

Presentazione

Il presente elaborato è la sintesi del lavoro di ricerca svolto nel triennio 2008-2011 nell'ambito del Dottorato di Ricerca in "Produttività delle piante coltivate", curriculum "Biologia delle specie mediterranee", con sede amministrativa presso l'Università degli Studi di Catania. Per lo svolgimento delle ricerche sono stati utilizzati campi sperimentali, strumentazioni, apparecchiature e materiali facenti capo al Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni Animali fino al 2010 e successivamente al Dipartimento di Scienze delle Produzioni Alimentari e Agrarie – Sezione: Scienze Agronomiche – dell'Università degli Studi di Catania, nonché al Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali (DIVAPRA) – Sezione: Genetica Agraria – dell'Università degli Studi di Torino. Presso quest'ultima Istituzione, l'attività di ricerca è stata svolta dal 18/07/2011 al 22/07/2011, e dal 01/08/2011 al 05/08/2011, sotto la guida dei professori Sergio Lanteri ed Ezio Portis.

Il tema sviluppato, approvato dal Collegio dei Docenti coordinato dalla prof.ssa Daniela Romano, ha riguardato "**Biologia florale, produzione di seme e miglioramento genetico del carciofo**". La tematica risulta, peraltro, coerente ed in sintonia con i contenuti del programma del Dottorato medesimo.

La necessità di approfondire le tematiche di cui sopra, scaturisce da una parte, dalla notevole importanza economica rivestita dal carciofo (*C. cardunculus* var. *scolymus*) in ambiente mediterraneo, dall'altra dalla entità delle problematiche limitanti l'ulteriore sviluppo di tale coltura, fra le quali quella del miglioramento genetico è certamente una delle più importanti.

Il carciofo, infatti, tra le specie ortive da pieno campo coltivate nel Bacino del Mediterraneo, ricopre certamente un posto di primo piano;

l'importanza è testimoniata dal fatto che oltre l'80% dei circa 130 mila ha investiti nella sua coltivazione nel 2009, abbia trovato collocazione nei Paesi prospicienti il Mar Mediterraneo (FAO, 2011). In tale contesto, l'Italia spicca in termini di superfici investite e produzioni, ribadendo ancora oggi la sua *leadership* a livello mondiale in virtù degli oltre 50 mila ha coltivati, ed una produzione totale annua di circa 510 mila t (Istat, 2011). Sulla base di tali statistiche, il carciofo si colloca a livello nazionale al terzo posto dopo pomodoro e patata in termini di superfici investite, secondo dopo il pomodoro in termini di produzione lorda vendibile.

A fronte delle sù citate statistiche, la coltura del carciofo non sembra adeguatamente supportata da innovazioni tecniche e biologiche in grado di modernizzarne l'assetto colturale e specializzarne la destinazione d'uso. In tale ambito, una problematica rilevante è certamente quella varietale, atteso che, in Italia la cinaricoltura si avvale per lo più di popolazioni locali (Mauromicale, 1987), spesso caratterizzate da ampia variabilità genetica (Lanteri *et al.*, 2001; Portis *et al.* 2005) ed elevato grado di eterozigosi, per cui il ricorso alla propagazione agamica è obbligatorio. Essa si realizza prelevando corpi riproduttori da carciofaie non specializzate per tale destinazione, per lo più operando una scarsa o nulla selezione delle piante madri per le caratteristiche produttive.

Il ricorso alla propagazione agamica implica diverse problematiche, fra le quali si ricordano:

- aleatorietà fitosanitaria del materiale di propagazione;
- scarsa reperibilità dei corpi riproduttori;
- lenta diffusione di eventuali nuove varietà ottenute attraverso selezione clonale (problema connesso al precedente);
- alti costi di impianto delle carciofaie;
- mancata estrinsecazione delle potenzialità produttive fin dal primo anno di impianto, cui consegue spesso una durata

pluriennale delle carciofaie, in deroga ai principi agronomici sottesi dalle tecniche di avvicendamento;

- alti rischi di diradamento della coltura a seguito delle elevate richieste evapotraspirative tipiche dei periodi di impianto.

Quale parziale soluzione a questi problemi, è stato spesso invocato il ricorso, ove possibile, alla propagazione gamica. L'utilizzo della riproduzione passa attraverso un stadio di "ringiovanimento" della coltura, fenomeno per cui anche progenie di varietà a produzione autunnale (di importanza strategica per gli ambienti mediterranei), perdono la loro intrinseca precocità, fornendo produzioni tardive, ovvero primaverili.

Alla luce di quanto esposto, sebbene il carciofo sia da annoverare fra le colture ortive da alto reddito, la sua configurazione colturale ammette spesso l'implementazione di tecniche agronomicamente aleatorie, attribuibile in una parte alla insufficiente mole di acquisizioni scientifiche circa i suoi aspetti genetici e fisiologici.

In Sicilia, per oltre un secolo, la coltivazione del carciofo è stata basata su due tipi: il "*Violetto di Sicilia*" nel versante orientale e lo "*Spinoso di Palermo*" in quello occidentale. Negli ultimi anni si va profilando, tuttavia, una forte innovazione nel settore varietale attesa la intensa introduzione e diffusione, in alcune aree, di nuovi tipi quali: *Violetto di Provenza*, *Spinoso sardo*, *Romanesco clone C3*, *Terom*, *Apollo* e *Tema 2000*. Ciò, se da un lato può consentire una più efficace articolazione dei calendari di produzione ed una più variegata offerta di prodotto con caratteristiche qualitative differenziate, in grado di meglio soddisfare le particolari esigenze dei mercati, dall'altro apre il fianco a possibili pericoli di mescolanze varietali, con conseguente perdita della "purezza" delle popolazioni autoctone.

Un altro aspetto della problematica varietale che merita di essere messo in evidenza è la variabilità genetica dei due tipi varietali autoctoni (Violetto di Sicilia e Spinoso di Palermo), atteso che nelle carciofaie siciliane la variabilità fenotipica di sovente risulta eccessivamente alta.

Non va tuttavia dimenticato come nell'Isola, soprattutto nelle aree poco o nulla interessate alla cinaricoltura da pieno campo, risultano presenti alcuni genotipi (pochi esemplari per postazione) presenti nei piccoli orti familiari, con caratteristiche bio-morfologiche sostanzialmente lontane dalle due popolazioni largamente coltivate, che da una parte la moderna analisi molecolare ha già consentito di caratterizzare anche sotto l'aspetto evoluzionistico (Mauro et al. 2009), e dall'altra il miglioramento genetico potrebbe valorizzare opportunamente.

Il presente elaborato è stato articolato in una parte generale redatta consultando la letteratura specifica, includente aspetti morfo-biologici, agronomici, fisiologici e genetici del carciofo, nonché una succinta disamina delle tecniche di marcatura molecolare, delle loro principali applicazioni e potenzialità per i programmi di *breeding*. Segue una parte sperimentale comprendente gli obiettivi delle ricerche, la descrizione delle metodologie adottate, l'analisi e descrizione dei risultati ottenuti, la discussione e le conclusioni generali.

Nel complesso sono state realizzate 5 prove, delle quali si riferirà nell'apposita sezione del presente elaborato.

L'elaborato comprende, infine, le fonti essenziali della bibliografia consultata.

PARTE GENERALE

1. Notizie storiche sulla coltura del carciofo

Il carciofo [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori], appartiene alla famiglia delle Asteraceae, tribù Tubuliflorae. La storia della sua coltivazione ha radici molto antiche, in quanto esso apparve in Sicilia, almeno in un assetto colturale simile a quello moderno, intorno al IX secolo d. C., periodo durante il quale la Sicilia era sotto il dominio Arabo.

L'antica mitologia greca fa risalire l'origine del carciofo ad una bella fanciulla di nome *Cynara*, dai lunghi capelli color cenere, trasformata da Giove innamorato in un carciofo. Il nome "*Cynara*", quindi, deriverebbe probabilmente da "cenere"; tuttavia non è chiaro se l'appellativo debba essere ricondotto al colore cinereo dei capelli della fanciulla, simili al colore delle foglie del carciofo, ovvero all'antica pratica di cospargere di cenerei i campi, onde aumentarne la fertilità. L'appellativo "*Scolymus*", invece, proveniente anch'esso dal greco, significa "spinoso", "appuntito", "pungente al tatto", con chiaro riferimento alla caratteristica delle forme ancestrali di carciofo, e che ancora oggi diverse varietà mantengono.

Probabilmente prendono origine dal termine neolatino *articactus*, da cui la parola italiana di articiocco, ormai in disuso, i vari appellativi del carciofo: francese *artichaut*, inglese *artichoke*, tedesca *artischoke*. Dall'arabo *harxaf*, *harshaf*, *harshuf*, *kharsshuf*, deriverebbe il nome italiano carciofo (desueto carchioffo), il catalano *carxofa*, lo spagnolo *alcachofa*.

La coltivazione di questa asteracea ha lasciato segni tangibili nell'immaginario popolare, così come nella medicina e nell'erboristeria. Il popolo gli attribuì effetti corroboranti e deodoranti, in special modo attraverso l'uso di decotti di radici e vino, o attraverso la diretta applicazione di radici pestate sulla pelle. Gli veniva attribuita la capacità di

rendere liscia e vellutata la pelle delle donne, come anche di influire negativamente sulla voce dei cantanti, per i quali l'uso ne era sconsigliato (Oliaro, 1967). Il carciofo ha altresì una sua lunga storia farmaceutica e taumaturgica, che va dall'antichità ai giorni nostri. I primi cenni sul carciofo quale essenza officinale si devono a Galeno (131 – 201 d. C.), il quale lo introdusse nella medicina ufficiale del tempo. Da allora gli interessi da parte della farmacopea si andarono moltiplicando, tanto che molti sono gli Autori che nel tempo vi hanno attribuito qualità medicinali: Stradone, Plinio il Vecchio, Marrone, Columella.

Amanus Lusitanus (1511 – 1562), medico, botanico, anatomista e farmacologo ha consigliato in diverse sue opere le radici di *Cynara*, citando addirittura il giovamento che ne avrebbero tratto il Pontefice Giulio II e Cosimo De' Medici. La medicina popolare gli ha attribuito anche proprietà diuretica, coadiuvante la secrezione biliare, antireumatica, deodorante e corroborante, se non addirittura afrodisiaca.

Castore Durante, medico romano, ne suggerisce l'uso per la effettuazione di una curiosa diagnosi precoce di gravidanza: *"A conoscere se una donna è gravida le si dia a bere quattro once del succo delle foglie e se vomiterà è gravida"* (Oliaro, 1967).

La domesticazione di tale pianta sembra sia avvenuta nel Bacino del Mediterraneo, non è ancora chiaro se in Italia Meridionale, con particolare riferimento alla Sicilia, o in Tunisia, o ancora nella Spagna meridionale (Ryder *et al.*, 1983; Foury, 1989; Bianco, 1990; Basnizki e Zohary, 1994; Pignone e Sonnante, 2004; Mauro *et al.*, 2006). Nel 1466 il carciofo appare a Napoli (proveniente forse dalla Sicilia) ad opera di Filippo Strozzi. A Venezia viene segnalato con sicurezza nel 1493, mentre in Francia fa la sua apparizione agli inizi del XVI secolo. In Inghilterra fu introdotto durante il regno di Enrico VIII, tanto che nel 1596 era una pianta da orto comune. Nel 1699 l'isola di Jersey era famosa per la produzione di carciofi, che

venivano concimati con alghe. A partire dal XVIII secolo, sulle orme degli emigranti, il carciofo fu introdotto in Paesi distanti dal centro di origine, tanto che sul finire del XVIII secolo era coltivato nei pressi di New York ed in Virginia; successivamente fu introdotto in Florida, Louisiana, California e Sud America (Bianco, 1990).

Le prime notizie attendibili sulla presenza del carciofo in Sicilia, o di forme ancestrali ad esso riconducibili (probabilmente il carciofo selvatico, *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* Lamk.), si devono allo storico greco Teofrasto (371–286 A. C.), il quale lo segnalò in “*Historia Plantarum*” (De Candolle, 1886); ma è agli Arabi (IX–X secolo) che sembra doversi attribuire la moderna coltivazione del carciofo.

Per circa otto secoli e mezzo la coltivazione del carciofo non si affermò in pieno campo, restando principalmente confinata in orti familiari, per lo più antistanti le abitazioni rurali. Solamente nel XIX secolo, infatti, il carciofo varca i confini dell’orto, entrando a far parte delle colture da pieno campo. Si ha notizia che a partire dal XIX secolo i carciofi della Piana di Catania, confezionati in sacchi di juta, cominciarono ad essere oggetto di commercializzazione con il Continente (Mauromicale, 1984).

2. Caratteri botanici, biologia e fisiologia

Il carciofo (*C. cardunculus scolymus*, al pari del cardo (o carciofo) selvatico (*C. cardunculus sylvestris*) e del cardo domestico [*C. cardunculus* L. var. *altilis* DC.], presenta corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 34$). Secondo Wiklund (1992), altre specie del genere *Cynara*, tutte endemiche del Bacino del Mediterraneo, sono:

- *C. humilis* L.;
- *C. cyrenaica* Maire & Weiller in Maire;
- *C. algarbiensis* Coss. ex Mariz;
- *C. cornigera* Lindley in Sibthorp & Lindley;
- *C. baetica* (Spreng.) Pau;
- *C. syriaca* Boissier;
- *C. auranitica* Post in Post & Autran.

La collocazione tassonomica delle specie del genere *Cynara* è tuttavia complicata dall'unicità dell'organizzazione morfologica della tribù delle Cynareae, che impone il ricorso a caratteri distintivi non sempre evidenti (Foury, 2004). L'articolazione dell'ambiente Mediterraneo, inoltre, unita alla preponderante allogamia della specie, favorisce la costituzione di gruppi le cui relazioni di parentela sono difficili da cogliere. Studi circa le relazioni isoenzimatiche (Rottemberg e Zohary, 1996), l'attitudine all'interincrocio (Rottemberg *et al.*, 1996), nonché sulle relazioni genetico – molecolari intra- ed intervarietali (Lanteri *et al.*, 2004a; Portis *et al.*, 2005a; b; c) portano alla conclusione che il carciofo e il cardo domestico, risultano filogeneticamente molto vicini al cardo o carciofo selvatico, il quale ha le più grandi probabilità di esserne l'unico progenitore. Da tale specie, pare

che l'uomo abbia praticato due selezioni divergenti: una per l'ampiezza della nervatura fogliare principale che conduce al cardo, l'altra per quella del capolino che conduce al carciofo (Basnizki e Zohary,1994; Lanteri *et al.*, 2004a).

Il carciofo è una specie polienne, le cui piante, se provenienti da achenio, presentano una radice principale fittonante e numerose radici secondarie avventizie. Le piante provenienti da carduccio o da ovolo presentano radici avventizie fibrose che col passare del tempo si ingrossano (le più piccole scompaiono), diventano carnose, e perdono la funzione assorbente per acquisire quella di riserva e di sostegno (Bianco, 1990). La loro profondità complessiva è di circa 40 cm. Nelle piante di oltre 1 anno la funzione assorbente viene mantenuta fino a quando il carduccio sulla cui base le radici sono inserite è in attivo accrescimento; verso la fine della primavera, le radici di 1 anno si ingrossano notevolmente e diventano carnose come quelle dell'anno precedente. Quando inizia l'accrescimento dei nuovi carducci le radici fibrose dell'annata precedente diventano carnose e vengono rimpiazzate da un nuovo sistema di radici avventizie. L'organo ipogeo di una pianta di carciofo consiste, quindi, dell'originale radice fittonante con le sue radici laterali molto ingrossate, di quelle carnose nate dai carducci dell'anno precedente e delle radici fibrose portate dai carducci dell'anno. Le radici carnose contengono in media oltre il 20% di inulina (percentuale ponderale in rapporto alla sostanza secca), 8 – 9 % di saccarosio, 1,5% di zuccheri riduttori e tracce di amido.

Con l'accrescersi della pianta, si rende sempre più evidente il fusto rizomatoso, volgarmente detto "ceppaia", su cui si vanno progressivamente differenziando gemme che daranno origine a germogli laterali detti carducci. Il differenziarsi dei carducci è un fenomeno che presenta una certa scalarità dovuta a motivazioni d'ordine ormonale (dominanza apicale), per cui sulla stessa ceppaia si trovano in genere germogli di età e stadio

fisiologico diverso, la qual cosa presenta importanti riflessi agronomici; il fenomeno della dominanza apicale si presenta di entità differenziata in relazione alla cultivar (Mauromicale e Copani, 1990), e viene meno con il differenziamento del capolino principale da parte del germoglio considerato (La Malfa, 1976). Gli ultimi germogli a svilupparsi che non hanno dato origine all'infiorescenza, con il sopraggiungere della siccità estiva disseccano la loro frazione epigea, trasformandosi in un organo sotterraneo detto "ovolo", ossia una sorta di ramo quiescente sotterraneo munito di gemma apicale fisiologicamente dominante, e numerose gemme laterali subalterne (Jannaccone, 1967).

Il caule risulta molto raccorciato, così da dare al carciofo l'aspetto di pianta "a rosetta", cioè acaule; la gemma apicale di ogni germoglio si evolve dando origine allo stelo florale, il quale reca in cima l'infiorescenza (capolino o calatide) principale.

Lo stelo florale, di lunghezza variabile in funzione della varietà, del periodo dell'anno o di eventuali trattamenti con fitormoni, risulta cilindrico, di colore verde cinereo, scanalato longitudinalmente, eretto, con un numero variabile di ramificazioni (le forme selvatiche di *C. cardunculus* presentano in genere un maggior numero di ramificazioni), presenta tricomi e reca foglie alterne di forma per lo più lanceolata; le ramificazioni subalterne alla principale (di 1°, 2° 3° ordine e così via), portano anch'esse ognuna all'estremità distale un capolino (di 1°, 2° 3° ordine e così via), di dimensioni progressivamente inferiori rispetto al principale.

Le foglie, di dimensioni, forma e numero variabile a seconda della cultivar, tendono al verde cinereo nella pagina inferiore, presentano una nervatura centrale molto sviluppata, ed in genere si presentano in minor numero nelle cultivar più precoci (Foti e La Malfa, 1981). La loro forma risulta variabile tanto tra i tipi varietali, che sulla stessa pianta (fenomeno di eterofilia marcata), in funzione di stadi fisiologici differenziali, potendo

passare da lanceolata, in prossimità del capolino, a pennatosetta o bipennatosetta, soprattutto nelle cultivar più tardive. La nervatura centrale rappresenta in termini ponderali la parte preponderante delle foglie adulte, tanto che il rapporto fra nervatura e lembo può assumere valori oscillanti tra 1 e 2, con i valori più elevati nelle cultivar primaverili.

Il picciolo assume lunghezza diversa e verso la base ha forma scanalata con evidenti costolature, mentre verso la parte centrale assume sezione semisferica, con la parte ventrale quasi piatta.

In riferimento alla struttura istologica, l'apice vegetativo appare costituito da *tunica* e *corpus*. Nella prima, sono riconoscibili due zone, una apicale e centrale ed un'altra laterale, in cui sono riconoscibili i primordi delle foglie. Nel *corpus* si può osservare una zona del procambio, il ribmeristema ed il flank-meristema, da cui si originano i primordi delle foglie e del procambio. Nel complesso, l'apice meristemato assume forma di cupola posta entro il cappuccio delle giovani foglie. Durante il ciclo ontogenetico del carciofo, l'apice caulinare va incontro a profonde modificazioni morfo-fisiologiche, che si concretizzano macroscopicamente nel differenziamento, prima e nell'emissione dell'infiorescenza, successivamente; il fenomeno è frutto principalmente dell'attività delle cellule meristematiche dell'apice caulinare; tali cellule, avvolgono un midollo parenchimatoso dapprima in numerosi strati, poi si riducono di numero sino a rendere evidente una struttura mantello-cuore; poche oltre compaiono al centro i primordi fiorali, i quali si appiattiscono centripetamente fino ad interessare l'intera superficie del talamo: ciò rappresenta il completamento della fase di differenziazione. Macroscopicamente, l'organogenesi del capolino del carciofo viene schematizzata attraverso la seguente successione di stadi fenologici (Foury, 1967):

- R:** indica la transizione dell'apice caulinare dalla fase vegetativa a quella riproduttiva;
- A:** il capolino è percepibile al tatto ma è completamente involupato nella rosetta fogliare che circonda la struttura caulinare;
- B:** l'allungamento dello stelo ed il dispiegamento delle foglie permettono di individuare il capolino al centro della rosetta fogliare;
- C:** il capolino è pienamente visibile e il complesso infiorescenziale ("pappo") raggiunge una lunghezza di 2–4 mm;
- D:** lo stelo florale risulta completamente allungato ed il capolino è delle dimensioni ottimali per la raccolta;
- E:** le brattee esterne cominciano a divergere, ed il talamo da concavo, comincia ad appiattirsi, mentre i fiori (flosculi) centrali raggiungono una lunghezza di 2 cm circa;
- F:** le brattee centrali si schiudono, ed al centro appaiono i primi flosculi;
- G:** comparsa dei fiori nella zona lasciata libera dalle brattee centrali ed antesi dei fiori periferici.

3. Distribuzione della coltura

3.1 Nel Mondo

Dall'esame delle statistiche FAO relative al triennio 2007–2009, appare evidente come la distribuzione mondiale della coltivazione del carciofo presenti una marcata omogeneità: dei circa 130.000 ettari interessati nel triennio da questa coltura, infatti, la quota più rilevante (pari a poco meno del 70%) ha interessato il continente europeo (Tab. 1). I Paesi maggiormente interessati dalla cinaricoltura risultano essere quelli prospicienti il Bacino del Mediterraneo: Italia (50.257 ha), Spagna (16.606 ha), Francia (9.433 ha), Egitto (7.887 ha), Algeria (2.280 ha), Marocco (4.094 ha), Grecia (2.083 ha), Turchia (2.900 ha) e Tunisia (2.310 ha), nel triennio 2007 – 2009 hanno realizzato congiuntamente circa l'80% delle superfici coltivate a livello mondiale (Tab. 1 e Fig. 1) (FAO, 2011). Di particolare rilievo appare il crescente interesse di Paesi quali Cina (9.780 ha), Perù (8.179 ha), Cile (5.290 ha) e Argentina (4.788 ha) (FAO, 2011).

Le produzioni areiche presentano ampie oscillazioni, comprese fra le 4,9 t ha⁻¹ della Francia, e le 22,4 t ha⁻¹ dell'Egitto; l'Italia, sebbene con una certa variabilità interregionale, si attesta su rese medie di 9,6 t ha⁻¹ (Tab. 1).

Relativamente al contributo alla produzione mondiale, stimato nella media del triennio 2007–2009 in circa 1.505.000 t (FAO, 2011), le prime due posizioni spettano ancora all'Italia (481,5 mila t) ed alla Spagna (209,0 mila t), mentre al terzo posto l'Egitto (176,3 mila t) ha preceduto il Perù (141,4 mila t), in virtù delle più elevate produzioni areiche (Tab. 1). Tale dato, apparentemente poco comprensibile, potrebbe essere attribuito a differenze nei parametri utilizzati nella formulazione delle stime produttive.

A fronte di una esportazione del prodotto italiano verso Francia, Belgio, Regno Unito, e Germania, stimabile in circa 3000 t annue, si è recentemente verificato un incremento delle importazioni dalla Spagna, con punte di 5000 t anno⁻¹. Le ragioni di questo *trend* negativo vanno probabilmente ricercate nella scarsa promozione e valorizzazione commerciale del prodotto italiano all'estero, con particolare riferimento al Nord Europa, che si concretizza in una cernita grossolana dei capolini che presentano sostanziali differenze di pezzatura, nel confezionamento in mazzi oppure alla rinfusa del prodotto con presenza-assenza di foglie, talora con stelo lungo, che costituisce un inutile ingombro, nella scarsa informazione sugli aspetti salutistici, qualitativi e nutrizionali (Licandro, 2002).

3.2 In Italia

Nel 1915 in Italia venivano coltivati circa 10 mila ettari con una produzione di circa 64 mila tonnellate di capolini.

Contribuivano alla realizzazione di tale produzione diverse Regioni, la prima delle quali risultava la Toscana con una superficie di poco inferiore ai 4 mila ettari ed una produzione di 25 mila tonnellate, con una incidenza sul totale del 39%; seguivano a distanza la Campania e la Sicilia che nel complesso non raggiungevano i 3 mila ettari ed una produzione di circa 18 mila t. Le regioni del Centro Nord partecipavano alla produzione totale con il 54%, quelle del Sud comprese le Isole col restante 46%. Sul finire degli anni '50, è cominciato quel processo di progressivo ampliamento delle superfici cinaricole, soprattutto nelle zone del Meridione d'Italia, che ha portato negli anni al completo rivolgimento della situazione preesistente. Le superfici cinaricole complessive, infatti, hanno avuto nel tempo un andamento variabile, raggiungendo i 20 mila ettari nel 1952, i 47 mila

ettari nel triennio 1961 – 63, e superando i 60 mila ettari nel triennio 1970–1972 (Foti, 1976). Da allora la cinaricoltura è andata progressivamente ridimensionandosi, fino a stabilizzarsi sull'attuale valore di circa 50 mila ha.

