquinamenti da polline esterno. A causa della proterandria che caratterizza la specie è necessario prelevare il polline maturo, sino alla completa recettività degli stigmi, e distribuirlo manualmente mediante spennellature; ii) la necessità, per la costituzione degli ibridi  $F_1$ , di effettuare il lavaggio dei capolini della linea *inbred* portaseme allo scopo di evitare autofecondazione (Perrino e Pacucci, 1974). Per la costituzione su scala commerciale di seme delle varietà ibride è stata utilizzata, nell'ultimo decennio la maschosterilità. Tale carattere è stato scoperto da Principe (1984) e sembrava determinato da un singolo gene recessivo chiamato  $ms_1$ ; più

recentemente Basnizky e Zohary (1994), hanno scoperto due geni addizionali non recessivi:  $ms_2$  e  $m_{3s}$ ; iii) la ridotta produzione di seme da parte di alcuni tipi varietali. iv) l'elevata depressione da *inbreeding* che manifesta già nelle prime generazioni ottenute da autofecondazione a che rende difficoltoso il loro mantenimento in coltura. Negli Stati Uniti, intorno agli anni 80, sono state costituite varietà da seme provenienti dalla selezione massale della *cultivar* "Green Globe" (Bagget *et al.*, 1982). Per quanto in numero limitato, varietà ibride sono state successivamente ottenute e commercializzate anche in Israele (Basnizki e Zohary, 1987) ed in Spagna. Un'ulteriore problematica legata alla moltiplicazione via seme è che le piante originate in questo modo producono i capolini in primavera. Il "passaggio attraverso il seme" comporta, infatti, una fase giovanile delle piantule e la conseguente perdita della capacità di produrre capolini in autunno. Inoltre, le piante ottenute da seme manifestano una scarsa reattività all'azione dell'acido gibberellico ( $AG_3$ ), ampiamente utilizzato come precoccizzante nelle coltivazioni di carciofo (Foti e Mauromicale, 1994). Recentemente, tuttavia, sono stati realizzati alcuni ibridi  $F_1$  molto reattivi all'azione dell'acido gibberellico, i quali, quando seminati in epoca precoce ed opportunamente trattati con  $AG_3$ , sono in grado di maturare capolini fin dal mese di novembre, assicurando un calendario di produzione simile a quello delle varietà rifioranti (Basnizky e Goldschmidt, 1994; Mauromicale e Ierna, 1995).

#### **1.12.5 Conseguenze dell'inbreeding**

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

#### **1.12.6 Eterosi**

Le caratteristiche allogame del carciofo fanno sì che gli incroci tra cloni determinano elevata eterosi, espressa chiaramente in biomassa e produzione (Pècaut e Foury, 1992). E' stato notato un impressionante vigore ibrido nelle ibridazioni tra *C. scolymus*, *C. cardunculus* e *C. syriaca*.

### 1.12.7 Controllo genetico di caratteri economicamente importanti

La maggior parte dei caratteri morfologici e legati alla produzione 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 e (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* (Basnizky e Zohary, 1994).

Poco studiato è invece il carattere della maschiosterilità. Inizialmente riportato come sotto il controllo di un gene recessivo, *ms<sub>1</sub>* (Principe, 1984), il determinismo di tale carattere è stato successivamente attribuito all’azione di due geni recessivi, *ms<sub>2</sub> ms<sub>3</sub>* (Basnizky e Zohary, 1994). Recenti ricerche effettuate in Francia su eventuali differenze fenotipiche e funzionali di piante maschiofertili (MF) e maschiosterili (MS) ed estesi successivamente anche ai nettari e al tenore in zuccheri da questi prodotti, non hanno evidenziato alcun chiaro risultato in merito (Lannuzel, 1998;1999).

## 2. MASCHIOSTERILITÀ

### 2.1 Introduzione

L’incapacità di un individuo a produrre gameti o zigoti vitali, è nota come sterilità che, tuttavia, può essere totale, parziale e interessare l’uno o l’altro sesso. La sterilità può essere causata da fattori ambientali, da specifici alleli (sterilità genica), da fattori genetici extra-nucleari (sterilità citoplasmatica), da una 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, pollini o gameti maschili funzionanti, è detta maschiosterilità. Questo tipo d'infertilità si differenzia dall'incompatibilità per la presenza di microspore non funzionali, o per la mancata formazione di quelle funzionali, e si esprime per azione di geni nucleari mutati, di geni plastidiali e mitocondriali mutati (citoplasmatici) e dei loro effetti combinati. L'aspetto comune ai due meccanismi riproduttivi (incompatibilità e maschiosterilità) consiste nella limitazione o nella riduzione delle autofecondazioni, con conseguenze da inbreeding nelle specie allogame (riduzione della depressione).

Dorsey (1914) ha definito la maschiosterilità come la mancata formazione di polline o come il mancato funzionamento di esso. In questi casi, la fertilità femminile è completamente o pressappoco intatta. 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 agli 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, mediante colorazione con carminio acetico, il ritrovamento della maschiosterilità è più facile di quello della sterilità femminile. Quest'ultima richiede, per essere provata, incroci e studi di sviluppo durante l'antesi e la formazione del seme, in modo da selezionare gli eventuali individui apodittici e i tipi che presentano aberrazione nello sviluppo del seme.

## **2.2 Classificazione**

Gli eventi che possono portare alla maschiosterilità sono molteplici e, a riguardo, sono state proposte diverse classificazioni:

- 1) 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);
- 2) Lacadena (1968) si è basato sui risultati di incroci intra e interspecifici, identificando i seguenti tipi di sterilità:
  - autoplasmica, che include piante maschiosterili ottenute da mutazioni in una popolazione geneticamente distinta;
  - omoplasmica, comprende piante maschiosterili originate da incroci intraspecifici;

- alloplastica, dove la maschiosterilità è comparsa a seguito di incroci interspecifici ed intergenerici;

3) 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;

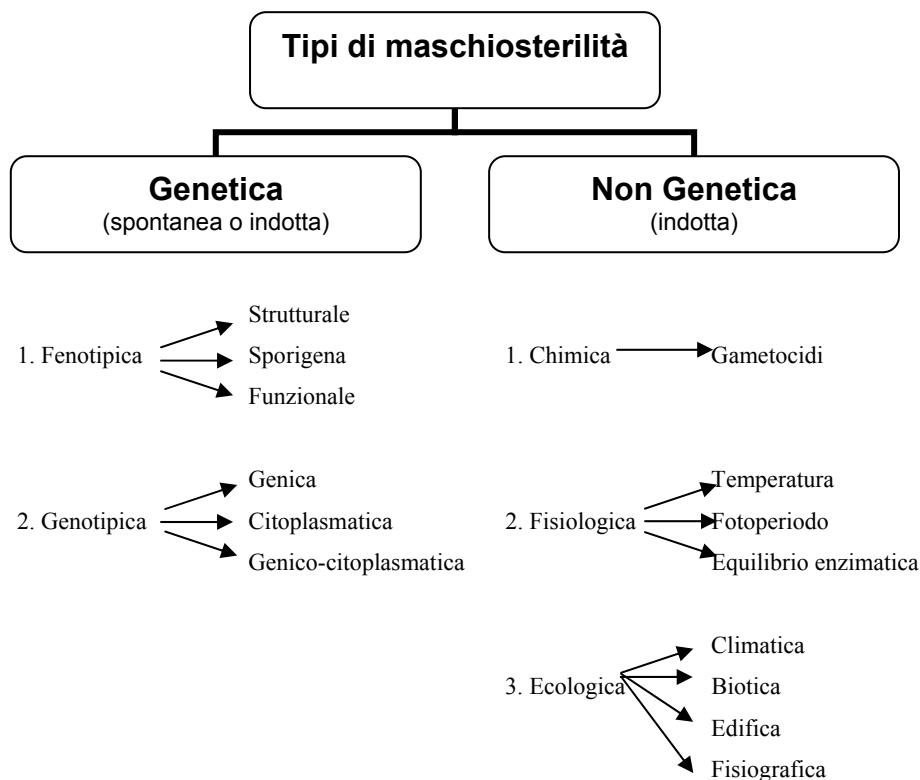
4) Gottshalk (1976) ha incluso nella maschiosterilità funzionale tutti quei mutanti in cui gli stami non sono formati oppure, pur formandosi il polline, la fecondazione è impedita dalla indeiscenza delle antere o da una separazione spaziale tra antere e stigma. Al contrario, non rientrano nella maschiosterilità funzionale quei casi in cui l'azione dei geni della maschiosterilità interessa la microsporogenesi o la microgametogenesi;

5) 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;

6) 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 (*Figura 21*).

Questa classificazione considera oltre alla 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.

**Figura 21.** Classificazione generale della maschiosterilità (Kaul, 1988).



### 2.2.1 Maschiosterilità genetica

**Classi fenotipiche.** – Senza considerare il genotipo, alcune anomalie fenotipiche, soprattutto nello sviluppo delle antere e nella loro funzionalità, portano alla maschiosterilità. Sulla base delle alterazioni fenotipiche predominanti nelle piante maschiosterili, si distinguono tre tipi di maschiosterilità:

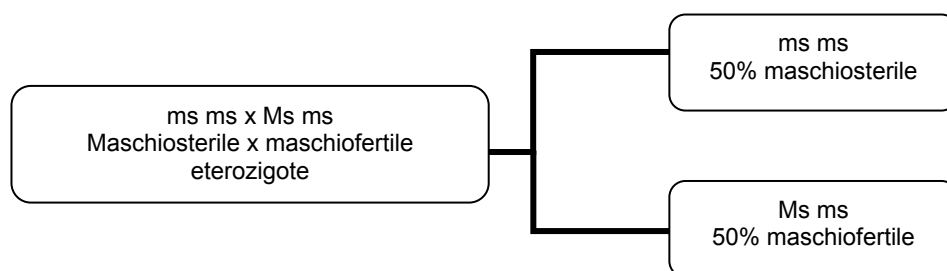
- **Strutturale**, quando il gene della maschiosterilità interessa la differenziazione e lo sviluppo dei primordi staminali; gli stami appaiono poco sviluppati, deformati e privi di tessuto microsporigeno (staminoidi rudimentali) oppure trasformati in organi florali o addirittura completamente assenti;
- **Sporigena**, quando il gene della maschiosterilità agisce bloccando la microsporogenesi o la microgametogenesi; gli stami appaiono ma il loro polline è completamente assente o scarso e non vitale (l'aborto delle cellule microsporigeni 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. In altri casi la fecondazione può essere impedita

dalla non corretta formazione di esina, dalla sua completa assenza sulla parete del granulo pollinico oppure da una separazione spaziale tra antere e stigma.

Classi genotipiche.- La maschiosterilità su base genetica può essere classificata in, genetica, citoplasmatica e genetico-citoplasmatica.

La maschiosterilità genetica è determinata dalla presenza di uno o più geni nucleari, recessivi “*ms*” e/o dominanti “*Ms*”, la cui azione non è influenzata dal citoplasma (*Figura 22*).

**Figura 22.** Maschiosterilità genetica (alleli *Ms* dominante sull’allele *ms*).



In alcuni casi, l’espressione della maschiosterilità è il risultato dell’interazione dei geni sopra indicati con geni nucleari depistatici o inibitori (Lewis *et al.*, 1956). In genere il controllo di questa formula di sterilità è controllata da alleli (*Ms e ms*) ad uno solo *locus* e di conseguenza, l’eredità e l’espressione della maschiosterilità è di tipo mendeliano. I geni *Ms* e *ms* devono essere necessariamente “linked” ad altri nello stesso cromosoma.

La maschiosterilità citoplasmatica, contrariamente a quella genetica, 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. Di conseguenza, in una specie vegetale che presenta la maschiosterilità citoplasmatica vi sono almeno due tipi di citoplasma: fertile “*N*” e sterile “*S*”. Indipendentemente dal genoma nucleare, le piante che hanno il citoplasma “*S*” sono maschiosterili, mentre quelle che hanno il citoplasma “*N*” sono maschiofertili. Come tutti i caratteri ad eredità extracromosomica, questo tipo di maschiosterilità è caratterizzato da una trasmissione di tipo materno.

La maschiosterilità 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*”. Le piante che presentano questo tipo di maschiosterilità sono caratterizzate dall’avere citoplasma di tipo “*S*” e geni nucleari ristoratori. I geni “*fr*”, citoplasma specifici, non determinano la comparsa della maschiosterilità nel citoplasma “*N*” come invece accade nel citoplasma “*S*”

per la combinazione dei geni “*fr*” con plasmogeni di tipo “*c*”. Diversamente, il gene ristoratore nella forma dominante “*Fr*” si comporta come un allele soppressore della maschiosterilità, in quanto ripristina la fertilità del sesso maschile se associato al citoplasma “*S*”. Nei genomi delle piante coltivate sono stati individuati numerosi geni ristoratori in numero comunque inferiore a quello dei geni “*ms*”. Alcune volte questi geni coesistono nello stesso genitore, ma segregano indipendentemente e non interferiscono con le loro individuali espressioni, come è dimostrato in molte specie vegetali di interesse agrario (Evenor *et al.*, 1984). Anche l’interazione fra geni “*ms*” e citoplasma “*S*” non è mai stata provata.

Fondamentalmente la maschiosterilità può essere considerata solo di due tipi: genetica e genetico-citoplasmatica. In una specie vegetale la maschiosterilità diventa citoplasmatica quando, in aggiunta ad un citoplasma “*N*”, esistono uno o più citoplasmi “*S*” e di geni “*Fr*” non si manifestano in essa. In genere i geni “*Fr*” sono già presenti nel “pool-genico” della specie prima ancora che avvengano mutazioni del citoplasma da “*N*” a “*S*”; per questo molti maschiosterili, considerati inizialmente come citoplasmatici, sono stati classificati più tardi come maschiosterili genetico-citoplasmatici.

La maschiosterilità citoplasmatica non può comunque essere considerata come una distinta classe di maschiosterilità, ma una forma transitoria nell’evoluzione di quella genetico-citoplasmatica.

### **2.2.2 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). Inoltre, l’influenza del genotipo utilizzato, della dose, della durata, del trattamento e dello stadio di sviluppo del tessuto sull’efficacia dei gametocidi, non permettono un’estensione generalizzata dei risultati ottenuti.

Anche la scalarità della fioritura in molte specie vegetali, come il finocchio, e quindi la contemporanea presenza sul pianta di fiori in diversi stadi di sviluppo, rende difficile stabilire il momento ottimale in cui eseguire il trattamento chimico. I gametocidi, che attualmente non hanno ancora raggiunto un reale interesse pratico, sono utilizzati pertanto solo per scopi sperimentali.

**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 fisiologico tali da determinare la comparsa di piante maschiosterili.

### **2.3 Origini e reperimento della maschiosterilità**

Nelle specie vegetali, la maschiosterilità compare dopo mutazioni spontanee ed incroci, oppure in seguito a trattamenti mutageni. Il tipo genetico di sterilità varia in funzione dell'incidenza di queste cause. La maschiosterilità genetica appare soprattutto in seguito a mutazioni spontanee e solo in pochi casi è comparsa dopo incrocio o trattamenti mutageni. La maggior parte delle specie in cui la maschiosterilità genetica è stata trovata appartengono alle dicotiledoni. La comparsa ripetuta di questo tipo di maschiosterilità nelle specie vegetali è un fenomeno regolare. Questo è testimoniato dalla presenza di molti geni “*ms*”, individuati e caratterizzati in specie oggetto di intensi studi citogenetici (es.: pomodoro e peperone). Poiché la maschiosterilità genetica è solitamente controllata da alleli recessivi, per questo la maschiosterilità si manifesta in piante autogame o dopo autofecondazione per le piante di specie allogame. Nelle piante di specie 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 e 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 tramite l'analisi citogenetica del germoplasma e/o in seguito a mutazioni spontanee o 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) può essere indotta facendo ricorso alla mutagenesi con agenti chimici e fisici, da soli o in combinazione. Si sono così ottenute nuove fonti di maschiosterilità in diverse specie tra cui il peperone. Nelle specie allogame, il controllo monogenico-recessivo di questi mutanti ne ha limitato fortemente la possibilità di utilizzo. E' stato 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. Nel tabacco e nella rapa da olio, ad esempio, sono stati trasferiti singoli geni dominanti, ricorrendo alla trasformazione genetica con plasmidi ricombinanti e caratterizzati da geni per la ribonucleasi sotto il controllo di un “promoter tappeto specifico” isolato dal tabacco (TA29.Rnase T **1** e TA29-barnase), ottenendo così piante maschiosterili. Tali geni hanno indotto la maschiosterilità alterando lo sviluppo del tappeto che va incontro ad una precoce degenerazione (Mariani *et al.*, 1990). Lo stesso metodo è stato successivamente utilizzato su cavolfiore e cicoria con risultati interessanti (Reynaers *et al.*, 1993).

## **2.4 Utilizzo della maschiosterilità**

Oggi le specie coltivate che vengono studiate con l'intento di ottenere varietà ibride sono moltissime. Grazie al vigore dell'ibrido (eterosi), sono stati ottenuti incrementi produttivi in quasi tutte le specie coltivate, comprese quelle che normalmente si riproducono per autofecondazione.

La tecnica che si cerca di adottare per produrre seme ibrido  $F_1$  differisce da specie a specie. Normalmente si cerca di ridurre gli interventi manuali, che risultano tranne qualche eccezione (es.: il pomodoro, il peperone, la melanzana, il melone, etc.), quasi sempre antieconomici, specialmente se i fiori sono piccoli e fragili e le piantine non dispongono di meccanismi naturali per favorire l'ibridazione. Per la produzione di seme ibrido e per limitare o annullare gli interventi manuali, si può pertanto ricorrere all'utilizzo di linee maschiosterili. Queste linee hanno come vantaggio 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 genetica-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.

La maschiosterilità è stata utilizzata anche per altri scopi, quali: a) per accelerare i programmi di selezione ricorrente in specie allogame; b) permettere di studiare più efficacemente i

meccanismi di riproduzione ed, in particolare, il tasso di allogamia di una specie; c) facilitare lo studio dell'apomissia e partenocarpia in una specie.

### **3. I MARCATORI GENETICI**

Il termine marcatore genetico si riferisce a qualsiasi carattere ereditato in maniera mendeliana semplice che sia in grado di mostrare delle differenze fra individui. I marcatori genetici si possono suddividere in tre tipologie di marcatori.

#### **3.1 Marcatori morfologici**

Un primo livello consiste nell'analisi fenotipica condotta con l'impiego di marcatori morfologici. Fino a trenta anni fa gli unici marcatori genetici disponibili erano quelli che si basano su caratteri morfologici. Benché in passato i marcatori morfologici siano stati sfruttati estesamente nell'analisi genetica e nel miglioramento genetico, essi presentano una serie di inconvenienti che ne limitano l'utilità (Tanksley, 1983), i principali vengono elencati di seguito.

1. Il numero limitato di caratteri facilmente rilevabili e, quindi, utilizzabili come marcatori.
2. L'influenza dell'ambiente sulla diversità fenotipica che, spesso, ne ostacola il rilevamento.
3. Lo scarso polimorfismo genetico, che limita ulteriormente il numero di marcatori utilizzabili nell'analisi genetica di determinati materiali sperimentali.
4. La condizione poliploide di alcune specie coltivate favorisce il mascheramento di eventuali mutazioni da parte di geni codificanti per lo stesso carattere presenti sui cromosomi omologhi.
5. Molti caratteri utilizzabili come marcatori sono rilevabili solo ad un determinato stadio di sviluppo della pianta, allungando i tempi della selezione. Questo aspetto, poco rilevante nelle specie annuali, assume notevole importanza nelle specie arboree con lunga fase giovanile di sviluppo.
6. Numerosi marcatori morfologici sono associati a caratteristiche agronomiche negative, che ne limitano l'uso nel miglioramento genetico.

L'unico vantaggio dei marcatori morfologici consiste nella semplicità e nel basso costo del rilevamento, che non richiede strutture di laboratorio, attrezzature sperimentali e reagenti.

### 3.2 Marcatori biochimici

Un secondo livello di analisi corrisponde all'impiego di marcatori proteici; fra questi gli isoenzimi ricoprono un ruolo importante. Gli isoenzimi sono forme diverse di un medesimo enzima con la stessa specificità di substrato. Tale polimorfismo dipende da mutazioni che hanno portato alla formazione di serie alleliche multiple allo stesso *locus*. Ciascuna forma isoenzimatica può essere quindi collegata concettualmente ad un particolare allele. Le prime esperienze di analisi del polimorfismo isoenzimatico in popolazioni naturali possono essere fatte risalire a Lewontin e Hubby (1966) su *Drosophila pseudoobscura*. Da allora gli isoenzimi sono stati molto utilizzati anche in ambito vegetale ed in particolare per studi di genetica delle popolazioni (Brown, 1979). I principali vantaggi di questi marcatori sono la codominanza, la mancanza di effetti epistatici e pleiotropici, la relativa facilità d'impiego, i bassi costi di utilizzo, la riproducibilità delle analisi. Gli isoenzimi presentano però alcuni importanti limiti. Innanzitutto, il numero di sistemi enzimatici polimorfici analizzabili è piuttosto limitato (12-20). Questo rende difficoltose o impossibili le indagini in popolazioni con un non elevato livello di polimorfismo. Inoltre, i loci enzimatici rappresentano solo una piccola e non casuale parte del genoma (quella espressa). La variabilità osservata potrebbe dunque non essere rappresentativa dell'intero genoma.

### 3.3 Marcatori molecolari

Lo studio della diversità genetica di specie selvatiche e coltivate attraverso marcatori molecolari, rappresenta un innovativo sistema di indagine che ha molteplici applicazioni nel miglioramento genetico. I marcatori molecolari sono stati, infatti, ampiamente utilizzati per la caratterizzazione genotipica di diverse specie vegetali. Attualmente hanno trovato ampia applicazione nell'accertamento dell'identità varietale, fondamentale soprattutto in specie a propagazione vegetativa, e per risolvere casi di omonimia e sinonimia.

L'analisi del genoma mediante marcatori molecolari è in grado di rilevare la diversità, espressa come mutazione, di regioni di DNA omologhe in individui appartenenti alla stessa specie. Un marcatore molecolare può essere definito come quel *locus* genomico, rilevabile con sonde (=probe) o inneschi (=primer) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' (Barcaccia *et al.* 2000). Tali marcatori, di conseguenza, non sono generalmente riferibili all'attività di specifici geni, ma si

basano direttamente sulla rilevazioni di differenze (=polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA che costituisce il genoma di ogni individuo (dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc.)

I marcatori molecolari rappresentano, per la ricerca genetica, degli strumenti eccezionali, poiché consentono di identificare specifiche sequenze nucleotidiche e quindi analizzare polimorfismi di particolari geni o regioni cromosomiche. All'interno di una specie gli individui si diversificano l'uno dall'altro per un numero più o meno elevato di caratteri (loci) che assumono diverse forme (alleli) e ciò mette nella condizione di poter rilevare i polimorfismi (mutazioni) nelle regioni di DNA omologhe (Loci).

Il termine di "*fingerprinting*" (impronta digitale), oggi comunemente impiegato come sinonimo di identificazione varietale, è stato coniato inizialmente per indicare la caratterizzazione molecolare, data l'elevata informatività e la precisa identificazione che alcune di queste metodologie permettono.

Rispetto ad altri marcatori genetici, i marcatori molecolari presentano numerosi vantaggi, in quanto:

- Il loro numero è virtualmente illimitato, permettendo di ottenere mappe genetiche sature e di scandagliare approfonditamente la variabilità genetica nelle popolazioni naturali.
- Non sono influenzati dall'ambiente né, come nel caso degli isoenzimi, dal tessuto e dallo stadio fenologico.
- Molti di essi sono in grado di rilevare differenze nelle sequenze nucleotidiche di regioni non espresse, meno conservate evolutivamente, del genoma, quindi evidenziano un livello di polimorfismo più elevato rispetto agli altri marcatori genetici.
- La codominanza di alcune categorie di marcatori (RFLP, STS) semplifica notevolmente l'analisi genetica.
- Generalmente non sono associati a caratteristiche agronomiche e qualitative indesiderabili
- La possibilità di evidenziare in molti casi, polimorfismo genetico tra i genomi permette l'analisi genetica anche in una situazione polipoide.
- Possono essere rilevati su tutti i tessuti della pianta ed indipendentemente dallo stadio di sviluppo, semplificando ed accelerando l'analisi genetica e la selezione assistita ( Tanksley, 1983).

Il numero di marcatori molecolari oggi a disposizione è molto numeroso ed è sempre in aumento anche in conseguenza della continua nuova messa a punto di tecniche di analisi del DNA. Spesso si identificano con sigle diverse marcatori molecolari che adottano tecniche

molto simili tra loro, che talvolta poco diversificano e/o sono state messe a punto in laboratori diversi. Nella tabella 10 è riportato un elenco delle principali tecniche di analisi molecolare.

**Tabella 10.** Acronimi comunemente utilizzati per i diversi marcatori molecolari.

|        |                                                              |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| AFLP   | <i>amplified fragment length polymorphism</i>                |
| AP-PCR | <i>arbitrarily primed PCR</i>                                |
| ARMS   | <i>amplification refractory mutation system</i>              |
| ASAP   | <i>arbitrary signatures for amplification</i>                |
| ASH    | <i>allele specific hybridisation</i>                         |
| ASLP   | <i>amplified sequence length polymorphism</i>                |
| ASO    | <i>allele specific oligonucleotide</i>                       |
| CAPS   | <i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>                |
| CAS    | <i>coupled amplification and sequencing</i>                  |
| DAF    | <i>DNA amplification fingerprint</i>                         |
| DGGE   | <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>               |
| GBA    | <i>genetic bit analysis</i>                                  |
| IRAP   | <i>inter-retrotransposon amplified polymorphism</i>          |
| ISSR   | <i>inter simple sequence repeat</i>                          |
| ISTR   | <i>inverse sequence-tagged repeats</i>                       |
| MP-PCR | <i>microsatellite-primed PCR</i>                             |
| OLA    | <i>oligonucleotide ligation assay</i>                        |
| RAHM   | <i>randomly amplified hybridizing microsatellites</i>        |
| RAMPO  | <i>randomly amplified microsatellite polymorphisms</i>       |
| RAMPs  | <i>random amplified microsatellite polymorphisms</i>         |
| RAMS   | <i>randomly amplified microsatellites</i>                    |
| RAPD   | <i>random amplified polymorphic DNA</i>                      |
| RBIP   | <i>retrotransposon-base insertion polymorphisms</i>          |
| REF    | <i>restriction endonuclease fingerprinting</i>               |
| REMAP  | <i>retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism</i> |
| RFLP   | <i>restriction fragment length polymorphism</i>              |
| SAMPL  | <i>selective amplification of polymorphic loci</i>           |
| SCAR   | <i>sequence characterised amplified regions</i>              |
| SNP    | <i>single nucleotide polymorphism</i>                        |
| SPAR   | <i>single primer amplification reactions</i>                 |
| SPLAT  | <i>single polymorphism amplification test</i>                |
| S-SAP  | <i>sequence-specific amplification polymorphisms</i>         |
| SSCP   | <i>single strand conformation polymorphism</i>               |
| SSLP   | <i>single sequence length polymorphism</i>                   |
| SSR    | <i>simple sequence repeat</i>                                |
| STMS   | <i>sequence-tagged microsatellite site</i>                   |
| STS    | <i>sequence-tagged site</i>                                  |
| TGGE   | <i>thermal gradient gel electrophoresis</i>                  |
| VNTR   | <i>variable number tandem repeats</i>                        |

La tecnica ideale di analisi molecolare dovrebbe possedere caratteristiche di semplicità di analisi, ridotti costi di applicazione, elevata capacità discriminante, buona riproducibilità entro

e tra laboratori, produzione di un elevato numero di marcatori in tempi brevi, necessità di bassi quantitativi di DNA anche parzialmente degradato, inoltre non dovrebbe richiedere particolari conoscenze iniziali relative al genoma degli organismi in studio e permettere una analisi di zone del DNA uniformemente distribuite su tutto il genoma. Ovviamente non è possibile che un'unica tecnica soddisfi tutti questi requisiti.

Una prima distinzione tra i marcatori molecolari può essere fatta considerando le tecniche utilizzate per le loro analisi, infatti sono disponibili tecniche basate sulla restrizione ed ibridazione di acidi nucleici e tecniche basate sulla PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Una seconda distinzione può essere fatta considerando il numero di loci saggiati, in questo caso possiamo distinguere marcatori “multi-*locus*” e “singolo-*locus*”.

I primi sono basati sull'analisi simultanea di molti loci genomici, implicando l'amplificazione di tratti cromosomici casuali mediante primer oligonucleotici a sequenza nota arbitraria. Sono definiti marcatori dominanti in quanto ad ogni *locus* è possibile evidenziare la presenza o l'assenza della banda ma non distinguere la situazione eterozigote (a/-) da quella omozigote per lo stesso allele (a/a).

I secondi prevedono l'impiego di sonde o primer specifici che determinati loci genomici al fine di ibridare o amplificare tratti cromosomici a sequenza nota. Sono definiti marcatori codominanti in quanto permettono di distinguere i loci omozigoti (a/a e b/b) da quello eterozigote (a/b) rappresentati rispettivamente da una o due bande

### **3.3.1 Marcatori molecolari basati su tecniche di restrizione e ibridazione**

Questi marcatori molecolari sono stati i primi ad essere utilizzati nell'analisi del genoma vegetale e sono stati messi a punto servendosi di endonucleasi di restrizione in combinazione col procedimento di ibridazione (SBH) messo a punto da Southern (1975). In principio tale tecniche venivano impiegate per la costruzione di mappe di restrizione di particolari sequenze di interesse.

Le endonucleasi di restrizione sono particolari enzimi di origine batterica capaci di legarsi e tagliare la molecola del DNA riconoscendo particolari sequenze di basi (siti di taglio) e producendo quindi dei frammenti polinucleotidici di dimensioni variabili. In cambiamento in questi siti anche di una sola base (mutazione puntiforme) o mutazione tra due siti successivi (per delezione, traslocazione, inserzione o inversione) portano variazione nella lunghezza dei frammenti di restrizione generati dopo digestione enzimatica.

### 3.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

I marcatori RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) evidenziano il polimorfismo genetico a livello di sequenze nucleotidiche mediante l'uso di enzimi, o endonucleasi, di restrizione e l'ibridazione con sonde molecolari. Gli enzimi di restrizione, di derivazione batterica, identificano siti specifici, consistenti in sequenze nucleotidiche palindromiche di 4, 6 o più coppie di basi, in corrispondenza dei quali la molecola del DNA viene digerita. Il taglio che si determina in corrispondenza dei siti specifici distribuiti lungo il DNA genomico, identificati da un determinato enzima, produce molteplici frammenti di restrizione di diversa lunghezza. (tab. 11).

**Tabella 11.** Sequenze dei siti di riconoscimento di alcune endonucleasi di restrizione e specie batterica da cui sono stati isolati.

| Batterio di origine               | Enzima         | Siti di riconoscimento   |
|-----------------------------------|----------------|--------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>           | <i>EcoRI</i>   | 5' G AATTC 3'<br>CTTAA G |
| <i>Escherichia coli</i>           | <i>EcoRV</i>   | 5' GAT ATC 3'<br>CTA TAG |
| <i>Hemophilus influenzae</i>      | <i>HindIII</i> | 5' A AGCTT 3'<br>TTCGA A |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | <i>BamHI</i>   | 5' GG ATCC 3'<br>CCTA GG |
| <i>Providencia stuartii</i>       | <i>PstI</i>    | 5' CTGCA G 3'<br>G ACGTC |

Il polimorfismo tra diversi genotipi per la lunghezza dei frammenti ottenuti può dipendere dalla modificazione del sito di restrizione dell'enzima, dovuto a sostituzioni di basi che possono determinare la comparsa o l'eliminazione del sito di restrizione, oppure, caso più frequente nelle specie vegetali, dall'inserzione o delezione di sequenze nucleotidiche nella regione delimitata dai siti di taglio dell'enzima (Beckman e Soller, 1986a, 1986b). Mentre il primo tipo di polimorfismo è specifico per un determinato enzima, il secondo può essere evidenziato dalla digestione con diversi enzimi. Una caratteristica importante delle sonde che vengono utilizzate per il rilevamento dell'ibridazione deve essere quella di avere sequenze bersaglio uniche o poco ripetute; le sequenze altamente o mediamente ripetute, infatti, producono un segnale di ibridazione troppo forte ed specifico che, in seguito a

autoradiografia, determina una strisciata continua o un profilo di ibridazione troppo complesso per essere utilizzato nell'analisi genetica.

La tecnica si articola nelle seguenti fasi:

1. digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione (in genere si utilizza un *6-base cutter* come *EcoRI*). Individui geneticamente diversi per la localizzazione dei siti di taglio produrranno frammenti di lunghezza diversa;
2. Separazione dei frammenti in base al loro peso molecolare mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Successivamente viene eseguito il *Southern blotting* attraverso il quale è possibile trasferire, mediante un tampone alcalino (denaturante), i frammenti dal gel di agarosio su un supporto più stabile quale una membrana di nitrocellulosa o nylon sfruttando un campo elettrico, un flusso ionico o il vuoto.
3. i frammenti denaturati vengono poi esposti ad una “sonda” (una sequenza di DNA a singolo filamento) marcata con un isotopo radioattivo (generalmente  $^{32}\text{P}$  o  $^{33}\text{P}$ ) o sostanze fluorescenti (digossigenina o fluoresceina) al fine di individuare solo quei frammenti che contengono le sequenze complementari a quella della sonda utilizzata.
4. infine la membrana viene esposta su una lastra fotografica. Gli RFLP sono visibili sulla lastra come bande dovute all'emissione di radioattività (nel caso del  $^{32}\text{P}$ ), fluorescenza o saggio colorimetrico (anticorpi specifici per la digossigenina).

Se compaiono bande diversi tra DNA di individui diversi, significa che la sonda ha trovato frammenti di diversa lunghezza coi quali appaiarsi. Quindi una sonda e l'enzima utilizzato per il taglio costituiscono, nel complesso, un marcatore genetico unico, l'RFLP, primo marcatore molecolare noto.

### **3.3.1.2 VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)**

Il genoma delle piante, così come quello di molti altri organismi, include molte sequenze di DNA ripetute (fuori dalle regioni codificanti) probabilmente dovute a fenomeni di duplicazione e ricombinazione. Le sequenze ripetute, in base alle loro caratteristiche, possono essere raggruppate in diverse classi. Quando ogni ripetizione è un oligonucleotide di lunghezza variabile tra 10 e 60 paia di basi (bp) si parla di sequenze “minisatelliti” (*minisatelliti* DNA) (Jeffreys *et al.*, 1985). In un dato *locus* il numero di sequenze ripetute, così come il motivo base, può variare. Dunque, il taglio del DNA in vicinanza di queste sequenze ripetute in *tandem* (*tandem repeats*) porta a frammenti di restrizione che mostrano corrispondenti variazioni di lunghezza. Se come sonde si utilizzano sequenze di elementi

ripetuti, è quindi possibile ottenere profili elettroforetici con un maggiore numero di bande polimorfiche, cioè più informativi, che con gli RFLP. Contrariamente agli RFLP più frequentemente biallelici, i VNTR sono multiallelici; inoltre, possono essere sia a singolo *locus* (e codominanti) sia, più frequentemente, multi*locus* (e dominanti).

In ambito vegetale questi marcatori sono stati utilizzati soprattutto per il *fingerprinting* varietale (Pecchioni *et al.*, 1993).

### 3.3.2 Marcatori molecolari basati su tecniche di amplificazione

#### (PCR – derivati)

Lo sviluppo di questi marcatori è avvenuto di seguito alla scoperta, da parte di Mullis *et al.* (1986), della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR): tale tecnica è un sistema di analisi molecolare basato sull'amplificazione (=sintesi ripetuta) *in vitro* di DNA situato tra due sequenze nucleotidiche, utilizzando una DNA polimerasi stabile alle alte temperatura (anche 95°C) estratta dal batterio *Thermos aquaticus* (Taq polimerasi). Questo enzima utilizza DNA a singola elica come stampo per la sintesi dell'elica complementare (in direzione 5'-3'). Per iniziare l'amplificazione essa necessita di un frammento di DNA a singola catena (*Primer*), che è omologo alla estremità 3' della catena nucleotidica da duplicare e che funziona come innesco della reazione.

La tecnica PCR prevede l'uso di un termociclatore (*Thermal cyclers*), cioè di uno strumento in grado di realizzare ripetuti cicli termici e, di conseguenza, ripetuti cicli di amplificazione. La reazione consiste di tre fasi principali:

- Denaturazione: in seguito a riscaldamento (94-96°C) si produce la rottura dei legami idrogeno e quindi la separazione dei due filamenti di cui è composta la doppia elica del DNA da amplificare (DNA “stampo”).
- Appaiamento o innesco: in seguito a rapido raffreddamento (36-68°C), le basi azotate degli inneschi di DNA a singolo filamento (*primers*) formano legami idrogeno in corrispondenza di sequenze nucleotidiche complementari sul DNA stampo (*annealing*).
- Estensione o allungamento: alla temperatura di 72°C (*optimum*) la Taq polimerasi, partendo dagli inneschi e procedendo in direzione 5'-3', catalizza la sintesi di un nuovo filamento di DNA, complementare a quello stampo, utilizzando i dNTP presenti in soluzione.

Dato che i prodotti di un ciclo di amplificazione servono da stampo per quello successivo, alla fine di ogni serie di reazioni viene duplicato l'ammontare di DNA sintetizzato e quindi con il passare dei cicli il numero di coppie aumenta in modo esponenziale.

I pregi di velocità, sensibilità, semplicità e selettività hanno reso la tecnica della PCR una procedura eccellente per esaminare la struttura e la funzione di un gran numero di alleli diversi in campioni di DNA quantitativamente limitati.

### **3.3.2.1 RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)**

L'analisi del polimorfismo di sequenze di DNA amplificate casualmente o RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) si basa sulla tecnica della PCR (Williams *et al.*, 1990). Anziché primer specifici, per l'amplificazione casuale di regioni del genoma vengono utilizzate piccole sequenze oligonucleotidiche (in genere primer di dieci nucleotidi, o decametri, contenenti il 50% di GC), che appaiandosi casualmente al DNA stampo producono un profilo di amplificazione che viene analizzato mediante separazione elettroforetica e colorazione con etidio bromuro.

I RAPD hanno il vantaggio di non richiedere l'uso di radioattivo o sonde, come gli RFLP, né di primer specifici, di non essere particolarmente laborioso e complessi, di essere relativamente economici e di richiedere minime quantità di DNA stampo (15-25 ng). L'inconveniente principale dei RAPD è determinato dalla scarsa riproducibilità dei profili RAPD, particolarmente fra esperimenti condotti in laboratori diversi. I RAPD, inoltre, rilevano un moderato livello di polimorfismo, quindi è necessario analizzare un numero elevato di primer per poter identificare i più informativi. Infine, essendo dominanti (presenza/assenza del prodotto di amplificazione) nella maggior parte dei casi, complicano l'analisi genetica e la selezione, particolarmente nelle specie allogame, come il carciofo, caratterizzate da un elevato grado di eterozigosi.

### **3.3.2.2 SSR (Simple Sequence Repeat)**

Nel genoma eucariote esiste un'altra classe di sequenze ripetute: i microsatelliti (Tautz, 1988; Dietrich *et al.*, 1992; Morgante e Olivieri, 1993; Bell e Ecker, 1994). In questo caso si tratta di sequenze costituite dalla ripetizione di un breve motivo di base di lunghezza generalmente compresa tra 1 e 6 bp (Tautz, 1998).

Nell'ambito del genoma nucleare delle specie eucariotiche sono piuttosto abbondanti (Tautz e Renz, 1984; Gupta *et al.*, 1996) sebbene la loro frequenza possa variare a seconda degli organismi (Morgante e Olivieri, 1993; Lagercrantz *et al.*, 1993). Nel caso delle specie coltivate, in particolare, è stata documentata la variazione delle ripetizioni (AC)<sub>n</sub> e (GA)<sub>n</sub> (Gupta e Varshney, 2000). Nel genoma delle piante sono state individuate anche le ripetizioni

tri e tetranucleotidiche, le più frequenti delle quali sono  $(AAG)_n$  e  $(AAT)_n$  (Gupta *et al.*, 1996). In uno studio su 54 specie Wang *et al.* (1994) hanno osservato che l'ordine di abbondanza delle sequenze microsatelliti è:  $(AT)_n > (A)_n > (AG)_n > (AAT)_n > (AAC)_n > (AGC)_n > (AAG)_n > (AATT)_n > (AAAT)_n > (AC)_n$ .

Il polimorfismo ad un dato *locus* in una specie è dovuto alla variazione di lunghezza del microsatelliti; questa dipende dal numero di volte in cui è ripetuto il motivo di base. Si ritiene che questa variabilità si origini *in vivo* in seguito allo slittamento (*slippage*) della DNA polimerasi durante la replicazione del DNA (Levinson e Gutman, 1987) e/o a *crossino over* ineguale tra cromosomi omologhi durante la meiosi (Vendramin, 1996). La teoria dello slittamento della polimerasi sembrerebbe supportata anche da esperimenti *in vitro* (Schlotterer e Tautz, 1992) e da studi sulla distribuzione delle mutazioni (Weber e Wong, 1993; Strand *et al.*, 1993).

Sono state messe a punto molte strategie di indagine del polimorfismo molecolare che si fondano sull'esistenza dei microsatelliti.

Le prime strategie si basavano essenzialmente sulla tecnica di ibridazione mentre, più recentemente, si sono affermate le tecniche basate sulla reazione PCR (Gupta e Varshney, 2000). In quest'ultimo caso uno degli approcci di maggiore successo è quello noto come *Sequenze Tagged Microsatellite Sites* (STMS) (Beckmann e Soller, 1990) talvolta indicato in letteratura anche con l'acronimo *Simple Sequenze Length Polymorphism* (SSLP) (Tautz, 1988). La tecnica si fonda sull'osservazione che le sequenze fiancheggianti un determinato *locus* microsatelliti nel genoma sono conservate all'interno delle specie, fra specie all'interno di un genere e, più raramente anche tra generi affini (Gupta e Varshney, 2000). Conoscendo le sequenze fiancheggianti il microsatelliti, è dunque possibile sintetizzare *primers* per l'amplificazione selettiva di singoli *loci* microsatelliti. Le differenze di lunghezza degli alleli di un *locus* microsatelliti sono difficili da risolvere su gel di agarosio e tramite colorazione con bromuro di etidio. Pertanto è necessario ricorrere a gel di poliacrilamide in combinazione con marcatura radioattiva, colorazione con nitrato di argento (Scrimshaw, 1992) o con bromuro di etidio (Tegelstrom, 1992). L'uso di *primers* fluorescenti in combinazione con sequenziatori semi-automatici ha dimostrato di essere soluzione tecnicamente più efficiente rispetto ai metodi tradizionali (Ziegle *et al.*, 1992; Schwengel *et al.*, 1994).

I vantaggi dei microsatelliti sono notevoli: elevato polimorfismo, elevata ripetibilità, trasferibilità dei risultati da un laboratorio ad un altro, possibilità di automazione, *multiplexing* (possibilità di usare due o più *primers* contemporaneamente quando i prodotti di

amplificazione differiscono in peso tanto da non sovrapporsi l'uno con l'altro nella stessa linea di gel (Mitchell *et al.*, 1997), possibilità di combinare primer marcati con fluorescina che emettono a differente lunghezza d'onda e codominanza.

Lo sviluppo di marcatori STMS richiede però il clonaggio ed il sequenziamento delle sequenze microsatelliti “bersaglio” pertanto il costo iniziale per la loro messa a punto è piuttosto elevato.

Inoltre, le sequenze microsatelliti possono avere sequenza variabile a seconda della specie. Ciò rende difficoltoso lo studio di relazioni filogenetiche anche tra specie nell'ambito dello stesso genere. L'analisi del polimorfismo SSR è pertanto indicata soprattutto a livello intraspecifico.

Gli SSR sono stati proposti per lo studio nei vegetali nel 1993 (Morgante e Olivieri, 1993). Da allora hanno trovato applicazioni in moltissimi campi con un notevole impatto nell'ambito del miglioramento genetico. In particolare sono stati utilizzati per il *fingerprinting* varietale, la costruzione di mappe genetiche, negli studi di associazione con geni di importanza agraria (*gene tagging*, analisi QTL) e in programmi di selezione assistita dai marcatori (*Marker-assisted selection*, MAS).

Grazie alla codominanza e al multiallelismo hanno trovato larghissimo impiego anche in studi di ecologia e genetica delle popolazioni. (Saghai-Maroo *et al.*, 1994; Bowers *et al.*, 1996; Provan *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Turpeinen *et al.*, 2001).

### 3.3.2.3 ISSR (Inter - Simple Sequence Repeat)

I primi studi relativi all'utilizzo della tecnica ISSR risalgono al 1994 (Gupta *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Da allora, a seguito di una rapida diffusione, la tecnica è stata applicata in numerose specie vegetali (Godwin *et al.*, 1997).