Andamento simile al precedente si è registrato per la produzione complessiva, la quale, pari mediamente a 336 mila t nel triennio 1961–63, ha superato le 700 mila t nel triennio 1970–72, per attestarsi successivamente sulle attuali 480 mila t. Le produzioni areiche, per contro, pur mostrando una tendenza all'aumento, presentano una irregolare variabilità da imputare al decorso stagionale, soprattutto se osservato in rapporto alle differenti regioni. Attualmente la coltura si attesta in Italia sui 50.000 ha (ISTAT, media triennio 2008-2010):

Le regioni italiane maggiormente interessate alla coltivazione di carciofo sono quelle centro–meridionali ed insulari: Puglia (16.947 ha), Sicilia (14.643 ha), Sardegna (13.322 ha), Campania (2.025 ha), Lazio (1.030 ha) e Toscana (567 ha), regione, quest'ultima, che assieme al Lazio ha subito negli anni un forte ridimensionamento delle superfici cinaricole (ISTAT, 2011) (Tab. 2 e Fig. 2). La recessione della coltura nelle aree un tempo vocate del Centro – Nord Italia, cui può aggiungersi la Sardegna, è riconducibile a cause economiche, alla carenza di un appropriato aggiornamento delle tecniche colturali e fitosanitarie, oltre alla mancata introduzione di cultivar rispondenti alle esigenze della trasformazione industriale, in particolare per l'idoneità alla IV gamma (Licandro, 2002).

3.3 In Sicilia

La produzione cinaricola siciliana, viene preminentemente consumata allo stato fresco all'interno della stessa regione, mentre più

contenuta è la quota produttiva destinata ai mercati nazionali e in misura notevolmente minore alla trasformazione industriale: quest'ultima, infatti, utilizza prevalentemente le cosiddette "code di produzione".

La Sicilia, seconda fra le regioni cinaricole italiane dopo la Puglia, nel triennio 2008–2010 (ISTAT, 2011) ha mediamente investito una superficie pari a circa 14.643 ha, realizzando una produzione media complessiva di 164.071 t anno⁻¹, superiore, quantunque di poco, a quella pugliese (Tab. 2). Nello stesso periodo, oltre 6 mila ha (pari al 42% dell'intera superficie cinaricola regionale) hanno insistito nella provincia di Caltanissetta, in particolare entro il triangolo immaginario formato dai Comuni di Niscemi, Gela e Butera. Si sono collocate a distanza le province di Agrigento (3.880 ha), con i Comuni di Menfi e Licata, Catania (1.417 ha), con l'area di Ramacca, Palermo (1067 ha), con agro di Buonfornello e Cerda, Siracusa (857 ha), con i circondari del capoluogo e di Rosolini, Trapani (610 ha) con i dintorni del capoluogo e di Castelvetro, nonché Ragusa (500 ha, pari all'3,4%) con i Comuni di Acate ed Ispica (ISTAT, 2011) (Tab. 3 e Fig. 3).

4. Significato economico della coltura

Il significato economico della coltura appare considerevole, come attesta il valore della PLV, stimabile in oltre 520 milioni di €.

La PLV unitaria, assai variabile in rapporto a molti fattori (varietà, ambiente di coltivazione, stagione di produzione, disponibilità e qualità di acque di irrigazione, andamento del mercato etc.) risulta comunque compresa fra 5.000 e 15.000 € ha⁻¹ (Licandro, 2002).

L'Italia, oltre ad essere il maggiore produttore di carciofo nel Mondo, rappresenta anche il più grande consumatore. Il consumo annuo pro-capite, ha raggiunto la punta di 10,5 Kg nel triennio 1975 – 1977, si è contratto a circa 8 Kg sul finire degli anni '80, per poi risalire agli attuali 8-9 Kg (Licandro, 2002).

Dagli ultimi dati ufficiali emerge che su circa 445 mila t di capolini commercializzati sul territorio nazionale, l'87% è destinato al consumo interno allo stato fresco, l'11% viene utilizzato dall'industria di trasformazione e soltanto il 2% trova sbocco nei mercati esteri. Tale quota viene per lo più collocata sui mercati francesi (81%), tedeschi (7%), belgi e lussemburghesi (6%), e svizzeri (3%).

In Sicilia la produzione è quasi esclusivamente destinata al consumo fresco; infatti, solamente il 6 – 8% viene utilizzato dall'industria conserviera, mentre la quota destinata all'esportazione, fino a qualche anno fa si aggirava intorno all'1%, ed era rappresentata da capolini del tipo varietale *Blanc Hyèrois*, prodotti nella provincia di Siracusa ed esportati prevalentemente in Francia.

5. Caratteristiche pedo-climatiche degli areali di coltivazione

In accordo con l'ampia adattabilità che lo caratterizza, il carciofo viene coltivato in Sicilia, in areali contraddistinti da caratteristiche pedologiche marcatamente differenziate (Mauromicale, 1984). Sotto il profilo pedologico, infatti, quantunque la preferenza di questa ortiva ricada su terreni di medio impasto, ben drenati e con pH compreso fra 6,4 e 7,0 (Bianco, 1990), la sua coltivazione viene effettuata con successo nei terreni alluvionali delle pianure di Catania, Gela e Licata, nei regosuoli da rocce argillose della zona compresa nel triangolo Termini Imerese – Cerda – Lascari, nonché in quelli bruno – calcarei della provincia di Siracusa. In ogni caso in terreni con pH superiori a 7,0.

Sotto il profilo climatico, l'Isola non presenta caratteristiche che ostacolino il normale svolgimento del ciclo colturale del carciofo (Mauromicale, 1984; 1986; Mauromicale *et al.*, 2004a). La coltura è prevalentemente, ma non esclusivamente, realizzata in zone pianeggianti, in larga parte ricadenti lungo le fasce costiere, o in zone pianeggianti un po' più interne, ma sempre situate ad altitudine modeste (Mauromicale *et al.*, 2004a). Tuttavia, negli inverni particolarmente freddi e soprattutto nelle aree collinari, temperature prossime allo zero (0 – 2 °C) causano, talvolta, lievi danni a carico dei capolini (sollevamento più o meno irregolare dell'epidermide delle brattee esterne), con negative ripercussioni sul valore commerciale degli stessi. Le gelate, inoltre, pur non compromettendo la vita delle piante, possono pregiudicare lo sviluppo dei capolini allo stato giovanile, e arrestare, in ultima analisi, le produzioni per un periodo di 30 – 40 giorni (Mauromicale, 1981). In riferimento ai danni da gelate, in prove condotte in agro di Cassibile (SR) (Mauromicale, 1981), è stato osservato

che temperature prossime allo 0 o di poco inferiori (-2 °C) per una durata di 7 ore, provocano sulle foglie delle piante adulte danni che si concretizzano nella comparsa di aree lievemente clorotiche che evolvono in necrosi, per lo più localizzate nella zona marginale del lembo fogliare. Sulle giovani piante provenienti da carducci, per contro, si assiste a fenomeni di imbrunimento e raggrinzimento a carico della nervatura centrale e della parte apicale delle foglie, con intensità decrescente via via che dalle foglie più giovani si passa a quelle più adulte. Lo stelo florale, pur non presentando in genere danni esteriori visibili, in sezione longitudinale e trasversale presenta estesi fenomeni di imbrunimento soprattutto a carico della regione midollare, e particolarmente evidenti nella regione dello scapo prossimale alla calatide. Indipendentemente dalla varietà coltivata, i capolini di peso unitario minore di 40 g, subiscono estesi fenomeni necrotici a carico delle brattee esterne, nonché imbrunimento pressoché completo dei tessuti interni del ricettacolo e dello stelo florale; in caso di danno particolarmente severo, tali capolini si possono presentare in una tipica posizione reclinata, a causa dell'allessamento della parte prossimale dello scapo. Su quelli più adulti e pronti per la raccolta, si notano per contro solo lievi imbrunimenti della parte apicale delle brattee più esterne, dello scapo florale, e solo raramente del ricettacolo. Attese, quindi, le rilevanti ripercussioni commerciali di siffatti eventi meteorici, in aggiunta all'importanza strategica che le produzioni cinaricole precoci assumono per diversi areali siciliani, andrebbe vagliata l'opportunità, sia sotto il profilo tecnico che sotto quello economico, di ricorrere ad apprestamenti di protezione (Mauromicale *et al.*, 2004a), nonché a tecniche agronomiche idonee a salvaguardare l'integrità del prodotto, e ad esaltarne le caratteristiche merceologiche. Tale necessità si fa ancora più pressante qualora si consideri che una maggiore affermazione di tale coltura, passa attraverso una migliore modulazione del calendario di offerta (Mauromicale, 1986; Foti e Mauromicale, 1994;

Mauromicale *et al.*, 2004a; 2004b): le produzioni commerciali di maggior pregio, infatti, forniscono in media meno del 25% del prodotto complessivo (trimestre novembre – gennaio), contro oltre il 60% di quelle successive (trimestre febbraio – aprile), con evidenti problemi di carattere commerciale che ne scaturiscono; quindi, come già dimostrato da Mauromicale *et al.*, (2004a), una migliore articolazione temporale dell’offerta, passa attraverso la migliore dislocazione territoriale della coltura, con tutti i rischi agronomici cui la coltura può andare incontro, e dei quali si è già accennato.

Temperature particolarmente elevate (> 25 °C) durante il periodo di transizione a fiore dell’apice del germoglio, causano una ben nota fisiopatia, nota come “atrofia del capolino”, in particolar modo nel gruppo degli “Spinosi” e dei “Catanesi” (Morone Fortunato *et al.*, 1981; Magnifico *et al.*, 1984; Magnifico *et al.*, 1985), e consistente in turbe fisiologiche indotte sull’assimilazione dello ione Ca^{2+} .

6. Calendari di raccolta e commercializzazione del prodotto

L'inizio e l'andamento della raccolta nell'arco della stagione produttiva sono largamente influenzati dalla varietà coltivata, dalla disponibilità di acqua per l'irrigazione, dall'epoca di impianto della carciofaia di 1° anno o di attivazione di quella polienne, dall'adattamento stagionale, dall'età della cariofaia, etc.

Nel Violetto di Sicilia coltivato in regime irriguo la maturazione dei capolini inizia intorno alla fine di ottobre e protrae fino ad aprili-maggio; in regime asciutto la produzione ha inizio soltanto nel mese di febbraio e si conclude in maggio.

Andamento produttivo analogo a quello di Violetto di Sicilia presenta il Violetto di Provenza.

La varietà Violetto Spinoso di Palermo inizia la maturazione alla fine di novembre e la prosegue fino ad aprile-maggio.

Le altre popolazioni locali: “Domestica di Calstelvetro”, “Verde Spinoso di Palermo”, “Messinese”, la varietà francese “Bianco di Hyeres” iniziano la produzione a marzo; in aprile cade il periodo di massima produzione ed in maggio la fine della raccolta.

La produzione del carciofo, come già riferito, è in gran parte destinata al consumo allo stato fresco, mentre solo una parte, relativamente piccola, intorno al 10-14%, è riservata all'industria conserviera.

La quota destinata all'esportazione è molto modesta.essa è rappresentata principalmente dai capolini della varietà Bianco di Hyeres, coltivata quasi esclusivamente nel siracusano, ed è stata diretta prevalentemente in Francia.

Inoltre, oltre a questioni di carattere geografico ed infrastrutturale, l'assenza di una precisa indicazione geografica distintiva, rende il prodotto siciliano meno capace di far fronte a periodi in cui si registra la contestuale presenza di prodotto proveniente da distretti produttivi diversi.

In questi ultimi anni, grazie alla collaborazione fra Enti di ricerca e Sezioni Operative di assistenza tecnica locali, si sta assistendo alla diffusione di alcune varietà come il *Violetto di Provenza*, *Tema 2000*, alcuni cloni di *Romanesco* quali il *C3*, ed altre tipi varietali, in grado di articolare significativamente l'offerta produttiva sotto il profilo merceologico, nonché di espandere e regolare il calendario di affluenza del prodotto isolano sui mercati nazionali ed esteri.

7. Caratteristiche nutrizionali

L'attuale interesse del consumatore nei confronti di alimenti "funzionali", per il loro benefico effetto sulla salute umana, ha stimolato l'interesse da parte sia della comunità scientifica che del settore industriale (alimentare e non) nei confronti del carciofo, in quanto dotato di riconosciute e diversificate proprietà terapeutiche. Il carciofo è infatti particolarmente ricco di composti antiossidanti che prevengono danni, causati da radicali liberi, nei confronti di molecole biologiche (proteine, lipidi e DNA), esercitano un'azione epatoprotettiva e coleretica (Gebhardt, 1996) e possono contribuire alla prevenzione di patologie vascolari quali l'arteriosclerosi (Pittler e Ernst, 1998; Brown, 1998; Rice-Evans, 1997). Tali proprietà terapeutiche sono riconducibili alla presenza di composti con spiccata attività antiossidante derivanti dal metabolismo dei fenilpropanoidi quali: i flavonoidi (apigenina e luteolina) e, in particolare, gli acidi mono e di-caffeoilchinici (Tab. 4) Lattanzio et al., 2009; Lombardo et al., 2010; Pandino et al., 2010a e b). Estratti di carciofo hanno evidenziato la capacità di inibire la biosintesi di colesterolo in colture cellulari di epatociti di ratto e diversi autori riferiscono anche di un'azione antitumorale riconducibile a sostanze fenoliche (Kosar et al., 2004; Papadopoulou e Frazier, 2004); inoltre, studi recenti indicano che alcuni composti presenti in carciofo esercitano un'attività inibitoria sulla HIV-integrasi, enzima che regola una tappa essenziale della replicazione dell'HIV e della integrazione del DNA virale nel genoma delle cellule ospite (Slanina et al., 2001).

Il carciofo è anche un'ottima fonte di inulina (Lattanzio et al., 2009), polisaccaride di riserva estraibile dalle radici e dai ricettacoli. L'inulina costituisce circa il 70-80% degli zuccheri totali della pianta, è un polimero a lunga catena del fruttosio (fruttano) e si trova come sostanza di riserva in

molte specie vegetali della famiglia delle *Compositae*. Essa rappresenta un valido sostituto del saccarosio, sia come dolcificante, sia come additivo e conservante per bibite, dolci, sciroppi e nei prodotti *light food o health food*. Il fruttosio è, infatti, dotato di un potere dolcificante superiore al saccarosio, ma con un potere calorico notevolmente inferiore, per cui risulta adatto anche alle diete ipocaloriche per diabetici. All'inulina, e ai fruttani in generale, sono inoltre riconosciute attività prebiotiche, giacché attivano nel colon umano i batteri del genere *Bifidus*, la cui presenza permette l'istaurarsi delle condizioni ottimali di acidità necessarie per l'inibizione di batteri nocivi. Infine, è stato dimostrato come l'inulina sia in grado di ridurre il tasso di colesterolo e di trigliceridi nel sangue e di contrastare l'aumento della glicemia (Lattanzio et al., 2009).

8. Commercializzazione ed utilizzazione del prodotto

Il principale prodotto ricavato dalla pianta di carciofo è rappresentato dai capolini, destinati in maggioranza al consumo fresco, la cui valutazione qualitativa viene effettuata in base a caratteristiche quali pezzatura e compattezza, nonché alle caratteristiche di freschezza e sanità. Secondo il Regolamento CE N. 963/98, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea dell'8/5/1998, il carciofo destinato al consumo fresco deve essere sano, pulito, dall'aspetto fresco, con brattee ben serrate, esente da parassiti e da danni da essi provocati, privo di odori e sapori estranei e con peduncolo di lunghezza non superiore ai 10 cm; sulla base di questi requisiti, i capolini vengono suddivisi nelle categorie "Extra", I e II. Inoltre essi vengono ulteriormente suddivisi secondo le seguenti classi di calibrazione: diametro da 13 cm ed oltre; diametro da 11 cm inclusi a 13 cm esclusi; diametro da 9 cm inclusi ad 11 cm esclusi; diametro da 7,5 cm inclusi a 9 cm esclusi; diametro da 6 cm inclusi a 7,5 cm esclusi.

Per il consumo fresco, i capolini vengono confezionati in fasci con alcune foglie e parte dello stelo, o in cassette con uno scapo di circa 10 cm senza foglie, come per il prodotto destinato all'esportazione (Bianco, 1990; Marzi, 2001).

Per una migliore conservazione è opportuna una refrigerazione del prodotto a 3 – 4 °C. Il deterioramento del prodotto si manifesta con la comparsa del colore violetto o di macchie scure sulle brattee interne. La presenza di un complesso infiorescenziale ("pappo") troppo pronunciato, è causa di scadimento qualitativo del prodotto (Tesi, 1976).

I capolini possono essere sottoposti a diversi processi di trasformazione:

disidratazione, surgelazione, liofilizzazione, deidrocongelazione, al naturale in salamoia, alla preparazione di precotti, sott'olio, creme, giardiniere, minestroni, prodotti di IV gamma.

I processi di trasformazione prevedono anzitutto la tornitura del ricettacolo e la spuntatura della parte superiore delle brattee, al fine di ottenere i cosiddetti “fondi” o “cuori” di carciofo. I “cuori” vengono commercializzati interi, divisi a metà o in quarti, fettine, spicchi (da capolini di 6-7 cm di diametro), interi, in pezzetti o dadi, purè, in creme liofilizzate.

Per la surgelazione i capolini vengono scottati per 4-10 minuti, a seconda delle dimensioni dei pezzi, in soluzione allo 0,7 % di acido citrico. La surgelazione avviene a -35 -40 °C; lo stoccaggio di effettua a -20 °C.

I carciofi sott'olio si preparano con capolini più piccoli, raccolti a fine campagna quando i prezzi sono più bassi. Durante la conservazione sui carciofi sott'olio o al naturale possono comparire cristalli di inulina di colore bianco (Le Roux, 1978; Di Venere *et al.*, 2005). Per eliminare la non piacevole presenza di tali cristalli, che possono formarsi soprattutto sui ricettacoli, i cuori, durante la lavorazione, si immergono per 30 minuti in una soluzione al 5% di acido citrico a temperatura di 60-80 °C.

Allo scopo di mettere a punto il metodo per produrre carciofi come prodotti “minimamente processati” o della IV gamma, Anese *et al.*, (1998), hanno condotto a Foggia ricerche sul tipo *Catanese*. I “cuori”, divisi in quarti, sono stati sbollentati per 5 minuti a 100 °C in una soluzione contenente percentuali variabili di acido lattico, citrico e acetico, tali da non alterare il sapore del carciofo. Successivamente il prodotto è stato posto in buste di poliammide e polietilene a bassa permeabilità all'ossigeno, CO₂ e vapore acqueo e in presenza di una miscela di azoto e CO₂. Con la sbollentatura, l'opportuna percentuale di acidi organici, l'atmosfera

modificata e la conservazione a temperatura di frigorifero, è stato possibile conservare il prodotto in ottime condizioni per un periodo di circa 30 giorni.

Le brattee di scarto dei capolini provenienti dall'industria conserviera hanno un buon contenuto di proteina grezza in cui sono presenti amminoacidi con un buon livello di isoleucina e leucina, istidina, acido glutammico, serina, fenilalanina, che possono essere utilizzati come additivi per gli alimenti. Inoltre, tali materiali, considerato il contenuto di sostanze fenoliche, potrebbero essere sfruttati come potenziali sottoprodotti per ricavare sostanze antiossidanti.

Oltre ai suddetti usi, il carciofo, ma più in generale il genere *Cynara* spp., si presta ad usi diversi da quelli tradizionalmente alimentari, così come ampiamente dimostrato in letteratura (Foti *et al.*, 1999; Curt *et al.*, 2005). Di relativamente recente interesse, infatti, è l'utilizzo di piante del genere *Cynara* spp., e del carciofo in particolare, per la produzione di biomassa per la produzione di energia, nonché di "seme" per l'estrazione di olio (Foti *et al.*, 1999; Maccarone *et al.*, 1999). Infatti, in un triennio di prove condotto nella Piana di Catania, è stato possibile accertare la buona produzione di biomassa da parte di diverse varietà, di cui due di carciofo, con produzioni areiche oscillanti, nella media delle due varietà testate, fra le 14,10 e le 9,95 t ha⁻¹ (Foti *et al.*, 1999). Attesa la composizione chimica particolarmente idonea all'uso, è stato dimostrato come sia possibile ricavare un quantitativo energetico oscillante fra 16.005 e 17.028 KJ Kg⁻¹ di sostanza secca, pari ad oltre 200 GJ ottenibili da 1 ha di coltura. Tale comportamento pone il carciofo in linea con i risultati ottenuti in Olanda con colture specializzate di *Miscanthus* (Van der Werf *et al.*, 1993), o negli Stati Uniti con colture di Kenaf (Webber, 1993). I suddetti risultati appaiono ancora più interessanti se si considera che:

1. allo stato attuale non esistono cultivar migliorate per i suddetti scopi, quindi, attraverso un programma di miglioramento genetico potrebbe

essere possibile ottenere cultivar in grado di raggiungere migliori risultati (Foti *et al.*, 1999). I primi risultati in tal senso lasciano intravedere alcune nuove linee ottenuti attraverso incroci siano in grado di implementare significamene la produzione di biomassa (Ierna e Mauromicale, 2010) ;

2. specialmente se proveniente da seme, il carciofo, atteso il suo ciclo biologico particolarmente adattato all'ambiente Mediterraneo, è in grado di raggiungere buoni risultati produttivi anche avvalendosi di tecniche di coltivazione “low inputs” (Foti *et al.*, 2005), per lo più limitate a minime concimazioni azotate, e irrigazioni di risveglio finalizzate all'allungamento della fase vegetativa prima del sopraggiungere della “stasi” invernale (Foti *et al.*, 1999). A tale riguardo, recentemente, è emerso che attraverso l'utilizzo di cultivar a propagazione agamica (Opal F1), con una più bilanciata concimazione fosfo-azotata, è possibile massimizzare l'efficienza agronomica delle concimazioni azotate, nonché incrementare significamente la produzione areica della carciofaia, in corrispondenza di più bassi input azotati (Ierna et al., 2011).

Altre possibili utilizzazioni del carciofo riguardano:

- la produzione di biomassa verde, ottenuta dallo sfalcio delle piante prima della formazione dello stelo florale, per l'alimentazione del bestiame (Fernández et al., 2006);
- produzione di biomassa per la produzione di energia (termica e/o elettrica) (Foti et al., 1999; Ierna e Mauromicale, 2010);
- l'estrazione dagli acheni di olio alimentare, dotato di un rapporto bilanciato tra acidi grassi insaturi a saturi (pari a circa 17:3) e privo di acido erucico (Maccarone et al., 1999);

- l'estrazione di fibra per la produzione di pasta di cellulosa, caratterizzata da buone caratteristiche meccaniche (resistenza alla piegatura, elevati indici di tensione e di strappo) (Gominho et al., 2000; Comino et al., 2009);
- l'estrazione dai floscoli di enzimi ad attività caseolitica, utilizzati per la produzione di formaggi tipici (Silva e Malcata, 2005; Barbagallo et al., 2006);
- l'estrazione dalle diverse parti della pianta di sostanze bioattive (polifenoli e inulina) (Molina et al., 2005; Lattanzio et al., 2009; Lombardo et al., 2010; Pandino et al., 2011);
- l'utilizzo della pianta intera e /o delle sue parti a scopo ornamentale (Lanteri et al., 2011).

9. Classificazione del germoplasma

Il germoplasma di carciofo attualmente disponibile, viene raggruppato e classificato secondo diversi criteri, i quali sono fondamentalmente basati sull'epoca di produzione e sulle caratteristiche morfometriche dei capolini (Mauromicale, 1987; 1988; Abbate *et al.*, 2006). Considerando l'epoca di raccolta, si sogliono distinguere varietà a produzione autunnale e varietà a produzione primaverile. Le prime, dette anche “precoci” o “rifiorenti”, assicurano una produzione pressoché continua tra l'autunno e la primavera, e comprendono il *Violetto di Sicilia* con le varie forme ad esso ascrivibili (*Masedu, Molese* etc.), lo *Spinoso Sardo*, il *Violetto Spinoso di Palermo*, il *Violet de Provence*, il *Violet Margot*, il *Blanca de Tudela*. Le seconde, indicate anche come “non rifiorenti” o “tardive”, forniscono produzioni solo primaverili (tra marzo e giugno) ed includono i tipi *Romaneschi* e il *Violetto di Toscana*, diffusi in Campania, Lazio e Toscana, *Camus de Bretagne, Blanc Hyérois*.

Considerando invece le caratteristiche del capolino, le varietà possono essere raggruppate in relazione al colore delle brattee esterne, alla dimensione, alla forma ed alla presenza di spine sulle brattee (Dellacecca e Damiani, 1976). Con riferimento a quest'ultimo aspetto, i tipi varietali si distinguono in “Inermi” (*Violetto di Sicilia, Violetto di Provenza, Romanesco, Violetto di Toscana* etc.) e “Spinosi” (*Violetto Spinoso di Palermo, Spinoso Sardo, Spinoso di Albenga* etc.).