**Principi della tecnica:** questa tecnica si basa sull'abbondanza delle sequenze microsatelliti nel genoma degli eucarioti (Lagercrantz *et al.*, 1993). I marcatori ISSR permettono di amplificare zone comprese tra due sequenze microsatelliti (zone intermicrosatellite), e prevedono l'utilizzo di un solo *primer* ancorato ad una delle estremità. Per la rilevazione di questi marcatori, infatti, si utilizzano *primer* oligonucleotidici (16-25 bp) costituiti dalla ripetizione di monomeri molto semplici quali (CA)<sub>n</sub>, (TC)<sub>n</sub>, (AGC)<sub>n</sub>, ecc. Tali *primer* possono presentare alcune basi selettive (da una a quattro) all'estremità 5' o 3' con la funzione di ancorare il primer ad una precisa porzione del microsatelliti complementare (Zietkiewicz *et al.*, 1994) oppure essere privi di tali nucleotidi-ancorati (Gupta *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994).

Questo approccio è stato descritto anche come MP-PCR (*Microsatelliti-Primed PCR*) o SPAR (*Singel Primer Amplification Reaction*, Gupta *et al.* 1994) o *non anchored ISSR* (Bornet et Branchard, 2001). L'utilizzo di un unico *primer* consente di amplificare solamente le zone comprese tra due sequenze ripetute ed invertite, purché esse siano di dimensioni amplificabili (vale a dire tra le 200 e le 2500 bp di distanza) (Zietkiewicz *et al.*, 1994). L'impiego di basi selettive aumenta la specificità del *primer* riducendo il numero di bande amplificabili a quelle che presentano, a fianco della sequenza ripetuta, le basi complementari alle basi selettive. Ovviamente soltanto i *primer* ancorati in 5' è possibile amplificare interamente anche i due microsatelliti che delimitano il marcatore; nel caso di *primer* ancorati in 3', infatti il tratto amplificato comprende solo la regione interna terminale dei due microsatelliti.

I marcatori ISSR sono caratterizzati da una elevata riproducibilità dovuta all'utilizzo di primer di lunghezza maggiore rispetto a quelli utilizzati per le amplificazione RAPD, consentendo quindi di utilizzare temperature di *annealing* maggiori (dipendenti dal contenuto in basi GC ma solitamente tra i 50 ed i 60°C) e quindi condizioni di maggiore stringenza. Alcuni studi effettuati sulla riproducibilità hanno dimostrato che il 92-95% delle bande totali rilevabili sono riproducibili e che, eliminando dalle conteggiare bande caratterizzate da una minore intensità, tali percentuali aumentano significativamente (Fang e Rose 1997; Moreno *et al.*, 1998).

I marcatori ISSR sono in grado di evidenziare polimorfismi che si possono manifestare in seguito alla presenza di inserzioni/delezioni all'interno delle zone comprese tra i siti complementari al *primer*, questa situazione determina modificazioni nella lunghezza del frammento amplificato; oppure la presenza di polimorfismi è rivelata dalla presenza di mutazioni a livello delle basi complementari ai nucleotidi-ancorati, in questo caso si ha la perdita di un sito di innescamento per l'amplificazione del frammento. I polimorfismi osservati possono dipendere anche dalla variazione dell'numero di ripetizioni presenti nei loci microsatelliti a causa del fenomeno dello *slippage* della DNA polimerasi; questo fenomeno è considerato la causa principale dell'elevata variabilità dei marcatori microsatelliti (Levinson e Gutman 1987). Tali polimorfismi sono evidenziabili solo nel caso di utilizzo di *primer* ancorati in 5'.

La tecnica ISSR può essere applicata su tutte quelle specie che contengono un numero sufficiente di sequenze ripetute a distribuzione casuale lungo il genoma e possiede il vantaggio che non è necessario conoscere sequenze genomiche della specie in studio. Il potenziale informativo della tecnica è quindi funzione della varietà e frequenza delle zone

microsatellitari che dipendono dalla specie in esame e dal tipo di sequenza analizzata. La percentuale di loci polimorfici analizzabile con gli ISSR è tuttavia inferiore a quella normalmente riscontrabile con i microsatelliti, inoltre la loro natura dominante fa sì che con questi marcatori non sia possibile risalire né al numero di loci saggiati né alle forme alleliche di un dato locus (Gupta *et al.*, 1994; Tsumura *et al.*, 1996; Ratnaparke *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

#### **3.3.2.4 AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism)**

Questa categoria di marcatori, sviluppata presso la società olandese Keygene (Zabeau e Vis 1993; Vos *et al.*, 1995), ha avuto negli ultimi anni una gran diffusione per la sua potenza ed efficacia nell'evidenziare polimorfismi.

La tecnica nasce dalla combinazione delle due principali metodiche d'analisi: la digestione del DNA con endonucleasi di restrizione e la tecnologia PCR. Gli AFLP, infatti, si basano sull'amplificazione selettiva, mediante PCR, di frammenti di DNA derivanti da restrizione con endonucleasi.

È un metodo estremamente versatile, in grado di rilevare, potenzialmente, la presenza di frammenti di restrizione in ogni organismo, indipendentemente dalla sua complessità, senza richiedere investimenti e ricerche iniziali per l'ottenimento di sonde o primer per sequenze specifiche.

**Principi della tecnica:** la rilevazione di tali marcatori prevede le seguenti fasi (Vos *et al.*, 1995):

- **Preparazione del DNA stampo:** Il DNA genomico viene ristretto con due enzimi di restrizione (un 6-base cutter come *EcoRI* o *PstI* ed un 4-base cutter come *MseI*), successivamente adattatori oligonucleotici, sintetici a doppio filamento, vengono ligati alle estremità coesive generate dalla restrizione. Le sequenze degli adattatori comprendono un'estremità coesiva con il sito di restrizione ed una zona a sequenza definita.

La legazione degli adattatori viene effettuata in presenza degli enzimi di restrizione in modo da permettere il taglio di eventuali unioni tra diversi frammenti, consentendo in questo modo la sola unione tra frammenti ed adattatori. Gli adattatori sono, inoltre, disegnati in modo da non ricostituire il sito di restrizione a seguito della legazione con un frammento.

Il DNA stampo (*DNA template* o *primary template*) ottenuto è pertanto costituito da frammenti che presentano alle estremità le sequenze degli adattatori specifici seguite dalle

rimanenti parti dei siti di restrizione, queste sequenze conosciute fungono da sito di appaiamento specifico per *primer* PCR appositamente sintetizzati.

- **Amplificazione:** La preparazione del DNA stampo mediante restrizione e legazione, precedentemente descritte, può generare diverse migliaia di frammenti, a seconda della complessità del DNA utilizzato. Per poter visualizzare i frammenti, a seguito di separazione elettroforetica, è necessario che solo una parte dei frammenti sia amplificata. A tale scopo vengono utilizzati *primer* universali, costituiti da una sequenza omologa agli adattatori ed al sito di restrizione e portanti alla loro estremità 3' da uno o tre nucleotidi addizionali che conferiscono la selettività desiderata (in questa fase uno dei due primer può venire marcato in 5' con sostanze radioattive come  $^{33}\text{P}$  o  $^{32}\text{P}$  oppure con coloranti fluorescenti come la fluorescina). Questa estensione consente l'appaiamento dei primer solo con una parte dei frammenti e la conseguente amplificazione selettiva.

Allo scopo di evitare l'amplificazione di "artefatti" i protocolli AFLP includono una fase di reamplificazione effettuata utilizzando primer privi di basi selettive o dotati di un'unica base selettiva. I prodotti di amplificazione così ottenuti costituiscono il "*secondary template*", utilizzato come stampo per l'amplificazione successiva.

Il numero ideale ed il tipo di nucleotidi selettivi da impiegare in fase di amplificazione varia a seconda della complessità del genoma. Una scarsa selettività dei primer si evidenzia, a seguito di separazione elettroforetica, con l'ottenimento di *smear* ed un elevato livello di co-migrazione delle bande; viceversa una eccessiva selettività può ridurre drasticamente il numero di amplificati e, conseguentemente, l'informatività della tecnica.

- **Visualizzazione degli amplificati:** esistono svariate procedure per la separazione elettroforetica degli amplificati e la successiva visualizzazione, tuttavia l'impiego del gel di poliacrilamide o l'utilizzo di elettroforesi capillare, consentono di ottenere il più elevato livello di risoluzione per i frammenti AFLP, permettendo di rilevare differenze di lunghezza imputabili a singoli nucleotidi. I prodotti di amplificazione sono rilevabili con autoradiografia o con strumenti ottici, a seconda del tipo di marcatura effettuata sul *primer*, ma anche con una colorazione diretta del gel mediante "Silver staining".

### 3.3.2.5 SAMPL (Selective Amplification of microsatellite Polymorphic Loci)

Tale tecnica è una derivazione di quella AFLP; la principale differenza è legata al fatto che vengono amplificati tratti di DNA microsatelliti senza la necessità di clonare e caratterizzare a priori la loro sequenza (Morgante e Vogel, 1994; Paglia e Morgante, 1998).

La metodologia si basa sull'impiego di un *primer* complementare a due sequenze SSR adiacenti in combinazione con un normale *primer* AFLP. Le procedure di restrizione del DNA gnomico, ligazione degli adattatori e la preamplificazione sono analoghe a quelle della tecnica AFLP, tuttavia, la PCR finale è realizzata impiegando un *primer* AFLP in combinazione con un *primer* complementare a due sequenze SSR adiacenti.

La presenza del frammento SAMPL permette che vengano usati come stampo per la PCR soltanto i frammenti ristretti-ligati e pre-amplificati che racchiudono microsatelliti adiacenti e omologhi a questo. La tecnica SAMPL combina le caratteristiche dei marcatori AFLP (saggio multi-locus) con quelle dei marcatori SSR (analisi di microsatelliti). Il più grande vantaggio di questa tecnica è senza dubbio la capacità di mettere in evidenza un elevato numero di polimorfismi per singola combinazione di primer e pertanto viene molto utilizzata nella caratterizzazione genetica, nella costruzione di mappe genetiche e nella saturazione di gruppi *linkage*.

#### **3.3.2.6 S-SAP (Sequence – Specific Amplification Polymorphism)**

Una buona base di partenza per lo sviluppo di marcatori molecolari è costituita dalla notevole dispersione, ubiquità e frequenza dei retrotrasposoni nel genoma delle piante. I retrotrasposoni sono sequenze di DNA che si replicano attraverso trascrizione, successiva trascrizione inversa e inserzione della nuova copia a cDNA nel genoma in modo molto simile a quanto accade per i retrovirus (Adams *et al.*, 1987; Grandbastien, 1992). I retrotrasposoni, contrariamente ai trasposoni, propagano copie “figlie” piuttosto che excidersi e muoversi essi stessi direttamente. Pertanto i retrotrasposoni membri di una famiglia attiva in replicazione, produrranno nuove inserzioni nel genoma, originando polimorfismo. Una inserzione stabile, in seguito ad incrocio, segrega come un *locus* mendeliano. I retrotrasposoni contengono sequenze ben definite e conservate che possono essere utilizzate per clonare marcatori specifici e sequenze fiancheggianti. In particolare un tratto del retrotrasposone noto come LTR (*Long Terminal Repeat*) contiene sequenze che sono essenziali per la sua trasmissione e l'integrazione nel genoma. Queste sequenze dunque tendono ad essere altamente conservate. Utilizzando *primers* complementari alle sequenze LTR è possibile individuare tutti i membri della famiglia di un retrotrasposone dispersi nel genoma. Recentemente è stata proposta una tecnica S-SAP (Waugh *et al.*, 1997) basata sull'analisi dei retrotrasposoni. I passaggi iniziali per la rilevazione dei polimorfismi a carico di queste regioni sono uguali a quelli utilizzati per gli AFLP. L'amplificazione selettiva è invece realizzata impiegando un *primer* AFLP (ad es.

*Mse*) in combinazione con un *primer* omologo ad un tratto terminale LTR, altamente conservata del retrotrasposone.

Una parte dei polimorfismi rilevabili con questa tecnica deriva da variazioni a carico dei siti di restrizione o delle sequenze ad essi fiancheggianti dove discriminano le basi selettive dei *primer* AFLP, una parte da variazioni a carico della sequenza nella regione 5' in corrispondenza delle LTR o ancora da modificazioni riconducibili a duplicazioni inserzionali a carico del retrotrasposone.

I vantaggi e gli svantaggi di questa tecnica sono analoghi a quelli degli AFLP. Questa classe di marcatori è molto utile in analisi filogenetiche al fine di ricavare informazioni sull'evoluzione del genoma di una specie.

### **3.3.2.7 STS (Sequence – Tagged Sites)**

Pur nella varietà di acronimi, tali tecniche sono accomunate da procedure simili che consentono di indagare via PCR il polimorfismo di sequenze specifiche. In questo caso vengono utilizzati *primers* in grado di riconoscere sequenze specifiche fiancheggianti soltanto quelle che si desidera amplificare.

Pertanto è necessario conoscere la sequenza nucleotidica di un gene o di un qualsiasi altro *locus*, sulla base della quale sintetizzare *primers* di circa 20 nucleotidi complementari alle regioni fiancheggianti (iniziale e finale) il tratto di DNA che si vuole amplificare. I prodotti specifici di amplificazione possono poi essere digeriti enzimaticamente per evidenziare ulteriori polimorfismi nelle sequenze amplificate.

I vantaggi di questi marcatori sono l'elevata riproducibilità e l'eredità spesso codominante. Hanno il principale svantaggio in ciò che li caratterizza: la necessità di ciniscere la sequenza delle regioni da amplificare. Sono stati utilizzati soprattutto per lo studio del polimorfismo in regioni gnomiche specifiche o per selezione assistita (Pecchioni *et al.*, 1993).

### **3.3.2.8 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**

Come suggerisce il nome, questa classe di marcatori molecolari, adottata solo di recente nelle specie vegetali (mais, riso, soia, pomodoro) consente di mettere in evidenza il polimorfismo riconducibile a differenze per i singoli nucleotidi (Jordan e Humphries 1994).

Gli SNP possono essere isolati a partire sia da sequenze codificanti, sia da sequenze non codificanti. Ci sono regioni ricche di SNP e regioni povere, dove non sono tollerate delle mutazioni. Quindi è più facile trovare SNP nelle regioni introniche che, non essendo tradotte,

non subiscono la pressione selettiva. Per la rilevazione dei marcatori SNP è necessario conoscere la sequenza che si vuole studiare per poter disegnare i *primer* specifici per la loro identificazione. Se la sequenza genica non è conosciuta, per la rilevazione dei marcatori è necessario passare, ad esempio, attraverso la costruzione di una libreria gnomica di cDNA. Una volta che la sequenza genetica è nota, vengono disegnati i *primer* specifici utilizzati successivamente per l'amplificazione dei frammenti che delineano tramite PCR. Le sequenze amplificate vengono sequenziate e poi allineate in modo da mettere in evidenza le differenze dovute a mutazioni puntiformi (inserzioni, delezioni e sostituzioni). Quando la sequenza in cui si ricerca un SNP è conosciuta (o perché è di un gene clonato o perché è inserita nel *database*), si procede subito con la sintesi dei *primer* e le operazioni successive coincidono con quelle sopra descritte.

Tra gli SNPs, gli ESTs (*Expressed Sequence Tags*) sono definiti i marcatori del futuro. Con questi è possibile analizzare i polimorfismi di tratti di DNA che vengono espressi, dunque è possibile risalire anche alle sostituzioni aminoacidiche nelle proteine. Le applicazioni future di questo gruppo di marcatori riguarderanno, in particolare, la tipizzazione dei genotipi ai fini del loro impiego nella selezione assistita e nell'identificazione di germoplasma specifico.

### **3.4 Utilizzo dei marcatori molecolari nello studio del genoma di carciofo**

L'applicazione dei marcatori molecolari nello studio del genoma del carciofo è stata caratterizzata principalmente dall'utilizzo dei marcatori di tipo RAPD. Tivang *et al.* (1996) hanno utilizzato tali marcatori per stimare la variabilità genetica esistente fra tre cultivars americane, Green Globe, Imperial Star e Big Heart e due varietà sintetiche. Sonnante *et al.*, (2002) hanno valutato le relazioni filogenetiche esistenti fra 32 tipi varietali di carciofo ed alcune accessioni di cardo coltivato e cardo selvatico. Lanteri *et al.* (2001) hanno impiegato i RAPD per stimare il livello di variabilità esistente in cinque popolazioni di carciofo del tipo varietale "spinoso sardo" coltivate nelle aree di maggior diffusione della coltura in Sardegna: Valledoria ed Usini (nord), Oristano (centro) e Samassi e Tratalias (sud). Per ciascuna di queste cinque popolazioni sono state analizzate trenta piante.

## **II. Obbiettivi della ricerca**

### **1. Studio della variabilità genetica in popolazioni di carciofo tipo Romanesco.**

Considerando la ricchezza del germoplasma nazionale come punto di partenza, il primo obiettivo è stato quello di utilizzare la disponibilità dei marcatori molecolari per studiare la variabilità genetica esistente tra e dentro alcune popolazioni di tipo Romanesco della specie *Cynara cardunculus*. Questa conoscenza è utile sia ai fini di una corretta conservazione del germoplasma che di una sua utilizzazione.

### **2. Studio della quota di alloincrocio e/o autoincompatibilità (sistema di incrocio).**

Avendo presente gli innumerevoli problemi esistenti e derivanti della propagazione vegetativa della specie, il secondo obiettivo è stato quello di mettere a punto una metodica d'ibridazione per una proficua moltiplicazione via seme, realizzando diverse prove, con ecotipi locali e alcuni genotipi maschiosterili.

### **3. Costituzione di una mappa genetica.**

Al fine di utilizzare i marcatori genetici nel miglioramento genetico (Marker Assistent Selection) è molto utili disporre di una mappa genetica. L'inizio della costituzione di una mappa genetica in carciofo è stato obiettivo della presente tesi.

### **4. Confronto di una popolazione “Virosata” e una “Risanata da virus”, attraverso la caratterizzazione molecolare utilizzando come punto di partenza l'RNA:**

### **III. Analisi della variabilità genetica in popolazioni di *Cynara cardunculus* Var. *scolymus* mediante la caratterizzazione molecolare di ecotipi di carciofo romanesco nel Lazio**

#### **1. INTRODUZIONE**

Lo studio della diversità genetica di specie selvatiche e coltivate attraverso marcatori molecolari, rappresenta un innovativo sistema d'indagine che ha molteplici applicazioni nel miglioramento genetico. I marcatori molecolari sono stati, infatti, ampiamente utilizzati per la caratterizzazione genotipica di diverse specie vegetali. Attualmente hanno trovato ampia applicazione nell'accertamento dell'identità varietale, fondamentale soprattutto in specie a propagazione vegetativa, e per risolvere casi di omonimia e sinonimia.

L'importanza di studiare la distribuzione della variazione genetica in specie vegetali è stata enfatizzata nella Convenzione su Diversità Biologica, firmata a Rio di Janeiro nel 1992, che incoraggiò la conservazione del germoplasma, come una delle migliori strategie per preservare la variazione genetica esistente nelle varietà locali ed ecotipi locali delle specie coltivate. Gli ecotipi locali sono popolazioni che contengono degli elementi comuni ma anche diversità considerevole che permette il loro adattamento a particolari condizioni micro-climatiche. Gli ecotipi locali hanno sperimentato processi d'evoluzione che, nonostante un possibile origine comune, generano materiale vegetale geneticamente divergente. La variabilità che esiste negli ecotipi locali generalmente spiana le fluttuazioni nella produzione annuale su una vasta serie delle condizioni ambientali, mentre determinando quello che è stato definito come il valore di busta (Swanson., 1994). Inoltre gli ecotipi locali rappresentano un'importante risorsa genetica disponibile, essendo una fonte di geni utili nel presente per miglioramenti genetici futuri.

L'Italia è il maggiore produttore di carciofo del mondo, con una superficie di circa 49,000 ettari, è la seconda esportatrice. Il carciofo è la terza coltura orticola in Italia dopo il pomodoro e la patata. Recentemente molte aziende cinearicole italiane hanno sostituito i loro ecotipi con un solo clone di tipo "Romanesco", che è caratterizzato da alta precocità. I coltivatori avevano trovato vantaggioso questo clone perché permette una precoce entrata sul mercato di carciofo potendo spuntare un prezzo più alto. Questo, però crea un rischio conseguente di erosione di variabilità genetica. Infatti, al momento, è piuttosto difficile

trovare coltivatori che coltivano i loro ecotipi. Inoltre, recentemente, alcuni coltivatori hanno compreso che il clone è suscettibile al freddo e alle malattie. La coltivazione del carciofo Romanesco soprattutto in ambiente laziale ha visto negli ultimi anni una grande diffusione del clone commerciale “C3”, caratterizzato da elevata precocità di produzione. La diffusione di un singolo clone come detto, rende più vulnerabile la cinaricoltura regionale e nazionale che, oltre a non poter competere per precocità con le produzioni del Sud d’Italia. Questa situazione nel Lazio ha portato a una notevole riduzione dei campi coltivati con le altre varietà commerciali ed ecotipi locali (quali. Castellamare, Grato, Campagnano), con conseguente erosione genetica. Durante il presente lavoro è stato molto difficile reperire le aziende che coltivassero ancora ecotipi di carciofo Romanesco.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare alcuni ecotipi di carciofo Romanesco reperiti in aziende laziali, per una futura salvaguardia della biodiversità esistente.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Collezione e caratterizzazione del materiale**

Trenta genotipi di carciofo “Romanesco” di tre aziende della provincia di Latina, sono state collezionate, prelevando porzioni delle foglie più giovani (10 g) e conservandole in azoto liquido. Le piante campionate sono state identificate con una sigla progressiva da L1 a L90.

### **2.2 Estrazione del DNA**

L’estrazione del DNA per ciascun genotipo, è stata effettuata secondo il protocollo riportato da Doyle e Doyle (1990) apportando alcune modifiche.