Un primo tentativo di classificazione numerica è stato effettuato da Porceddu *et al.* (1976), i quali hanno raggruppato il germoplasma di carciofo in quattro gruppi principali: “Spinosi” (*Violetto Spinoso di Palermo, Spinoso Sardo, Spinoso di Albenga* etc.), “Violetti” (*Violetto di Toscana, Violetto di Chioggia, Nostrano, Violetto di Pesaro* etc.),

“Romaneschi” (*Campagnano, Castellammare, Tondo di Paestum, Camard, Blanc Hyérois, Camus de Bretagne* etc.), “Catanesi” (*Violetto di Sicilia, Violetto di Provenza* etc.).

Tale classificazione, con opportune correzioni, è stata aggiornata da indagini di carattere molecolare (Lanteri *et al.*, 2004a), effettuate tramite marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Lo studio ha complessivamente riguardato 118 accessioni, compresi differenti cloni appartenenti ad uno stesso tipo varietale, due accessioni di cardo domestico, nonché 4 accessioni di cardo selvatico. I risultati hanno nel complesso dimostrato quanto segue:

- l'elevata similitudine esistente fra tipi varietali identificati da diversi appellativi, spesso di origine vernacolare;
- tipi varietali differenti per pochi, quantunque fenotipicamente significativi caratteri, dovuti a mutazioni occorse in un limitato numero di geni, possono condividere un comune *background* genetico; da ciò conseguirebbe la non attendibilità dei marcatori fenotipici fino ad oggi utilizzati per scopi sistematici;
- le relazioni filogenetiche fra diversi tipi varietali, sono sostanzialmente scaturite dal tipo di selezione operata dall'uomo. In quest'ottica, caratteri fenotipici, quali la presenza di spine sulle brattee, sembrano essere di importanza chiave nella comprensione delle origini del materiale attualmente in coltivazione. Non altrettanto può dirsi del carattere pigmentazione delle brattee, sulla base del quale non possono essere messe in evidenza chiare relazioni filogenetiche;
- la variabilità genetica osservata all'interno di accessioni relative ad alcuni tipi varietali, è risultata essere maggiore di quella riscontrata fra accessioni diverse dello stesso tipo varietale, confermando la

composizione multiclone di molte varietà a propagazione gamica (Lanteri *et al.*, 2001; Portis *et al.*, 2005a).

L'Italia accoglie oggi una ricca biodiversità cinaricola, che si concretizza nella locale coltivazione di una moltitudine di tipi varietali ed ecotipi, molto spesso ben adattati alle condizioni pedoclimatiche contingenti. In Italia, infatti, la cinaricoltura si avvale per lo più di popolazioni locali (Mauromicale, 1987; 1988; Mauromicale e Ierna, 2000; Lanteri *et al.*, 2004), spesso caratterizzate da una composizione multiclone a base genetica molto ampia (Lanteri *et al.*, 2001; Lanteri *et al.*, 2004; Portis *et al.*, 2005) ed anch'esse con elevato grado di eterozigosi, per cui il ricorso alla moltiplicazione agamica è obbligatorio. Malgrado la possibilità di disporre di una così ampia biodiversità, la cinaricoltura italiana oggi si basa per lo più sulla coltivazione su larga scala di pochi tipi varietali che, per caratteristiche bio-agronomiche, merceologiche, nonché per la capacità di adattamento a “nuovi” areali di coltivazione, hanno incontrato il favore di cinaricoltori e consumatori.

Negli ultimi anni si va profilando, tuttavia, una forte innovazione nel settore varietale, attesa la intensa introduzione, in alcune aree, di nuovi tipi a propagazione agamica quali *Violetto di Provenza*, *Spinoso sardo*, *Romanesco clone C3*, *Terom* e *Tema 2000*, o a propagazione gamica quali *Opal*, *Violin*, *Concerto* etc. Ciò, se da un lato può consentire una più efficace articolazione dei calendari di produzione ed una più variegata offerta di prodotto con caratteristiche qualitative differenziate ed in grado di meglio soddisfare le particolari esigenze dei mercati (Foti, 1976; Foti e Mauromicale, 1994; Mauromicale *et al.*, 2004b), dall'altro apre il fianco a possibili pericoli di mescolanze varietali, con conseguente perdita della “purezza” delle popolazioni autoctone. Se a ciò si aggiunge che la graduale sostituzione dei genotipi locali di largo impiego, sino ad ora, è stata operata

in favore di pochi genotipi sulla base di ristrette caratteristiche produttive e merceologiche, è facile intuire come il pericolo dell'erosione genetica o la mescolanza con genotipi esotici non adattati alle condizioni pedo – climatiche contingenti, minacci le possibilità di un futuro sostenibile della coltura in parola (Portis *et al.*, 2005a).

10. Panorama varietale in Sicilia

In Italia fino a poco tempo fa la quasi totalità della produzione cinaricola veniva affidata a tipi varietali propagati per via agamica, altamente eterozigoti (Mauromicale, 1984; 1987; 2004a; Lanteri *et al.*, 2001; Portis *et al.*, 2005a), nei quali è stato sempre possibile ravvisare un forte legame territoriale con i centri di maggiore coltivazione. L'utilizzo e la diffusione di popolazioni fortemente differenziate sotto il profilo bio – agronomico, merceologico ed organolettico, ha permesso lo sviluppo di una cinaricoltura dalla *facies* estremamente multiforme e composita, per decenni viatico di “naturale” conservazione *in situ* di una rilevante quota di biodiversità; ciò nel contempo ha conferito all'attività cinaricola caratteristiche proprie dei sistemi culturali sostenibili.

A livello regionale, fino a pochi anni fa la cinaricoltura era fondamentalmente basata su due tipi locali (*Violetto di Sicilia* sul versante orientale, *Violetto Spinoso di Palermo* su quello occidentale), i quali, introdotti successivamente in zone o regioni più o meno distanti dal luogo di origine, hanno finito per prendere le denominazioni delle nuove località, generando così, a volte, notevole confusione nomenclaturale. Esempio eloquente, a tal proposito, costituisce il *Violetto di Sicilia* il quale, nella regione di origine viene denominato, a seconda della zona di provenienza degli organi di moltiplicazione, *Catanese*, *Niscemese*, *Siracusano*, *Caltagirone*, etc. La stessa varietà introdotta successivamente in Puglia, ha finito per prendere la denominazione dei nuovi ambienti di coltivazione (*Violetto di San Ferdinando*, *Baresano*, *Violetto di Brindisi*, *Locale di Mola*, *Molese* etc.) (Mauromicale, 1987; 1988).

Da quanto detto, è deducibile come la produzione cinaricola regionale si sia basata per molto tempo su pochi tipi varietali, i quali, se da

un lato, hanno permesso nei secoli lo sviluppo di una cinerea dalla pianta del tutto peculiare (soprattutto in virtù della spiccata precocità), dall'altro non si prestano bene alla possibilità di ampliare e meglio articolare il calendario di produzione, né ad aumentare le rese e differenziare la qualità del prodotto, con particolare riferimento alle esigenze dell'industria di trasformazione e dei mercati esteri (Foti, 1976; Mauromicale, 1987; Foti e Mauromicale, 1994). Infatti l'Italia, oltre ad essere il maggiore produttore, è anche il maggior consumatore, in special modo di prodotto non trasformato (Foti e Mauromicale, 1994), mentre scarso sembra essere il contributo dell'industria nell'assorbimento del prodotto. Tale aspetto, unitamente al peculiare assetto del periodo di offerta del prodotto, scarsamente articolato e per lo più concentrato nei mesi primaverili, rende necessaria una migliore copertura dei mesi autunnali, per calmierare i prezzi e favorire i consumi, unitamente ad una migliore articolazione merceologica dell'offerta produttiva (Foti, 1976; Mauromicale, 1987; Foti e Mauromicale, 1994).

Un contributo sostanziale alla soluzione di tali problemi potrebbe essere dato dalla diffusione in coltura sia di alcune varietà locali italiane, che di varietà estere (Foti, 1976; Foti e Mauromicale, 1994), nonché di tipi di nuova costituzione (Mauromicale *et al.*, 2004 a), la cui presenza, grazie anche al contributo degli Enti di ricerca territoriali, sta assumendo negli ultimi anni delle quote progressivamente più rilevanti.

L'attuale panorama varietale del carciofo contempla, comunque, una gamma di tipi la cui utilizzazione maggiormente integrata potrebbe indubbiamente aiutare ad articolare l'offerta produttiva (Mauromicale, 1987).

Di seguito si riporta una sintetica disamina delle caratteristiche dei principali tipi varietali disponibili, distinti in autunnali e primaverili in relazione all'epoca di raccolta.

Tipi autunnali:

- ***Violetto di Sicilia***: è una varietà multiclonale (Portis *et al.*, 2005) autoctona e propagata per via agamica, la cui epoca di maturazione dei capolini, particolarmente precoce, inizia a fine ottobre – inizio novembre e si protrae fino ad aprile. Il capolino principale, mediamente compatto, ha un peso medio di circa 142 g, forma cilindro – conica, con brattee esterne verdi soffuse di sfumature violette, e brattee interne verde – biancastre, anch'esse con sfumature violette; i capolini sono destinati in prevalentemente al consumo fresco sui mercati nazionali, sebbene tale tipo varietale abbia una spiccata capacità a produrre capolini da carducci idonei per l'industria conserviera (Mauromicale *et al.*, 2004 b). L'elevata precocità che la caratterizza, unitamente ad un'altrettanto spiccata adattabilità ambientale ed un periodo produttivo ampio (novembre – aprile), ha fatto sì che per oltre un secolo la cinaricoltura praticata nella Sicilia orientale si sia basata quasi esclusivamente su tale tipo varietale, nelle varie forme ad esso ascrivibili. I suoi punti deboli sono rappresentati dalla frequente insorgenza di fenomeni di atrofia del capolino in carciofaie particolarmente forzate, e la tendenza a divaricare le brattee a seguito di alte temperature, la qual cosa si traduce in una perdita di compattezza del capolino stesso ed il conseguente deprezzamento del prodotto. Non ultimo, la “maturazione” dei capolini in un periodo dell'anno poco favorevole sotto il profilo delle temperature, unitamente alle caratteristiche biologiche intrinseche, fanno sì che tale varietà sia caratterizzata da scarsa “contemporaneità di emissione” dei capolini (Restuccia e Mauromicale, 1981), e da basso peso unitario dei capolini secondari (Mauromicale *et al.*, 2004 b).

- ***Violetto di Provenza***: varietà multiclone riflorente, propagata per via agamica, con ampio periodo produttivo (novembre – aprile). Il capolino principale pesa in media 168 g ed ha forma ovoidale, con brattee esterne color viola con sfumature verdi, e brattee interne giallo - violacee. E' varietà molto precoce, sebbene di poco inferiore rispetto al *Violetto di Sicilia* (Mauromicale, 1988), e risulta adattabile a diversi ambienti di coltivazione; tale varietà si contraddistingue inoltre per le buone caratteristiche organolettiche dei capolini, nonché per la capacità, al pari del *Violetto di Sicilia*, di produrre capolini da carducci idonei per l'industria conserviera. Tra i suoi punti deboli si ricorda la scarsa "contemporaneità di emissione" dei capolini nei mesi autunno – vernini, la minore adattabilità ambientale rispetto al *Violetto di Sicilia*, e la suscettibilità all'atrofia del capolino (Mauromicale *et al.*, 2004 b).
- ***Tema 2000***: varietà monoclonale, autunnale e propagata per via agamica. E' stata selezionata nell'ambito di progenie della cv *Terom*. L'epoca di maturazione commerciale dei capolini va da novembre ad aprile. I capolini presentano caratteri morfologici del tutto peculiari, in quanto si presentano con brattee esterne di colore viola molto intenso ed uniforme, mentre quelle interne appaiono di color giallo con sfumature violacee; le brattee esterne, inoltre, sono sormontate da una breve spina giallastra, cosa che non ha invece riscontro sul fogliame, che risulta essere inerme. La forma dei capolini è ellissoidale – conica, ed il peso medio del capolino principale è di circa 143 g. Si adatta a diversi ambienti di coltivazione, e tra i suoi punti di forza annovera l'elevata precocità, l'ampia stagione produttiva, l'elevata capacità produttiva, nonché l'elevata resistenza all'atrofia del capolino. Tra i suoi punti deboli si richiamano la

tendenza a produrre capolini relativamente poco compatti, poco idonei alla trasformazione industriale, capolini secondari di dimensioni ridotte, meno accettati rispetto ai due precedenti tipi, nonché capolini e piante suscettibili agli attacchi da *Botrytis cinerea* (Mauromicale *et al.*, 2004 b).

- ***Violetto Spinoso di Palermo***: si tratta di una varietà multiclone (Portis *et al.*, 2005a), spinescente, a produzione autunnale, particolarmente coltivata sul versante occidentale dell'Isola; sebbene non assuma particolare diffusione nazionale è molto richiesta a livello locale (Mauromicale, 1987), in virtù delle sue caratteristiche organolettiche. I capolini si presentano verdi con sfumature violette di varia intensità, con brattee sormontate da spine prominenti, presenti anche sulle brattee interne; queste assumono colorazione giallo – verdastra con sfumature violacee. Nel complesso le calatidi assumono forma ovoidale di compattezza medio – elevata del peso medio di circa 170 g. La sua coltivazione viene per lo più praticata in aree ad inverni miti. Tra i punti di forza si ricordano la buona precocità, l'ampia stagione produttiva (novembre – aprile), le ottime caratteristiche organolettiche quanto a sapore, tenerezza, elevata frazione edule del capolino e dello scapo florale. Tra i punti deboli si annoverano la ridotta capacità produttiva, il ristretto *range* di adattabilità (sensibilità a temperature relativamente distanti dall'optimum), nonché l'elevatissima sensibilità all'atrofia del capolino (Magnifico *et al.*, 1985; Mauromicale *et al.*, 2004 b).
- ***Spinoso sardo***: Si tratta di una varietà multiclone (Lanteri *et al.*, 2001), estremamente precoce, spinescente, a propagazione agamica. Il periodo di produzione va da ottobre ad aprile, ed i capolini si presentano con brattee esterne di colore verde con sfumature violette

di varia intensità, sormontate da una prominente spina giallastra; le brattee interne, anch'esse spinose, sono giallo paglierino con sfumature viola. La forma complessiva del capolino è conica, di media compattezza, del peso medio di circa 155 g; la coltivazione viene praticata in aree ad inverni miti. Si tratta, nel complesso, di una specie non molto dissimile rispetto al *Violetto Spinoso di Palermo*, dal quale però si distingue per la maggiore precocità (Mauromicale *et al.*, 2004b), la minore compattezza dei capolini, nonché la maggiore produttività. E' estremamente suscettibile all'atrofia del capolino ed è sensibile a temperature distanti dall'optimum.

Tipi primaverili:

- **Romanesco clone C3:** varietà monoclonale, primaverile, ottenuta nell'ambito di popolazioni di *Castellammare* mediante micropropagazione *in vitro*. Sebbene unifera, risulta caratterizzata da spiccata precocità rispetto alle altre cultivar tardive: in Sicilia avvia la "maturazione" dei capolini nel periodo di gennaio – febbraio, e la protrae fino ad aprile. I capolini si presentano con brattee esterne viola con sfumature verdastre, mentre le interne sono giallo – verdastre con sfumature violette; nel complesso i capolini assumono forma isodiametrica, di compattezza medio – elevata, e del peso unitario medio di circa 300 g. La sua coltivazione viene praticata in aree ad inverni miti. Tra i punti di forza di tale cultivar si annoverano le eccellenti caratteristiche organolettiche dei capolini, la spiccata precocità nell'ambito dei tipi primaverili, la buona contemporaneità di emissione, ed il largo anticipo con cui in Sicilia concretizza la maturazione commerciale dei capolini (circa 1 – 2 mesi) rispetto ai classici areali di coltivazione campani e laziali. Tra i punti a sfavore di tale cultivar vanno menzionati l'elevato costo del materiale di

propagazione, la forte dipendenza della precocità dall'andamento termico invernale, nonché la produzione di capolini secondari di scarsa idoneità per l'industria conserviera (Mauromicale *et al.*, 2004 b).

- ***Terom***: varietà con epoca di maturazione primaverile e a propagazione agamica. Il peso fresco del capolino principale è di circa 261 g, il quale si presenta di forma ellissoidale – conica e di compattezza medio – elevata; il colore delle brattee esterne è viola intenso, mentre le interne sono di colore giallastro con sfumature viola. La sua coltivazione viene per lo più effettuata in areali ad inverni miti. Possiede una buona capacità produttiva unitamente ad una spiccata contemporaneità nel produrre capolini di grosse dimensioni e dall'aspetto gradito ai consumatori. Rispetto al *Romanesco* clone C3, però, è più tardiva, e i capolini di 2° e 3° ordine non sono molto richiesti dall'industria conserviera in quanto eccessivamente laschi.
- ***Blanc Hyèrois***: è un tipo varietale primaverile, di origine francese e propagato per via agamica. Matura i capolini in epoca molto tardiva (aprile – maggio), i quali si presentano privi di pigmentazione antocianica. I capolini, sferici, molto compatti, raggiungono pezzatura elevate (i principali arrivano anche a 320 g), e sono molto graditi dai mercati francesi, i quali attenzionano le produzioni siciliane, attesa la maggiore precocità di queste rispetto al corrispettivo prodotto continentale (Mauromicale, 1987). Per tale motivo tale varietà si presta bene ad arricchire il panorama varietale siciliano, quanto a tipologia merceologica e sbocchi di mercato (Foti e Mauromicale, 1994). La sua coltivazione viene praticata con

successo in aree ad inverni miti. Trai punti di forza si ribadisce la pezzatura dei capolini, e la “contemporaneità di emissione” degli stessi (Restuccia e Mauromicale, 1981). Tra i punti a sfavore, però, si ricordano le produzioni tardive e temporalmente assai concentrate, nonché lo scarso apprezzamento sui mercati nazionali.

Tipi primaverili a propagazione gamica di recente introduzione:

- **Madrigal:** pianta molto vigorosa con foglie assurgenti profondamente incise, tollera bene le basse temperature. Presenta capolini di colore verde intenso con leggera pigmentazione violetta che scompare con la maturazione commerciale dei capolini, i quali sono molto compatti (chiusi), di grossi dimensioni (170-260 g.), adatti alla trasformazione industriale. La produzione è molto elevata e tardiva (metà maggio), e molto concentrata.
- **Harmony F₁:** pianta di media vigoria, più precoce del Madrigal e in grado in alcuni casi di una 2° produzione dai carducci emessi in primavera; i capolini sono conici, verdi, simili al Blanca de Tutela, di media dimensioni (150-190 g.) adatti per l'industria di trasformazione.
- **Opal F₁:** varietà primaverile a propagazione gamica; il peso del capolino principale è intorno a 210 g, ha forma conica ed una colorazione delle brattee esterne viola con sfumature verdi. Ha una elevata capacità produttiva (Calabrese *et al.*, 2004) e i capolini risultano essere compatti, di media pezzatura, e con caratteristiche apprezzate dai mercati. Il punto debole risiede nella dipendenza dal

trattamento con GA₃ per ottenere produzioni precoci (Mauromicale *et al.*, 2004 b).

- **Concerto F₁**: pianta eretta e vigorosa, foglie inermi di colore intenso. I capolini si presentano di forma conico – ovoidale, con brattee esterne di colore violetto soffuso di verde, di pezzatura medio – grande (peso medio 190 – 200 g) ed elevata produttività (fino a 15 capolini pianta⁻¹). L'epoca di produzione si ha in primavera, ovvero a fine inverno (con trapianti in luglio e trattamenti con GA₃).

Accanto alle suddette affermate cultivar, la cinarea siciliana potrebbe trarre giovamento dall'introduzione su più vasta scala di cultivar oggi in collezione presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Catania, e che, già ampiamente sperimentati negli ambienti siciliani (Mauromicale, 1984, 1987; Foti e Mauromicale, 1994; Mauromicale *et al.*, 2000; Mauromicale *et al.*, 2004a; 2004b) contribuirebbero a meglio articolare l'offerta produttiva isolana.

Tra queste ricordiamo:

- **Violet Margot**: si tratta di una cultivar dalle ottime caratteristiche produttive (precocità, ritmo di maturazione e capacità produttiva), e qualitative (pezzatura dei capolini, forma e colorazione delle brattee interne ed esterne) (Mauromicale, 1986; 1987; 1988);
- **Violet de Gapeau**: costituisce il termine di passaggio dai tipi riflorenti ai tipi uniferi, si evidenzia per i pregiati capolini di ottima pezzatura, compattezza, forma e colorazione (Mauromicale, 1987);

realizza la maturazione commerciale dei capolini nei mesi di gennaio – febbraio, ovvero in un periodo in cui la qualità dei capolini commercializzati precocemente, comincia a scadere. La sua introduzione in coltura, interessando sia i mercati locali che quelli esteri, migliorerebbe l’offerta soprattutto in termini di continuità;

- ***Camard (Capitou)***: si tratta di una varietà molto apprezzata sui mercati francesi, e sui quali, coltivata negli areali mediterranei, si potrebbe presentare con un certo anticipo rispetto alle corrispondenti coltivazioni continentali, segnatamente rispetto a quelle francesi;
- ***Violetto di Toscana***: si caratterizza per l’elevata “contemporaneità di emissione”, e le alte rese. La maturazione commerciale dei capolini si realizza, negli ambienti di coltivazione isolani, sempre entro la prima decade di aprile, per cui potrebbe incontrare un’ottima collocazione sui mercati dell’Italia centrale, atteso che nel periodo in discorso, il prodotto locale non è ancora presente sui mercati;
- ***Tudela EB 1***: rappresenta probabilmente il tipo varietale dotato di maggior precocità (Mauromicale, 1987). Nonostante scarsa sia la rispondenza dei suoi capolini ai gusti dei consumatori italiani, le calatidi si presentano totalmente scevre da pigmentazioni antocianiche, per cui tale tipo varietale potrebbe essere preso in seria considerazione dall’industria di trasformazione;
- ***Tudela EB 9***: presenta caratteristiche del tutto simili al clone EB 1, dal quale però si differenzia per l’essere un clone non rifiorente. Le sue potenzialità quindi, complementari al corrispondente clone

precoce, risiedono nel fatto di poter assicurare una certa continuità di rifornimento alle industrie di trasformazione.

11. Miglioramento genetico

11.1 Obiettivi

Gli obiettivi del miglioramento genetico consistono nell'ottenimento di cultivar, possibilmente a propagazione gamica, dotate di buona precocità, produttività, contemporaneità di emissione dei capolini, resistenza alle basse temperature ed alle malattie parassitarie (segnatamente *Verticillium dahliae*) (Bianco, 1990). Nei confronti del capolino, un obiettivo non ancora raggiunto consiste nell'ottenerlo con ricettacolo quanto più ampio possibile, nonché con brattee tenere e che restino ben serrate per lunghi periodi. Particolarmente sentita è, inoltre, l'esigenza di ottenere cultivar idonee alle richieste dell'industria di trasformazione, la quale è perlopiù orientata alla lavorazione di capolini con assenza di pigmentazioni antocianiche, bassi contenuti in polifenoli (sostanze causa di imbrunimenti durante i processi di lavorazione), uniformi, poco fibrosi e con scarsa evidenza del complesso infiorescenziale ("pappo").

11.2 Metodi, vantaggi e limiti

Sino ad ora, la costituzione di nuove varietà di carciofo è stata realizzata attraverso tre vie diverse (Mauromicale e Ierna, 2000):

- selezione clonale effettuata nell'ambito di popolazioni locali propagate per via agamica;
- selezione clonale effettuata nell'ambito di progenie provenienti da autofecondazione spontanea o controllata oppure da incrocio;
- selezione di linee inbred e la costituzione di ibridi F_1 , da propagare direttamente per seme;

- costituzione di varietà sintetiche.

Il primo metodo, applicabile con successo solo su popolazioni caratterizzate da discreta variabilità bio–morfologica, consiste nella clonazione di piante dotate di particolari caratteristiche agronomiche di pregio. Tale metodo trae profitto dalla quota di variabilità dovuta in una data popolazione a mescolanza casuale o controllata, di corpi riproduttori di zone diverse, o ad insorgenza di mutazioni chimeriche verificatesi nel corso delle numerose moltiplicazioni. Tale variabilità, nonostante le varietà di carciofo oggi esistenti vengano ordinariamente propagate per via agamica, può raggiungere livelli apprezzabili per determinati caratteri, quali la precocità di maturazione, la contemporaneità di emissione dei capolini e la capacità produttiva (Restuccia e Mauromicale, 1981; Mauromicale e Copani, 1989; Mauromicale e Ierna, 2000a). Ciò giustifica i buoni risultati già ottenuti con l'applicazione di tale metodo. In particolare, sono stati isolati cloni dalle tre popolazioni precoci mediterranee e precisamente dal *Violetto di Provenza* in Francia (Foury *et al.*, 1969 a; 1969 b), dal *Violetto di Sicilia* in Italia (Abbate e Noto, 1981; Mauromicale e Copani, 1989), dal 'Blanca de España' in Spagna (Trigo Colina, 1981). Anche nella varietà primaverile *Romanesco*, con l'ausilio della micropropagazione *in vitro* sono stati selezionati alcuni cloni.