- direttamente in un tubo eppendorf da 1,5 ml. è stata frantumata in azoto liquido una quantità di tessuto fresco variabile da 0,1 a 0,2 g;
- sono stati aggiunti 800µl di tampone di lisi CTAB (2% CTAB; 0,1 M Tris HCl 1M pH 8,0; 20mM EDTA 0,5 M pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanololo);
- i campioni sono stati incubati per 120 min. a 60°C;
- successivamente sono stati centrifugati a 12000 rpm per 5 min, il supernatante è stato trasferito in un nuovo tubo eppendorf da 1,5 ml, sono stati aggiunti 800µl di cloroformio:alcol isoamilico (24:1 v:v) e centrifugati a 12000rpm per 15 min;

- la fase acquosa superiore è stata trasferita in un nuovo tubo e sono stati aggiunti 800µl di isopropanolo freddo, mescolando le soluzioni ed incubando a -20°C per due ore.
  - Dopo una centrifugazione a 4°C di 20 min a 10000 rpm il pellet precipitato è stato sottoposto ad un lavaggio con 100 µl di isopropanolo freddo (70%), lasciato asciugare all'aria e risospeso accuratamente in 500µl di tampone TE (10mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA);
  - i campioni sono stati incubati 60 min, a 37°C, in presenza di 1µl di 10mg/ml di DNase-free RNase e, successivamente, miscelati con un volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1 v:v:v) e centrifugati a 10000 rpm per 10 min.
  - a seguito del trasferimento del surnatante in un nuovo tubo eppendorf, i residui di fenolo sono stati rimossi mediante l'aggiunta 500µl di un volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1 v:v) ed il DNA presente nella fase acquosa è stato recuperato dopo centrifugazione a 1000 rpm per 10 min.
  - Il DNA è stato infine precipitato con l'aggiunta di 500µl di etanolo freddo e posto a -20°C per 30 min. Dopo una centrifugazione di 20 min a 1000 rpm a 4°C, il pellet precipitato è stato sottoposto a uno o più lavaggi mediante 100µl di etanolo freddo 70 %, lasciato asciugare all'aria e risospeso in 50 µl di tampone TE (10mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA).
- Il DNA estratto è stato quantificato su gel d'agarosio e con spettrofotometro, a partire dal DNA ottenuto di ciascuna delle 90 piante è stata effettuata una caratterizzazione molecolare mediante applicazione di marcatori AFLP e ISSR.

### **2.3 Analisi AFLP**

L'analisi AFLP è stata condotta su DNA genomico digerito con enzimi MseI e PstI e ligato con adattatori specifici per i due enzimi utilizzati. Nella preamplificazione (prevista dal protocollo AFLP) sono stati utilizzati *primer* con zero basi selettive (Pst0 e Mse0), mentre nell'amplificazione sono stati utilizzate tre combinazioni di *primer* con 2 basi selettive: MseAC-PstCT, MseTT-PstCA, e MseGC-PstAC.

Il protocollo si è articolato nelle seguenti fasi:

- Preparazione del DNA stampo
- Preamplificazione
- Amplificazione selettiva
- Elettroforesi
- Visualizzazione degli amplificati

### 2.3.1 Preparazione del DNA stampo

La reazione di restrizione e ligazione sono state effettuate contemporaneamente incubando 250 ng di DNA genomico (5 µl) a 37°C per 4 h in un volume finale di 25 µl costituito da tampone di restrizione e legazione (R/L) 1X, 2,5 U di *MseI*, 2,5 U di *PstI*, 1 U T4 DNA-ligasi, 5 pmol di adattatore *PstI*, 50 pmol di adattatore *MseI* e 0,5 mM ATP. Gli adattatori sono stati preparati miscelando quantità equimolari dei singoli oligonucleotici.

Un'aliquota di 5 µl di DNA ristretto/ligato è stata utilizzata nella successiva fase di preamplificazione.

### 2.3.2 Preamplificazione

5 µl di DNA ristretto/ligato sono stati preamplificati in un volume finale di 45 µl, sono stati utilizzati 75 ng di ogni *primer* con zero basi selettive (*Pst0* e *Mse0*), tampone PCR 1X, 200 µl di ciascun dNTP, e 1 U di *Taq* Polimerasi.

Per le reazioni di preamplificazione è stato utilizzato il seguente profilo termico:

- 1 min a 94°C (denaturazione iniziale)
- 30 s a 94°C (denaturazione)
- 30 s a 55°C (appaiamento) 25 cicli
- 1 min a 72°C (estensione)
- 10 min a 72°C (estensione finale).

Prima di eseguire la successiva amplificazione selettiva è stata verificata, mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2 %, la presenza di uno *smear* di frammenti di peso molecolare compreso tra un minimo di 100 ed un massimo di 1000 bp. Un'aliquota di DNA stampo preamplificato è stata diluita 1/10 in dH<sub>2</sub>O.

### 2.3.3 Amplificazione selettiva

Come stampo nella amplificazione selettiva sono stati utilizzati 2,5 µl del prodotto di preamplificazione. In tale reazione, operativamente identica a quella precedente, sono stati utilizzati *primer* con 2 basi selettive. Per le reazioni è stato utilizzato il seguente profilo termico:

1 min a 94°C (denaturazione iniziale)  
 30 s a 94°C (denaturazione)  
 da 65°C a 56.6°C (-0.7 °C ogni ciclo) per 30 s (appaiamento).....13 cicli  
 1 min a 72°C (estensione)  
  
 5 min a 72°C (estensione finale)  
 30 s a 56°C (appaiamento)  
 1 min a 72°C (estensione).....23 cicli  
 1 min a 72°C (estensione finale)

Al termine dell'amplificazione, i prodotti di reazione sono stati miscelati con 8 µl di *loading buffer* (98% formamide, 10 mM EDTA, 0,01% blu di bromofenolo e 0,01% di cilec cianolo) e conservati a 4°C.

### 2.3.3 Elettroforesi

L'elettroforesi è stata effettuata con il Genomix della Beckman Coulter, mediante gel di acrilammide (6%) verticale, preparato tra due lastre di vetro 30 x 60 cm e spaziatori di 0,4 mm. Per la preparazione dei gel denaturanti di poliacrilammide si è utilizzata una acrilammide premiscelata ad elevata risoluzione per alti pesi molecolari. L'elettroforesi è stata condotta a 80 W per circa 2 h.

## 2.4 Analisi ISSR

Per i marcatori ISSR sono stati utilizzati i *primer* 841 e 856 (British Columbia University). Per ciascuno dei primer testati sono state individuate le condizioni ottimali di amplificazione PCR (Tab. 12).

**Tabella 12.** Sequenze dei primers ISSR e temperature di annealing ( $T_a$ ) utilizzate per le reazioni PCR.

| Primer         | Sequenze 3' → 5'     | $T_a$ (°C) |
|----------------|----------------------|------------|
| 841            | (GA) <sub>8</sub> YC | 45         |
| 856            | (AC) <sub>8</sub> YA | 50         |
| Y= pirimidine. |                      |            |

Il protocollo utilizzato per l'analisi ISSR è consistito in tre tappe successive:

- amplificazione
- separazione degli amplificati mediante elettroforesi
- analisi dei pattern elettroforetici

#### **2.4.1 Amplificazione**

Le reazioni PCR sono state condotte in volumi finali di 10 µl contenenti 10 ng di DNA genomico, 0,3 µM primer, 100µM di ciascun deossinucleotide (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10mM Tris-HCl (pH 9,0) e 1 unità di *Taq* Polimerasi.

Le amplificazioni sono state effettuate per mezzo di un termociclatore Eppendorf programmato con il seguente profilo termico:

5 min a 94°C (denaturazione iniziale)  
1 min a 94°C (denaturazione)  
1 min alla T° di *annealing* specifica del primer     **35 cicli**  
2 min a 72°C (estensione)  
5 min a 72°C (estensione finale).

I prodotti di amplificazioni sono stati conservati a 4°C fino al momento della separazione elettroforetica.

#### **2.4.2 Elettroforesi**

L'elettroforesi è stata condotta secondo il protocollo riportato nel paragrafo 2.3.3.

#### **2.5 Analisi statistica**

I risultati delle reazioni di amplificazione sono stati separati mediante gel di acrilammide (6%) analizzato con il Genomix della Beckman Coulter. Dai profili di amplificazione sono state analizzate 191 bande per i marcatori AFLP e 51 per gli ISSR da cui si è ottenuta una matrice 0 e 1, attribuendo 0 all'assenza ed 1 alla presenza della banda.

La matrice ottenuta è stata utilizzata nella sua totalità, considerando solo i marcatori AFLP o considerando solo i marcatori ISSR per le analisi statistiche, applicando il *software* GDA

(Lewis e Zaykin, 1996). Si è così ottenuta la stima della variabilità genetica fra ed entro popolazioni, il livello di eterozigosità attesa e le distanze genetiche (Nei, 1972) fra le popolazioni da cui poi si sono ottenuti i dendrogrammi (Fig. 1) di similarità genetica usando la metodologia UPGMA.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Come atteso, i materiali analizzati hanno presentato un elevato grado di polimorfismo, evidenziando la potenziale capacità degli AFLP nell'accertamento dei requisiti richiesti alle cultivar nella costituzione varietale (Tab. 13).

I risultati hanno mostrato la presenza di una elevata percentuale di variabilità all'interno di ogni popolazione, con valori compresi tra 73% e 85% in funzione del marcatore usato (Tab. 13), mentre la variabilità fra piante di aziende diverse è compresa tra il 27 e il 15% del totale. Questi dati sono in accordo con quelli riportati da altri autori (Lanteri *et al.*, 2001) utilizzando i marcatori RAPD. La percentuale di *loci* polimorfici è stata calcolata assumendo che il livello massimo per definire un *locus* polimorfico fosse pari al 95% (criterio di polimorfismo). In questo modo sono stati ottenuti valori del 67% per gli AFLP e dell'80% per gli ISSR; considerando entrambi i marcatori insieme è stato evidenziato un livello di polimorfismo pari al 77%. Valori più bassi sono stati ottenuti utilizzando marcatori di tipo diverso (Lanteri *et al.*, 2001, Sonnante *et al.*, 2002). Analizzando le singole aziende si evidenzia un polimorfismo più alto nell'azienda 'Latina 2' e più basso in 'Latina 1' con gli AFLP mentre è più alto in 'Latina 1' e più basso in 'Latina 3' con i marcatori ISSR (Tab. 14). Tali differenze possono essere da imputare al fatto che i due tipi di marcatore rivelano differenti regioni genomiche con diverse similarità e/o a differenze tra i genotipi considerati.

**Tabella 13.** Polimorfismo (P), eterozigosità attesa (He) e varianza all'interno delle popolazioni ( $\sigma$ -I) e tra le popolazioni ( $\sigma$  -P).

a) 242 loci (191 AFLP and 51 ISSR)

| Population | n    | s-P   | s-I   | P (0.95) | He   |
|------------|------|-------|-------|----------|------|
| Latina1    | 27   |       | 58.85 | 0.63     | 0.22 |
| Latina2    | 28   |       | 79.03 | 0.87     | 0.33 |
| Latina3    | 26   |       | 72.35 | 0.81     | 0.30 |
| Mean       | 27.0 | 14.79 | 68.57 | 0.77     | 0.28 |

b) 191 loci AFLP

| Population | n    | s-P  | s-I   | P (0.95) | He   |
|------------|------|------|-------|----------|------|
| Latina1    | 30   |      | 37.54 | 0.57     | 0,20 |
| Latina2    | 30   |      | 62.82 | 0.87     | 0,33 |
| Latina3    | 29   |      | 59.13 | 0.82     | 0,31 |
| Mean       | 29.6 | 9.08 | 53.15 | 0.67     | 0,26 |

c) 51 loci ISSR

| Population | n    | s-P  | s-I   | P (0.95) | He   |
|------------|------|------|-------|----------|------|
| Latina1    | 16   |      | 16.31 | 0.88     | 0,32 |
| Latina2    | 21   |      | 16.21 | 0.86     | 0,32 |
| Latina3    | 15   |      | 13.22 | 0.76     | 0,26 |
| Mean       | 17.2 | 5.70 | 15.42 | 0.80     | 0,29 |

**Tabella 14.** Nei's Original Measures of Genetic Identity and Genetic distance (Nei, 1972).

**a) 242 loci (191 AFLP and 51 ISSR)**

| pop ID   | Lt1  | Lt2  | Lt3  |
|----------|------|------|------|
| Latina 1 | **** | 0.96 | 0.88 |
| Latina 2 | 0.08 | **** | 0.92 |
| Latina 3 | 0.13 | 0.08 | **** |

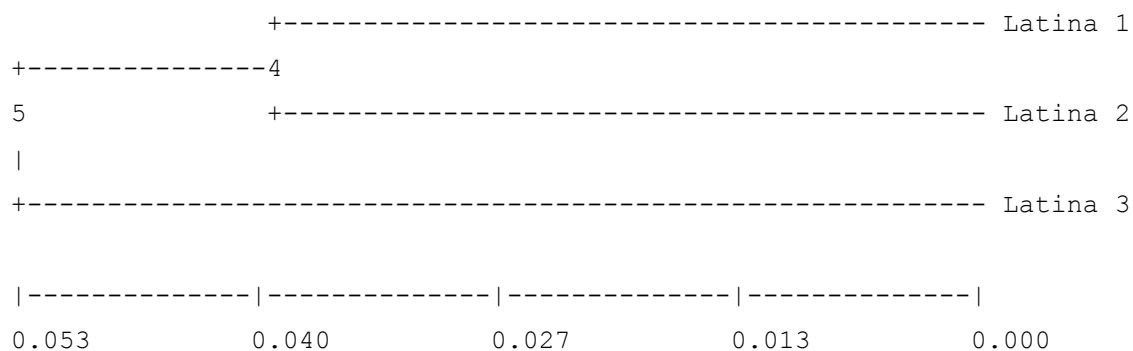
**b) 191 loci AFLP**

| pop ID   | Lt1  | Lt2  | Lt3  |
|----------|------|------|------|
| Latina 1 | **** | 0.96 | 0.91 |
| Latina 2 | 0.05 | **** | 0.93 |
| Latina 3 | 0.10 | 0.07 | **** |

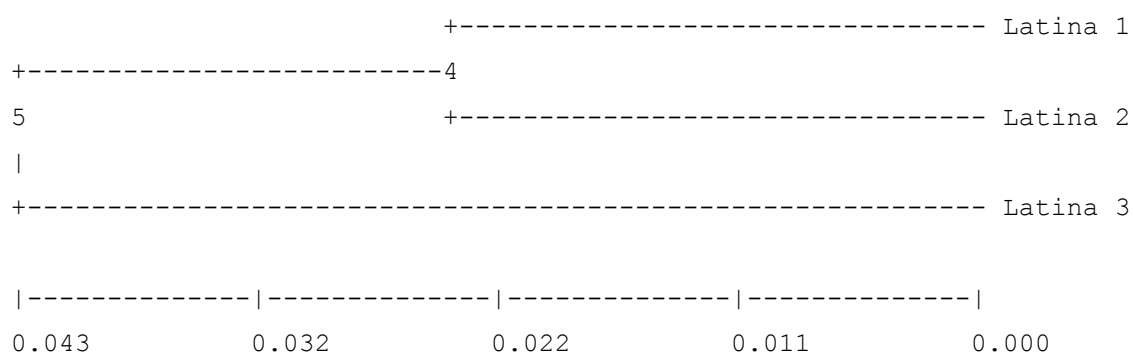
**c) 51 loci ISSR**

| pop ID   | Lt1  | Lt2  | Lt3  |
|----------|------|------|------|
| Latina 1 | **** | 0.81 | 0.78 |
| Latina 2 | 0.21 | **** | 0.89 |
| Latina 3 | 0.25 | 0.12 | **** |

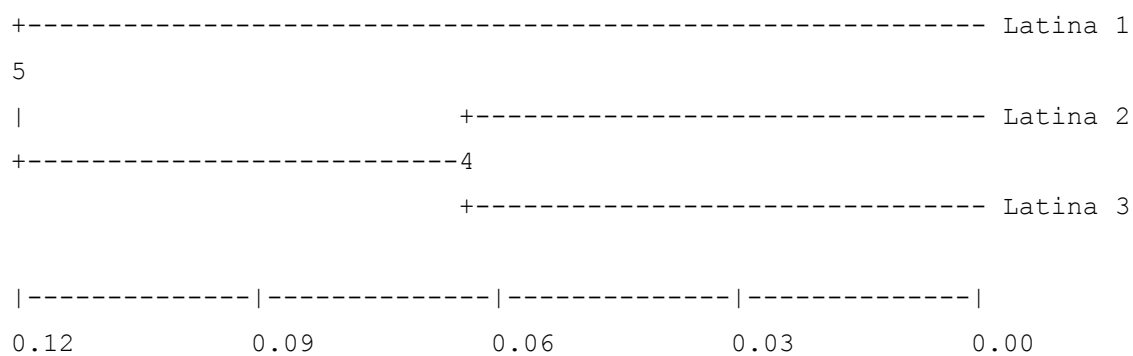
I valori di eterozigosità attesa, nel caso di due alleli (presenza/assenza), possono variare tra 0, se il *locus* è monomorfico (solo un allele presente), e 0,5 se gli alleli sono presenti in ugual misura, valori intermedi danno un'indicazione della proporzione fra i due alleli. Dai risultati dell'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) si evidenzia che l'elevato polimorfismo è determinato da un *locus* con entrambi gli alleli ben rappresentati e pertanto la variabilità presente all'interno delle popolazioni è rilevante. In Fig. 23 sono indicate le distanze genetiche tra le popolazioni: come è evidente tali distanze non sono molto alte a causa dell'elevata variabilità esistente all'interno delle popolazioni. Anche se le popolazioni 'Latina 1' e 'Latina 3' risultano sempre più distanti, nel complesso i diversi dendrogrammi ottenuti mostrano diverse configurazioni.



#### a) 242 loci (191 AFLP and 51 ISSR)



#### b) 191 loci AFLP



#### c) 51 loci ISSR

**Figura 23.** Dendrogramma di distanza genetica ottenuto mediante l'indice di Nei (1972).

Il presente studio dimostra l'esistenza di una grande variabilità all'interno delle aziende analizzate che ancora utilizzano ecotipi locali, rilevando la presenza di un buon germoplasma da porre in conservazione.

#### **4. CONCLUSIONI**

La difficoltà di trovare aziende che coltivino ancora ecotipi ed il rischio di erosione genetica dovuto all'estensivo utilizzo di un singolo clone sottolineano la necessità di conservare germoplasma di carciofo; i dati ottenuti dal presente lavoro confortano circa la buona variabilità genetica presente nelle aziende che hanno materiali di propria produzione che devono essere messi in conservazione.

I risultati ottenuti con i due tipi di marcatore sono diversi fra loro, evidenziando la necessità di usare più tipologie di marcatore per avere una più ampia ed attendibile esplorazione dell'intero genoma del carciofo.

## **IV. Produzione di ibridi F1 puri di carciofo per sviluppare una mappa genetica**

### **1. INTRODUZIONE**

Recentemente le specie coltivate che vengono studiate con l'intento di ottenere varietà ibride sono moltissime. Grazie al vigore dell'ibrido (eterosi), sono stati ottenuti incrementi produttivi in quasi tutte le specie coltivate, comprese quelle che normalmente si riproducono per autofecondazione. In carciofo inoltre la produzione di seme porterebbe ad una serie di vantaggi: abbattimento dei costi di impianto a seguito della possibilità di meccanizzare la semina, migliorare lo stato fito-sanitario delle colture, ridurre l'uso di fertilizzanti e la necessità irrigua, permetterebbe l'espressione della piena capacità produttiva della pianta già durante il primo anno d'età, costituire varietà sintetiche ed ottenere linee *inbred* per la produzione di ibridi F<sub>1</sub> e ampliare le informazioni sulla base genetica dei caratteri d'importanza agronomica, commerciale e industriale.

Per la produzione di seme ibrido e per limitare o annullare gli interventi manuali, si ricorre all'utilizzo di linee maschiosterili. Queste linee hanno come vantaggio una più facile impollinazione ed una maggiore produzione di seme.

La maschiosterilità è stata utilizzata anche per altri scopi, quali: a) per accelerare i programmi di selezione ricorrente in specie allogame; b) permettere di studiare più efficacemente i meccanismi di riproduzione ed, in particolare, il tasso di allogamia di una specie; c) facilitare lo studio dell'apomissia e partenocarpia in una specie.

Al fine di mettere appunto le tecniche di produzione di seme in carciofo, le attività sono state articolate secondo le seguenti linee: (a) individuazione e caratterizzazione di cloni maschiosterili; (b) sviluppo della metodologia di ibridazione, (c) moltiplicazione del seme ottenuto, (d) caratterizzazione molecolare della popolazione ottenuta, (e) creazione di una mappa genetica. E' stato inoltre impostato un campo di interincrocio tra 6 cloni diversi del tipo "romanesco" ed un clone maschiosterile, allo scopo di valutare la libera impollinazione.

Nell'ambito dello sviluppo di una metodologia di ibridazione, sono state effettuate diverse prove (impiego di insetti pronubi, impollinazione per strofinamento del capolino e impollinazione manuale con pennello) come fondamento per scegliere il metodo più adatto per ottenere una popolazione significativa per avere una mappa genetica

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Selezione dei cloni MS ed ecotipi locali (cultivar considerati)

Nella presente ricerca è stata utilizzata una popolazione F<sub>2</sub> di provenienza francese (INRA), fornita da Dr. Pècaut (che possiede genotipi maschiosterili), sono state impiegati 4 cloni MS, come parentali femminili, successivamente caratterizzate da un punto di vista morfologico e molecolare (Tab 15). Il materiale è stato coltivato in pieno campo presso l'azienda della Facoltà di Agraria dell'Università della Tuscia (Viterbo). Le cause della maschiosterilità, sicuramente di tipo post-meiotico, sono state attribuite ad anomalie verificatesi dopo la formazione delle microspore. Una volta individuati i parentali maschiosterili, questi sono stati mantenuti per carducci.

**Tabella 15.** Caratterizzazione morfologica delle piante maschiosterili utilizzate.

| PIANTA | PIANTA        |              |                  | CAPOLINO    |             |          |             |               |
|--------|---------------|--------------|------------------|-------------|-------------|----------|-------------|---------------|
|        | Diametro (cm) | Altezza (cm) | Presenza di cera | Largh. (mm) | Lungh. (mm) | Forma    | Colore      | Numero totale |
| MS6    | 120           | 51           | ++               | 75          | 60          | Globoso  | Viola-verde | 3             |
| MS9    | 115           | 61           | ++               | 68          | 73          | Allungat | Verde       | 5             |
| MS14   | 130           | 55           | ++               | 73          | 67          | Globoso  | Viola       | 8             |
| MS16   | 135           | 64           | ++               | 80          | 81          | Allungat | Viola-verde | 5             |



**Figura 24.** Recinzione delle piante maschiosterili con rete anti-insetto e tessuto - non tessuto.

Come parentali maschili sono stati utilizzati cultivars locali: due cloni del tipo romanesco (Grato I e Castellamare) e due ecotipi di cardo selvatico, allevate a un centinaio di metri delle piante maschiosterili. Tutte le piante sono state isolate con una struttura di protezione (gabbie) conformata di una rete anti-insetto che copriva tutta la pianta e di tessuto- non tessuto per ogni singolo capolino (Fig. 24) al fine di evitare inquinamento di polline straniero.