Il limite sostanziale di tale metodo, basato sulla selezione e successiva propagazione mediante tecniche tradizionali, è stato fino ad ora rappresentato dal ridotto tasso di moltiplicazione (da 5 a 10 piante ottenibili per anno da un capostipite), che ha fortemente rallentato la diffusione in coltura di nuovi cloni isolati (Mauromicale e Ierna, 2000 b). La micropropagazione *in vitro*, tecnica che potrebbe aumentare considerevolmente il tasso di moltiplicazione, non è, però, ancora utilizzabile nelle cultivar precoci in quanto induce, con elevata frequenza,

l'insorgenza di mutanti tardivi (Pécaut *et al.*, 1985). I mutanti, rappresentati dalle forme *Pastel*, *Bull*, e *Pastel-Bull*, sono fondamentalmente caratterizzati dalla produzione primaverile dei capolini; infatti, essi perdono la capacità di produrre in autunno che originariamente avevano le piante capostipiti da cui avevano preso origine. La forma *Bull*, esclusivamente autunnale, si caratterizza per le foglie carnose ed intere, con capolini anch'essi carnosì e globosi, di scarso valore organolettico (Mauromicale e Ierna, 2000 b).

La selezione clonale nell'ambito di progenie provenienti da autofecondazione o da incrocio, utilizza l'elevato grado di eterozigosi che caratterizza le varietà di carciofo attualmente in coltivazione. Il metodo consiste nell'individuare, nell'ambito di progenie provenienti da incroci casuali o da precisi programmi di *breeding*, quelle piante che presentino pregevoli caratteristiche bio-agronomiche, e nel moltiplicarle successivamente per via agamica (Mauromicale e Ierna, 2000 b). Con tale metodo è possibile l'ottenimento di cultivar con caratteristiche anche profondamente diverse dai parentali di partenza, ma che inevitabilmente maturano i capolini in primavera. Infatti, anche quando si utilizzano come parentali i cloni precoci (autunnali), il "passaggio attraverso il seme" comporta il ritorno alla fase giovanile delle plantule, e la conseguente perdita del carattere "autunnalità".

I vantaggi consentiti da questo metodo sono rappresentati, dalla possibilità di ottenere nuovi cloni e di poterli introdurre e diffondere velocemente in coltura, in quanto, essendo primaverili è possibile avvalersi del contributo della micropropagazione *in vitro* per intensificare il ritmo della loro moltiplicazione.

Il limite più consistente, invece, è costituito proprio dalla impossibilità di ottenere cloni a maturazione autunnale, al pari delle varietà autunnali mediterranee, quali *'Violetto di Provenza'*, *'Violetto di Sicilia'* etc.

Il metodo in questione, comunque, ha permesso di ottenere nuovi genotipi tra i quali si ricordano *Camerys*, *Caribou*, *Salanquet*, *Cacique*, *Carlite*, *Terom* (Mauromicale, 1987).

Anche in Italia sono state ottenuti ed introdotti in coltura nuovi genotipi quali: *Grato 1* e *Grato 2*, con caratteristiche vicine a quelle di *Romanesco*; *Etrusco* e *Moro di Corneto* somiglianti a *Terom* e *Romanesco*.

La costituzione di varietà a propagazione per “seme” (achenio sotto il profilo botanico), è stata messa a punto nell'ultimo ventennio (Mauromicale e Ierna, 2000 b). Essa è finalizzata alla creazione di nuovi genotipi con struttura genetica altamente uniforme e sostanzialmente differenti dai genotipi di partenza, i quali, a seguito dell'elevato grado di eterozigosi, vengono propagati per via agamica. L'impiego dell'achenio in luogo dei tradizionali organi di propagazione (ovoli, frazioni di ceppaia, carducci, cabosses etc.) comporta alcuni sostanziali vantaggi, tra i quali si ricordano (Basnizki e Zohary, 1994):

- riduzione dei costi di impianto a seguito della più agevole meccanizzazione delle operazioni;
- miglioramento dello stato sanitario della coltura, la qual cosa si traduce spesso nella possibilità di concretizzare maggiori produzioni areiche;
- possibilità di ottenere cultivar con caratteristiche idonee a specifici utilizzi (biomassa, industria conserviera, estrazione di olio da achenii etc.), con conseguente possibilità di specializzazione colturale;

- estrinsecazione della piena capacità produttiva già dal primo anno di età, che consentirebbe di ridurre ad un solo anno la durata della carciofaia, agevolandone l'avvicendamento;
- ottenimento di nuove cultivar velocemente diffusibili, con conseguente veloce diversificazione della gamma di prodotto collocabile sui mercati nazionali ed esteri.

La sequenza delle fasi del lavoro di miglioramento genetico che conduce alla costituzione di una varietà a propagazione gamica può essere così sintetizzata (Foury, 1967; Perrino e Pacucci, 1974; Mauromicale e Ierna, 2000 b):

- scelta dei parentali sulla base delle finalità da perseguire;
- autofecondazioni manuali ripetute. La tecnica prevede il preventivo isolamento dei capolini portaseme, al fine di evitare la ricezione di polline estraneo, ed il conseguente prelievo del polline maturo dagli stessi capolini. Attesa la marcata dicogamia proterandra della specie (Foury, 1967), è possibile conservare il polline a temperature di 3 – 4 °C onde allungarne la vitalità di 5 – 7 giorni, cioè fino a quando non si realizzerà la recettività degli stimmi, momento in cui si rende possibile l'impollinazione manuale, attraverso una o più manipolazioni. L'impollinazione viene eseguita tramite l'ausilio di pennelli a setole morbide, e consiste nello spennellare delicatamente il polline raccolto sugli stimmi recettivi;
- costituzione di linee *inbred*, attraverso 4–6 sequenze di autofecondazione. Le piante appartenenti alle singole linee (in vero assai depresse a seguito dell'*inbreeding*) possono essere lasciate interincrociare al fine di ripristinare parte del vigore perso;

- costituzione di ibridi F₁ ottenuti attraverso l'incrocio fra linee inbred selezionate. Su scala ridotta, tale operazione è in genere preceduta dal lavaggio delle calatidi portaseme, onde aumentare la purezza dell'incrocio, la recettività degli stimmi ed allungare la vitalità del polline successivamente aderente agli stimmi; non sempre, però, tale operazione sembra necessaria (Pécaut *et al.*, 1985). Per la produzione di “seme” su scala commerciale, nell'ultimo decennio è stata utilizzato il carattere “maschiosterilità”, scoperta per la prima volta da Principe (1984), e governata da un singolo gene recessivo. Più tardi, Basnizki e Zohary (1994), hanno scoperto due geni recessivi non allelici responsabili del carattere in esame, utilizzati nella costituzione dei loro ibridi.

Gli ibridi F₁ utilizzano gli effetti benefici dell'eterosi e del “risanamento naturale” a seguito del processo gamico, la qual cosa si traduce in un migliore stato fisiologico (Cosentino e Mauromicale, 1990) maggiore rigoglio vegetativo, nonché in un considerevole incremento della capacità produttiva (Mauromicale *et al.*, 2004 b).

Le ricerche sulla possibilità di creazione di ibridi da seme, cominciate in Francia intorno alla metà degli anni '60, attraverso soprattutto lo studio della biologia fiorale e della segregazione dei caratteri (Foury, 1967; 1969 b), hanno permesso la costituzione dei primi ibridi sufficientemente uniformi circa 20 anni dopo, ad opera soprattutto di ricercatori israeliani (Basnizki e Zohary, 1987).

Le prime cultivar messe a punto negli anni ottanta (*Talpiot, Giorgio, Agribas, 044* etc.) erano caratterizzate da epoca di maturazione tardiva (tra aprile e maggio), elevate produzioni areiche e contemporaneità di

emissione, e presentavano per lo più capolini poco pigmentati, globosi od allungati (Basnizki e Zohary, 1987; Mauromicale e Ierna, 2000 b). Il limite sostanziale alla diffusione su larga scala di tali varietà è stato rappresentato dalla scarsa reattività all'azione precocizzante dell'acido gibberellico, per cui esse non si prestavano a sostanziali modifiche del calendario produttivo (Mauromicale *et al.*, 1989). Tale limite era presente anche nei successivi ibridi F₁ H 137 ed H 223, i quali però presentavano già caratteristiche dei capolini più idonee alle esigenze dei mercati italiani (Mauromicale e Ierna, 2000 b).

Di più recente costituzione sono gli ibridi F₁ molto reattivi ai trattamenti con AG₃, dei quali la cultivar 'Orlando' può considerarsi capofila (Mauromicale e Ierna, 2000 b). In diverse ricerche (Basnizki e Goldschmidt, 1994; Mauromicale e Ierna, 1995) è stato dimostrato come la giusta combinazione dei fattori "epoca di semina" e "trattamento con GA₃" sia in grado di realizzare un calendario di produzione non dissimile dai tipi autunnali di vecchia coltivazione (Ierna e Mauromicale, 2004).

- Costituzione di varietà sintetiche

Di un certo interesse appare la possibilità di costituire varietà sintetiche di carciofo, fra le quali la cultivar *Talpiot* si può ritenere il capofila (Basnizki, 1984). Dette cultivar vengono costituite attraverso strategie di selezione fenotipica.

Tra i vantaggi di queste varietà si ricordano:

- la relativa semplicità di costituzione;
- la possibilità di propagazione gamica.

Tra gli svantaggi di queste varietà si ricordano:

- la non perfetta uniformità della cultivar.

Quindi la costituzione di varietà sintetiche e maggiormente indicata per l'industria di trasformazione, meno esigente rispetto al mercato fresco in rapporto alle caratteristiche di uniformità merceologiche del prodotto.

12. Biologia della riproduzione

Le prime ricerche inerenti la possibilità di propagare gamicamente il carciofo hanno avuto luogo in Francia, intorno alla metà degli anni '60 del secolo scorso (Foury, 1967). Tale possibilità ha reso necessaria l'acquisizione di conoscenze circa gli aspetti riproduttivi del carciofo, nonché sull'ereditarietà di alcuni dei principali caratteri fenotipici, fino ad allora di scarso interesse nell'ottica della tradizionale tecnica di propagazione (Foury, 1969; Perrino e Pacucci, 1974; Basnizki e Zohary, 1994). Tali studi sono risultati in seguito di importanza essenziale nello sviluppo di programmi di miglioramento genetico.

12.1 Induzione florigena

Il carciofo è una specie longidiurna obbligata con un fotoperiodo critico pari a circa 10,5 ore (Basnizki e Zohary, 1994). Negli individui provenienti da seme, la transizione dell'apice del germoglio da vegetativo a riproduttivo dipende sostanzialmente dalla interazione fra tre elementi determinanti (Basnizki, 1985): (i) raggiungimento da parte delle plantule di uno stadio "critico", indicato generalmente nella emissione della settima – ottava foglia; (ii) termoperiodo; (iii) fotoperiodo.

Per quanto attiene il primo aspetto, l'emissione di un certo numero di foglie segnerebbe il momento dell'acquisizione da parte della pianta, della "competenza" a rispondere a determinati stimoli induttivi. Ciò sembrerebbe in parte confermato da indagini di Mauromicale e Ierna (1995) i quali, nell'indurre la fioritura precoce mediante impiego di AG₃ in *Orlando* F₁, indicherebbero essenziale in quest'ultimo il raggiungimento dello stadio di 13^a foglia per sortire apprezzabili risultati.

Per quanto attiene il termoperiodo ed il fotoperiodo, l'induzione fiorale in carciofo necessiterebbe di un preventivo periodo di esposizione di 250 ore ad una temperatura di circa 7 °C (Foury, 1987), accompagnato da un fotoperiodo di 8 ore circa. Pur tuttavia è stata accertata l'esistenza di risposte differenziali in funzione del germoplasma utilizzato (Foury, 1987), tanto che la temperatura minima induttiva riportata da vari Autori varia tra 7 e 13 °C (Basnizki e Zohary, 1994); la successiva transizione a fiore sarebbe determinata dal raggiungimento di un fotoperiodo maggiore di 10,5 ore. L'insieme di queste indicazioni farebbe ritenere il comportamento del carciofo simile ad altre specie bienni con *habitus* "a rosetta", le quali necessiterebbero preventivamente di un certo numero di unità termiche vernalizzanti per raggiungere l'induzione a fiore (Mauromicale e Ierna, 1995).

A questo comportamento, però, fanno eccezione alcuni dei tipi varietali più largamente diffusi nel Mediterraneo, quali *Violetto di Sicilia*, *Violetto Spinoso di Palermo*, *Spinoso sardo*, *Violet de Provence*, *Violet Margot* e *Blanca de España*: allo stato attuale, in tali popolazioni le relazioni fra fattori ambientali ed induzione florigena non sono state ancora elucidate.

12.2 Biologia fiorale

Foury (1967) ha studiato in dettaglio la biologia fiorale del carciofo. In base a tali indagini oggi il carciofo viene classificato come specie prevalentemente allogama; tale configurazione riproduttiva non è impedita da fenomeni di autocompatibilità, ma viene favorita da un meccanismo di spiccata dicogamia proterandra (Perrino e Pacucci, 1974), in base al quale la recettività degli stigmi di una data calatide (5 – 6 giorni dopo l'antesi) viene raggiunta solo dopo una significativa riduzione della vitalità dei granuli pollinici prodotti dalla calatide stessa (3 – 4 giorni dopo l'antesi).

Tuttavia, l'esistenza di una certa scalarità di fioritura fra capolini di uno stesso individuo, nonché fra flosculi di una stessa infiorescenza, rende possibile, sebbene improbabile, il riscontro di individui provenienti da autofecondazione (gitonogamia) (Foury, 1967). Allo stesso risultato si perviene agevolmente tramite la frigoconservazione del polline a 2 – 3 °C: in tal modo, infatti, la vitalità dei granuli pollinici può essere prolungata di ulteriori 4 – 6 giorni circa.

Nella maggior parte delle varietà, in ogni capolino di normale conformazione si possono riscontrare circa 800 – 1.400 flosculi (Basnizki e Zohary, 1994): fra questi i primi a raggiungere l'antesi sono i fiori periferici e, proseguendo in direzione centripeta, essa interessa l'intero capolino nell'arco di due – tre giorni. In ogni flosculo, l'androceo matura per primo, e l'elongazione dello stilo non ancora recettivo, permette la fuoriuscita del polline, il quale aderendo alle pareti stigmatiche esterne, si colloca al di sopra della corolla, in una zona facilmente esplorabile da pronubi. Le due labbra stigmatiche raggiungono la recettività due – tre giorni dopo la fuoriuscita del polline (Foury, 1967).

Le varietà coltivate (e persino cloni diversi di un dato tipo varietale) differiscono sensibilmente nella produzione quantitativa e qualitativa di polline. Quest'ultimo, negli ambienti mediterranei, viene raccolto e trasportato da una variegata fauna di imenotteri apoidei, le cui visite iniziano con la deiscenza delle antere, cui si accompagna l'attività di secrezione dei bulbi nettariiferi, e si conclude con l'avvizzimento stigmatico (Basnizki e Zohary, 1994). *Apis mellifera* viene indicata come il principale pronubo in questi ambienti, tuttavia molti altri apoidei solitari vengono spesso riscontrati in carciofaie in antesi, quali *Bombus terrestris* o *Xilocopa violacea* (Pinzauti *et al.*, 1981).

12.3 Formazione dell'achenio

Le varietà di carciofo (e persino i diversi cloni nell'ambito di tipi varietali) differiscono sensibilmente nella capacità di produrre achenii. In esperimenti condotti a Bari (Bianco, 1990) in condizioni di libera impollinazione, il numero di achenii riscontrati per singolo capolino di diversi tipi varietali ha variato tra 115 e 670. In Israele (Basnizki e Zohary, 1994), persino in individui relativamente fecondi ed in condizioni ottimali, è stata riscontrata una percentuale di allegazione non superiore al 50%. Le ragioni di risultati tanto poco soddisfacenti sono ritenute di carattere genetico ed ambientale (Foury, 1967; 1987). Alcuni studi, infatti, indicano differenze varietali nella tendenza a produrre achenii abortiti, talvolta di dimensioni poco inferiori alla norma, talaltra molto piccoli, striminziti e con ovulo ridotto ad una pellicola disseccata e fragile. Nel primo caso la spiegazione risiederebbe in cause di natura trofica (competizione fra achenii per le sostanze di riserva), che porterebbero a morte embrioni meno "competitivi" entro il 20° - 25° giorno dall'antesi, nel secondo caso sono stati invocati non ben definiti scompensi di natura fisiologica nei primi stadi della macrosporogenesi (Foury, 1978; 1987; 1989). I meccanismi coinvolti non sono ancora chiari, così come i fattori scatenanti gli eventi descritti: tuttavia sembra poter individuare nel processo di domesticazione (che ha comportato la preferenza per la propagazione agamica del carciofo probabilmente già a partire dal Medioevo) uno dei fattori che abbiano nel tempo ridotto le capacità riproduttive di tale asteracea (Foury, 1978).

Per quanto riguarda la componente ambientale, è noto come i migliori risultati vengano raggiunti in condizioni di caldo secco: indicazioni bibliografiche specifiche (Foury, 1967; Basnizki e Zohary, 1994), mettono in evidenza che piogge tardive abbassano drasticamente il numero di achenii di ottenibili, attraverso la compromissione della vitalità pollinica, così come dello stato sanitario dei capolini stessi.

12.4 Germinazione del “seme”

Gli achenii di carciofo volgarmente denominati “semi” non presentano, di norma, alcuna forma di dormienza, per cui essi acquisiscono la facoltà germinativa subito dopo la maturazione e la perdono entro 4 – 5 anni; è tuttavia ravvisabile una forte interazione fra condizioni esterne e risposta germinativa (Basnizki e Mayer, 1985; Foury, 1987, 1989; Mauromicale e Licandro, 2002; Ierna *et al.*, 2004b).

In una prova effettuata in condizioni di laboratorio, Basnizki e Mayer (1985) hanno studiato comparativamente il comportamento di achenii ottenuti da libera impollinazione, raccolti da capolini di *Camus de Bretagne* e *Violet de Provence*, nonché di achenii di *Cynara syriaca* Boiss. Le condizioni sperimentali hanno previsto la determinazione della germinabilità e della velocità di germinazione in condizioni di luce e di buio, entro un *range* di temperature compreso fra 10 e 35 °C.

Nel complesso sono scaturiti diversi interessanti risultati: in condizioni di buio gli achenii di *C. syriaca* hanno manifestato una buona germinabilità nel *range* di temperature 10 – 20 °C, mentre più alte sono state le esigenze termiche per l'*optimum* relativo agli achenii di carciofo (15 – 20 °C). Tali differenze sembrerebbero in linea con quanto riportato da Ierna *et al.*, (2004b), i quali però hanno indicato temperature ottimali di germinazione leggermente inferiore (pari a 16 °C) per gli achenii di carciofo. In ambedue le specie, le alte temperature (35°C) hanno drasticamente ridotto la germinazione e, nei pochi achenii germinati, hanno indotto la formazione di radici morfologicamente anomale, dalla funzionalità probabilmente compromessa. Già a 30 °C la luce ha inibito la germinazione, mentre alla stessa temperatura ed in condizioni di buio essa, sebbene ridotta, nei genotipi testati è variata dal 9 al 20% circa.

L'esposizione alla luce, quindi, ha rivelato un comportamento tendenzialmente afotoblastico degli achenii di *Cynara* spp., attesa una riduzione media di germinabilità compresa fra il 10 e l'82%, in funzione del genotipo considerato; la velocità di germinazione, inoltre, è risultata più elevata in condizioni di buio, dove è rimasta invariabile nel *range* di 20 – 35 °C. Gli Autori, inoltre, hanno evidenziato la formazione di uno strato mucillaginoso attorno agli achenii in corrispondenza delle temperature di esposizione più elevate, probabilmente con la funzione di ridurre gli scambi gassosi, in special modo quelli relativi all'O₂.

L'insieme di questi comportamenti (estrema sensibilità agli innalzamenti termici, parziale inibizione della germinazione ad opera della luce e riduzione degli scambi gassosi alle più alte temperatura), viene spiegato come un comportamento adattativo degli achenii di *Cynara* spp. al fine di evitare la germinazione indotta da piogge pre-autunnali, in un periodo di scarsa rispondenza fra condizioni meteorologiche ed esigenze ambientali delle specie (Basnizki e Mayer, 1985).

Le positive ripercussioni agronomiche derivanti dall'introduzione di cultivar a propagazione gamica, hanno portato negli anni ad intensificare le ricerche inerenti la biologia della germinazione di achenii di *Cynara* spp., soprattutto in quelle condizioni, facilmente riscontrabili in ambiente mediterraneo (elevate concentrazioni saline delle acque irrigue, temperature superiori all'*optimum*), potenzialmente limitanti nei confronti di tale processo. In un doppio esperimento, condotto in laboratorio ed in vasi posti all'aperto, Mauromicale e Licandro (2002) hanno valutato, nel primo caso gli effetti di due regimi termici ($20 \pm 0,5$ e $30 \pm 0,5$ °C) e di 4 livelli di salinità del mezzo di germinazione (equivalenti ad una pressione osmotica di 0, -0,3, -0,6 e -0,9 MPa) sulla germinabilità e l'energia germinativa di achenii di *Romanesco* e della cv 4055 F₁, nonché sulla lunghezza delle radichette di tre giorni, limitatamente alle progenie di *Romanesco*; nel

secondo caso, achenii della cv 4055 F₁ allevati in vaso sono stati irrigati con soluzioni a diverse concentrazioni di NaCl (equivalenti ad una pressione osmotica di -0,04, -0,5 e -1,0 MPa), e su di essi è stata registrata la percentuale di plantule emerse. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza gli effetti depressivi sinergici dell'elevata concentrazione osmotica e delle eccessive temperature sulla germinazione e sull'energia germinativa degli achenii. La riduzione della germinazione, infatti, pari al 10% in corrispondenza di 20 °C e -0,6 MPa, è risultata assai più elevata a parità di pressione osmotica del mezzo a 30 °C (60%). In corrispondenza di -0,9 MPa, essa è inoltre risultata ancora relativamente elevata a 20 °C (57,5%) e quasi completamente inibita a 30°C (2,5%). La riduzione dell'energia germinativa è risultata significativamente più elevata in corrispondenza di 30 °C per tutti i livelli di salinità. La lunghezza delle radichette è stata influenzata in maniera altamente significativa dalla salinità del mezzo, tuttavia tale sensibilità è risultata maggiore in corrispondenza di 30 °C piuttosto che di 20 °C, essendo nel secondo caso le radichette risultate in media 1,15 cm, contro la quasi totale inibizione della loro crescita registrata a 30 °C. In condizioni naturali e dopo 20 giorni dalla semina, l'emergenza delle plantule, pari al 96% a -0,04 MPa, è scesa al 48% ed allo 0% rispettivamente a -0,5 e -1,0 MPa, mentre dopo altri 20 giorni e limitatamente alla concentrazione di sali equivalente a -0,5 MPa, l'emergenza è risultata più che dimezzata a causa dell'elevata mortalità delle plantule in corrispondenza dello stadio cotiledonare (Mauromicale e Licandro, 2002).

13. Risorse genetiche

13.1 Specie spontanee del genere *Cynara* e relativa distribuzione geografica

Secondo Rottemberg e Zohary (2005), il genere *Cynara* comprende sostanzialmente il complesso di varietà botaniche *Cynara cardunculus* L., nonché altre sei (forse sette) specie, tutte originarie del Bacino del Mediterraneo.

Il complesso botanico *C. cardunculus* L. è costituito dalla forma selvatica (cardo o carciofo selvatico) *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori, nonché da due forme domestiche, ossia il carciofo [*C. cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori] ed il cardo domestico *C. cardunculus* L. var. *altilis* (DC.). Le altre specie afferenti al genere, tutte rappresentanti esclusivamente la flora spontanea mediterranea, al pari del carciofo selvatico sono piante erbacee perenni ad *habitus* semicespuglioso, più o meno fittamente spinescenti, e con corredo cromosomico diploide $2n = 2x = 34$ (almeno nelle accessioni sino ad oggi studiate); fra tali specie alcune presentano distribuzione fortemente endemica (Basnizki e Zohary, 1994).

Di seguito si riporta una breve disamina dei rappresentanti del genere *Cynara* spp., nonché una breve descrizione delle principali caratteristiche bio – morfologiche.

- ***C. cardunculus* L.:** come già detto, viene attualmente considerato come un complesso di varietà botaniche molto affini. La forma selvatica si presenta ad *habitus* robusto, semicespuglioso, pienamente interfertile con le due forme coltivate (Rottemberg e Zohary, 1996). Il primo a sottolineare le forti affinità filogenetiche in

C. cardunculus L. fu De Candolle (1886), il quale suggerì sulla base delle somiglianze morfologiche, per il carciofo selvatico il ruolo di progenitore del carciofo.