Il diagramma delle impollinazioni realizzate è spiegato per ogni singolo capolino delle piante maschiosterili nella tabella 16, i numeri tra parentesi sono i semi ottenuti per ogni incrocio.

**Tabella 16.** Diagramma delle impollinazioni realizzate.

|                                                                                                                         |                                                                                                                         |                                                                     |                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>MS 6</b><br>1. Grato I<br>2. Grato I (6)<br>3. Grato I                                                               | <b>MS 6</b><br>1. Castellamare                                                                                          |                                                                     | <b>MS 6</b><br>1. Cardo<br>2. Cardo<br>3. Grato |
| <b>MS 9</b><br>1. Grato I (402) <u><b>Incrocio 1</b></u><br>2. Grato I<br>3. Grato I                                    | <b>MS 9</b><br>1. Cardo                                                                                                 |                                                                     |                                                 |
| <b>MS 14</b><br>1. Cardo                                                                                                | <b>MS 14</b><br>1. Castellamare (3)<br>2. Grato I (284)<br>3. Grato I (334) <u><b>Incrocio 2</b></u><br>4. Grato I (70) | <b>MS 14</b><br>1. Castellamare<br>2. Cardo<br>3. Cardo<br>4. Cardo |                                                 |
| <b>MS 16</b><br>1. Grato I (386) <u><b>Incrocio 3</b></u><br>2. Grato I<br>3. Grato I<br>4. Grato I<br>5. Grato I (335) | <b>MS 16</b><br>1. Castellamare                                                                                         |                                                                     |                                                 |

## 2.2 Tecnica di impollinazione

Tutte le ibridazione sono state effettuate adottando l'impollinazione manuale raccogliendo il polline con un pennello, ripetendo due volte al giorno la stessa procedura (a causa della scalarità della fioritura all'interno dei capolini) dal 12 giugno al 1 luglio 2003. Nella figura 25 abbiamo il capolino maschiofertile Grato I ed il capolino maschiosterile MS 9 nel momento della impollinazione.

Nel mese di agosto i fiori secchi sono stati raccolti ed accuratamente estratti i semi (Fig. 26), i migliori risultati in termini di semi prodotti sono stati ottenuti nelle ibridazioni con Grato I, i semi provenienti da tre incroci sono stati posti a germinare e poi trapiantati in condizioni di campo (Tab. 16).



**Figura 25.** Capolini Grato I e MS 9(nel momento della impollinazione).



**Figura 26.** Fiore secco e semi delle incrocio Grato I x MS9.

## 2.3 Semina

È stata realizzata nella azienda Albani-Ruggieri di Civitavecchia, i tre incroci scelti sono stati seminati in piati di germinazione, per un totale di 180 semi l'uno (Fig. 27).

Sono state portate a condizioni di pieno campo un totale di 119 piante per incrocio, disposte in sette file distanti 1,20 m, e 17 colonne distanti 1 m. l'una dell'altra (Fig. 28).

La fase di impianto della carciofaia, è stata suddivisa nell'aratura, la cui profondità è stata di 35-45 cm, con la quale sono stati interrati i concimi fosfo-potassici. Pochi giorni prima dell'impianto, sono state effettuate le lavorazioni superficiali, allo scopo di sminuzzare il

terreno e renderlo idoneo ad ospitare la coltura, i concimi azotati sono stati distribuiti in parte all'impianto ed il resto frazionato in tre successivi interventi.

La lotta alle erbe infestanti e la pratica dell'irrigazione sono state effettuate regolarmente, i risultati ottenuti nello sviluppo delle piante sono stati soddisfacenti.



**Figura 27.** Semina e germinazione dei tre incroci scelti.

## **2.4 Collezione e caratterizzazione del materiale**



**Figura 28** Parcella primo incrocio Grato I x MS 9.

Ai fini della caratterizzazione molecolare è stato scelto il primo incrocio, Grato I x MS 9, per avere un maggior numero di piante (100) sono state collezionate, prelevando porzioni delle foglie più giovani (10 g) e conservandole in azoto liquido. Le piante campionate sono state identificate con una sigla progressiva da 1 a 119 rispettando la loro posizione in campo.

## 2.5 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA per ciascun genotipo, è stata effettuata con il **DNeasy Plant Mini Kit** della **QIAGEN**. Direttamente in un tubo eppendorf da 2,0 ml. è stata omogenizzata in azoto liquido una quantità di tessuto fresco variabile da 0,1 a 0,2 g; il materiale omogeneo ottenuto realizzando la macinazione con il **Tissulyser** è lavorato con i buffer del kit. La resa di DNA ottenuta è stata soddisfacente e di buona qualità.

Il DNA estratto è stato quantificato su gel d'agarosio e con spettrofotometro, a partire dal DNA ottenuto di ciascuna delle 100 piante è stata effettuata una caratterizzazione molecolare mediante applicazione di marcatori AFLP e ISSR.

## 2.6 Analisi ISSR

L'analisi ISSR è stata condotta sulla popolazione scelta, secondo il protocollo già riportato nel capitolo III paragrafo 2.4. Sono stati utilizzati i *primer* riportati nella tabella 17 (British Columbia University).

**Tabella 17.** Sequenze dei primers ISSR e temperature di annealing ( $T_a$ ) utilizzate per le reazioni PCR.

| Primer | Sequenze 3' → 5'     | $T_a$ (°C) |
|--------|----------------------|------------|
| 810    | (GA) <sub>8</sub> T  | 43         |
| 811    | (GA) <sub>8</sub> C  | 43         |
| 812    | (GA) <sub>8</sub> A  | 44         |
| 818    | (CA) <sub>8</sub> G  | 52         |
| 834    | (AG) <sub>8</sub> YT | 45         |
| 841    | (GA) <sub>8</sub> YC | 45         |
| 847    | (CA) <sub>8</sub> RC | 54         |
| 848    | (CA) <sub>8</sub> RG | 56         |
| 855    | (AC) <sub>8</sub> YT | 52         |
| 857    | (AC) <sub>8</sub> YG | 54         |

Y= pirimidine; R=purine.

## 2.7 Analisi AFLP

L'analisi AFLP è stata condotta seguendo il protocollo già riportato nel capitolo III paragrafo 2.3. nell'amplificazione sono stati utilizzate dodici combinazioni di *primer* con 2 basi selettive, ottenute abbinando 3 *primer* Mse (MAC, MTT, MGC) e 4 Pst (PCA, PAC, PCT PCG).

## 2.8 Analisi statistica

I risultati delle reazioni di amplificazione sono stati separati mediante gel di acrilammide (6%) analizzato con il Genomix della Beckman Coulter. Dai profili di amplificazione sono state analizzate le bande per i marcatori AFLP e per gli ISSR da cui si è ottenuta una matrice dove è stato riportato se il marcatore era uguale al genotipo del genitore paterno o materno.

Per ottenere la distanza genetica fra i marcatori la matrice ottenuta è stata utilizzata nella sua totalità, per le analisi statistiche mediante il software MapMaker V 3.0 (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1993) utilizzando un LOD= 3. La distanza di ricombinazione è stata determinata usando la funzione Kosambi (Kosambi, 1944).

## 2.9 Campo di interincrocio (libera impollinazione).



**Figura 29** Impollinazione entomofila.

In una parcella sperimentale presso l'azienda della Facoltà di Agraria dell'Università della Tuscia (Viterbo), avente 6 cloni maschiofertili diversi, del tipo Romanesco (Grato 1, Grato 2, Castellamare, Colosseo, Aurelio e C3) ed un clone maschiosterile (MS 6), è stato lasciato a

libera impollinazione, essendo una specie allogama, dovuto all'asincronia tra la maturazione del polline e la recettività dello stigma (proterandria); l'impollinazione viene effettuata dalle api e dagli altri insetti pronubi che ne sono particolarmente attratti dal polline (Fig. 29).

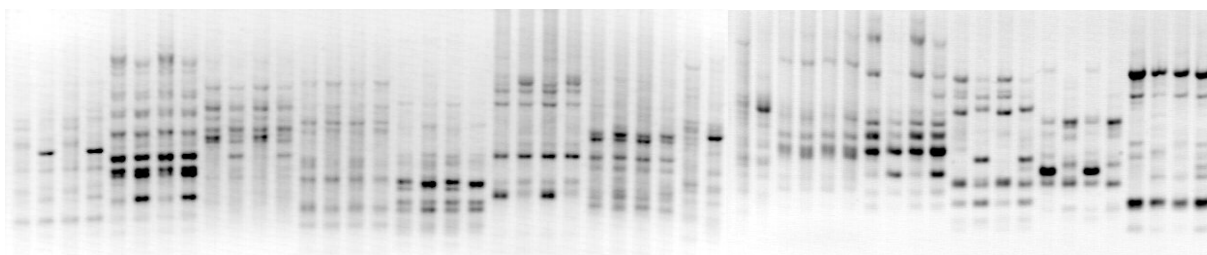
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Ai fini delle ibridazioni, l'impollinazione manuale con il pennello si è rivelata migliore rispetto alle altre metodologie provate (strofinamento del capolino, impiego di insetti pronubi). Negli incroci effettuati fra Grato I e MS 9, MS 14 e MS 16 sono stati conteggiati più di 300 semi/capolini (Tab. 16). La percentuale di germinazione è stata per ogni singolo incrocio di 70%, 97% e 96% rispettivamente.

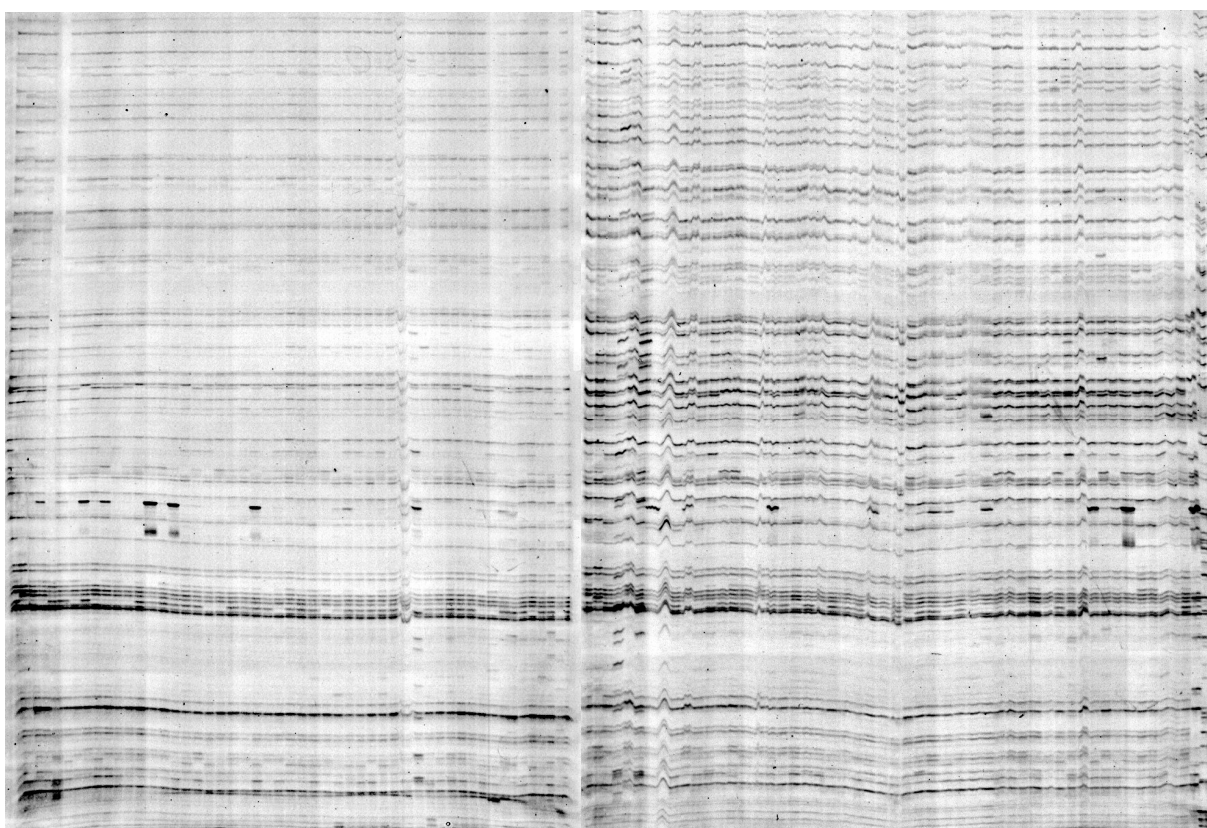
L'analisi molecolare (AFLP e ISSR) del primo incrocio (Grato I x MS9) è stata utilizzata nella sua totalità (Fig. 30, 31 e 32), per realizzare una mappa genetica preliminare mediante il software MapMaker V 3. (Fig. 33) Che in futuro sarà ampliata con l'applicazione di altri primer.



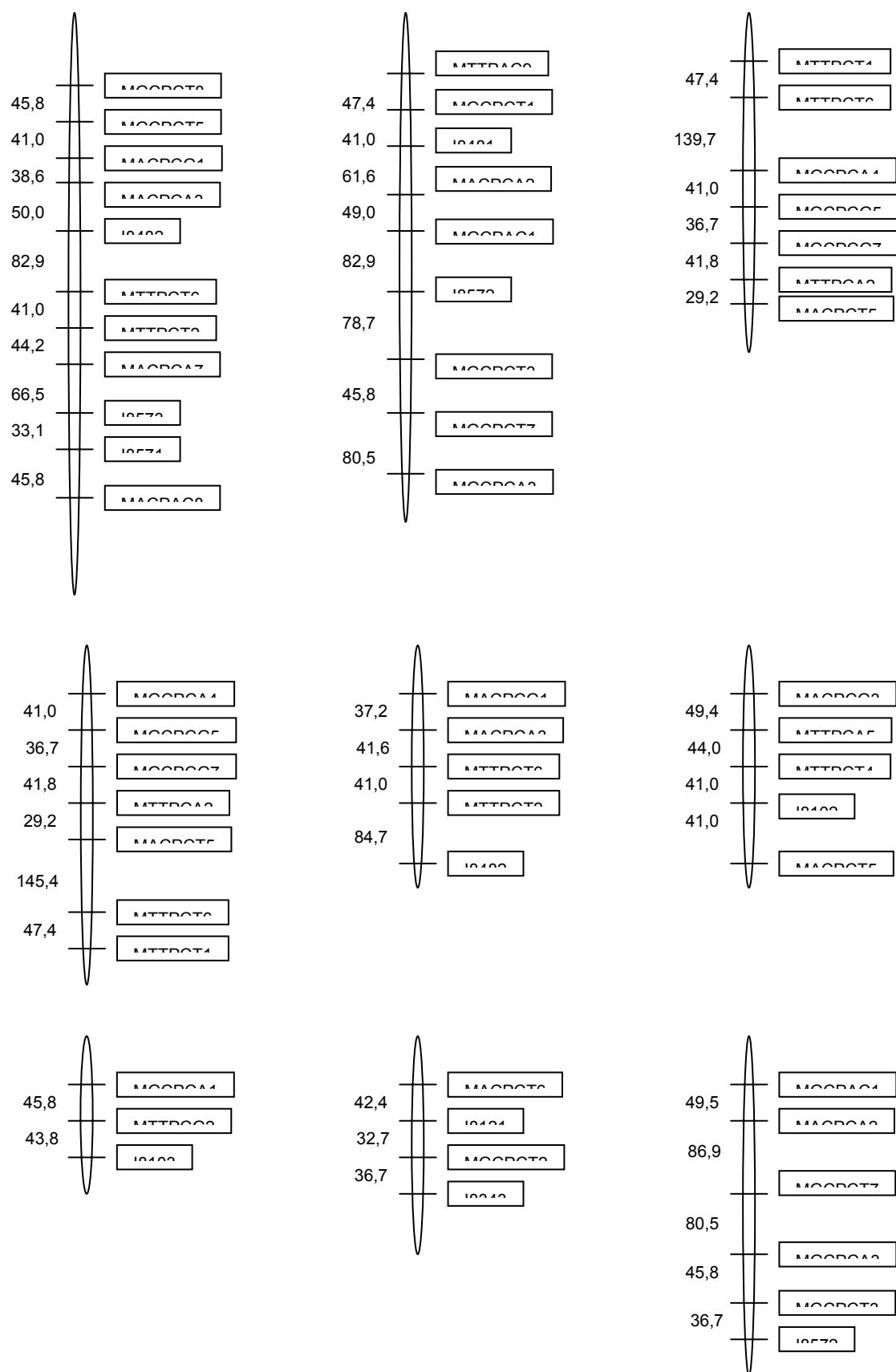
**Figura 30** Pattern elettroforetici ottenuti con le 12 combinazioni di primer AFLP sui parentali (Grato I, MS 9).



**Figura 31** Pattern elettroforetici ottenuti con i 12 primer ISSR sui parentali (Grato I, MS 9).



**Figura 32** Esempio di Pattern elettroforetico AFLP prodotto dalla combinazione MGC-PCT sulla progenie (Grato I x MS 9).



**Figura 33** Mappe di associazione ottenute con dall'analisi molecolare.

I risultati ottenuti nel campo di interincrocio a libera impollinazione sono riportati nella tabella 18 dove per ogni singola pianta, viene indicato con una lettera il capolino utilizzato nell'incrocio e il numero di semi prodotti

**Tabella 18.** Campo di interincrocio a libera impollinazione.

|                            |                            |                  |                                               |                             |                                    |                            |                             |                                               |                                    |                    |                                       |                            |                                      |                             |
|----------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Grato 1                    | Colos                      | Castel           | MS 6                                          | Colos                       | Grato 2<br>A. 11                   | MS 6                       | C3<br>A. 1                  | Grato 2<br>A. 203                             | Aurelio                            | C3<br>A. 1<br>B. 9 | Grato 1<br>A. 112<br>B. 326<br>C. 298 | Aurelio                    | Castel<br>A. 127<br>B. 145<br>C. 213 | Grato 1<br>A. 156<br>B. 102 |
| Grato 2                    | Aurelio                    | C3               | Grato 1<br>1. 44                              | Aurelio                     | Castel                             | Grato 1<br>1. 322<br>2. 98 | Colos                       | Castel<br>1. 195<br>2. 87<br>3. 135<br>4. 146 | MS 6                               | Colos              | Grato 2                               | MS 6                       | C3                                   | Grato 2                     |
| Castel<br>A. 243<br>B. 57  | MS 6                       | Colos            | Grato 2<br>A. 302<br>B. 155<br>C. 233<br>D. 2 | MS 6                        | C3                                 | Grato 2                    | Aurelio                     | C3<br>A. 10                                   | Grato 1<br>A. 45                   | Aurelio<br>A. 0    | Castel<br>A. 117<br>B. 21<br>C. 178   | Grato 1<br>A. 96<br>B. 132 | Colos                                | Castel<br>A. 162<br>B. 97   |
| C3<br>A. 2<br>B. 0<br>C. 9 | Grato 1<br>A. 34<br>B. 334 | Aurelio<br>A. 13 | Castel                                        | Grato 1<br>A. 135<br>B. 176 | Colos                              | Castel<br>A. 187           | MS 6                        | Colos                                         | Grato 2<br>A. 123<br>B. 175        | MS 6               | C3<br>A. 3<br>B. 21                   | Grato 2<br>A. 45           | Aurelio<br>A. 101<br>B. 62           | C3<br>A. 5                  |
|                            | Grato 2<br>A. 221          |                  | C3<br>A. 36                                   |                             | Aurelio<br>A. 55<br>B. 43<br>C. 72 |                            | Grato 1<br>A. 216<br>B. 345 |                                               | Castel<br>A. 102<br>B. 308<br>C. 0 |                    | Colos                                 |                            | MS 6                                 |                             |

#### 4. CONCLUSIONI

Pur avendo al momento utilizzato un numero esiguo di marcatori, sono state ottenute alcune mappe di associazione che dimostrano la validità delle popolazioni e dei metodi usati. Naturalmente nel futuro dovranno essere usati un numero maggiore di marcatori al fine di ottenere delle mappe sature da utilizzare come assistenza all'attività di miglioramento genetico e caratterizzazione del carciofo.

Inoltre, gli esperimenti effettuati hanno evidenziato come la tecnica di ibridazione e propagazione via seme del carciofo sia una tecnica percorribile, specialmente utilizzando genotipi maschiosterili, anche per la produzione industriale. Questo è di particolare rilevanza considerando che la propagazione gamica ha vantaggi sul piano pratico, economico e fitosanitario.

## **V. Analisi di materiale Risanato da virus verso Non risanato**

### **1. INTRODUZIONE**

la tecnica di propagazione *in vitro*, basata sulla proliferazione di gemme da meristemi apicali, oltre a favorire il miglioramento genetico, la rapida moltiplicazione, il facile mantenimento del germoplasma e la disponibilità di carciofaie uniformi, è utilizzata nel risanamento da virus. I virus si manifestano come ingiallimenti fogliari, ma possono rimanere anche latenti riducendo però la crescita della pianta.

Sono state analizzati con marcatori molecolari alcuni genotipi di carciofo Romanesco (viroso e risanato da virus), presenti nei campi sperimentali del Arsial di Tarquinia, appartenenti a una prova di risanamento da virus attraverso la moltiplicazione *in vitro*.

### **2. MATERIALI E METODI**

#### **2.1 Collezione e caratterizzazione del materiale**

Ai fini della caratterizzazione molecolare sono state collezionate 10 piante, appartenenti al clone Grato I, 5 viroso e 5 risanate da virus, prelevando porzioni delle foglie più giovani (10 g) e conservandole in azoto liquido. Le piante campionate sono state identificate con una sigla progressiva da 1 a 10.

#### **2.2 Estrazione del RNA**

L'estrazione del RNA per ciascun genotipo, è stata effettuata con l'**RNeasy Plant Mini Kit** della **QIAGEN**.

#### **2.3 Retrotrascrittasi per la sintesi del cDNA**

L'RNA ottenuto nella estrazione è stato sintetizzato con il kit per la retrotrascrittasi del cDNA, il cDNA ottenuto è stato quantificato su gel d'agarosio e con spettrofotometro, a partire dal cDNA ottenuto da ciascuna delle 10 piante è stata effettuata una caratterizzazione molecolare mediante l'applicazione di marcatori AFLP e ISSR.

## 2.4 Analisi ISSR

L'analisi ISSR è stata condotta sui due gruppi (Risanato – Non risanato) secondo il protocollo già riportato nel capitolo III paragrafo 2.4. Sono stati utilizzati i *primer* riportati nella tabella 19 (British Columbia University). Per ciascuno dei primer testati sono state individuate le condizioni ottimali di amplificazione PCR.

**Tabella 19.** Sequenze dei primers ISSR e temperature di annealing ( $T_a$ ) utilizzate per le reazioni PCR.

| Primer | Sequenze<br>3'→5'     | $T_a$ (°C) |
|--------|-----------------------|------------|
| 810    | (GA) <sub>8</sub> T   | 43         |
| 811    | (GA) <sub>8</sub> C   | 43         |
| 812    | (GA) <sub>8</sub> A   | 44         |
| 818    | (CA) <sub>8</sub> G   | 52         |
| 826    | (AC) <sub>8</sub> CC  | 53         |
| 834    | (AG) <sub>8</sub> YT  | 45         |
| 841    | (GA) <sub>8</sub> YC  | 45         |
| 855    | (AC) <sub>8</sub> YT  | 52         |
| 856    | (AC) <sub>8</sub> YA  | 50         |
| 857C   | (AC) <sub>8</sub> YGC | 59         |
| 857G   | (AC) <sub>8</sub> YGG | 58         |

Y= pirimidine; R=purine.

## 2.5 Analisi AFLP

L'analisi AFLP è stata condotta seguendo il protocollo già riportato nel capitolo III paragrafo 2.3. Nell'amplificazione sono stati utilizzate dodici combinazioni di *primer* con 2 basi selettive, ottenute abbinando 3 *primer* Mse (MAC, MTT, MGC) e 4 Pst (PCA, PAC, PCT PCG).

## 2.6 Analisi statistica

I risultati delle reazioni di amplificazione sono stati separati mediante gel di acrilammide (6%) analizzato con il Genomix della Beckman Coulter. Dai profili di amplificazione sono state analizzate le bande per i marcatori AFLP e per gli ISSR da cui si è ottenuta una matrice 0 e 1, attribuendo 0 all'assenza ed 1 alla presenza della banda.

La matrice ottenuta è stata utilizzata nella sua totalità, considerando solo i marcatori AFLP o considerando solo i marcatori ISSR per le analisi statistiche, applicando il *software* GDA (Lewis e Zaykin, 1996). Si è così ottenuta la stima della variabilità genetica fra ed entro popolazioni, il livello di eterozigotità attesa e le distanze genetiche (Nei, 1972) fra le popolazioni da cui poi si sono ottenuti i dendrogrammi (Fig. 34) di similarità genetica usando la metodologia UPGMA.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

**Tabella 20** Correlazione fra marcatori e funzione genomica dell'analisi discriminante.

| Marcatore  | Funzione |
|------------|----------|
|            | 1        |
| i855(a)    | ,667     |
| MAC-PCT(a) | ,660     |
| 857G(a)    | -,523    |
| i818(a)    | ,422     |
| MAC-PCA(a) | -,399    |
| MAC-PAC(a) | ,377     |
| MTT-PCG(a) | ,374     |
| i810(a)    | ,277     |
| i826(a)    | ,255     |
| 857C(a)    | ,251     |
| i856(a)    | ,249     |
| i841(a)    | -,226    |
| MAC-PCG    | -,208    |
| i834(a)    | ,199     |
| i812(a)    | -,181    |
| MTT-PCA    | ,176     |
| MTT-PAC    | ,151     |
| i811(a)    | -,116    |
| MTT-PCT    | ,073     |
| MGC-PCA    | ,068     |
| MGC-PCT    | -,059    |
| MGC-PAC    | ,047     |
| MGC-PCG(a) | -,019    |

**Tabella 21** Correlazione totale fra i due gruppi (Virosate e Risanate da virus).

| Gruppo   | Funzione |
|----------|----------|
|          | 1        |
| Virosate | 4,414    |
| Risanate | -5,517   |

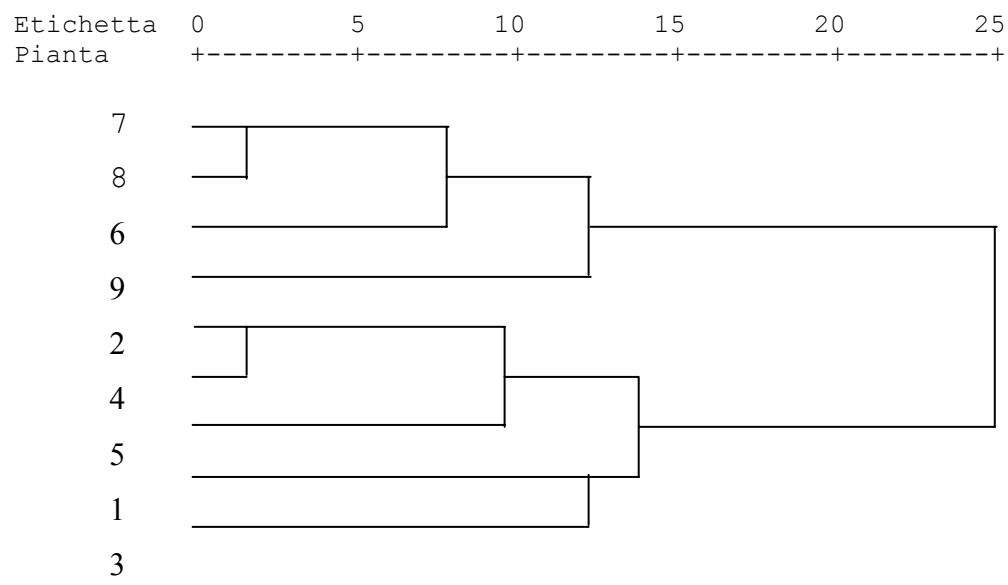
La Tabella 20 indica quanto ciascun marcatore contribuisce alla funzione che discrimina fra i due gruppi (Virosate e Risanate da virus). La tabella 21 indica la correlazione totale ottenuta con tutti i marcatori utilizzati.

I risultati ottenuti evidenziano una marcata differenza fra i due gruppi analizzati (Fig. 35), in particolare il gruppo delle piante virosate ha un numero di bande maggiore del gruppo della piante risanate de virus, ad indicare un maggior numero di geni attivi nel primo gruppo.

Si sono evidenziate anche differenze, in termine di numero di bande, anche al interno di ciascun gruppo, questo è dovuto a differenze ambientali fra le piante dello stesso clone che provocano l’attivazione di geni differenti.

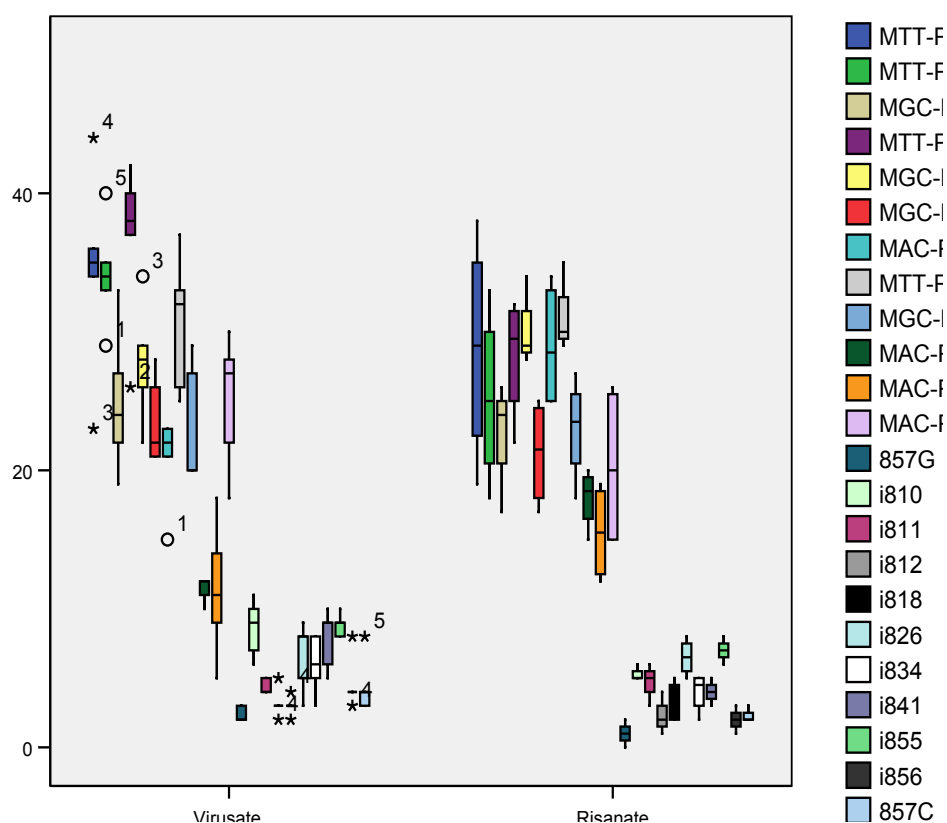
Si sono anche individuate alcune bande (Fig 36) presenti in tutte le piante del gruppo risanato da virus ed assenti in tutte quelle del gruppo virosato, indicando l’attivazione di un possibile gene che agisce nel sistema di resistenza al virus.

**Figura 34.** Dendrogramma di distanza genetica ottenuto mediante l’indice di Nei (1972).

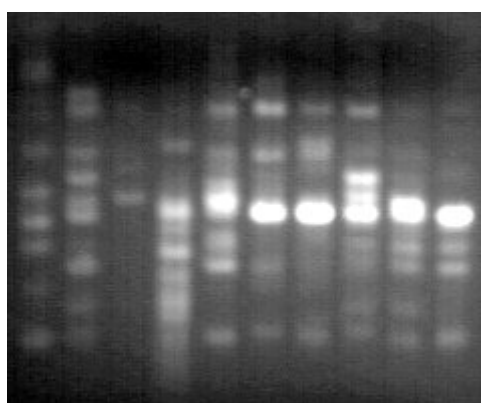


**Tabella 22** Raggruppamenti ottenuti in base all’analisi molecolare impostando il numero di cluster a 2,3 o 4.

| Campione | 4 cluster | 3 cluster | 2 cluster |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 1        | 1         | 1         | 1         |
| 2        | 2         | 2         | 1         |
| 3        | 1         | 1         | 1         |
| 4        | 2         | 2         | 1         |
| 5        | 2         | 2         | 1         |
| 6        | 3         | 3         | 2         |
| 7        | 3         | 3         | 2         |
| 8        | 3         | 3         | 2         |
| 9        | 4         | 3         | 2         |



**Figura 35** Distribuzione del numero di bande per i diversi marcatori fra i due gruppi (Virusate e Risanate da virus).



**Figura 36** Banda di cDNA ottenuta con l'amplificazione del primer ISSR 826, presente solo nel gruppo risanato da virus.

#### 4. CONCLUSIONI

Le correlazioni fra i due marcatori e i raggruppamenti ottenuti in base all'analisi molecolare (Tab. 22) evidenziando un'ampia differenza fra i due gruppi, che indicano una forte componente immunologica nell'attivazione di geni.

## **VI. Analisi della variabilità genetica e morfologica tra 25 cloni di Carciofo Romanesco collezionate (selezionate) nel Lazio.**

### **1. INTRODUZIONE**

Nel presente esperimento si è voluto collezionare per conservare e caratterizzare i genotipi di carciofo romanesco ancora presenti nelle aziende laziali, come una strategia per preservare la variazione genetica esistente negli ecotipi locali, i quali rappresentano un'importante risorsa genetica disponibile, essendo una fonte di geni utili nel presente per miglioramenti genetici futuri. Recentemente molte aziende cinearicole italiane hanno sostituito i loro ecotipi con un solo clone commerciale di tipo "Romanesco" chiamato "C3", creando un rischio conseguente di erosione di variabilità genetica.

La diffusione di un singolo clone come detto, rende più vulnerabile la cinaricoltura regionale che non può competere per precocità con le produzioni del Sud d'Italia, questa situazione ha portato a una notevole riduzione dei campi coltivati con le altre varietà commerciali ed ecotipi locali (quali. Castellamare, Grato, Campagnano), con conseguente erosione genetica. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare alcuni ecotipi di carciofo Romanesco reperiti in aziende laziali, per una futura salvaguardia della biodiversità esistente.

### **2. MATERIALI E METODI**

Il presente esperimento di analisi molecolare è stato realizzato sui 25 cloni di carciofo del campo catalogo dell'Arsial di Tarquinia, i quali sono stati collezionati in diverse località della regione Laziale. A differenza della metodologia di campionamento eseguita per l'esperimento riportato nel capitolo III (Analisi della variabilità genetica in popolazioni di *Cynara cardunculus* Var. *Scolymus* mediante la caratterizzazione molecolare di ecotipi di carciofo romanesco nel Lazio) in questo caso i genotipi raccolti sono stati selezionati cercando di collezionare le diverse tipologie presenti nel campo basandosi su caratteristiche morfologiche. Ogni genotipo è stato propagato in vitro per ottenere 18 piante valutate nel campo sperimentale dell'Arsial Tarquinia ponendo le piante in un sesto 70X70 cm.

Per verificare che le piante di ciascuna parcella appartenessero effettivamente allo stesso clone sono state analizzate utilizzando 3 marcatori molecolari ISSR (810,834 e 841) per dopo realizzare la prova completa di analisi molecolare fra i 25 cloni del campo catalogo..

## 2.1 Collezione e caratterizzazione del materiale

Ai fini della caratterizzazione molecolare sono stati raccolti per una prova preliminare, le 18 piante appartenenti un singolo clone, successivamente sono stati raccolti 1 pianta per ogni singola parcella.

Sono state collezionate, prelevando porzioni delle foglie più giovani (10 g.) e conservandole in azoto liquido. Le piante campionate sono state identificate con una sigla progressiva da 1 a 25 specificando la sua posizione al interno di ogni parcella.

## 2.2 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA per ciascun genotipo, è stata effettuata con il **DNeasy Plant Mini Kit** della **QIAGEN**. Direttamente in un tubo eppendorf da 2,0 ml. è stata omogenizzata in azoto liquido una quantità di tessuto fresco variabile da 0,1 a 0,2 g; il materiale omogeneo ottenuto realizzando la macinazione con il **Tissulyser** è lavorato con i buffer del kit, la resa di DNA ottenuta è alta è pulita.

Il DNA estratto è stato quantificato su gel d'agarosio e con spettrofotometro, a partire dal DNA ottenuto di ciascuna delle 100 piante è stata effettuata una caratterizzazione molecolare mediante applicazione di marcatori AFLP e ISSR.

## 2.3 Analisi AFLP

L'analisi AFLP è stata condotta seguendo il protocollo già riportato nel capitolo III paragrafo 2.3.

Nell'amplificazione sono state utilizzate nove combinazioni di *primer* con 2 basi selettive, ottenute abbinando 3 *primer* Mse (MAC, MTT, MGC) e 3 Pst (PCA, PAC, PCT).

## 2.4 Analisi ISSR

L'analisi ISSR è stata condotta sulla popolazione scelta, secondo il protocollo già riportato nel capitolo III paragrafo 2.4. Sono stati utilizzati i *primer* riportati nella tabella 23 (British Columbia University). Per ciascuno dei primer testati sono state individuate le condizioni ottimali di amplificazione PCR.

**Tabella 23** Sequenze dei primers ISSR e temperature di annealing ( $T_a$ ) utilizzate per le reazioni PCR.

| Primer | Sequenze<br>3' → 5'   | $T_a$ (°C) |
|--------|-----------------------|------------|
| 810    | (GA) <sub>8</sub> T   | 43         |
| 811    | (GA) <sub>8</sub> C   | 43         |
| 826    | (AC) <sub>8</sub> CC  | 53         |
| 834    | (AG) <sub>8</sub> YT  | 45         |
| 841    | (GA) <sub>8</sub> YC  | 45         |
| 855    | (CA) <sub>8</sub> RC  | 54         |
| 857C   | (AC) <sub>8</sub> YGC | 59         |
| 857G   | (AC) <sub>8</sub> YGG | 58         |

Y= pirimidine; R=purine.

## 2.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è riportata nel capitolo III paragrafo 2.5.

## 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

### 3.1 Correlazioni altamente significative fra caratteristiche morfologiche (dati primo e secondo anno 2004-2005)

Numerose sono le correlazioni fra le diverse caratteristiche morfologiche rilevate (oltre a quelle già constatate e trasformate in nuove variabili, per esempio rapporto H/D sostituisce diametro capolino e sua altezza) (Tab. 24).

Riguardo alla variabile H/D è molto strano che essa non sia consistente fra i due anni, anzi la correlazione fra H/D 2004 e H/D2005 è molto bassa (0.09). Ci si aspetterebbe che ciascun clone sia molto stabile per il rapporto HD che identifica la tipologia del capolino. Questa differenza fra i due anni potrebbe essere dovuta al fatto che le medie per clone nei due anni sono state fatte fra piante differenti, ma anche in questo caso il carattere sembra troppo influenzato dall'ambiente, mentre dovrebbe essere uno dei caratteri distintivi del "tipo".

**L'altezza della pianta** è consistente fra i due anni ( $R=0.93$ ), inoltre è un carattere facilmente rilevabile. È significativamente correlato (positivamente) con importanti caratteristiche di "buona" produzione (Peso cimarolo  $r=0.8$ ), ma non con il numero di commerciali ( $r=-0.7$ ), è inoltre correlato positivamente con la precocità (più la pianta è alta più è tardiva).

Selezionando per questo “facile” carattere (piante alte) si porterebbe selezionare per grossi cimaroli e piante tardive anche se questo va a discapito della produzione (peso e numero) dei capolini secondari (economicamente meno importanti).

| <b>Correlazioni altamente significative fra caratteristiche morfologiche (dati primo e secondo anno 2004-2005)</b> |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Altezza pianta2004 = Altezza pianta2005                                                                            | 0.93  |
| Altezza pianta2004 = N. commerciali 2005                                                                           | -0.68 |
| Altezza pianta2005 = N. commerciali 2005                                                                           | -0.75 |
| Altezza pianta2004 = peso Cimaroli2004                                                                             | 0.87  |
| Altezza pianta2005 = peso Cimaroli2004                                                                             | 0.73  |
| Altezza Pianta2004 = precocità2005                                                                                 | 0.88  |
| Altezza Pianta2004 = precocità2004                                                                                 | 0.88  |
| Altezza Pianta2005 = precocità2004                                                                                 | 0.88  |
| Altezza Pianta2005 = precocità2005                                                                                 | 0.90  |
| Precocità2004 = Precocità2004                                                                                      | 0.94  |
| Precocità2004 = Peso cimarolo2004                                                                                  | 0.85  |
| Precocità2005 = Peso cimarolo2004                                                                                  | 0.80  |
| Precocità2004 = Rapporto H/D2004                                                                                   | 0.60  |
| Precocità2005 = Rapporto H/D2004                                                                                   | 0.65  |
| Precocità2004 = N. commerciali 2005                                                                                | -0.67 |
| Precocità2005 = N. commerciali 2004                                                                                | -0.78 |
| N. commerciali 2004 = N. commerciali 2005                                                                          | 0.62  |
| Peso cimarolo2004 = Acaffei                                                                                        | -0.75 |
| Peso cimarolo2004 = Clorogen                                                                                       | -0.63 |
| Peso cimarolo2004 = Ddicafei                                                                                       | 0.69  |
| Peso cimarolo2005 = Ddicafei                                                                                       | 0.73  |
| Altezza Pianta 2004 = sacarosi                                                                                     | -0.63 |
| Altezza Pianta 2004 = Acaffei                                                                                      | -0.75 |
| Altezza Pianta 2005 = inulina                                                                                      | -0.69 |
| Altezza Pianta 2005 = Acaffei                                                                                      | -0.63 |
| Altezza Pianta 2005 = ADicafei                                                                                     | 0.62  |
| Altezza Pianta 2005 = Ddicafei                                                                                     | 0.67  |
| Precocità 2004 = Acaffei                                                                                           | -0.76 |
| Precocità 2005 = Acaffei                                                                                           | -0.62 |
| Precocità 2004 = Clorogen                                                                                          | -0.76 |
| Precocità 2005 = Clorogen                                                                                          | -0.64 |
| Precocità 2004 = ADicafei                                                                                          | 0.79  |
| Precocità 2005 = ADicafei                                                                                          | 0.80  |
| Precocità 2004 = Ddicafei                                                                                          | 0.73  |
| Precocità 2005 = Ddicafei                                                                                          | 0.68  |
| Peso cimarolo2005 = Bcaffei                                                                                        | 0.76  |

**Tabella 24** Correlazioni altamente significative fra caratteristiche morfologiche (dati primo e secondo anno 2004-2005).

**La precocità:** le piante più precoci lo sono in entrambi gli anni, ma oltre ad essere più basse hanno cimaroli più piccoli e leggeri anche se il numero dei capolini commerciali è più alto. Quindi le piante precoci entrano prima in produzione (sul mercato), ma producono cimaroli più piccoli. In termini di vantaggio economico bisognerebbe sapere: (i) che differenza di prezzo c'è fra i commerciali ed il cimarolo (negli anni), (ii) le differenze di prezzo temporali fra il periodo di produzione “precoco” e quello “tardivo”, (iii) i costi di raccolta del singolo cimarolo e dei “tanti” commerciali. Si potrebbe concludere che la “corsa” alla precocità sia non giustificabile. Anche se i tipi più precoci hanno i capolini più globosi (H/D).

Per quanto riguarda le caratteristiche di “**qualità**”:

Le piante alte hanno meno contenuto in acidi Caffeï, in saccarosio, ma più Ddicafeï.

Le piante più precoci hanno più acido clorogenico e Caffeï, ma meno acidi dicafeï.

Tutte le variabili sono in qualche modo correlate fra di loro.