La forma selvatica si caratterizza per la presenza di un'ampia rosetta fogliare molto spinescente, con gruppi di spine parzialmente concresciute alla base delle foglie, steli fiorali molto ramificati, alla cui estremità distale vengono portati capolini con flosculi (fiori) blu violetti. All'interno del genere *Cynara* spp., il carciofo selvatico è indubbiamente il più diffuso geograficamente: sembra sia originario del Bacino del Mediterraneo centro – occidentale, tuttavia la sua presenza si estende, da Est ad Ovest, dal Mare Egeo fino alle isole Canarie e a Madera, mentre da Nord a Sud, dalle coste meridionali della Francia, fino alle coste della Tunisia. Popolazioni isolate sono state rinvenute a Creta, Cipro, Egitto e Turchia, lungo le coste del Mar Nero. Secondo Wiklund (1992), negli areali di distribuzione occidentali prevarrebbero forme con brattee involucriali molto acuminate, sormontate da lunghe spine, mentre nella parte orientale prevarrebbero forme con brattee meno acute, spine meno pronunciate e margini interni con un'evidente pigmentazione paglierina.

Tali forme preferiscono habitat xerofiti, per lo più indisturbati e caratterizzati da terreni argillosi; tuttavia riescono a colonizzare anche ambienti antropizzati, quali bordi stradali o margini di terreni coltivati. A seguito delle correnti migratorie, il carciofo selvatico si è dimostrato in grado di colonizzare vasti areali del Nuovo Mondo: già nel 1845 Charles Darwin notò la sua massiccia presenza in vaste aree delle Pampas. Più recentemente esso si è insediato in Messico, California ed Australia. Presenta corredo cromosomico $2n = 2x = 34$, e la fioritura, negli ambienti mediterranei, avviene in maggio – luglio.

- ***C. syriaca* Boiss.** [*C. auranitica* Post.]: presenta *habitus* simile al carciofo selvatico, dal quale si differenzia per la più ampia lamina fogliare, non settata. Presenta lunghi steli fiorali (superiori a 1,5 m) recanti capolini di dimensioni relativamente ampie. E' pianta spontanea tipicamente mediorientale, dove colonizza per lo più pianure alluvionali con substrato basaltico. La sua capacità di colonizzare nuovi areali fa di essa, in condizioni particolari, una specie infestante. *C. syriaca* è una specie piuttosto variabile sotto il profilo morfologico, al punto che alcuni Autori (Post e Dinsmore, 1933; Wiklund, 1992) ne hanno identificato un'ulteriore specie *C. auranitica* Post. Tuttavia, altri Autori non giustificano tale distinzione interspecifica (Kupicha, 1975; Feinbrun-Dothan, 1978; Mouterde, 1983). La specie presenta corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 34$), e fiorisce in giugno – agosto.
- ***C. cornigera* Lindley** [sin. *C. sibthorpiana* Boiss. et Heldr.]: si tratta di una pianta ad *habitus* più contenuto, con steli fiorali relativamente brevi recanti all'estremità distale uno solo, ovvero pochi capolini sub – sessili. I flosculi sono generalmente bianchi, mentre le foglie, di colore per lo più chiaro, si presentano glabre con prominenti nervature bianche. *C. cornigera* cresce su substrati calcarei lungo le coste del Sud della Grecia, Creta ed altre isole dell'arcipelago dell'Egeo, fino a Cipro, lungo le coste occidentali dell'Egitto ed in Cirenaica. Presenta corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 34$) e fiorisce prima delle altre specie congeneri (aprile – maggio).
- ***C. algarbiensis* Cosson:** si tratta di una pianta dallo sviluppo relativamente contenuto, caratterizzata da foglie biancastre con nervature verdi evidenti in posizione abassiale, e con segmenti fogliari terminanti in brevi mucroni. La sua presenza è limitata al Sud del Portogallo, nonché all'adiacente zona della Spagna

meridionale. Cresce per lo più su terreni sciolti ad un'altitudine superiore a 500 m. Presenta corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 34$) e fiorisce in giugno-luglio (Diaz Lifante, 1990).

- ***C. baetica* (Spreng.) Pau** [includente *C. hystrix*]: si caratterizza per il medio sviluppo, capolini con brattee a margine scuro, e nervature biancastre sulla superficie fogliare abassiale. I flosculi sono generalmente bianchi. Presenta corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 34$) e fiorisce molto tardivamente (luglio – agosto). E' specie nativa della Spagna meridionale e del Nord Marocco, e comprende due sottospecie: (i) *C. baetica* subsp. *baetica* [sin. *C. alba* Boiss.] confinata nel sud della Spagna, dove cresce in zone rocciose e substrati calcarei, ad un'altitudine compresa fra 500 e 1.700 m s.l.m. (Talavera, 1987). (ii) *C. baetica* subsp. *maroccana* Wikl. [*Hystrix* Ball.], la quale differisce dalla prima per la pigmentazione bluastra dei flosculi.
- ***C. cyrenaica* Maire et Weiller**: si tratta di un taxon poco conosciuto, descritto da Maire e Weiller (1939) in Cirenaica. Predilige habitat con suoli pesanti e calcarei, ad un'altitudine superiore a 500 m s.l.m. Fiorisce in maggio – giugno. In letteratura non esiste alcuno studio di carattere citogenetico.
- ***C. humilis* L.** [sin. *Bourgea humilis* (L.) Cosson]: si tratta di una pianta a sviluppo relativamente contenuto, morfologicamente distinguibile per i margini fogliari tipicamente revoluti e gli achenii muniti di estroflessioni (“ali”). Tale peculiarità ha portato molti botanici a considerarla appartenente al genere *Bourgea*, tuttavia Franco (1976), Tavalera (1987) e Wiklund (1992) nei loro studi tassonomici, nonché Rottemberg e Zohary (1996) nei loro studi genetico – molecolari, hanno collocato tale specie all'interno del

genere *Cynara*. *C. humilis* è specie nativa della penisola Iberica, del Nord del Marocco e delle aree costiere algerine. Predilige habitat indisturbati, benché riesca a colonizzare i margini stradali, in un'ampia variabilità tipologica di suoli, ad un'altitudine variabile tra 0 e 1.400 m s.l.m. Frequentemente si incontra in ampie distese assieme a *C. cardunculus* e con *C. algarbiensis* e/o *C. baetica*. In tali areali di congiunzione, sono stati segnalati casi di ibridazione interspecifica di *C. humilis* con le altre tre succitate specie (Wiklund, 1989; 1992). Presenta corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 34$) e fiorisce in maggio – giugno (Fernandes and Queiròs, 1971).

- ***C. tournefortii* Boiss. & Reuter:** la collocazione sistematica di tale specie è problematica, così come non esistono studi di carattere citogenetico; si caratterizza per i capolini sessili, singoli, e trae origine dalla Spagna meridionale (Willkomm e Lange, 1870; Coutinho, 1913; Franco, 1976) e dal Marocco (Emberger e Maire, 1941). Morfologicamente si distingue dalle altre specie del genere *Cynara*, tanto che ci sono dubbi circa la sua attuale collocazione sistematica; Wiklund (1992) lo ha trattato come un *taxon* separato. E' ancora dubbio se faccia parte del *gene pool* del carciofo.

13.2 Affinità genetiche tra le specie

Come già accennato, già studi di carattere morfologico (tassonomia classica) hanno suggerito la stretta affinità tra il carciofo selvatico e cardo coltivate e carciofo (De Candolle, 1886; Hedrick, 1919; Wiklund, 1992). Più recentemente, studi di carattere citogenetico hanno confermato tale ipotesi. Incroci fra carciofo selvatico, cardo e carciofo sono relativamente facili da eseguire, con il risultato di ottenere anche numerosi achenii, nonché ibridi F₁ pienamente fertili (Rottemberg e Zohary, 1996). Inoltre, la stretta affinità fra carciofo selvatico e carciofo è stata messa in luce da studi isoenzimatici (Rottemberg *et al.*, 1996), i quali hanno evidenziato elevati valori di identità (0,92 – 0,96) fra le due specie. Tali evidenze di carattere genetico indicano il carciofo selvatico come (Rottemberg e Zohary, 2005):

- la forma spontanea filogeneticamente più vicina al carciofo;
- la più probabile forma ancestrale di carciofo e cardo domestico;
- il *gene pool* primario selvatico del germoplasma coltivato.

In contrasto con quanto esposto, sono state riscontrate barriere riproduttive fra il complesso di varietà botaniche *C. cardunculus* L. ed alcune delle altre specie selvatiche congeneri (Rottemberg e Zohary, 2005): è stato questo il caso di *C. syriaca*, *C. algarbiensis*, *C. baetica* e *C. humilis*. Gli Autori sono riusciti a ottenere solo pochi achenii frutto di incroci fra i suddetti genotipi e *C. cardunculus*, dai quali, per altro, si sono sviluppati rari individui F₁ semisterili (Rottemberg e Zohary, 1996). Tali risultati sono stati supportati da successive indagini isoenzimatiche, in quanto sono stati trovati valori di identità genetica molto contenuti (0,68 – 0,74) fra le suddette quattro specie, ed il complesso biologico *C. cardunculus* L. Ciò suggerirebbe l'opportunità di considerare queste specie come membri del *gene pool* spontaneo secondario della coltura (Rottemberg e Zohary, 2005).

Fra queste specie, la più vicina alle specie coltivate risulta essere, da un punto di vista morfologico (Wiklund, 1992) e citogenetico (Zohary e Basnizki, 1975) *C. syriaca*.

Tentativi di incrocio fra *C. cornigera* e *C. cardunculus* non hanno avuto esito positivo (Rottemberg e Zohary, 1996), probabilmente a causa: (i) della maggiore precocità di fioritura di *C. cornigera* rispetto alle varietà coltivate, la qual cosa non avrà lasciato il tempo di effettuare impollinazioni tempestive nonché (ii) probabilmente della ristretta variabilità genetica del materiale sperimentale utilizzato. Tuttavia, gli Autori sospettano l'esistenza di barriere riproduttive fra *C. cornigera* e il complesso di specie *C. cardunculus* simili a quelle esistenti per le quattro specie spontanee; in altre parole, anche *C. cornigera* apparterrebbe al *gene pool* secondario della specie (Rottemberg e Zohary, 2005). Gli stessi Autori ipotizzerebbero simili meccanismi anche in riferimento a *C. cyrenaica*.

In conclusione, il germoplasma di carciofo attualmente disponibile potrebbe avvalersi di caratteri ereditabili, relativamente facili da introdurre da accessioni di carciofo selvatico; più problematica sembra essere l'introduzione dalle altre specie di *Cynara*, tuttavia, la possibilità di ottenere seppur pochi achenii vitali, suggerirebbe l'opportunità di approfondire studi circa la possibilità di ibridare tali specie con le varietà coltivate. Diversi, infatti, sono i caratteri interessanti offerti, fra cui la precocità, le proprietà medicinali e l'habitus contenuto (*C. cornigera*), diverse sostanze aromatiche (*C. syriaca*, *C. humilis*) o la resistenza/tolleranza a diverse avversità biotiche.

14. Ereditarietà di alcuni caratteri fenotipici

14.1 Ereditarietà dei caratteri quantitativi

Le informazioni sono per lo più limitate ad alcune differenze varietali. L'espressione della maggior parte dei caratteri morfologici e produttivi descritti da Dellacecca *et al.*, (1976), sembra essere presieduta da più coppie alleliche (Porceddu *et al.*, 1976). E' questo il caso di caratteri quali le dimensioni dei capolini, la forma o il peso (Foury, 1978; 1987). Gli stessi Autori sono arrivati alle medesime conclusioni per caratteri quali le dimensioni della pianta, la ramificazione dello stelo florale, la precocità di produzione ed il ritmo di emissione dei capolini. Per tutti questi caratteri di rilevante interesse economico, progenie segreganti F₂ ed F₃ derivate da incroci intervarietali, hanno mostrato variabilità continua; tuttavia in letteratura non esistono indicazioni precise sul probabile numero di coppie alleliche coinvolte nell'espressione di tali fenotipi (Basnizki e Zohary, 1994).

14.2 Ereditarietà dei caratteri controllati da *major genes*

In passato sono stati descritti diversi caratteri per i quali sono stati riportati rapporti di segregazione di tipo mendeliano, riconducibili ad una singola coppia allelica:

- Presenza/assenza di spine: il passaggio dalla presenza di spine su foglie e brattee, riscontrabile nel carciofo selvatico, così come nei tipi varietali afferenti al gruppo degli "Spinosi" (Porceddu *et al.*, 1976), a varietà inermi, sembra sia dovuta alla mutazione di un singolo allele (Pochard *et al.*, 1969). Inusualmente, però, l'allele per la non spinescenza (*Sp*) sembra essere dominante rispetto

all'allele selvatico per il fenotipo spinescente (*sp*). Diversi Autori hanno confermato tale ipotesi in incroci riguardanti carciofo e carciofo selvatico (Basnizki e Zohary, 1994; Lanteri *et al.*, 2006). Alcuni tipi varietali inermi, infatti, quali *Camus de Bretagne*, *Violet de Provence* o diverse accessioni di *Romanesco*, contengono cloni che, se incrociati con carciofi spinescenti o con accessioni di carciofo selvatico, danno luogo a progenie segreganti per il carattere in questione in rapporto 1:1.

- Marcatori fenotipici in foglie e flosculi: allo stato attuale sono disponibili due marcatori: un primo detto “*yellow leaf*” (*feuille jaune*), designato *j*, consistente in una mutazione recessiva con comparsa di foglie apparentemente prive di clorofilla, riscontrato in una progenie di *Romanesco* proveniente da autofecondazione (Foury e Aubert, 1977), ed un secondo detto “*white flower*” (*fleur blanche*), una mutazione recessiva designata *b* (Foury *et al.*, 1977) consistente nella comparsa di flosculi privi di pigmentazione in individui derivanti da autofecondazione in *Camard*.
- Pigmentazione dei capolini: tradizionalmente le varietà di carciofo vengono distinte sulla base della pigmentazione dei capolini (verdi o violetti), carattere estremamente importante per la definizione della destinazione d'uso delle varietà. Si tratta tuttavia di un carattere estremamente variabile in rapporto al genotipo considerato, nonché alle condizioni ambientali (Basnizki e Zohary, 1994). Secondo Pochard (1969) e Foury (1969a), tale carattere sembra essere controllato da un allele dominante per la produzione di antociani, nonché da un ulteriore allele dominante per l'inibizione della pigmentazione. Tuttavia, la variabilità continua riscontrata da altri Autori nelle progenie sperimentali ha indotto a ritenere più complesse le basi genetiche dell'espressione del

carattere; apparentemente sembrerebbero coinvolti più alleli modificatori in aggiunta ad uno o due *major genes* (Basnizki e Zohary, 1994).

- Maschiosterilità: allo stato attuale, in carciofo è stata segnalata l'esistenza del carattere "maschiosterilità", di natura genetica (Principe, 1984), indicata come ms_1 , la cui espressione sembra sia presieduta da un singolo allele recessivo. Basnizki e Zohary (1994) hanno segnalato l'esistenza di due ulteriori geni non allelici per la maschiosterilità, indicati con ms_2 ed ms_3 , usati con successo in incroci sperimentali effettuati in Israele.

15. Influenza dell'ambiente sulle caratteristiche biologiche e produttive del carciofo

La produzione cinaricola appare come il risultato di complesse interazioni che coinvolgono aspetti genetici e fattori squisitamente ambientali e colturali. La conoscenza di come questi ultimi riescano ad influenzare l'espressione del fenotipo, risulta imprescindibile nell'ottica di una buona pianificazione territoriale e temporale delle produzioni, nonché nell'individuazione di più opportuni obiettivi perseguibili nei programmi di miglioramento genetico.

In riferimento al carciofo, diversi Autori hanno dimostrato come l'influenza dell'ambiente e dei fattori colturali possa sortire significativi effetti in seno ad importanti parametri quali:

- la produttività e l'articolazione temporale delle produzioni (Mauromicale, 1986; 1994; Mauromicale e Ierna, 1995; Mauromicale *et al.*, 1996; Mauromicale *et al.*, 2004a; 2005a; 2005b);
- le caratteristiche morfo – biometriche dei capolini (Basnizki e Goldsmith, 1994; Foury, 1994; Mauromicale e Ierna, 2000b; Mauromicale e Raccuia, 2000; Ierna e Mauromicale, 2004; Ierna *et al.*, 2004a).

In un biennio di prove, ponendo allo studio gli effetti di due ambienti (Mazzarino-CL, 573 m s.l.m.; Siracusa-SR, 15 m s.l.m) su tre tipi varietali a propagazione agamica, di cui 2 autunnali (*Violetto di Sicilia*, *Violet Margot*) e uno primaverile (*Blanc Hyérois*) Mauromicale (1986) ha dimostrato la sostanziale riduzione del ciclo biologico riscontrata in collina, pari rispettivamente a 50 e 24 giorni per *Violetto di Sicilia* e *Violet Margot*, ed un allungamento del ciclo (pari a 13 giorni) in *Blanc Hyérois*, nonché

l'incremento della precocità commerciale dei tipi riflorenti studiati: al 31 ottobre, infatti, *Violetto di Sicilia* e *Violet Margot* hanno prodotto circa 0,6 capolini pianta⁻¹, contro 0 capolini riscontrati in pianura. Su questi due tipi, anche l'intervallo di tempo intercorrente fra la raccolta del capolini principale ed il primo di ordine successivo si è notevolmente ridotto passando dalla pianura alla collina, essendo risultato rispettivamente pari a 90 e 94 giorni in *Violetto di Sicilia* e 25 e 32 giorni in *Violet Margot*. Comportamento sostanzialmente opposto ha mostrato il tipo varietale *Blanc Hyérois*, il quale ha espresso maggiore precocità commerciale in pianura. A metà aprile, infatti, in pianura aveva già fornito 3,6 capolini pianta⁻¹, contro 0,3 in collina, ed il suo ciclo biologico si è concluso 20 giorni prima in pianura, evidenziando altresì un ritmo di emissione dei capolini più sostenuto.

In una seconda prova condotta in tre ambienti diversi della Sicilia (Siracusa-SR, 15 m s.l.m.; Mazzarino-CL, 573 m s.l.m.; Randazzo-CT, 650 m s.l.m.), considerevolmente diversificati sotto il profilo microclimatico, Mauromicale (1994) ha messo in evidenza gli effetti dell'ambiente di coltivazione sulle caratteristiche produttive della varietà sintetica *Talpiot* (Basnizki e Zohary, 1987). I risultati hanno dimostrato come la scelta dell'ambiente di coltivazione abbia sostanzialmente modificato il calendario di produzione, ritardandolo all'aumentare della quota altimetrica. A Siracusa, infatti, la raccolta è iniziata e si è conclusa con un anticipo pari rispettivamente a 8 e 19 giorni rispetto a Mazzarino, e a 24 e 29 giorni per Randazzo, con picchi di produzione in corrispondenza del 18 maggio (Siracusa), 28 maggio (Mazzarino) e 20 giugno (Randazzo), ed un tempo medio di raccolta dei capolini pari rispettivamente a 7,2, 9,8 e 8,5 giorni.

In una prova effettuata in un biennio in due ambienti diversi (Cassibile-SR, 15 m s.l.m.; Geracello-EN, 550 m s.l.m.), differenziati sotto il profilo microclimatico, utilizzando due tipi varietali riflorenti (*Violetto di Sicilia*,

Violet de Provence) ed uno semi-tardivo (*Romanesco* clone C3), Mauromicale *et al.* (2004a) hanno studiato l'influenza dell'ambiente di coltivazione sulla precocità commerciale, sul decorso delle produzioni e sulle caratteristiche dei capolini. Per effetto delle condizioni “naturalmente vernalizzanti” riscontrate in collina, è stato possibile evidenziare per i due tipi autunnali un anticipo di circa 1 mese della prima raccolta rispetto alla pianura, ma soprattutto un più intenso ritmo di produzione dei capolini durante il periodo autunnale, dimostrando la tendenza delle due varietà di soddisfare le proprie esigenze in freddo prima che in pianura. Tali effetti sono apparsi più apprezzabili in *Violetto di Sicilia*, il quale al 31 dicembre ha fornito 5,1 capolini pianta⁻¹ in collina contro 0,3 capolini pianta⁻¹ in pianura, mentre per *Violet de Provence* alla stessa data ha prodotto 4,1 capolini pianta⁻¹, contro 0,6 in pianura. Tali differenze sono scaturite dal più intenso ritmo di maturazione dei capolini, essendosi ridotto il numero di giorni intercorso fra la raccolta del capolino principale ed il primo di ordine successivo, di 113 (ottobre) e 75 (novembre) giorni in *Violetto di Sicilia*, e di 64 (ottobre) e 74 (novembre) giorni in *Violet de Provence*. Ciò acquisisce ancor più importanza se si considera che le condizioni induttive riscontrate in collina, hanno influito non solo sulla precocità di induzione fiorale, ma anche sulla differenziazione delle ramificazioni secondarie e sull'induzione fiorale delle stesse (Mauromicale *et al.*, 2004a). Il clone *Romanesco C3*, ha invece messo in evidenza un comportamento del tutto singolare, considerato che in collina il 17% circa delle piante ha regolarmente “maturato” il capolino principale a metà dicembre; tuttavia la restante parte delle piante, che peraltro aveva già differenziato il capolino principale, è rimasta bloccata dal successivo abbassamento termico, cosicché i loro capolini sono arrivati a maturazione soltanto in primavera. In pianura, per contro, il decorso termometrico più mite, se da un lato non ha permesso di ottenere entro dicembre alcun capolino principale di dimensioni accettabili,

dall'altro è risultato in grado di sostenere un continuo processo di accrescimento dei capolini medesimi, consentendo alle piante di “maturare” i primi capolini primaverili con 1 mese di anticipo rispetto alla collina, e di produrre 2,7 capolini pianta⁻¹ al 31 marzo. In riferimento gli effetti dell'ambiente sulle caratteristiche dei capolini, quelli relativi ai tipi autunnali coltivati in collina si sono presentati di forma significativamente più allungata e steli con fiorali considerevolmente più lunghi, probabilmente in relazione al maggior contenuto di gibberelline endogene indotto dalla collina. Su *Romanesco* clone C3, invece, gli effetti dell'ambiente si sono estrinsecati soltanto sul peso unitario del capolino, risultato maggiore in pianura.

In un biennio di ricerche volto ad individuare il miglior ambiente per la produzione di plantule radicate, Mauromicale *et al.* (2005b) hanno messo a confronto gli effetti di 2 località (Siracusa-SR, 15 m s.l.m.; S. Domenica Vittoria-ME, 1.100 m s.l.m.) assai differenziate sotto il profilo microclimatico, sul comportamento di un clone di *Violetto di Sicilia* (9/8) precedentemente selezionato presso la Facoltà di Agraria di Catania (Mauromicale e Copani, 1989). Le plantule, ottenute mediante idonea tecnica di propagazione (Mauromicale e Licandro, 2004), sono state successivamente trapiantate in due località, Siracusa-SR, 15 m s.l.m e Moio Alcantara-ME, 560 m s.l.m., rispettivamente nelle date 14 luglio e 25 maggio, al fine di valutarne le prestazioni bio – produttive. L'indagine ha messo in luce differenze molto interessanti, in quanto sia a Siracusa che a Moio Alcantara, le plantule prodotte a S. Domenica Vittoria rispetto a quelle provenienti da Siracusa hanno manifestato un più elevato ritmo di emissione fogliare, ed un minor numero di foglie in corrispondenza dello stadio A (Foury, 1967) di differenziazione del capolino principale (mediamente 42,8 contro 43,3). Esse hanno altresì manifestato maggiore precocità, essendo cominciata la raccolta del capolino principale in media

con un mese di anticipo sia a Siracusa che a Moio Alcantara, ed un più elevato ritmo di emissione dei capolini. Questi ultimi, pur non essendo risultati di peso significativamente diverso, se provenienti da plantule prodotte in montagna hanno manifestato una più spiccata pigmentazione ed una maggiore compattezza delle brattee.

In riferimento alle modificazioni delle caratteristiche dei capolini, in ricerche condotte da Mauromicale e Ierna (2000b) in due località (Siracusa e Catania), e su due varietà di carciofo (*Orlando* F₁ e *Violetto di Sicilia*) sono stati valutati gli effetti di 2 e 3 epoche di semina rispettivamente per Siracusa (10 luglio, 10 agosto) e Catania (1 luglio, 20 luglio e 10 agosto), 4 e 3 applicazioni di GA₃ a 60 ppm rispettivamente per Siracusa (piante non trattate, 1, 2 e 3 trattamenti allo stadio di 8^a, 15^a e 25^a foglia) e Catania (piante non trattate, 2 e 3 trattamenti allo stadio di 8^a, 15^a e 25^a foglia), in riferimento ai parametri morfometrici dei capolini e degli steli fiorali secondari. Gli Autori hanno messo in evidenza significativi effetti in sia in relazione al periodo di raccolta dei capolini, che al periodo di semina (o impianto) o ai trattamenti con GA₃. In relazione al periodo di raccolta, l'anticipo di questa operazione colturale, ottenuto tramite l'anticipo della messa a dimora dei corpi riproduttori e l'impiego di GA₃, ha comportato in entrambi i genotipi una significativa riduzione del peso fresco, maggiormente evidente in *Orlando* F₁, mentre il diametro longitudinale e trasversale degli stessi è significativamente incrementato nelle raccolte più tardive (novembre) rispetto a quelle più precoci (febbraio). L'anticipo della raccolta ha inoltre comportato una significativa modificazione dell'indice di forma dei capolini (rapporto fra diametro longitudinale e trasversale), ma in maniera più accentuata in *Orlando* F₁. In entrambi i genotipi, il ritardo dell'epoca di semina ha comportato un significativo aumento del peso e del diametro trasversale dei capolini, riducendone nel contesto il diametro longitudinale e l'indice di forma. Risposte differenziate per anno e genotipo

sono state riportate in relazione alla lunghezza degli steli fiorali. In relazione ai trattamenti con GA₃ è stata notata una significativa riduzione del peso fresco dei capolini relativi alla cv *Orlando* F₁, nonché i due diametri, particolarmente quello trasversale, ma in ragione inversa al ritardo dell'epoca di semina; come conseguenza di ciò, l'indice di forma ha subito significativi incrementi in entrambe le varietà, soprattutto in relazione alle semine più precoci. Avuto riguardo alla lunghezza degli steli fiorali, effetti diversificati sono emersi in relazione alla varietà, all'anno, nonché al numero di trattamenti.