### **3.2 Raggruppamento dei cloni sulla base di differenti caratteristiche morfologiche e qualitative.**

#### **3.2.1 Cluster utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno, e caratteristiche qualitative.**

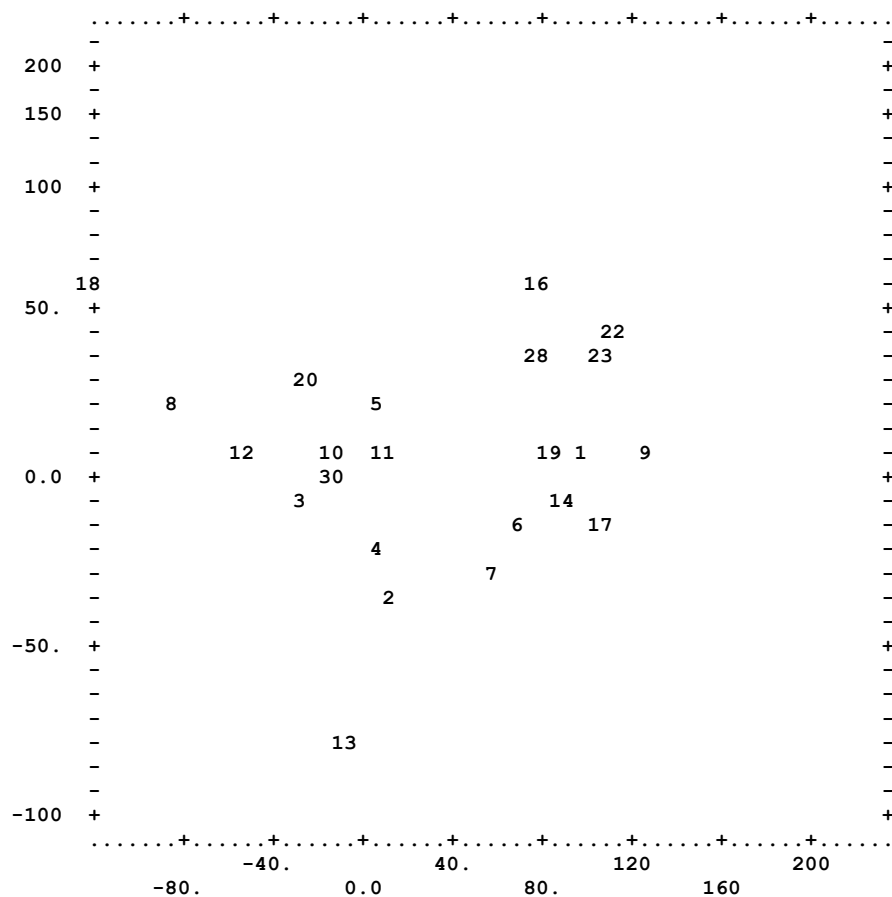
Divedendo i cloni in 10 cluster in base alle caratteristiche morfologiche di due anni(2004-5) si ottengono i raggruppamenti riportati nella tabella 25.

| Cluster | Cloni         | Cluster | Cloni         |
|---------|---------------|---------|---------------|
| 1       | 18 C3 Tardivo | 6       | 16 C3 mutante |
| 2       | 13 Au13       |         | 22 Cast Au    |
| 3       | 5 Sermo 2     |         | 23 Au 12      |
|         | 10 Col 2      | 7       | 3 Pont6       |
|         | 11 Cast 3     | 8       | 4 Sermo 1     |
| 4       | 2 Pont 5      |         | 20 Cast7Au    |
|         | 15 cast 8     | 9       | 30 Pont 2     |
|         | 28 Sezze3     |         | 17 C3 Precoce |
| 5       | 1 Pont        | 10      | 19 cast 5     |
|         | 8 Camp 1      |         | 9 Col 1       |
|         | 12 Camp 2     |         | 6 Sezze 4     |
|         |               |         | 7 Sezze 6     |

**Tabella 25** Cluster utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno.

Come visto anche in precedenti analisi i raggruppamenti non sono strettamente connessi alle località di raccolta, questo è dovuto, probabilmente, sia alla grande variabilità presente entro sito di raccolta (che a volte è maggiore di quella riscontrata fra siti di raccolta (Pagnotta et al., 2004) che al fatto che il materiale non è stato collezionato seguendo un campionamento casuale, ma è stato scelto (selezionato) sulla base di caratteristiche morfologiche. Si ha una leggera divisione per ecotipo (Campagnano vs castellamare) dovuta, probabilmente, più ad una similitudine fra i due Campagnano inclusi che non fra i castellamare. I 3 cloni provenienti dal C3 si raggruppano in cluster differenti.

I numeri riportati nel grafico 37 corrispondono al numero del Clone.



**Figura 37** Analisi delle coordinate principali: rappresentazione delle relazioni morfologiche del I (2004) e del II (2005) anno dei 25 cloni.

Il clone 18 C3 Tardivo si colloca fuori Plot, quindi distanti da tutti gli altri.

I due cloni Campagnano (8 e 12) come i due Sezze (6 e 7) sono raggruppati nella stessa cluster, mentre i cloni delle altre “provenienze” sono distribuiti nelle diverse clusters.

Alcuni dei cloni di Castellamare (11 e 15) sono i più simili al clone C3 precoce.

Da tener presente che le variabili che meglio clasterizzano (più uniformi entro cluster e difforni fra cluster) sono: Peso cimarolo<sup>2004</sup>, Peso primario<sup>2004</sup>, Precocità<sup>2004</sup>.

### 3.2.2 Cluster utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno, e caratteristiche qualitative:

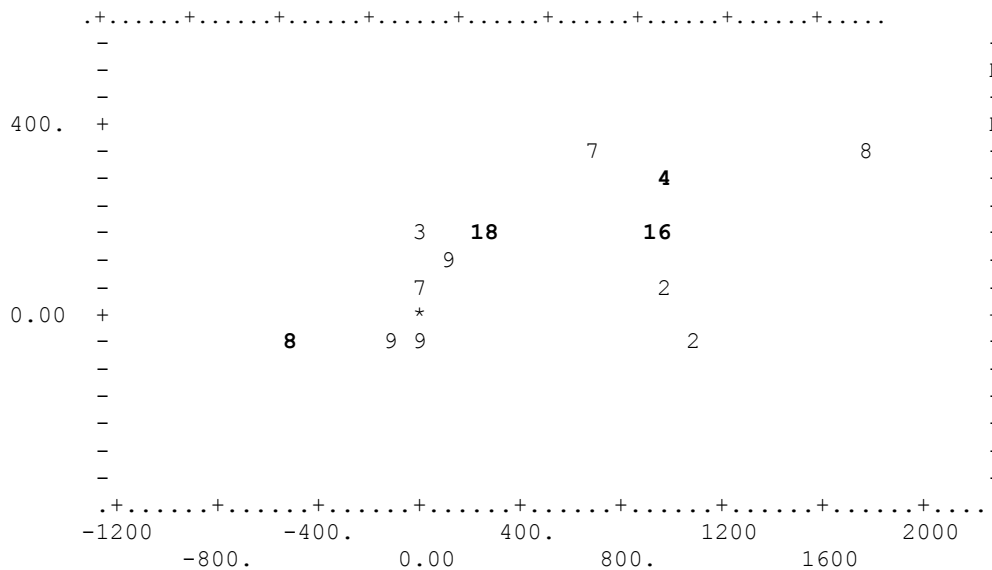
Divedendo i cloni in 10 cluster in base alle caratteristiche morfologiche di due anni(2004-5) e qualitativi si ottengono i raggruppamenti riportati in Tabella 26.

**Tabella 26** Cluster utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno e caratteristiche qualitativi.

| Cluster | cloni                                           | Cluster | Cloni                                            |
|---------|-------------------------------------------------|---------|--------------------------------------------------|
| 1       | 13 Au13<br>19 cast 5                            | 6       | 8 Camp 1                                         |
| 2       | 15 cast 8<br>30 Pont 2<br>11 Cast 3<br>2 Pont 5 | 7       | 17 C3 Precoce<br>22 Cast Au<br>9 Col 1           |
| 3       | 1 Pont<br>28 Sezze3                             | 8       | 6 Sezze 4<br>7 Sezze 6                           |
| 4       | 23 Au 12                                        | 9       | 10 Col 2<br>12 Camp 2<br>5 Sermo 2<br>20 Cast7Au |
| 5       | 18 C3 Tardivo                                   | 10      | 4 Sermo 1<br>16 C3 mutante<br>3 Pont6            |

Risultati leggermente differenti della cluster con solo morfologici. Differenza più significativa la divisione dei due cloni Campagnano (8 e 12).

I numeri riportati nella figura 38 in grassetto corrispondono al numero del Clone, mentre quelli non in grassetto corrispondono al numero del cluster.



**Figura 38** Analisi delle coordinate principali: rappresentazione delle relazioni morfologiche del I (2004) e del II (2005) anno e caratteristiche qualitativi dei 25 cloni.

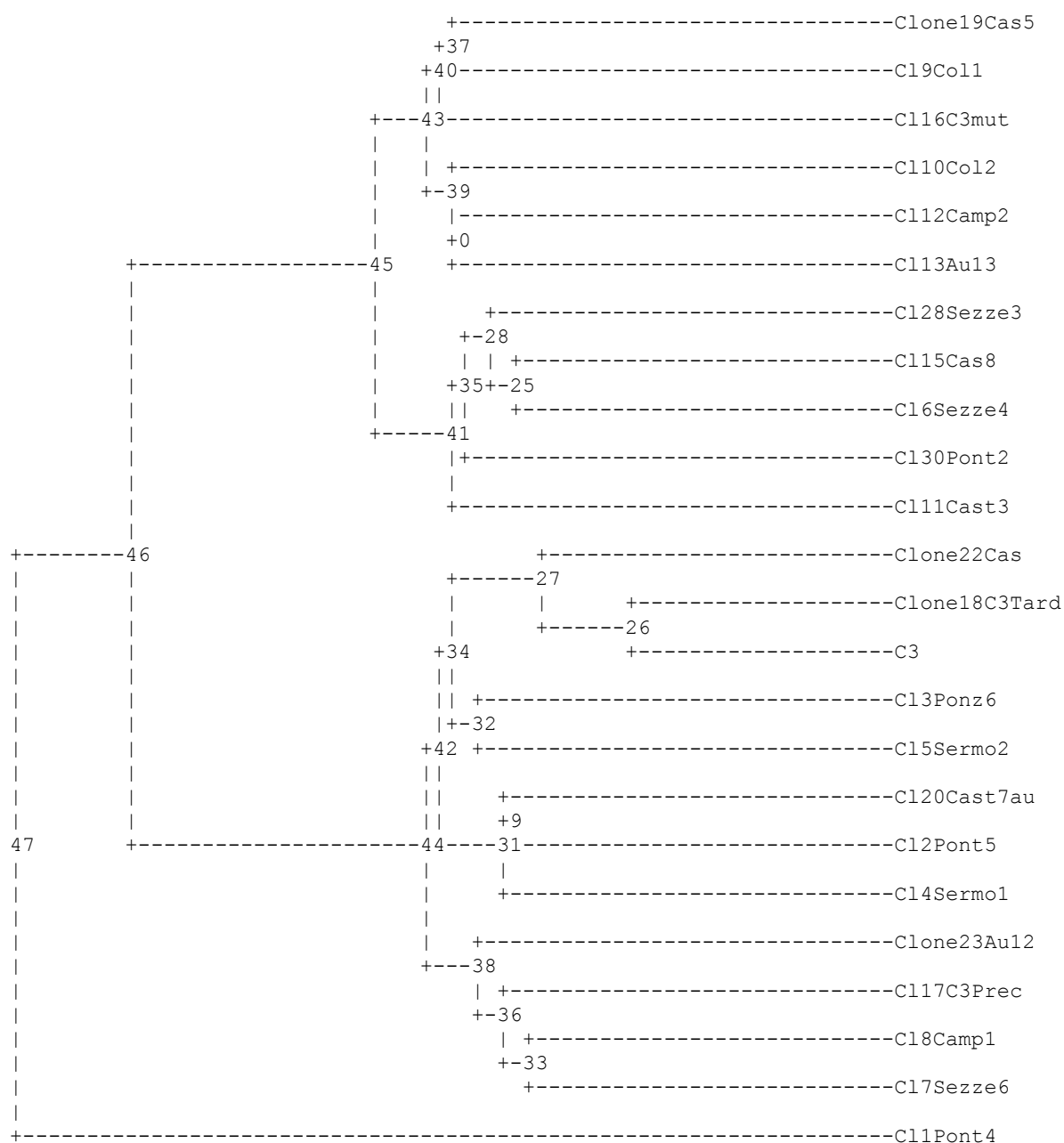
### 3.2.3 Cluster utilizzando Marcatori Molecolari AFLP e ISSR (GDA)

Totale di 159 loci analizzati. Dendrogramma basato sulle distanze genetiche (Nei, 1972) fra i diversi cloni. (Fig. 39)

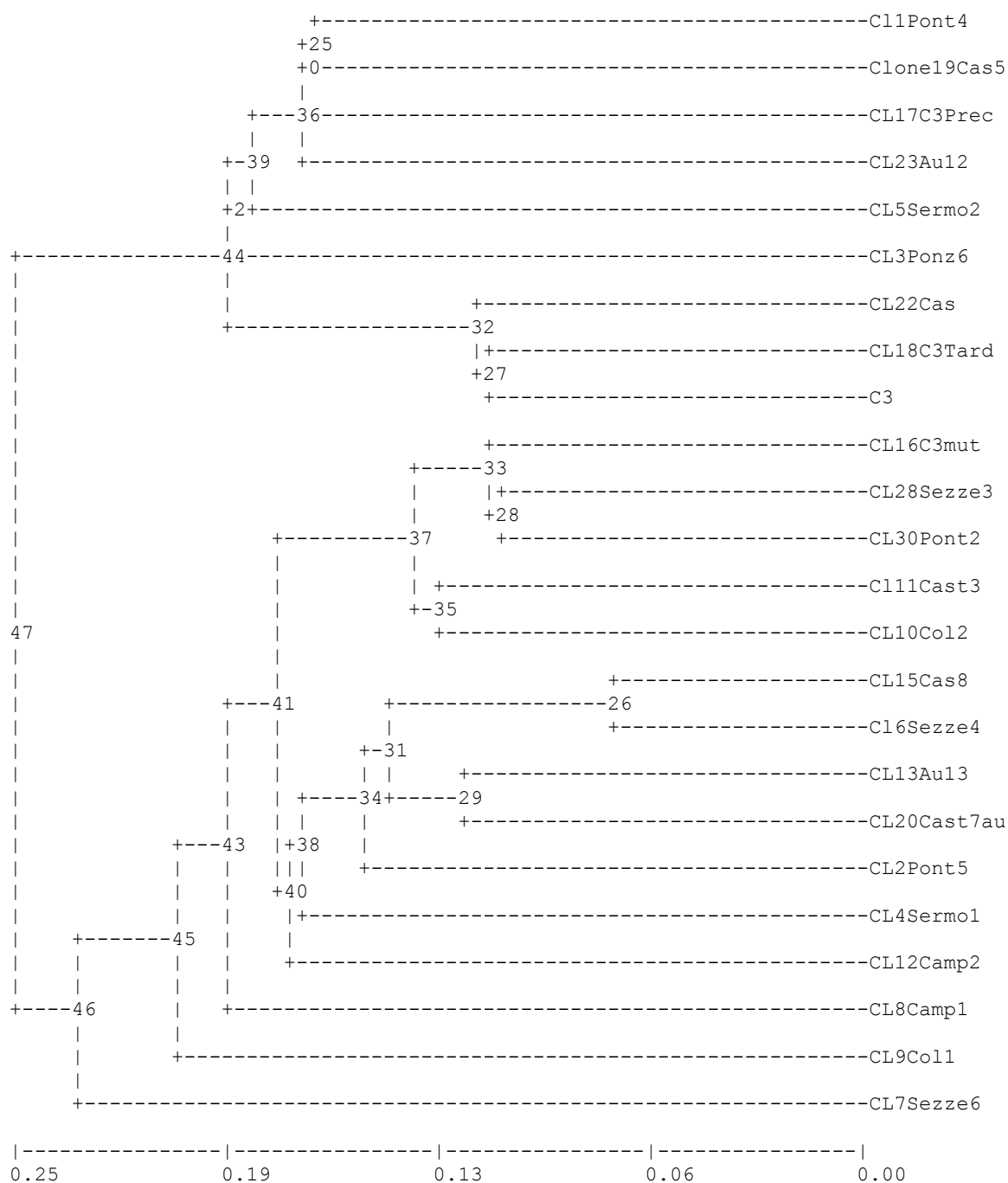
Si possono identificare due grossi raggruppamenti, uno con: CL1Pont4, Clone19Cas5, CL9Col1, CL16C3mut, CL12Camp2, CL13Au13, CL10Col2, CL28Sezze3, CL15Cas8, CL6Sezze4, CL30Pont2 e CL11Cast3; ed un altro con: CL22Cas, CL18C3Tard, C3, CL3Ponz6, CL5Sermo2, CL20Cast7au, CL2Pont5, CL4Sermo1, CL23Au12, CL17C3Prec, CL8Camp1 e CL7Sezze6.

I cloni nei due raggruppamenti non sono assimilabili ne per località di raccolta, ne per ecotipo (Campagnano vs castellamare) questo è dovuto, probabilmente, sia alla grande variabilità presente entro sito di raccolta (che a volte è maggiore di quella riscontrata fra siti di raccolta (Pagnotta et al., 2004)) che al fatto che il materiale non è stato collezionato seguendo un campionamento casuale, ma è stato scelto (selezionato) sulla base di caratteristiche morfologiche

Se si effettua l'analisi con solo i loci ottenuti da amplificazioni AFLP (73 loci), si ottiene un dendrogramma delle distanze genetiche leggermente differente come si evidenzia dalla figura 40.



**Figura 39** Dendrogramma basato sulle distanze genetiche (Nei, 1972) fra i diversi cloni, utilizzando marcatori molecolari AFLP e ISSR (159 Loci).



**Figura 40** Dendrogramma basato sulle distanze genetiche (Nei, 1972) fra i diversi cloni, utilizzando marcatori molecolari AFLP (73 Loci).

Anche utilizzando solo dati AFLP le tre varianti del clone C3 si raggruppano allo stesso modo, i.e. C3 tardivo vicino al C3 standard con il C3 precoce nella stessa cluster, ma più distante. Il C3 mutato, come atteso, si colloca in altro gruppo.

Il polimorfismo presente nei diversi cloni è differente andando dal S. Erasmo che appare molto uniforme al clone C3 con un polimorfismo del 47%. È da notare che essendo presente solo un genotipo entro popolazione (clone) il polimorfismo indica una differenza presenza assenza fra le diverse bande più che una differenza reale entro clone.

### 3.3 Analisi dei principali componenti, utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno, e caratteristiche qualitative.

3 componenti spiegano il 77% della variabilità

| 1° componente<br>(47%)                                                                          | 2° componente<br>(17%)                       | 3° componente<br>(13%)                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|
| glucosio<br>precA<br>pesocimA<br>precB<br>Acafeei<br>hplantA<br>hplantB<br>Ddicafei<br>RapHDciB | pesopriB<br>Bcafeei<br>inulina -<br>pesopriA | pesocim<br>ncommA<br>nprimB<br>ncommB |

#### 3.3.1 Analisi dei principali componenti, utilizzando dati morfologici del I (2004) e del II (2005) anno, caratteristiche qualitative e Marcatori più significativi.

Glucosio = 810/2 0.91  
 Fruttosio = TTCT/21 0.84  
               TTAC/19 -0.72  
 Precocità 811/9 0.86  
 H/D CIM TTCT/23 0.81  
               TTCT/26 0.81  
               TTAC/19 -0.81

3 componenti spiegano il 69% della variabilità

| 1° componente<br>(34%) | 2° componente<br>(20%) | 3° componente<br>(13%) |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| 834A1                  | TTCTA13                | RapHDciB               |
| 834A2                  | TTCTA23                | Bcaffei                |
| 834A8                  | TTCTA26                | pesopriB               |
| 834A16                 | TTACA19                | Ddicafei               |
| 811A3                  | RapHDciA               | inulina                |
| 811A14                 | pesocimB               | hplantB                |
| 811A15                 | ncommB                 | hplantA                |
| TTACA3                 | fruttosio              | pesopriA               |
| Saccarosi              | ncommA                 | 810A7                  |
| 834A27                 |                        | TTCTA21                |
| ADicafei               |                        | pesocimA               |
|                        |                        | TTCTA15                |

### 3.4 Regressione Stepwise fra caratteristica morfologica e Marcatori molecolari che hanno mostrato correlazione positiva con caratteri morfologici.

La regressione StepWise ottenengono le seguenti equazioni:

$$\text{Clorogen} = 481.29 - 120.33 \text{ 811/9} - 31.50 \text{ TTCT/1} - 51.28 \text{ TTCT/13} + 64.67 \text{ TTCT/21}$$

$$\text{Inulina} = 1967.5 + 1180 \text{ 810/4} + 889.25 \text{ 810/10} - 1969.42 \text{ TTCT/15}$$

$$\text{Saccarosio} = 451 + 13 \text{ 810/4} - 191.25 \text{ 834/1} - 66.25 \text{ 841/14} + 161.25 \text{ 811/9} + 20.5 \text{ TTCT/8} - 84 \text{ TTCT/32} - 62.75 \text{ TTAC/6}$$

$$\text{Fruttosio} = 72.07 \text{ 126.56 TTCT/21} + 57.74 \text{ TTCT/32}$$

$$\text{Glucosio} = 755.5 - 206.79 \text{ 810/2}$$

$$\text{Precocità (Tardività) 2004} = -4.48 + 0.27 \text{ 810/4} + 3.38 \text{ 810/7} + 7.27 \text{ 811/9} - 0.20 \text{ 841/14} + 4.02 \text{ TTCT/13} - 0.08 \text{ TTCT/21} + 2.70 \text{ TTAC/19}$$

$$\text{Precocità (Tardività) 2005} = -0.77 + 2.57 \textbf{810/7} + 1.06 \text{811/3} + 2.02 \textbf{811/9} + 2.71 \textbf{TTCT/13} - 1.3 \text{TTCT/23}$$

$$\text{AltezzaP 2004} = 68.79 - 1.71 \text{810/4} - 36.81 \text{810/10} - 0.27 \text{TTCT/13} + 38.43 \text{TTCT/15} - 8.01 \text{TTCT/21} + 10.32 \text{TTAC/6} + 1.44 \text{TTAC/19}$$

$$\text{Altezza P 2005} = 37.86 + 15.64 \text{810/7} + 10.61 \text{811/9}$$

$$\text{PesoCim2004} = 289.93 + 2154 \text{810/7} - 71.47 \text{810/10} + 84.35 \text{834/27} - 19.90 \text{811/2} + 179.23 \text{TTCT/15} - 136.56 \text{TTCT/19} + 48.44 \text{TTCT/21}$$

$$\text{PesoCim2005} = 313.03 - 25.79 \text{810/4} - 49.55 \text{TTCT/13} + 41.83 \text{TTCT/15}$$

$$\text{Rapport H/D} = 0.79 + 0.14 \text{TTCT/23} - 0.07 \text{TTCT/32}$$

Questa regressione hanno tutte un alta significatività indicano la possibilità di avere alcuni marcatori che possono dare un indicazione su caratteristiche morfologiche utili nella selezione dei cloni. Per il carattere Precocità (Tardività) alcuni dei marcatori (segnati in grassetto) sono presenti nelle regressioni dei due anni, mentre per gli altri due caratteri i marcatori che entrano nelle regressioni sono sempre differenti indicando una forte componente ambientale nell'attivazione di geni.

#### 4. CONCLUSIONI

Più le piante sono alte, più hanno cimarioli grossi, più sono tardive e più componenti hanno, più sono tardive più il carciofo è oblungo (alto H/D).

Riguardo alla variabile H/D è molto strano che essa non sia consistente fra i due anni, anzi la correlazione fra H/D 2004 e H/D2005 è molto bassa (0.09). Ci si aspetterebbe che ciascun clone sia molto stabile per il rapporto HD, che identifica la tipologia del capolino.

I cloni sono molto variabili per le caratteristiche rilevate.

Non vi è **netta** corrispondenza fra luogo di collezione del clone e suo raggruppamento (sia dati molecolari che morfologici come medie e come dato per pianta) questo principalmente per l'alta variabilità presente all'interno delle popolazioni (aziende) dove si sono collezionati i

cloni e la scelta non casuale dei cloni che sono non dei campioni della popolazione, ma delle selezioni entro popolazioni.

Si raggruppano assieme Sezze 6 e 7; Camp 8 e 12

Si ha una *leggera* divisione per ecotipo (Campagnano vs castellamare).

Il clone 18 C3 Tardivo si colloca distante da tutti gli altri.

Tre componenti principali spiegano il 77% della variabilità riscontrata: la precocità, il peso del cimarlo e l'altezza della pianta.

Alcuni marcatori (bande) sono correlati (anche con altissima significatività) con caratteristiche morfologiche e qualitative. Sono quindi, dopo ulteriore verifica, utilizzabili nella selezione del materiale.

Le caratteristiche morfologiche sono correlate fra loro e questo fa sì che è possibile scegliere caratteristiche più facilmente misurabili per avere indicazioni del comportamento del materiale per altre caratteristiche.

Anche se i caratteri morfologici misurati sono altamente influenzati da effetti di tipo ambientali ciascun clone ha una sua peculiarità.

## **VII. Bibliografia**

- Abbate V., Noto G., (1981) Variabilità ambientale e genotipica in popolazioni siciliane di *Cynara scolymus* ed isolamento di nuovi cloni di Violetto di Sicilia. Atti III Cong. Int. Studi sul carciofo. Ed. Laterza (Bari): 797-807
- Adams S. E. , Mellor J., Gull K., Sim R. B., Tuite M. F., Kingsman S. M., Kingsman A. J. (1987). The functions and relationships of Ty- VLP proteins in yeast reflect those of mammalian retroviral proteins. Cell., 49: 111-119.
- Ancora G., Saccardo F., (1987). Carciofo: nuove tecniche di propagazione. Informatore agrario 4: 77-79
- Barbieri R. (1961) Sperimentazione agronomica su nuove varietà di canapa condotta in Campania nel 1960. Edit. Consorzio Naz. Prod. Canapa.
- Barcaccia G., Alberini E., Rosellini D., *et al.*, (2000) Inheritance and mapping of 2n-egg production in diploid alfalfa. *Genome* 43: 528-537
- Basnizki J., (1981). Exigences eco-Physiologiques comme à l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) et aux cynarées sauvages. In : Studi sul carciofo. Industri Grafica Laterza, Bari.

- Basnizki J., Zohary D., (1987) A seed planted cultivar of globe artichoke. *HortSci* 22: 678-679
- Basnizky J., Goldschmidt E. E., (1994) Further examination of gibberellina-a3 effects on flowering of globe artichokes (*Cynara scolymus* L.) under controlled environment and field conditions. *Israel J Plant Sci* 42 (2): 159-166
- Basnizky j., Zohary d., (1994) Breeding of seed – Planted artichoke. *Plant Breed Rev* 12: 253-269
- Beckmann J. S., Soller M., (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellites sites. *Bio/Technology*, 8: 930-932
- Bell C. J., Ecker J. R., (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*, 19: 137-144
- Bianco V. V., (1990) Carciofo (*Cynara scolymus* L.). In VV Bianco e F Rimpini (eds.), *Orticoltura*. Patron Editore, Bologna
- Bornet B., Branchard M., (2001) Nonanchored Inter Simple sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Reporter*, 19: 209-215
- Brown A. H. D., (1979) Enzyme polymorphism in plant populations. *Theoretical Popoulation Biology*, 15: 1-42
- Causey J. L., Feirtag J. M., Gallaher D. D., *et al.*, (2000) Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in Hypercholesterolemic men. *Nutrition Research* 20 (2): 191-201
- Ciccarese F., Cirulli M., (1985) La verticilliosi del carciofo. *Informatore fitopatologico* 9: 25-26
- Ciccarese F., Cirulli M., Frisullo S., (1985) Prova di lotta chimica contro la verticilliosi del carciofo. *Informatore fitopatologico* 5: 39-42

- Cirulli M., Ciccarese F., Frisullo S., (1984) L'avvizzimento del carciofo da *Verticillium dahliae* Kleb. In Italia Meridionale. Informatore agrario 30: 52-55
- Curzi M., (1930) Intorno alle tracheomicosi e a nuovi gravi casi di verticilliosi. Boll. R. Staz. Pat. Veg. X, 1: 44-62
- D'Alessandro F., Agosta I., (1984) Aspetti agronomici della coltura del carciofo *L'informatore agrario*, 23: 23-42
- Deidda M., (1967) Contributo al miglioramento genetico del carciofo. Atti I Congresso Int. Di Studi sul Carciofo. Bari. Ed. Minerva Medica (Torino): 157-174
- Dellacecca V., Magnifico V., Marzi V., *et al.*, (1976) Contributo alla conoscenza delle varietà di carciofo coltivate nel mondo. Atti I Congresso Int. Di Studi sul Carciofo. Bari. Ed. Minerva Medica (Torino): 199-316
- Dellacecca V., (1990) Cardo (*Cynara cardunculus* L.) Orticoltura, Patron Editore, Bologna: 252-258
- Dellacecca V., Pace M., (1974) Influenza del materiale di propagazione sulla precocità di produzione della carciofaia. In: Nuovi studi sul carciofo. Ed. Minerva Medica Italiana, Torino
- Devos P., De Bruirne E., De Langhe E., (1975) Influence of 2,4-D on propagation of *Cynara scolymus* L. in vitro. Meded. Fac. Landbouwhoges. Rijksuniv. Gent. 40: 829-836
- Dietrich W., Katz H., Lincoln S. E., Shin H. S., Friedman J., Dracopoli N. C., Lamder E. S., (1992) A genetic map of mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, 131: 423-447
- Ernst M., Feldheim W., (2000) Fructans in higher plants and in human nutrition. *J Appl Bot-Angew Bot* 74(1-2): 5-9

- Evenor D., Izhar S., (1984) Coexistence of cytoplasmatic and nuclear genes for male sterility in *Petunia*. *Mol. Gen. Genet* 194: 523-527
- Fang D. Q., e Roose M. L., (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* 95: 408-417
- Foti S., Mauromicale G., (1994) Sul miglioramento del calendario di produzione del carciofo e delle caratteristiche di qualità del prodotto mediante la diffusione di nuove varietà. *Sementi Elette XL*: 19-79
- Foury C., (1967) Etude de la biologie Florale de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.) ; Application à la sélection lère partie. Données sur la Biologie Florale. *Ann. Amélior. Plantes*, 17 (4) : 357-373
- Foury C., (1979) Quelques aspects pratiques de la sélection généalogique de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.) Présentation. Création délinées. *Ann. Amélior. Plantes* 29 : 382-418
- Foury C., Aubert S., (1977) Observation préliminaires sur la présence et la répartition de pigments anthocyaniques dans un mutant d'Artichaut (*Cynara scolymus* L.) à fleurs blanches. *Ann. Amélior. Plantes* 27 : 603-612
- Foury C., Cadilhac B., Aubert S., (1977) Observations sur les teneurs en chlorophylle et en cinarine, et sur la structure des chloroplastes d'un mutant d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) à feuilles jaunes. *Ann. Amélior. Plantes* 27 : 587-602
- Gebhardt R., Fausel M., (1997) Artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol in vitro* 11(5): 669-672
- Godwin I. D., Aitken E. A. B., Smith L. W., (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18(9): 1524-1528

- Graifenberg A., Curadi M. Giustiniani L., (2001) Come valorizzare la qualità del carciofo. *Innovazione e Agricoltura* 1(4): 44-52
- Graifenberg A., Giustiniani L., (1997) Problematiche colturali e valorizzazione del carciofo. *Inf Agr* 27: 53-57
- Grandbastien M. A., (1992) Retroelements in higher plants. *Trends Genet.*, 8: 103-108
- Gupta M., Chyi M. S., Romero-Severson J., *et al.*, (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using simple primers of simple sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998-1006
- Gupta P. K., Balyan H. S., Sharma P. C., Ramesh B., (1996) Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci.*, 70: 45-54
- Gupta P. K., Varshney R. K., (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185
- Iannaccone A. (1967) Avvicendamenti, metodi di propagazione e durata della carciofaia. Atti I Cong. Int. Bari. Ed: Minerva Medica. Torino: 9-16
- ISMEA, (1999) Istituto per studi, Ricerche e informazioni sul mercato agricolo
- ISTAT <http://www.agricolturaoggi.com>
- Jacoboni N., (1958) Il carciofo romanesco: biologia e coltivazione. Ann. Fac. Agr. Univ. XIII, Perugia
- Jordan S. A., Humphries P., (1994) Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7 q31-q35. *Human Molecular Genetics*, 3: 1915-1925

- Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., *et al.*, (1997) Antioxidant activity of polyphenolics in diets- Rate constant of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica and Biophysica Acta General Subjects* 1335(3): 335-342
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175
- Kraft K., (1997) Artichoke leaf extract – Recent findings effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine* 4(4): 369-378
- Kroon P. A., Williamson G., (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 335-361
- Lagercrantz U., Ellegren H., Anderson L., (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.*, 21: 1111-1115
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations, *Genomics* 1:174-181
- Lannuzel A. L., (1998/99) Cretion the semences hybrides d'artichaut. Etudes préliminaires pour l'amélioration de la pollinisation par abeilles. Rapport de stage. Université de Brest.
- Lanteri S., Di Leo I., Ledda L., Mameli M.G., Portis E. (2001). RAPD variation within and among populations of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), cv 'Spinoso sardo'. *Plant Breeding* 120 (3): 243-247
- Lattanzio V., Lafiandra D., Morone Fortunato I., (1979) Composizione chimica e valore nutritivo del carciofo (*Cynara scolymus* L.) In: Atti 3° Congresso Internazionale sul carciofo, Bari; Tip. Laterza, Bari: 117-125

- Levinson G., Gutman G. A., (1987) Slipped-strand misrepairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4: 203-221
- Lewis P.O., Zaykin D. 1996. Genetic Data Analysis: software for the analysis of discrete genetic data. Sinauer Assoc. Sunderland Massachusetts.
- Lewontin R. C., Hubby J. L., (1966) Molecular approach to the study of generic heterozygosity in natural population. *Genetic*, 119: 609-619
- Li Y., T. Fahima *et al.*, (2000) Microsatellite diverse correlated with ecological-edaphic and genetic factors in three microsites of wild emmer wheat in north Israel. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 851-862
- Lincoln SE, Daly MJ, Lander ES (1993) constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP version 3.0, Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, pp 97
- López Anido F. S., Firpo I. T., García S. M., *et al.*, (1998) Estimation of genetic parameters for yield traits in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) *Euphytica* 103: 61-66
- Lopez G., Ros G., Ortuno J., *et al.*, (1999) Protein quality of artichoke and artichoke by products as affected by heat treatment and dietary fiber. *Arch Latinoam Nutr* 49(1): 49-54
- Maccioni M., (1954) Carciofo. Enciclop. Agrar. Ital. Vol. II
- Magnifico V., (2000) Una coltura importante ma dimenticata. *Informatore Agrario, Speciale carciofo*. 26: 35-36
- Magnifico V., Lattanzio V., (1981) Ritmo di asportazione degli elementi nutritivi nel carciofo. Ca, Na, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu. Atti del 3° Congresso internazionale dl carciofo. Bari 1981, 283-293
- Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R., (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, vol 347: 737-742

- Martelli G. P., Russo M. Rana G. L., (1979) A survey of *Cynara* species. In: Atti 3° Congresso Internazionale sul Carciofo. Bari, Ind. Laterza, Bari 895-920
- Mauromicale G., (1987) Panorama varietale del carciofo e sua prevedibile evoluzione. *Inf Agr* 5: 69-75
- Mauromicale G., Copani V., (1989) Caratteristiche biologiche e produzione di cloni diversi di carciofo isolati in popolazioni Siciliane di Violetto di Sicilia. *Tecnica agricola* 41(4): 3-17
- Mauromicale G., Ierna A., (1995) Effects of gibberellic acid and sowing date on harvest time and yields of seed-grown globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie* 15(9-10): 527-538
- Mauromicale G., Ierna A., (2000) Panorama varietale e miglioramento genetico del carciofo. *Inf Agr* 26: 39-45
- Mauromicale G., Morello N., Ierna A., (2000) Nuove varietà per migliorare la cinaricoltura siciliana. *Inf Agr* 26: 47-51
- Miccolis V., (1996) Il carciofo: aspetti di tecnica culturale. Supplemento dell'informatore agrario 33: 17-20
- Miller T., (1975) New artichoke clones. *New Zeland J Agr* 131(1): 33-35
- Mitchell S. E., Kresovich S., Jester C. A., Hernandez C. J., Szew-Fadden A. K., (1997) Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop. Sci.*, 37: 617-624
- Moreno S., Martin J. P., Ortiz J. M., (1998) Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117-125
- Morgante M., Olivieri A. M., (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant Journal*, 3:175-182

- Morgante M., Vogel J., (1994) Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms. *U. S. Patent Appl* 08/326456
- Mullis K. B., Faloona F. A., Scharf S.J., *et al.*, (1986) Specific Enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263-273
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 183-192.
- Oliaro T., (1967) Lineamenti di una storia del carciofo. In: Atti I Congr. Int. Carciofo. Bari. Ed, Minerva Medica, Torino.
- Paglia G., Morgante M., (1998) PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Mol breeb* 4: 173-177
- Papalini P., Cinquanta A., Ercolani R., (1997) Etrusco e Moro di Corneto, due nuove cultivar di carciofo. *Inf Agr* 27: 59-61
- Pècaut P., (1983) Amélioration des variétés à multiplication végétative, variétés à multiplication par semences, clones sans virus issus de multiplication in vitro. Procès-verbal de la Séance de 12 janvier. *Académie d'agriculture de France* : 69-78
- Pècaut P., (1993) Globe artichoke *Cynara Scolymus* L. In G. Kallo and B. D. Berg (eds.) *Genetic Improvements of Vegetabl crops. Pergamon, Oxford* : 737-746
- Pècaut P., Foury C., (1992) L'artichaut. In : Gallais A., Bannerot H. Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection, INRA Paris. 460-470
- Pècaut P., Foury C., Rico F., Martin F., (1979, 1981). Bilan d'un premier de sélection de variétés d'artichauts à semence. In : Atti del 3° Congr. Int. Sul Carciofo, Bari. 615-627

- Pecaut P., Martin F., (1993) Variation occurring after natural and in vitro multiplication of early mediterranean *cultivars* of globe artichoke (*Cynara Scolymus* L.) *Agronomie* 13: 909-919
- Pecchioni N., Peveri C., Monetti A., Faccioli P., Grossi M., Velè G., Portesi A., Terzi V., Stanca A. M., (1993) Uso di tecniche molecolari (RFLP e PCR) per il riconoscimento varietale di specie di interesse agrario. *Sementi elette*, 3-4:55-60
- Perrino P., Pacucci G., (1974) Indagine su alcune tecniche di autofecondazione e di incrocio nel carciofo (*Cynara Scolymus* L.). *Sementi Elette* 20: 3-10
- Pignatti S., (1982) Flora d'Italia. Ed agricole. Vol. 3: 163
- Pirazzoli C., (1999) Programmare l'offerta del carciofo per vincere la concorrenza. *Informatore Agrario* 30: 31-36
- Principe J A., (1984) Male-sterility in Artichoke. *Hort Science* 19 (6): 864
- Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., Goldstein D. B., Powell W., (1999) A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153: 943-947
- Pulselli A., (1928) Un grave caso di tracheomicosi del carciofo. *Boll. R. Staz. Pat. Veg.* VIII, 2: 189-193
- Quagliotti L., (1996) Osservazioni sui rapporti tra caratteristiche morfologiche e terminabilità dei semi di cardo. *Ann. Fac. Agr. Torino*, IV: 225-235
- Ratnaparkhe M. B., Santa D. K., Tulla A., *et al.*, (1998) Inheritance of inter simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a *Fusarium wilt* resistance gene in chickpea. *Theor Appl Genet* 96: 348-353
- Reynaers A., Van de Wiele H., De Sutter G., Janssens J., (1993) Engineered genes for fertility and application in hybrid seed production. *Scientia Horticulturae* 5:125-139

- Rossi V., De Paoli G., (1986) Micropropagation of artichoke (*Cynara Scolymus* L.) VI international congress of plant tissue cell culture. Minnesota
- Rottenberg A., (1993) Genetic affinities among the various species grouped in the genus *Cynara* L. (in Hebrew). MSC thesis. The Hebrew University, Jerusalem
- Rottenberg A., Zohary D., (1996) The wild relatives and the wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resour Crop Ev* 43(1): 53-58
- Saccardo F., Ancora G., (1985) Il contributo della micropropagazione al miglioramento della coltura del carciofo. Recenti acquisizioni del miglioramento genetico italiano in orticoltura e floricoltura. 24-26
- Saghai-Maroo M. A., Biyashev R. M., Yang G. P., Zhang Q., Allard R. W., (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal localisations and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of sciences of the USA*, 91: 5466-5470
- Scaramella Petri P., Ricci A. (1979) Micropropagazione di *Cynara scolymus* L. Var. Sativa, da tessuti in vitro. In atti: del 3° Congresso Internazionale Di Studi sul Carciofo. Laterza, Bari. 231-238
- Scarascia Mugnozza G. T., Pacucci G., (1976) Tipi di potenziale valore pratico isolati nell'ambito di un programma per il miglioramento genetico del carciofo. Atti: del II Congresso Internazionale Di Studi sul Carciofo. Ed. Minerva Medica. (Torino): 117-143
- Schlotterer C., Tautz D., (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.*, 20 : 211-215
- Schwengel D., Jedlicka A. E., Nanthakumar E. J., Weber J. L., Levitt R. C., (1994) Comparison of fluorescence-based semi-automated phenotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. *Genomics*, 22 : 46-54

- Scrimshaw B. J., (1992) A simple nonradiocative procedure for visualization of (coda)<sub>n</sub> dinucleotide repeat length polymorphisms. *Bio Techniques*, 13: 189
- Slanina J., Taborska E., Bochorakova H., Slaninova I., Humpa O., Robinson W. E. Jr., Schram K. H., (2001) New and facile method of preparation of the HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Letters* 42: 3383-3385
- Sonnante G., De Paolis A., Lattanzio V., Perrino P. (2002) Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 49: 247-252
- Sportelli G F., (2001) Così evolverà la coltura del carciofo. *Orticoltura* 3: 19-23
- Strand M., Prolla T., Liskay R., Petes T., (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365: 274-276
- Strasburger E., (1982) Parte sistematica. In: trattato di botanica. A. Delfino Editore
- Tanksley, 1983)
- Tarantino E., (1979) Studio sulla distribuzione dei consumi idrici durante il ciclo colturale del carciofo nel metapontino. In atti: del 3° Congresso Internazionale Di Studi sul Carciofo. Laterza, Bari. 505-523
- Tarantino E., (1984) L'irrigazione. *L'informatore agrario*, 23: 49-52
- Tautz D., Renz M., (1984) Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. *Nucl Acids Research.*, 12 (10): 4127-4138
- Tautz D., (1988) Hypervariability of simple sequence repeat as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471

- Temperini O., Graifenberg A., Mariotti R., Micozzi F., Amici C., Saccardo F., (2000) Situazione attuale e prospettive future del carciofo romanesco nel Lazio. In. Atti Convegno: Carciofi e salute (Regione Lazio Arsial, Ladispoli)
- Tesi R., (1976) Primi risultati del miglioramento genetico della varietà toscane di *Cynara cardunculus*, Var. *scolymus*. In atti: del II Congresso Internazionale Di Studi sul Carciofo. Bari. Ed. Minerva Medica (Torino): 747-763
- Tesi R., (1981) Terom, a new artichoke cultivar for Tuscany. Ortoflorofrut. Ital. 30: 49-51
- Tivang J., Skroch P. W., Nienhuis J., *et al.*, (1996) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within artichoke (*Cynara Scolymus* L.) cultivars and breeding populations. *J Am Soc Hortic Sci* 121(5): 783-788
- Trigo Colina L., (1981) Etude du comportement clonal de la population d'artichaut Blanca de España Cultivée dans la Vallée l'Ebre. In atti: del 3° Congresso Internazionale Di Studi sul Carciofo. Laterza, Bari. 629-638
- Tsumura Y., Ohba K., Strass S. H., (1996) Diversity an inheritance of inter simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet* 92(1): 40-45
- Turpeinen T., Tenhola T., Manninen O., Nevo E., Nissila E., (2001) Microsatellite diversity associated with ecological factors in *Hordeum spontaneum* populations in Israel. *Mol. Ecol.*, 10: 1577-1591
- Vendramin G. G., Lelli L., (1996) Marcatori molecolari nel miglioramento genetico delle piante: i microsatelliti. *Biotec.*, 1996; Numero 4
- Viani P., (1929) Carciofo. Trattato di orticoltura. Ed. Battiato, Catania, Vol. II: 894-914
- Walgovich M. J., (2000) Anticancer properties of fruit and vegetables. *Hort sciences* 35(4): 573-575

- Wang G., Mahalingam R., Knap H. T., (1998) (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L) Merr. *Theor Appl Genet* 96(8):1086-1096
- Waugh R., Bonar N., Baird E., *et al.*, (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet* 255(3): 311-321
- Weber J. L., Wong C., (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 1123-1128
- Wiklund A., (1992) The genus *Cynara* L. (*Asteraceae- Carduae*). *Bot. J. Linnean Soc.* 109: 75-123
- Wu K. S., Jones R., Danneberger L., *et al.*, (1994) Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucleic Acids Res* 22(15): 3257-3258
- Ziegle J. S., Su Y., Corcoran K. P., Nie L., Mayrand P. E., Hoff L. B., McBride L. J., Diehl M. N. S. R., (1992) Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*, 14: 1026-1031
- Zietkiewicz E. Rafalski A., Labuda D., (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored PCR amplification. *Genomics* 20: 176-183