L'insieme delle poche ma significative sperimentazioni brevemente riportate, ha messo in luce come alla base del determinismo della produzione ci sia un complesso insieme di interazioni fra fattori genetici ed epigenetici, che da un lato potrebbe essere proficuamente utilizzato per l'ampliamento del calendario di offerta del prodotto (Mauromicale, 1986; Foti e Mauromicale, 1994), dall'altro però ribadisce la necessità di meglio comprendere le risposte di natura genetica e fisiologica, onde poter opportunamente sostenere l'introduzione di innovazioni di processo nel panorama cinaricolo di tipo intensivo.

16. Marcatori molecolari e miglioramento genetico

16.1 Concetti di base

Per biotecnologie si intende “*qualsiasi tecnica che utilizza organismi viventi, o sostanze da essi ricavate, con l’intento di creare o modificare dei prodotti, per migliorare piante o animali, o per sviluppare microrganismi per specifici usi*” (Kumar, 1999). In agricoltura le biotecnologie hanno trovato principale applicazione nello sviluppo di colture cellulari per una più rapida propagazione delle specie di interesse, nella diagnostica fitopatologia per il rilevamento di patogeni attraverso l’uso di anticorpi monoclonali o di sonde molecolari, nel miglioramento genetico delle specie agro – forestali al fine di introdurre nuovi caratteri in modo più efficace ed economico rispetto ai metodi convenzionali attraverso l’uso dei marcatori molecolari (Persley, 1992).

Sotto quest’ultimo profilo, uno degli obiettivi principali dei *breeders* è quello di migliorare cultivar già esistenti, imperfette per uno o più caratteri, attraverso l’incrocio con linee in possesso di caratteri desiderati. Per raggiungere tale scopo, le metodiche di miglioramento genetico classico prevedono una serie di incroci, nei quali i meccanismi di segregazione ed ereditarietà interessano l’intero genoma, seguiti dalla selezione dei ricombinanti “superiori” sotto il profilo desiderato. Siffatte procedure necessitano di protocolli assai lunghi e dispendiosi, spesso per la quantità di incroci da eseguire, nonché per le diverse generazioni di piante da allevare e selezionare fenotipicamente.

Con l’avvento delle tecnologie relative ai marcatori molecolari, sono oggi implementabili diverse strategie in grado di superare, o comunque ridimensionare, molte delle problematiche pratiche ed economiche connesse ai metodi di miglioramento genetico classico.

16.2 I marcatori genetici

I marcatori genetici possono essere definiti come punti distribuiti lungo un genoma, che servono da riferimento per l'analisi dello stesso (Lefebvre e Chevre, 1995).

16.2.1 I marcatori morfologici

L'ereditarietà di questi marcatori può essere monitorata visivamente, quindi senza il ricorso a complesse metodologie di laboratorio. Se l'espressione di un determinato carattere è presieduto da una singola coppia allelica (caratteri detti qualitativi, monofattoriali o singolo locus), una volta accertata l'influenza dell'ambiente sul fenotipo, tali marcatori possono essere utilizzati come marcatori genetici. Tuttavia, la loro espressione è influenzata, oltre che dall'ambiente, da interazioni di tipo epistatico o pleiotropico, potendo rendere errate le conclusioni cui si giunge. Inoltre il loro numero è molto limitato ed il loro ottenimento presuppone procedure di non sempre facile esecuzione. A ciò si aggiunga che i relativi alleli interagiscono in maniera mendeliana (dominante – recessivo), rendendo spesso indistinguibili, nell'immediato, gli individui omozigoti da quelli eterozigoti.

16.2.2 I marcatori molecolari

L'analisi della variabilità genetica di una popolazione può essere effettuata mediante l'uso di tecniche biomolecolari, capaci di rilevare le differenze (mutazioni) tra regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa specie.

Di queste tecniche fanno parte i marcatori genetici. Essi non rappresentano un gene target, ma agiscono come “bandierine” sul

cromosoma, segnalando la loro posizione (locus) nel genoma. Ci sono tre tipi principali di marcatori genetici: i marcatori morfologici, chiamati anche “classici” o “visibili”, perché si basano su caratteri fenotipici; i marcatori biochimici, che includono le varianti alleliche degli enzimi (proteine), chiamati isoenzimi; i marcatori molecolari, o basati sull’analisi del DNA, che rivelano i punti di variabilità sul DNA (Jones et al. 1997; Winter e Kahl, 1995).

I marcatori molecolari rappresentano un sistema di analisi genomica di grande precisione in quanto non sono riferibili all’attività di specifici geni, ma si basano direttamente sulla rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA, differenze dovute ad inserzioni, mutazioni, duplicazioni ecc..

Un marcatore molecolare si definisce come: “un locus genomico rilevabile con sonde (probe) o primer specifici, che in virtù della sua presenza, permette di identificare inequivocabilmente un tratto cromosomico specifico e le regioni che lo circondano alle estremità 3’ e 5’” (Barcaccia et al. 2000).

Al fine di stimare la variabilità genetica di una popolazione vegetale è necessario indagare i polimorfismi a livello di un pool di marcatori molecolari selezionati attraverso precisi criteri sperimentali. Quanto più elevato sarà il numero di marcatori indagati, maggiore sarà l’attendibilità dei dati ottenuti. Sperimentalmente sarebbe necessario analizzare un numero crescente di loci genetici sino a quando i valori di diversità genetica non raggiungano un valore costante.

La scelta della tecnica da adottare per eseguire misure della variabilità genetica dipende da diversi fattori legati alla conoscenza della specie e del suo genoma, al numero di popolazioni da analizzare, ai tempi e costi dell’analisi.

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

- trattandosi di porzioni di DNA non subiscono interferenza da parte dell'ambiente e sono valutabili a partire da qualsiasi tessuto della pianta;
- identificano porzioni di DNA appartenenti a sequenze trascritte, regioni di regolazione e introni;
- in alcuni casi sono codominanti, consentendo la distinzione tra la condizione eterozigote e quella omozigote;
- non presentano effetti epistatici o pleiotropici;
- nella maggior parte dei casi rilevano polimorfismi neutri in quanto una variazione allelica nel locus marcatore non ha effetti a livello fenotipico;
- la loro analisi può essere automatizzata.

Il numero di marcatori molecolari oggi a disposizione è numeroso ed è sempre in aumento anche in conseguenza della continua messa a punto di nuove tecniche di analisi del DNA. Spesso, comunque, si identificano con sigle diverse marcatori molecolari che differiscono poco gli uni dagli altri e che sono stati studiati con tecniche molto simili tra loro, magari solo perché sono stati messi a punto in laboratori distinti (tabella 5).

AFLP (amplified fragment length polymorphism)
ARMS (amplification refractory mutation system)
ASAP (arbitrary signatures from amplification)
ASLP (amplified sequence length polymorphism)
CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)
CAS (coupled amplification and sequencing)
DAF (DNA amplification fingerprint)
IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism)
ISSR (inter-simple sequence repeats)
ISTR (inverse sequence-tagged repeats)
OLA (oligonucleotide ligation assay)
RAMPO (randomly amplified microsatellite polymorphism)
RAMS (randomly amplified microsatellites)
RAPD (random amplified polymorphic DNA)
RBIP (retrotransposon-based insertion polymorphisms)
REF (restriction endonuclease fingerprinting)
RAMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism)
SCAR (sequence characterised amplified regions)
SNP (single nucleotide polymorphism)
SPAR (single primer amplification reactions)
SPLAT (single polymorphic amplification test)
SSCP (single strand conformation polymorphism)
SSLP (simple sequence length polymorphism)
SSR (simple sequence repeats)
STS (sequence-tagged-site)
TGGE (thermal gradient gel electrophoresis)
VNTR (variable number tandem repeats)

Tabella 5: Acronimi comunemente utilizzati per i diversi marcatori molecolari.

Un marcatore molecolare ideale dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- elevata capacità discriminante (polimorfico);
- possibilità di analisi di zone del DNA uniformemente distribuite sul genoma;
- codominanza;
- stabilità, non deve essere influenzato dall'ambiente o avere effetti epigenetici;
- semplicità di analisi;
- ridotti costi di applicazione;
- buona riproducibilità entro e tra laboratori;
- necessità di bassi quantitativi di DNA;
- applicabilità anche in casi di assenza di conoscenze iniziali relative ai genomi oggetto di studio;
- multiallelico, deve presentare più di due alternative alleliche in uno stesso locus genico;
- neutro, le sostituzioni alleliche a livello del locus non hanno altri effetti fenotipici, dunque non comportano effetti selettivi dell'ambiente, ma permettono solo di determinare il suo genotipo;
- non epistatico e non pleiotropico, i locus analizzati non devono essere influenzati dall'informazione genetica presente in un'altra zona del genoma;
- semplice da rilevare;
- ereditato in maniera mendeliana.

Nessuna delle tecniche messe a punto sino ad ora è stata in grado di soddisfare tutti questi requisiti. Spesso perciò la scelta della tecnica da

utilizzare è dettata dagli obiettivi che ci si prefigge e dalle caratteristiche dei genomi da analizzare.

Una prima classificazione dei marcatori molecolari prevede la distinzione di questi ultimi in base alla metodologia applicata. Si distinguono:

- tecniche basate sulla restrizione ed ibridazione degli acidi nucleici: RFLP, VNTR;
- tecniche basate sulla PCR (Polymerase Chain Reaction): STS, SNP, RAPD, SSR, I-SSR, AFLP.

Un'ulteriore classificazione si basa sul numero di loci presi in esame dal marcatore. Si distinguono perciò:

- marcatori "singolo-locus", i quali prevedono l'ibridazione o l'amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l'utilizzo di sonde o inneschi specifici per determinati loci genomici (ad esempio, RFLP e SSR);
- marcatori "multi-locus", basati sull'analisi simultanea di molti loci genomici; applicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali con inneschi oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria (ad esempio, RAPD, AFLP).

I primi sono pertanto marcatori di tipo codominante (permettono cioè di distinguere i loci omozigoti da quelli in condizione eterozigote) mentre i secondi sono marcatori di tipo dominante (ad ogni locus si può evidenziare la presenza o l'assenza della banda, e pertanto non è possibile distinguere la situazione eterozigote da quella omozigote per lo stesso allele marcatore).

Le tecniche di analisi molecolare AFLP, SSR ed SNP sono oggi tra le più utilizzate per valutare la biodiversità a scopo di conservazione. In seguito verranno descritti i marcatori molecolari AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), marcatori dominanti e multi-

locus, utilizzati per il presente lavoro di ricerca. Nei capitoli successivi saranno brevemente descritte e verranno illustrati i principali campi di applicazione della tecnica.

16.2.2a *Marcatore AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)*

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

La tecnica (Fig. 4) 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 primers per sequenze specifiche.

16.2.2b *La tecnica*

La tecnica AFLP prevede le seguenti fasi (Vos et al. 1995) – schematizzate nella Figura 4:

1. *Digestione*: il DNA genomico viene ristretto con due enzimi di restrizione (un rare base cutter come *EcoRI* o *PstI* ed un frequent base cutter come *MseI* o *TaqI*);
2. *Ligazione*: alle estremità coesive dei frammenti ottenuti (dovute alla restrizione) vengono ligati adattatori oligonucleotidici sintetici a doppio filamento, dotati di un estremità coesiva con il sito di restrizione. La ligazione avviene in presenza degli enzimi di restrizione in modo da permettere il taglio di eventuali unioni tra i frammenti, consentendo in questo modo la sola unione tra frammenti ed adattatori. Gli adattatori sono, inoltre, costruiti in modo tale da non ricreare dei siti

riconosciuti dagli enzimi di restrizione dopo il processo di ligazione.

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 *primers* PCR appositamente sintetizzati. A seguito delle reazioni di restrizione e ligazione si possono generare migliaia di frammenti a seconda della complessità del genoma utilizzato.

Non essendo possibile visualizzare un tale numero di frammenti occorre che solo una parte di essi sia amplificata. Si procede perciò ad una amplificazione selettiva spesso preceduta da una preamplificazione.

3. *Preamplificazione*: il primary template viene amplificato utilizzando *primers* universali, costituiti da una sequenza omologa agli adattatori ed al sito di restrizione e recanti, all'estremità 3', un nucleotide che conferisce selettività. In questo modo l'appaiamento dei *primers* avviene solo con una parte dei frammenti. Oltre a ridurre il numero di frammenti, questa fase ha la funzione di evitare l'amplificazione di "artefatti" cioè di frammenti dotati di estremità non completamente complementari ai *primers* utilizzati per la successiva amplificazione. I frammenti ottenuti costituiscono il "secondary template";
4. *Amplificazione selettiva*: il "secondary template" viene amplificato utilizzando *primers* identici a quelli della preamplificazione, ma con l'aggiunta di due o tre nucleotidi addizionali che conferiscono una grande selettività. In questo modo viene estremamente ridotto il numero di frammenti che

potranno essere visualizzati correttamente in seguito. 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 *primers* provoca, a seguito di separazione elettroforetica, l'ottenimento di "smear" ed un elevato livello di comigrazione delle bande; viceversa una eccessività selettività può ridurre drasticamente il numero di amplificati e, di conseguenza, la quantità di informazioni che è possibile ottenere;

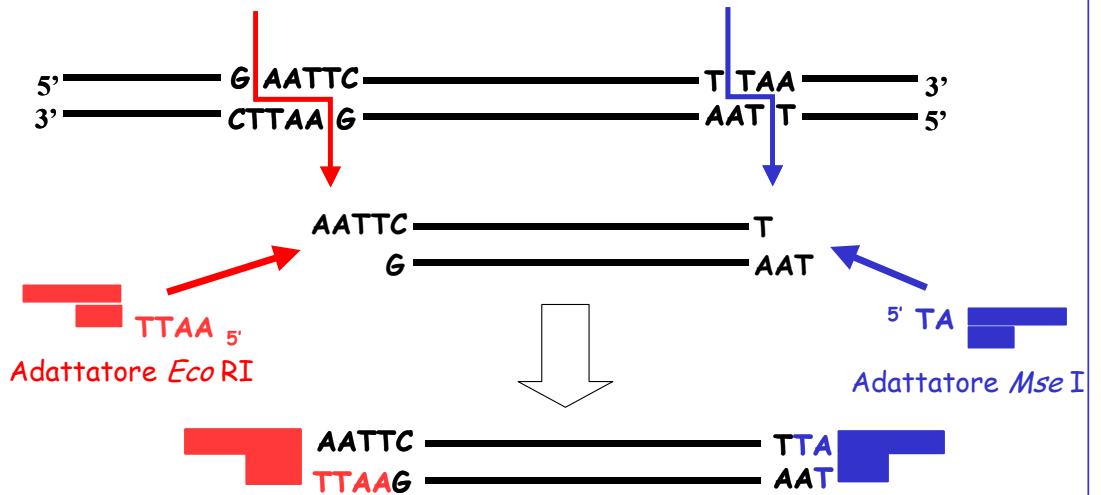
5. *Visualizzazione degli amplificati*: esistono svariate procedure per la separazione elettroforetica degli amplificati e la successiva visualizzazione; tuttavia l'impiego del gel di poliacrilammide (manualmente o mediante sequenziatori automatici), o l'utilizzo di elettroforesi capillare, consentono 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".

L'origine dei polimorfismi AFLP è molteplice e può essere dovuta a diverse cause: mutazioni a livello del sito di restrizione possono provocare sia la perdita che la creazione di un sito di restrizione; mutazioni a livello delle sequenze adiacenti al sito di restrizione e complementari all'estensione dei *primers* selettivi impiegati in fase di amplificazione possono rendere possibile/impossibile l'appaiamento dei *primers* impiegati; all'interno del frammento amplificato possono avvenire inserzioni, duplicazioni o delezioni. Tali mutazioni possono causare, come effetto, la

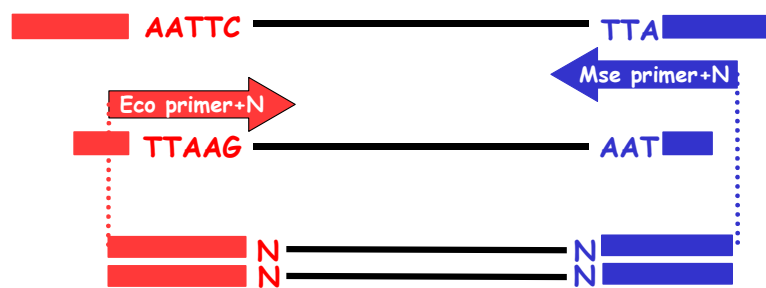
comparsa o la scomparsa di un frammento oppure differenze nelle dimensioni di un frammento ristretto amplificato (Fig. 5).

Marcatori AFLP

a) restrizione-ligazione



b) preamplificazione



c) amplificazione selettiva

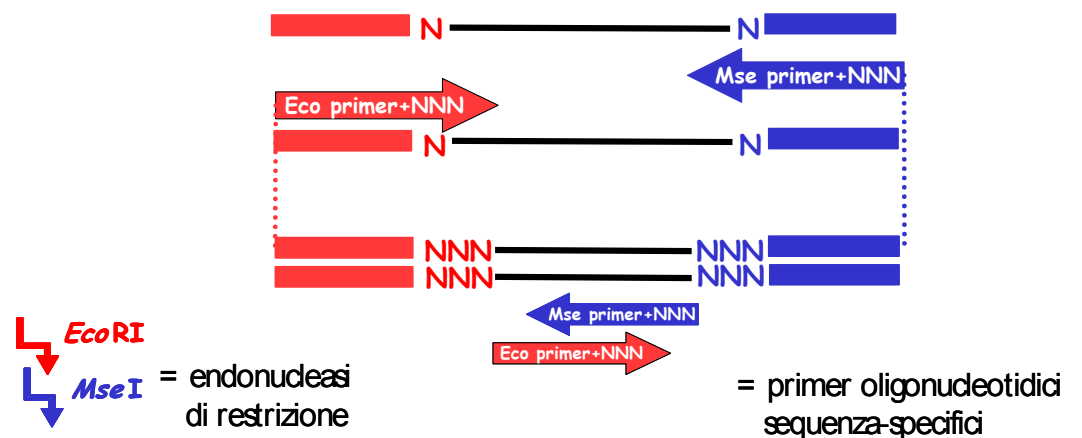


Figura 4: Rappresentazione schematica della tecnica AFLP utilizzando come coppia di primer Eco/rise.

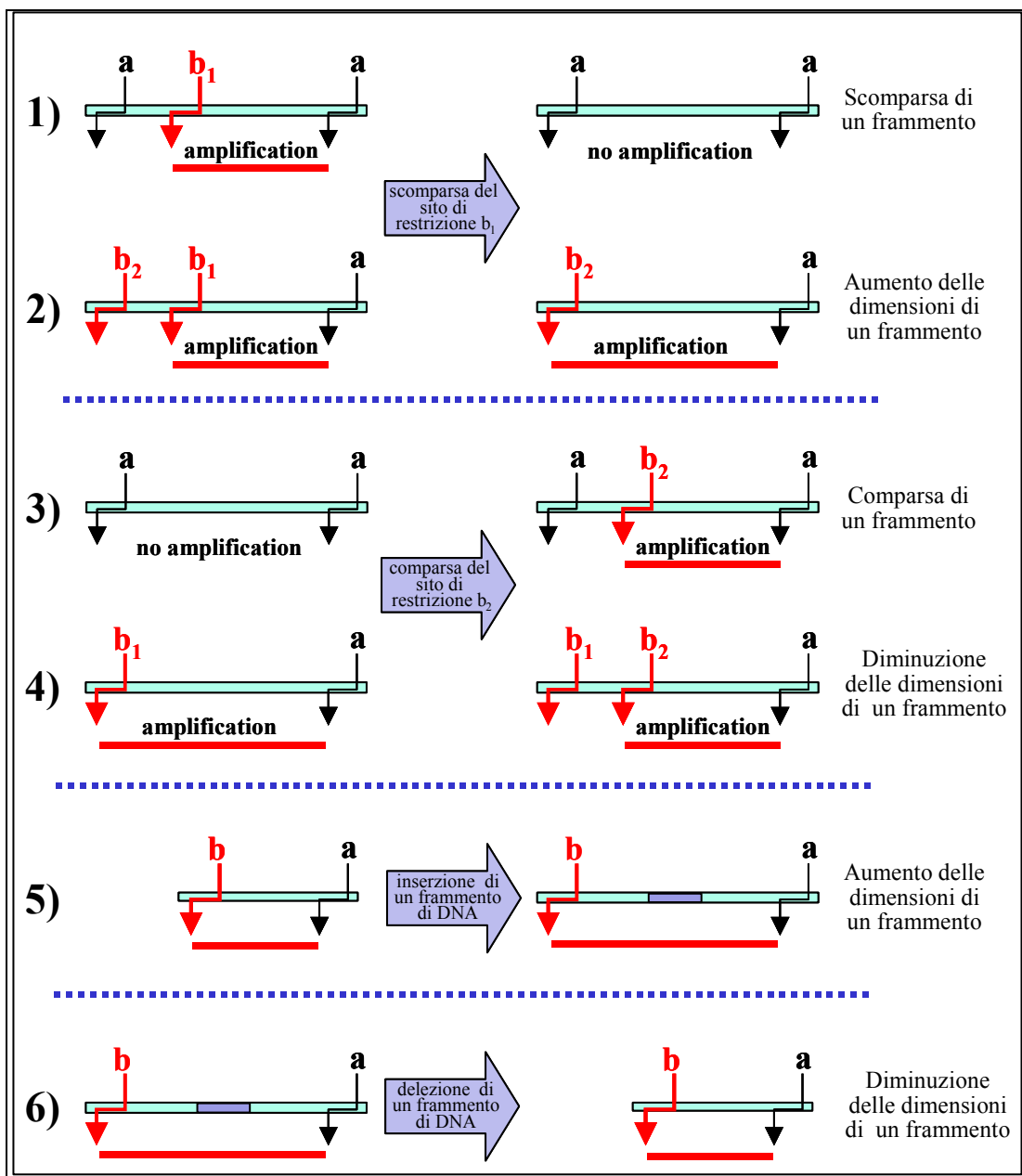


Figura 5: Rappresentazione grafica di sei possibili cambiamenti nei profili elettroforetici evidenziabili mediante tecnica AFLP.

16.2.2c *Pregi e applicazioni dei marcatori AFLP*

I marcatori AFLP sono ampiamente utilizzati in campo vegetale, in quanto offrono importanti vantaggi rispetto ad altri marcatori molecolari. In particolare, uno dei maggiori pregi della tecnica è rappresentato dall'elevato **potere discriminante** rispetto ad analisi con RAPD (Powell et al. 1996; Maughan et al. 1996; Russel et al. 1997; Blears et al. 1998; Daly 1998; Nakajima et al. 1998; Barker et al. 1999), RFLP (Hill et al. 1996; Lu et al. 1996; Maughan et al. 1996; Powell et al. 1996; Russel et al. 1997) e marcatori microsatelliti (Powell et al. 1996; Maughan et al. 1996; Russel et al. 1997). Con varie combinazioni ottenute da un basso numero di *primer* AFLP è infatti possibile ottenere un elevato numero di profili ricchi di bande, generate da amplificazione di loci unici ed uniformemente distribuite nel genoma. Ciò evidenzia anche **un'elevata efficienza in termini di tempo e di costi** di questa tecnica. Inoltre, non rendendosi necessaria la conoscenza di nessuna informazione relativa alle sequenze per la costruzione di primer specifici o di sonde, la tecnica si differenzia da RFLP e microsatelliti per i quali sono necessari forti investimenti iniziali destinati alla caratterizzazione di porzioni target del genoma da analizzare.

Un ulteriore vantaggio è dato dalle **basse quantità di DNA necessarie** per le analisi (a partire da 20 ng); inoltre, è possibile utilizzare anche DNA parzialmente degradato. Grazie a queste caratteristiche e considerando che i marcatori AFLP non richiedono ibridazione di sonde, possono essere facilmente evitati problemi relativi a parziali digestioni e all'ottenimento di pattern elettroforetici poco distinguibili, spesso causa di non riproducibilità per i marcatori RFLP (Vannechoutte 1996). La ripetizione delle amplificazioni AFLP ha dimostrato la quasi totale **riproducibilità** (Vos et al. 1995; Jones et al. 1997) e la presenza di falsi positivi o falsi negativi generalmente ammonta a meno del 2% (Huys et al. 1996; Tohme et al. 1996; Janssen et al. 1997; Arens et al. 1998).

Da quanto si evince dalla letteratura la tecnica è **applicabile per scopi tassonomici**, alla totalità degli organismi. Sono infatti riportati studi, oltre che in ambito vegetale, su batteri (Huys et al. 1996; Janssen et al. 1997; Keim et al. 1997; Terefework et al. 2001;), funghi (Rosendahl e Taylor 1997; Van der Lee et al. 1997; Gonzalez et al. 1998; Majer et al. 1998; Garcia et al. 2002), nematodi (Semblat et al. 1998; Floyd et al. 2002), artropodi (Triantaphyllidis et al. 1997) e vertebrati (Otsen et al. 1996; Ajmone-Marsan et al. 1997; Liu et al. 2002).

Rimanendo in campo vegetale le possibili applicazioni di AFLP sono:

- **costruzione di mappe genetico-molecolari**: una grande quantità di mappe è stata costruita per molte specie, tra le quali mais, orzo, riso, sorgo, girasole, erba medica, patata pomodoro, fagiolo, lattuga, carciofo ecc. (Barcaccia et al. 1999; Castiglioni et al. 1999; Lotti et al. 2000; Saliba-Colombani et al. 2000; Chalmers et al. 2001; Kang et al. 2001; Oliver et al. 2001; Hausmann et al. 2002; Menz et al. 2002; Ouedraogo et al. 2002, Lanteri et al. 2006, Portis et al. 2009);
- **analisi filogeniche ed analisi della diversità genetica**: la stima delle distanze genetiche basate sulle differenze dei pattern AFLP si sono rivelate notevolmente informative in studi relativi alle diversità genetiche (Powell et al. 1996; Greef et al. 1997; Hagen et al. 2002; Hurtado et al. 2002; Lanteri et al. 2003; Sasanuma et al. 2002; Steiger et al. 2002; Ude et al. 2002), ad analisi filogenetiche (Sharma et al. 1996; Heun et al. 1997; Kardolus et al. 1998; Aggarwal et al. 1999; Mace et al. 1999; Kim et al. 2002; Kropf et al. 2002; Liebers et al. 2001, Portis et al. 2006, Portis et al. 2005, Portis et al. 2005, Portis et al. 2005, Lanteri et al. 2004); alla genetica di popolazioni (Rieseberg et al. 1999; Russel et al. 1999; Van der Hulst et al. 2000; Wong et al. 2001; Coart et al. 2002) ed alle origini geografiche di

genotipi e pool genici (Beismann et al. 1997; Heun et al. 1997; Paul et al. 1997);

- **miglioramento genetico:** è stato verificato che, nonostante la tendenza di alcuni gruppi di marcatori AFLP ad essere ereditati in modo associato (Ranade e Sane 1996), i frammenti amplificati tendono a coprire tutti i cromosomi e sono ereditati in modo mendeliano (Akerman et al. 1996), pre-requisito fondamentale per l'utilizzo della tecnica in programmi di miglioramento genetico. In particolare i marcatori AFLP sono stati utilizzati per identificazione varietale, analisi delle distanze genetiche, selezione indiretta, reincrocio assistito (programmi di selezione assistita da marcatori molecolari: MAS – Marker Assisted Selection).

16.2.2d *Problemi e limiti*

Esistono comunque alcune problematiche relative alla tecnica AFLP. Uno dei principali problemi di questi marcatori (per altro comune a tutti i marcatori multilocus) è l'**omologia** cioè la possibilità che bande omologhe non siano originate dalla stessa porzione del genoma (de la Hoz et al. 1996). Generalmente si assume che bande che migrano nello stesso modo siano omologhe, ma non esistono ragioni oggettive per accettare a priori questa considerazione. La comigrazione di diverse bande rafforza la probabilità che esista omologia tra esse, tuttavia, una banda di un particolare peso molecolare può anche essere originata da frammenti provenienti da regioni diverse del genoma (Mace et al 1999).

Un altro aspetto problematico degli AFLP è legato al **fenomeno della dominanza**, il quale rende impossibile distinguere la condizione omozigote da quella eterozigote. È stata tuttavia suggerita la possibilità di identificare gli individui eterozigoti sulla base dall'intensità della banda amplificata visualizzata sul gel di poliacrilammide (o dall'altezza del picco, a seconda del sistema di visualizzazione utilizzato) (Castiglioni et al. 1999).

L'intensità di una banda generata da un individuo omozigote dovrebbe essere doppia se paragonata a quella prodotta dall'individuo che presenta lo stesso allele in condizione eterozigote, basandosi sulla considerazione che l'amplificazione viene effettuata su un numero doppio di frammenti stampo. Tuttavia, Vos et al. (1995), hanno dimostrato la bassissima sensibilità degli AFLP alla concentrazione iniziale del DNA utilizzato, ottenendo pressappoco la stesse intensità nelle bande generate utilizzando concentrazioni decrescenti di DNA genomico (da 25 ng a 25 pg). Numerose ricerche hanno riportato il fatto che i marcatori dominanti non presentino la stessa efficienza dei marcatori codominanti negli studi di genetica di popolazione (Lewis e Snow 1992; Lynch e Milligan 1994). Le stime effettuate riportano che l'utilizzazione di marcatori dominanti richiede un

numero di individui da 2 a 10 volte superiore rispetto a marcatori di tipo codominante. Tuttavia altri autori (Krauss e Peakall 1998) riportano che questo svantaggio viene ampiamente compensato, per i marcatori AFLP, dall'ampio numero di polimorfismi generabili con una singola amplificazione.

16.3 Principali applicazioni

Le applicazioni dei marcatori molecolari nella ricerca in campo vegetale sono numerose e diversificate a seconda della natura genetica e della rilevanza biologica dei polimorfismi.

Nell'ambito di una specie gli individui si diversificano per un numero più o meno elevato di caratteri, la qual cosa scaturisce da polimorfismi (mutazioni) nelle regioni di DNA omologhe (loci). Il genoma vegetale è comunque molto complesso e di conseguenza è difficile valutarlo per ogni individuo nella sua globalità o confrontarlo tra individui per osservarne le differenze. Tuttavia, i marcatori molecolari hanno messo a disposizione della ricerca genetica strumenti prima impensabili, poiché consentono di identificare con certezza una specifica sequenza nucleotidica e quindi di analizzare polimorfismi di particolari geni o regioni cromosomiche.

Attualmente esistono molte interessanti applicazioni riguardanti i marcatori molecolari; ai fini della interpretazione del presente lavoro se ne riportano due in particolare: (i) costruzione di mappe genetiche e selezione assistita; (ii) caratterizzazione e dissezione della variabilità genetica.

16.3.1 Costituzione di mappe genetiche e selezione assistita

I marcatori molecolari, potendo co – segregare con i geni e venendo ereditati secondo modelli mendeliani, permettono di costruire mappe genetiche sature di molte piante di interesse agrario. E' questo un settore di grandi potenzialità applicative per il miglioramento genetico (MAS, *Marker Assisted Selection* = selezione assistita). Mappe genetiche sature di interi genomi, intese come rappresentazioni grafiche dei singoli gruppi di associazione con l'indicazione dell'ordine e della posizione relativa dei geni

lungo il cromosoma, possono essere sviluppate sulla base dei valori di ricombinazione analizzando la segregazione dei marcatori molecolari in progenie ottenute con appropriati programmi di incrocio (Barcaccia *et al.*, 2000 b; Kumar, 1999; Collard *et al.*, 2005). Com'è noto, la costruzione di mappe genetiche si basa sul fatto che maggiore è la distanza fra due marcatori lungo il cromosoma, maggiore è la probabilità che un evento di ricombinazione (conseguenza del *crossing-over*) interrompa l'associazione tra alleli di questi geni. L'analisi delle frequenze di ricombinazione consiste nel seguire la trasmissione ereditaria di alleli marcatori parentali in una popolazione da incrocio e consente di determinare le associazioni e di mappare i geni lungo il cromosoma. Grazie a una serie numerosa di confronti fra dati di segregazione di coppie di marcatori (test a due punti) possono così essere definite le associazioni, calcolate le distanze di ricombinazione assegnando a ciascun gene marcatore la sua posizione in relazione agli altri geni marcatori dello stesso gruppo.

La distanza tra geni marcatori viene espressa in centimorgan (cM), cioè unità di ricombinazione, pari ad una distanza che fa ottenere un gamete ricombinante ogni 100 prodotti di meiosi. Generalmente alla frequenza di ricombinazione viene applicata una funzione che tiene conto dell'interferenza, cioè del fenomeno secondo cui la frequenza del *crossing-over* in una determinata regione *cromosomica* può essere modificata a causa del *crossing-over* possibile in una regione vicina.

Tali procedimenti statistici possono essere effettuati tramite l'ausilio di specifici *software*, quali *MapMaker* (Lander *et al.*, 1987) o *JoinMap* (Stam e Ooijen, 1995).

In generale le popolazioni segreganti utilizzate nei vegetali per la costruzione di mappe genetiche sono rappresentate da popolazioni F_2 , ottenute mediante autofecondazione dell'ibrido F_1 prodotto attraverso

l'incrocio di due linee omozigoti, oppure da popolazioni BC₁ (*backcross*) ottenute mediante reincrocio dell'ibrido F₁ con una delle due linee parentali.

L'impiego di popolazioni di mappaggio F₂ e BC₁ consente di stimare le distanze di mappa sfruttando gli eventi di ricombinazione relativi alle singole meiosi. Tra i due, il metodo migliore per stabilire se due geni marcatori si trovano sullo stesso cromosoma e per calcolare la loro distanza relativa, è il reincrocio poiché i rapporti fenotipici (molecolari) che si ottengono in questo caso esprimono fedelmente i rapporti fra gameti prodotti dall'ibrido. Nel reincrocio dell'ibrido si ottengono due fenotipi parentali e due fenotipi ricombinanti: questi ultimi, quando ci si trova in presenza di associazione, sono immediatamente riconoscibili perché sempre presenti in misura complessiva inferiore al 50%. Va comunque rilevato che la F₂ fornisce una quantità di informazioni teoricamente doppia rispetto alla BC₁ perché i marcatori segregano sia nei gameti maschili che in quelli femminili della popolazione F₁. In questo modo risulta tuttavia difficile analizzare in dettaglio regioni cromosomiche caratterizzate dalla presenza di marcatori strettamente associati. Inoltre, nel caso di specie annuali, le popolazioni F₂ e BC₁ non possono essere mantenute nel tempo. Una strategia proposta in mais per ovviare a questi inconvenienti consiste nell'impiego di linee inbred ricombinanti, linee RI (Burr *et al.*, 1988), prodotte mediante successivi cicli di autofecondazione a partire da una F₂. Dopo 5–6 generazioni di autofecondazione è possibile ottenere linee altamente omozigoti che risultano fissate per corti blocchi di associazione. Tali linee possono essere mantenute mediante autofecondazione ed offrono la possibilità di aggiungere, in tempi successivi, nuovi marcatori ad una mappa precedentemente prodotta.

E' comunque possibile utilizzare anche la popolazione F₁, se ottenuta attraverso l'incrocio di due genotipi altamente eterozigoti oppure di un genotipo eterozigote con una linea omozigote (*pseudo-testcross*

rispettivamente a due vie o a una via) (Grattataglia e Sederoff, 1994). In realtà, questo approccio coincide con il tipo di analisi genetica eseguita con il metodo del reincrocio e consiste essenzialmente nel seguire separatamente la segregazione di marcatori in condizione eterozigote in ciascuno dei due parentali. Così facendo possono essere prodotte due mappe distinte, una per ciascuno dei due parentali utilizzati nell'incrocio iniziale, se questi sono entrambi genotipi altamente eterozigoti. L'analisi di segregazione può infatti essere condotta separatamente per gli alleli marcatori segreganti dal parentale materno e da quello paterno. Successivamente, loci co-dominanti eterozigoti nei parentali per i medesimi alleli possono eventualmente fungere da loci-ponte per eseguire un allineamento delle due mappe. Se invece l'incrocio è fatto con una linea parentale omozigote (inbred), è possibile produrre una sola mappa genetica per il genotipo parentale eterozigote. In questo modo l'analisi di segregazione potrà infatti essere condotta unicamente per gli alleli marcatori segreganti dal genotipo parentale altamente eterozigote.

In tutte le popolazioni di mappaggio è possibile osservare diversi tipi di segregazione in relazione anche al tipo di marcatori molecolari impiegati (dominante/co-dominante).

Prendendo in considerazione marcatori dominanti, la popolazione F_1 che si genera dall'unione tra due parentali che condividono o sono polimorfici per un determinato allele marcatore, non darà origine a segregazione (sarà monomorfica) se in almeno uno dei parentali l'allele in questione è presente in condizione omozigote. Si avrà invece segregazione 1:1 (presenza v_s assenza dell'allele marcatore) se i due parentali sono polimorfici e, ove presente, l'allele marcatore considerato è in condizione eterozigote; la generazione segregante può essere una F_1 o una BC_1 . Se, infine, i due parentali sono monomorfici e l'allele marcatore è presente in entrambi in condizione eterozigote, nella discendenza si avrà una

segregazione 3:1 (presenza contro assenza dell'allele marcatore). Questa situazione può verificarsi indifferentemente in popolazioni F_1 , BC_1 e F_2 .

Nel caso di marcatori co-dominanti, la condizione eterozigote di un locus genomico è evidenziata dalla presenza di entrambi i possibili alleli marcatori a quel locus. L'unione tra un parentale omozigote ed un parentale eterozigote, indipendentemente dal fatto che gli alleli considerati siano comuni ai due parentali, darà una segregazione 1:1. Se i due parentali presentano un allele condiviso la situazione può riguardare indifferentemente una popolazione F_1 o BC_1 ; se nessuno degli alleli considerati è condiviso, la popolazione di riferimento sarà necessariamente una F_1 . Se invece entrambi i parentali sono in condizione eterozigote e almeno uno degli alleli marcatori di ogni parentale è polimorfico si osserverà una segregazione di tipo 1:1:1:1. Tale situazione è osservabile unicamente nelle popolazioni F_1 ottenute dall'incrocio di genotipi parentali eterozigoti. Infine, l'unione di due parentali eterozigoti per la medesima coppia di alleli marcatori darà una discendenza (F_1 o F_2) che fornirà una segregazione 1:2:1.

Mappe genetiche basate su marcatori RFLP, SSR, AFLP, RAPD etc. sono al momento disponibili per molte specie di interesse agrario. Negli ultimi quindici anni, i genomi delle più importanti piante coltivate sono stati caratterizzati estensivamente ed il confronto dei dati molecolari globalmente ricavati ha rivelato similitudini marcate fra ed entro famiglie di *taxa* botanici, sia in termini di composizione di geni (sintenia) che di disposizione lineare degli stessi lungo il cromosoma (colinearità). Sebbene per molte specie non siano state ancora costruite mappe genetiche, i fenomeni di sintenia e colinearità dei genomi consentono l'impiego di sonde eterologhe e *primer* universali per l'analisi particolareggiata di regioni cromosomiche che portano geni d'interesse al fine di saturarle ed

individuarvi marcatori molecolari associati a tali geni (Barcaccia *et al.*, 2000 b).

Attualmente tali mappe iniziano ad essere utilizzate per identificare geni agronomicamente importanti e utili ai fini della MAS. La selezione assistita viene effettuata a livello genotipica, usando marcatori molecolari strettamente associati a geni che controllano monogenici, come quelli responsabili di resistenze ad organismi patogeni. In questo modo, la valutazione e la selezione dei materiali durante un programma di miglioramento genetico finalizzato alla costituzione varietale potranno essere condotte a livello genotipico direttamente in laboratorio ed indipendentemente dalla valutazione del carattere, evitando il dispendio di risorse richiesto dai procedimenti convenzionali (Kumar, 1999). Analogamente questa strategia si rivela molto utile ai fine applicativi anche per l'individuazione di loci per caratteri poligenici (QTL, *Quantitative Traits Loci*), principalmente associati alla produttività ed alle caratteristiche di qualità.

16.3.2 Caratterizzazione e dissezione della variabilità genetica

L'introduzione di tecniche per la rilevazione di polimorfismi genomici, ha reso possibile l'acquisizione di più approfondite informazioni circa il grado di diversità/similarità genetica di molte specie vegetali, nonché come la diversità genetica esistente si strutturi sia entro che tra popolazioni (Barcaccia *et al.*, 2000 b; Lanteri *et al.*, 2004). La maggior parte dei marcatori molecolari è in grado di rilevare la variabilità di regioni di DNA omologhe in diversi individui nell'ambito di una popolazione o di più popolazioni della stessa specie o di specie diverse. Il modello di riferimento delle differenze fra *taxa* distinti è quello dell'orologio molecolare, secondo il quale, assunta una velocità di mutazione costante,

due sequenze di DNA (o due alleli) relative ad uno stesso locus di due individui differenti, saranno tanto più diverse fra loro, in termini di numero di mutazioni nucleotidiche accumulate, quanto maggiore è il tempo intercorso dal momento della loro separazione da una sequenza (o da un allele) ancestrale appartenente ad un progenitore comune (Nei, 1987). In sostanza, quanto maggiore è il numero di mutazioni a più loci portate da due individui, tanto maggiore è la diversità (o in maniera complementare, la similarità) genetica fra loro, parametro che misura la distanza genetica fra individui. Secondo il modello mutazionale *stepwise* proposto da Valdes *et al.*, (1993), che prevede eventi mutazionali con uguale probabilità di una specifica sequenza nucleotidica, alleli di dimensioni risulterebbero simili anche in termini di entità degli eventi mutazionali subiti. Ciò significa che due individui (o due popolazioni) debbano essere considerati geneticamente distanti quando a più loci presentano alleli di dimensioni molto diverse. Al fine di avvalorare questi modelli, però, bisogna tener presente che la maggior parte delle mutazioni è silente, tale cioè da lasciare il prodotto genico inalterato e quindi con effetti così piccoli sulla capacità di un organismo di sopravvivere e riprodursi, che la selezione naturale sarebbe incapace di influenzare apprezzabilmente la loro differenza. In accordo con la teoria della neutralità di Kimura (1983), infatti, la maggior parte delle modificazioni molecolari è il risultato di mutazioni neutrali dal punto di vista selettivo. A questo proposito va ricordato che i loci marcatori saggiati sono prevalentemente neutrali, cioè non hanno un significato particolare nell'adattamento degli individui all'ambiente.

La caratterizzazione della variabilità genetica, mediante analisi semplici da condurre e con risultati facili da interpretare, prevede la stima di particolari coefficienti di similarità genetica (SG) o dissimilarità genetica ($DG = 1 - SG$). A tal fine i dati relativi all'insieme di marcatori molecolari raccolti nel campione di individui o sottopopolazioni in esame sono

utilizzati per costruire le matrici di similarità genetica, o dissimilarità genetica, calcolando i coefficienti relativi in tutte le possibili combinazioni a coppia tra tutti gli individui di una popolazione e/o tra più popolazioni. I coefficienti di similarità utilizzabili a tale scopo sono molteplici.

Il coefficiente di Dice (1945) è senza dubbio tra i più diffusi: $SG_{ij} = 2a / (2a + b + c)$, dove a è il numero di marcatori comuni alla coppia di individui i e j considerati, b è il numero di marcatori presenti in j ed assenti in i , e c quello dei marcatori presenti in i ed assenti in j . Esso fornisce un risultato uguale al coefficiente di Nei e Li (1979): $SG_{ij} = 2a / (a + b) + (a + c)$, dove $a + b$ è il numero totale di marcatori presenti in j e $a + c$ è il numero totale di marcatori presenti in i .

Un altro coefficiente spesso usato è quello di Jaccard (Rohlf, 1993): $SG_{ij} = a / (a + b + c)$, dove a è il numero di marcatori comuni alla coppia di individui i e j considerati, b è il numero di marcatori presenti in j ed assenti in i , e c il numero di marcatori presenti in i ed assenti in j .

Un ulteriore coefficiente, detto di *Simple Matching*, è il seguente: $SM_{ij} = m / (m + n)$, dove m è il numero delle corrispondenze ($= a + d$) ed n quello delle differenze (polimorfismi) tra i profili molecolari considerati ($= b + c$); d è il numero di marcatori assenti in entrambi gli individui.

In tutti i casi, un valore di similarità genetica pari a 1 indica completa identità genetica tra la coppia di individui considerati, mentre un valore pari a 0 indica completa diversità. Le matrici di similarità sono necessarie per condurre le analisi di raggruppamento attraverso la costruzione di dendrogrammi di (dis)similarità genetica oppure la definizione dei centroidi secondo le coordinate principali. Uno dei programmi più usati per eseguire analisi di questo tipo è NTSYS-pc (Rohlf, 1993).

Lo studio della struttura genetica di popolazioni richiede, invece, analisi più complesse ed articolate e prevede anzitutto il calcolo delle frequenze degli alleli marcatori a tutti i loci saggiati. Il calcolo è diverso in funzione della natura genetica del tipo di marcatori molecolari analizzati.

Nel caso di marcatori co-dominanti, le frequenze alleliche possono essere determinate, per ogni locus, nel seguente modo: $p_{a1} = (D + \frac{1}{2} H)$ e $q_{a2} = 1 - p_{a1} = (R + \frac{1}{2} H)$, dove D e R sono le frequenze dei genotipi omozigoti per l'allele marcatore, rispettivamente, a_1 e a_2 (rappresentati da una sola banda), mentre H è la frequenza del genotipo eterozigote a_1a_2 (rappresentato da due bande). Nel caso invece di marcatori dominanti, le frequenze alleliche possono essere derivate impiegando la seguente equazione: $p_{a1} = 1 - (1 - F_b)^{1/2}$, dove F_b è la frequenza della banda relativa al locus in questione in una situazione di equilibrio Hardy – Weinberg e il valore $1 - F_b$ rappresenta la frequenza dell'altro allele allo stesso locus (q_{a0}).

Una prima stima della variabilità può essere fornita dalle statistiche descrittive relative al numero di loci polimorfici e al numero osservato (n_0) ed effettivo (n_e) di alleli per locus, quest'ultimo calcolato secondo la formula di Kimura e Crow (1964): $n_e = 1/\sum p_i^2$ dove p_i indica la frequenza dei possibili alleli ad un determinato locus.

Wright (1965) è stato il primo ad elaborare un approccio appropriato per valutare la struttura genetica delle popolazioni e la ripartizione della diversità tra sottopopolazioni sviluppando statistiche valide per un locus con due alleli o per loci con più alleli considerando l'allele più comune come primo allele e come secondo allele tutti gli altri insieme.

Dal momento che la separazione tra sottopopolazioni provoca *inbreeding*, cioè un eccesso di omozigosità, è possibile misurare questo effetto in termini di diminuzione delle frequenze dei genotipi eterozigoti. A tale scopo, l'eterozigosità di una popolazione può essere studiata a tre

diversi livelli di complessità: (i) singoli individui (H_I); (ii) sottopopolazioni (H_S); (iii) popolazione totale (H_T). H_I equivale all'eterozigosità media osservata negli individui delle sottopopolazioni; corrisponde all'eterozigosità media a tutti i loci di un individuo e può essere interpretato come la probabilità che un individuo sia eterozigote per un gene. H_S rappresenta il livello di eterozigosità attesa della sottopopolazione e si calcola come: $H_S = 1 - \sum p_i^2$, dove p_i è la frequenza di tutti gli alleli nella specifica sottopopolazione; se all'interno di questa gli incroci sono casuali, questo indice equivale a $2p_s q_s$, dove p_s e q_s sono le frequenze alleliche della particolare sottopopolazione; H_T costituisce l'eterozigosità attesa della popolazione complessiva, nel caso tutte le sottopopolazioni fossero riunite insieme e si calcola come: $H_T = 1 - \sum p_i^2$, dove p_i è la frequenza media degli alleli nelle diverse sottopopolazioni; anche in questo caso se gli incroci sono casuali, questo indice è uguale a $2p_s q_s$, dove p_s e q_s sono le frequenze medie tra le sottopopolazioni.

Le statistiche di Wright comprendono una serie di parametri F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} , equivalenti a stime del coefficiente di *inbreeding*, che differiscono tra loro a seconda delle popolazioni di riferimento. $F_{IS} = (H_S - H_I)/H_S$ misura l'*inbreeding* degli individui rispetto alla sottopopolazione alla quale appartengono ed equivale alla riduzione di eterozigosità media di un individuo a causa degli incroci non casuali all'interno della sottopopolazione stessa; $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$ misura gli effetti della strutturazione della popolazione in sottopopolazioni e rappresenta quindi la riduzione di eterozigosità di una sottopopolazione rispetto alla popolazione totale; tale quantità è chiamata indice di fissazione ed è sempre ≥ 0 (è zero se tutte le sottopopolazioni sono in equilibrio Hardy – Weinberg ed hanno tutte le stesse frequenze alleliche); $F_{IT} = (H_T - H_I)/H_T$, misura la riduzione di eterozigosità di un individuo relativa alla popolazione totale; rappresenta il coefficiente di *inbreeding* complessivo e comprende sia la quantità

effettiva dovuta agli incroci non casuali, che quella dovuta alla suddivisione della popolazione in sottopopolazioni.

La relazione matematica fra i tre tipi di coefficienti è la seguente: $(1 - F_S)(1 - F_{ST}) = (1 - F_{IT})$. Per molte popolazioni naturali di piante i valori di F_{IS} sono vicini allo zero; qualora gli incroci avvengano in maniera casuale $F_{IS} = 0$, e quindi $F_{ST} = F_{IT}$.

Nei (1973) ha esteso l'analisi a più loci elaborando al contempo una formulazione di coefficienti validi per loci multiallelici.

Secondo Nei, il grado di diversità genetica di singole popolazioni e di differenziazione tra popolazioni può essere valutato utilizzando i parametri H_T , H_S , D_{ST} e G_{ST} (Nei, 1977). I due parametri, H_T e H_S , equivalgono rispettivamente agli indici di diversità genetica totale della popolazione come complesso delle n sottopopolazioni campionate e di diversità genetica presente entro le singole sottopopolazioni campionate per tutti i loci saggiati. Dalla differenza tra questi due indici può essere ottenuta la differenziazione genetica: $D_{ST} = H_T - H_S$. il grado di differenziazione (G_{ST}) può invece essere derivato come rapporto tra la differenziazione e la diversità genetica totale ($G_{ST} = D_{ST}/H_T$). tale parametro, detto anche indice di fissazione, assume valore nullo quando le sottopopolazioni considerate sono in equilibrio ed hanno le stesse frequenze alleliche.

E' necessario sottolineare che l'indice di fissazione di Nei coincide con quello di Wright: la nomenclatura G_{ST} è valida per loci multiallelici, mentre nel caso di loci diallelici viene usato il termini F_{ST} . l'indice di fissazione consente di determinare il flusso genico (Slatkin, 1987) tra le popolazioni in esame: $N_m = c(1 - G_{ST})/G_{ST} = c(1 - F_{ST})/F_{ST}$, dove c è pari a 0,5 per marcatori dominanti e a 0,25 per marcatori co-dominanti (McDermott e McDonald, 1993). Questo parametro assume valori inferiori a 1 in assenza di flusso genico, mentre valori maggiori di 1 indicano

presenza di flusso genico legato allo scambio di alleli marcatori tra le popolazioni considerate.

La conoscenza dell'indice di fissazione rende, inoltre, possibile stimare la quota di incrocio secondo la formula di Ritland (1983): $t = (1 - G_{ST}) / (1 + G_{ST}) = (1 - F_{ST}) / (1 + F_{ST})$.

Dal momento che i loci genomici saggiati possono presentare un diverso livello di polimorfismo, e cioè un diverso numero di alleli, può essere utile definire la capacità discriminante di ognuno di essi calcolando il coefficiente di differenziazione (Gregorius, 1987): $\delta t = (1 - \sum p_i^2) [N / (N - 1)]$, dove p_i rappresenta la frequenza degli alleli marcatori ad un determinato locus, mentre N è la dimensione della popolazione. Valori uguali a 0 indicano che il locus non è in grado di distinguere nessuno degli individui o delle popolazioni esaminate, mentre un valore pari a 1 indica che il locus presenta alleli marcatori in grado di discriminare tutti gli individui e le popolazioni considerate.

Sulla base delle frequenze alleliche a tutti i loci saggiati, si può calcolare la distanza genetica fra le popolazioni in esame applicando la formula di Nei (1978): $DG_{ij} = \ln \sum p_i p_j / (\sum p_i^2 p_j^2)^{1/2}$, dove p_i e p_j sono le frequenze di un dato allele nella coppia di popolazioni i e j considerate; quando tale indice assume il valore di 1 indica che le due popolazioni sono nettamente divise fra loro, mentre con valore 0 esse presentano le medesime frequenze alleliche.

Tutte le statistiche elencate possono essere calcolate con l'ausilio di appropriati *software* Arlequin (Schneider *et al.*, 1995), PopGene (Yeh *et al.*, 1997), GDA (Lewis e Zaykin, 1999).

PARTE SPERIMENTALE

17. Motivazioni e obiettivi generali delle prove

La rilevante importanza del carciofo per l'economia siciliana, deducibile dalla PLV (stimabile in 160-180 milioni di euro per anno) che esso è in grado di assicurare, impone alla ricerca un rinnovato impegno e sostanziali sforzi per poter adeguatamente sostenere l'attuale ruolo ed alimentare l'auspicato ulteriore sviluppo. Tra le innovazioni recentemente proposte per promuovere avanzamenti significativi nella coltivazione del carciofo, quelle biologiche - cioè basate sull'utilizzo di nuovi genotipi - appaiono in questo momento le più idonee a consentire non solo un miglioramento qualitativo e quantitativo delle produzioni, ma anche un ammodernamento nella gestione agronomica della coltura. L'utilizzo di genotipi a propagazione per seme consente di utilizzare modelli colturali innovativi basati sulla semina meccanica e sull'adozione di sestri di impianto adatti ad una più agevole meccanizzazione delle operazioni colturali compresa la raccolta dei capolini. Al pari di essi, anche la costituzione di nuovi cloni nell'ambito di popolazioni autoctone di carciofo a propagazione vegetativa può contribuire in misura significativa a incrementare le rese e ad attenuare l'erosione genetica di questi genotipi. Quest'ultima, come è noto, è causata dalla degenerazione bio-fisiologica delle piante indotta dall'età avanzata di larga parte delle carciofaie (2-3-4 anni) e dalla scarsa attenzione nell'opera di selezione del materiale di propagazione. La messa a punto di nuovi genotipi, sembra quindi quanto mai auspicabile sia per ammodernare la tecnica di coltivazione che per conservare e rendere più redditizio il patrimonio genetico autoctono.

In questo quadro si inseriscono gli obiettivi generali di questa tesi di dottorato volti a:

a) mettere a punto metodiche e strategie di miglioramento genetico convenzionale utilizzando tecniche molecolari in grado di ottimizzare il lavoro di selezione;

b) costituire nuovi genotipi a propagazione per seme e valutarne le caratteristiche bio-morfologiche, nonché l'uniformità, l'omogeneità e la performance agronomica, anche attraverso l'utilizzo di marcatori AFLP;

c) mettere a punto procedure e tecniche idonee per la produzione di seme e valutare le caratteristiche di qualità del seme prodotto;

d) valutare gli effetti della depressione da inbreeding sulla struttura riproduttiva e sull'accrescimento della pianta;

e) costituire nuovi cloni di 'Spinoso di Palermo' con caratteristiche agronomiche superiori a quelle della popolazione autoctona.

Infine, considerato che lo svolgimento dell'attività di miglioramento genetico necessita di puntuali e ben dettagliate informazioni sulla biologia della pianta, si è ritenuto opportuno dedicare una linea di ricerca allo studio della fenologia, della biologia fiorale e della riproduzione.

17.1 Prova A) Fenologia, biologia fiorale e riproduzione

17.1.1 Scopo della prova

Per pianificare l'attività di miglioramento genetico del carciofo, come di quella delle altre colture, è necessario poter disporre di informazioni puntuali sulla fenologia, sulla biologia fiorale e sulla riproduzione. In tal senso, al momento, si dispone soltanto dei risultati del lavoro di Foury (1967), il quale ha studiato la biologia fiorale della cv. Violetto di Provenza a propagazione vegetativa e di quelli di Baggio et al. (2011), appena pubblicati, sulla cv. "Nobre UPF" a propagazione per seme. In entrambi i casi le informazioni disponibili sono preziose, ma, nel contempo non esaustive, in quanto il primo lavoro è basato su una varietà a propagazione vegetativa con struttura genetica altamente eterozigote, mentre il secondo - basato su lavoro che tratta di una cultivar propagata per seme - è stato realizzato in Brasile, in un contesto climatico differente rispetto a quello mediterraneo. Con la presente prova, si è voluto portare un contributo di conoscenze sull'argomento, analizzando la fenologia, la biologia fiorale l'allegagione e la maturazione degli acheni fino alla loro dispersione nell'ambiente di un genotipo di carciofo propagato per seme e, quindi, con struttura genetica sufficientemente omozigote.

17.1.2 Materiali e metodi

La prova è stata condotta nell'annata agraria 2008/2009 in agro di Cassibile (SR) (37° 03'N, 15° 18'E, 10 m a.s.l), su un terreno classificato come calcixerollic xerochrepts (USDA, Soil Taxonomy). Il clima nella zona è tipicamente semiarido-mediterraneo, con inverni miti ed estati calde e secche. Le medie mensili delle temperature massime estive oscillano tra 29.6° C (giugno) e 32.5° C (luglio), mentre, durante il periodo invernale, esse sono comprese tra i 15.4° C (gennaio) e i 16.6 (febbraio) (servizio

Idrografico, 1959-1998). All'inizio della sperimentazione, le caratteristiche del suolo, analizzate presso i laboratori dell'ex Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni Animali (DACPA), ora Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), Sezione: Scienze Agronomiche, dell'Università degli Studi di Catania, sono state le seguenti: argilla 18,5 %, limo 26,1 %, sabbia 55,4 %, pH 7,6, sostanza organica 2 %, azoto totale 0,17 %, P disponibile 100 mg Kg⁻¹ e K scambiabile 580 mg Kg⁻¹. Le suddette analisi sono state condotte in accordo con le procedure ufficiali approvate dalla Società Italiana di Scienza del Suolo (Violante, 2000).

La gestione agronomica e le cure colturali consecutive (irrigazioni, concimazioni, scarducciature ed interventi fitosanitari) sono state condotte in accordo con le consuetudini della zona e con le esigenze manifestate dalle piante. I "semi" sono stati seminati il 20 settembre, secondo un sesto rettangolare: distanza sulla fila pari a 0.8 m e tra le file a 1.25 m, sul terreno previamente lavorato ad una profondità di 0.3 m circa, e concimato con sostanza organica (3000 kg/ha), N (20 kg/ha), P₂O₅ (50 kg/ha) e K₂O (150 kg/ha). In copertura sono stati apportati altri 180 Kg/ha di N in 3 successive epoche. L'investimento unitario è risultato pari a 1 pianta m⁻².

La cultivar di carciofo utilizzata è stata la linea NP4, selezionata presso il Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), da una progenie ottenuta dalla varietà "Nobre-UPF", una cultivar di carciofo brasiliana propagata per "seme" utilizzata per fini industriali (preparazione di carciofi al naturale). La scelta della linea NP4 è stata suggerita dall'esigenza di disporre di una progenie sufficientemente omozigote non ottenuta da ibrido, e propagata per seme.

Durante il periodo che va dalla semina (settembre 2008) fino alla maturazione (luglio 2009), e alla dispersione (agosto 2009) degli acheni, sono state osservate, analizzate e descritte le varie fasi fenologiche della

pianta, che vengono pedissequamente riportate nella tabella 6 e nella figura 6.

E' stata calcolata la somma termica necessaria per il raggiungimento dei successivi stadi fenologici secondo la formula $GGD = T_m - T_b \cdot n.g.$, dove T_m = temperatura media giornaliera, T_b = temperatura base posta pari a 9° C in accordo con Abdel-Al Zidan et al. (1976), n.g.= numero di giorni dopo la semina per il raggiungimento di un determinato stadio fenologico.

Per meglio definire la scala descrittiva degli stadi dello sviluppo del capolino, sono stati raccolti ogni settimana 4 infiorescenze, durante il periodo che va dalla comparsa del capolino principale all'interno della rosetta fogliare, fino alla maturazione fisiologica degli acheni (aprile-luglio).

Durante le fasi di accrescimento del capolino sono stati osservati e/o rilevati:

- dimensioni e modificazioni della forma del capolino;
- colore, consistenza e modificazioni morfologiche delle strutture fiorali.

Il capolino è stato diviso in tre aree (periferica, mediana e interna), da cui sono stati prelevati 10 fiori per la caratterizzazione morfologica in accordo con quanto riportato da Baggio et al. (2011) (figura 7). Con i dati raccolti durante l'accrescimento e lo sviluppo dei capolini è stata realizzata una scala 1-15, dove sono stati riportati i dati sullo stadio del capolino (tabella 7).

L'andamento della temperatura, rilevato durante il ciclo biologico delle piante, è riportato nella figura 8.

17.1.3 Risultati e discussione

17.1.3a Sequenza degli stati fenologici

Durante il ciclo biologico è stato possibile osservare l'evoluzione dei principali stadi fenologici, i quali vengono riportati nella tabella 6 e nella figura 6.

L'emergenza delle plantule è avvenuta dopo 11 giorni dalla semina, la formazione della rosetta fogliare al 67° giorno e l'apparizione del capolino all'interno della rosetta al 190° giorno. Uno stadio fenologico importante per l'attività di miglioramento genetico è quello riconducibile all'inizio della colorazione violacea delle brattee interne (Fase H, tabella 6) perchè precede di una settimana circa l'inizio dell'antesi dei fiori e indica il momento propizio per la preparazione del capolino (taglio apice delle brattee e isolamento spaziale del capolino o delle piante) per l'autofecondazione o l'incrocio. Un'altra fase importante potrebbe essere quella indicata come "J" e denominata "sviluppo completo dell'infiorescenza", che rappresenta il momento ottimale per inserire i pronubi all'interno degli isolatori. Questa fase, infatti precede di 2 giorni la comparsa del polline sugli stimmi. La senescenza delle foglie è stata raggiunta al 288° giorno, dopo la semina e ha preceduto la senescenza dell'infiorescenza di circa 20 giorni. Quest'ultima ha coinciso con la fase di maturazione degli acheni (Fase O). La dispersione di questi ultimi nell'ambiente circostante si è verificata circa un mese dopo.

In relazione alle somme termiche necessarie per il raggiungimento di un determinato stadio fenologico è emerso che per l'emergenza della plantula sono risultati necessari 148 gradi giorno (GG), per la formazione del capolino principale all'interno della rosetta fogliare 1124 GG, per la comparsa del polline sugli stimmi 1688 GG e per la completa maturazione degli acheni 2521 GG. (Tab. 6).

17.1.3b *Stadi di sviluppo del capolino*

Durante i 15 stadi di sviluppo, sono stati osservati le variazioni del numero di brattee, delle dimensioni e della forma del capolino (tab. 7). Le brattee, a crescita completa, si presentano molto consistenti con mucrone all'estremità. Il numero medio di brattee per capolino rilevato durante l'intero arco del suo sviluppo, è stato pari a 176, oscillando tra 91 (stadio 2) e 214 (stadio 9). Lo stadio 4, corrispondente alla maturazione commerciale del capolino sia ai fini industriali ma anche per l'utilizzo allo stato fresco, è stato raggiunto dopo 4 settimane dello stadio fenologico "D" (tab. 6). A tale epoca il capolino aveva raggiunto le dimensioni di 9.2 x 9.9 cm. In corrispondenza dello stadio 15, quando i frutti (acheni) erano maturi fisiologicamente e ritenuti pronti per la raccolta, il diametro raggiunto dal capolino è stato di 16.3 cm. È stata osservata una variazione dell'884 % tra il diametro più elevato (16.8 cm) e quello più basso (1.9 cm) (tab. 7).

E' interessante notare come l'indice di forma del capolino (rapporto tra diametro polare ed equatoriale) vari in misura apprezzabile con il variare del suo stadio di sviluppo. Esso, infatti, pari a 1,21 nel capolino allo stadio di sviluppo iniziale "1" è progressivamente, diminuito fino a raggiungere il valore di 0,45 nell'ultimo stadio di sviluppo del capolino corrispondente alla maturità fisiologica degli acheni. Questo effetto è dipeso sia dal progressivo aumento del diametro equatoriale che dalla progressiva diminuzione del diametro polare, a partire dallo stadio di sviluppo "5" del capolino (tab. 7).

La figura 7 mostra alcuni particolari della morfologia florale del carciofo ripresi dal lavoro di Baggio et al., 2011 e che sono apparsi sostanzialmente confermati dalle osservazioni e dai rilievi effettuati nel corso di questa prova. Una caratteristica della famiglia delle Asteraceae è quella di presentare un elevato numero di fiori per capolino, come mostrato nella figura 7A. In questa prova sono stati riscontrati mediamente 1250 fiori

per capolino, valore leggermente inferiore a quello (circa 1400) osservato da Foury (1967). I capolini hanno presentato una fioritura centripeta. I fiori sono risultati tubulati, ermafroditi, morfologicamente simili, e con simmetria radiale (fig. 7B e 7C).

Il fiore ha una corolla gamopetala con cinque lobi uguali. Il calice è costituito da sepali trasformati in “pappo” (Joly, 2000; Vidal e Vidal, 2000), che aiutano il processo di dispersione anemofila del frutto. L’androceo possiede cinque stami, con filetti liberi e antere fuse che avvolgono lo stilo (fig. 7D). L’ovario è inferiore e uniloculare (fig. 7E), lo stilo è avvolto dalle antere in una struttura chiamata “antera collare” (fig. 7F), che è stata già descritta in 56 specie della famiglia delle Asteraceae (Meri e Dulberger, 1986). Cerana (2004) ha studiato la morfologia florale del genere *Mikania* della famiglia delle Asteraceae, descrivendo la presenza del nettario, nella parte basale del fiore, il quale risulta più chiaramente visibile nel carciofo (figura 7G).

Le strutture riproduttive del fiore maturano in tempi diversi (proterandria), atteso che l’androceo matura alcuni giorni prima del gineceo (Ryder et al., 1983; Ancora, 1988). Il polline maturo è completamente colorato, con tre pori di pari superficie. Il frutto è un tipico achenio, monospermico, secco e indeiscente (figure 7H e 7I).

Foury (1967) ha descritto sette stadii per lo sviluppo del capolino della cultivar francese ‘Violet de Provence’. La scala di sviluppo utilizzata in questa prova è composta da 15 stadi: sette di loro sono equivalenti a quelli osservati da Foury (1967) e gli altri 8 stadi (tab. 7) sono state descritti, in precedenza soltanto da Baggio et al., 2011. Essi comprendono le fasi che vanno dalla completa apertura del capolino fino alla produzione degli acheni.

17.2 Prova B) Costituzione e caratterizzazione bioagronomica e molecolare di tre nuove linee di carciofo a propagazione gamica

17.2.1 Scopo della prova

Il lavoro di selezione massale condotto presso la Cooperativa Triticola Erechim (Cotrel) in Brasile, a partire da germoplasma introdotto dall'Italia (Baggio et al., 2011), ha consentito di ottenere una varietà sintetica “Nobre” UPF relativamente omogenea sotto il profilo biologico e morfologico. Infatti, all'interno di questo genotipo è possibile osservare differenze tra le piante coltivate in ordine a epoca di maturazione del capolino, portamento della pianta, dimensioni e colorazione delle foglie, dimensioni e forma dei capolini. Questa variabilità ha indotto il DISPA (ex DACPA), a intraprendere un lavoro di autofecondazione e selezione genotipica mediante l'impiego di marcatori molecolari AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) in collaborazione con il Dipartimento DiVaPRA dell'Università di Torino, allo scopo di ridurre l'eterozigosi e di conseguenza aumentarne l'uniformità all'interno della varietà Nobre UPF e valutare la possibilità di selezionare nuovi genotipi che manifestassero buon valore agronomico, uniformità, distinguibilità e minore variabilità fenotipica e genetica.

Con questa prova abbiamo voluto intraprendere un'attività di miglioramento genetico volto alla costituzione di linee a propagazione per seme. Nel contempo è stato avviato un lavoro volto a caratterizzare sotto il profilo morfologico, biologico, produttivo e molecolare le 3 nuove linee ottenute attraverso l'attività di autofecondazione e di selezione successiva per poter esprimere un giudizio sulla loro distinguibilità e sul loro valore agronomico.

Il lavoro di questa linea di ricerca è propedeutico per una eventuale iscrizione delle nuove linee a propagazione per seme al Catalogo Nazionale delle Varietà.

17.2.2 Materiali e metodi

La prova è stata realizzata nel biennio 2009-2010 / 2010-2011 in agro di Cassibile (SR) su terreno a tessitura argilloso-sabbiosa. In uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con 3 ripetizioni, sono stati posti allo studio 3 genotipi: NP2, NP4 e NP5. I tre genotipi sono stati ottenuti dalla varietà brasiliana a propagazione gamica Nobre UPF, attraverso un processo di selezione massale prima e autofecondazione e selezione genotipica successivamente. In particolare, un lotto di seme di “Nobre UPF” è stato seminato nel settembre del 2007; dalla progenie ottenuta, presentante un’apprezzabile variabilità genotipica, è stato possibile individuare tre gruppi di individui sulla base delle caratteristiche biologiche, morfologiche e produttive.

Da ciascun gruppo individuato è stata selezionata e successivamente clonata una pianta rappresentativa. Gli individui di ciascun clone (7-10 piante) sono stati coltivati nell’annata 2008-2009 e inizialmente caratterizzati a livello molecolare mediante marcatori SSR (Simple Sequence Repeats – microsatelliti) allo scopo di valutarne il livello di omozigosi/eterozigosi. Nella tarda primavera del 2009 sono stati sottoposti ad autofecondazione controllata, isolando le piante di ciascun clone per mezzo di rete antibombi (7x3 mm) 3-4 giorni prima dell’antesi.

Due giorni dopo l’inizio dell’antesi è stata introdotta all’interno di ciascun isolatore un’arnia contenente circa 300 individui di *Bombus terrestris* per favorire l’impollinazione dei fiori tra i capolini delle piante. A fine fioritura sono stati tolti gli impollinatori e le piante, irrigate a norma di bisogna, sono state lasciate per maturare il seme a fine luglio. Un lotto di

seme ottenuto dall'autofecondazione di ciascuna linea è stato seminato nel settembre 2009. Sulle tre progenie ottenute nella primavera successiva si è proceduto all'analisi molecolare AFLP di tutti gli individui, per eliminare quelli geneticamente più distanti e sottoporre a incrocio controllato quelli rimanenti.

Le piante scelte sono state isolate per ciascuna delle tre progenie a mezzo isolatori e sottoposti allo stesso trattamento dell'anno precedente per produrre seme in isolamento spaziale. Dal seme ottenuto nell'estate 2009 è stato possibile ottenere per ciascuna linea (NP2, NP4 e NP5) progenie uniformi, sulle quali nelle annate 2009-2010 e 2010-2011 è stata realizzata la caratterizzazione morfo-bio-agronomica. Per tale caratterizzazione sono stati rilevati: la statura e il portamento della pianta, le dimensioni e il colore delle foglie, le dimensioni, il numero, il peso e la forma dei capolini, la resa in prodotto trasformato (capolini torniti, eliminando la frazione di brattee e ricettacolo non utilizzabili dall'industria), la data di raccolta del capolino principale e di quelli secondari.

In previsione di una probabile distribuzione industriale della produzione delle linee, viste le caratteristiche dei capolini, è stata determinata anche la resa industriale netta mediante il rapporto tra il peso fresco del capolino tornito, privato delle brattee esterne e apicali e della parte esterna del ricettacolo, e il peso fresco del capolino intero.

Per ogni linea è stata anche allestita una scheda varietale descrittiva redatta secondo le indicazioni di Dellacecca et al (1976) e delle schede UPOV (2001).

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) secondo un modello a due vie genotipo x annata. Le medie sono state confrontate mediante l'*LSD test* o il *Tukey's test* solo quando l'*F* è risultato significativo per $P \leq 0.05$.

17.2.2a Analisi molecolare per selezione assistita

- Estrazione del DNA

Il DNA genomico necessario per l'applicazione delle tecniche molecolari è stato estratto seguendo il protocollo di Doyle e Doyle (1990) al quale sono state apportate le modifiche riportate da Lanteri et al. (2001) per l'applicazione al genoma di carciofo.

Prima fase:

- una quantità di circa 2 g di tessuto fresco, proveniente da foglie sane e senza alcuna alterazione, è stata frantumata in un mortaio con azoto liquido;
- la polvere così ottenuta è stata trasferita in 800 µl di tampone di lisi (2% CTAB, 0,1 M Tris-HCl pH 9.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.2% β-mercaptoetanololo);
- dopo aver trasferito i campioni in provette da 2 ml e averli incubati per 90 min. a 65°C, sono stati aggiunti 400 µl di una miscela di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1 v:v:v);
- la soluzione è stata tenuta in agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente e poi sottoposta a centrifuga a 16 000 giri min⁻¹ per 10 min;
- il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta a cui sono stati aggiunti 42 µl di ammonio acetato e 800 µl di isopropanolo;
- il contenuto è stato mescolato lentamente per inversione, fino alla comparsa di una “medusa” di DNA precipitato;
- la “medusa” è stata prelevata dalla soluzione con una pipetta pasteur uncinata, lavata in una soluzione di etanolo al 70% e poi asciugata su carta assorbente al fine di rimuovere l'eccesso di etanolo;
- la “medusa” di DNA è stata quindi posta in provette da 1,5 ml e sono stati aggiunti 800 µl di TE 0,1X (Tris-HCl 10 mM a pH 8, EDTA 1 mM).

Seconda fase:

- sono stati aggiunti 2 μl di RNAsi per rimuovere l'RNA presente ed il materiale è stato lasciato riposare per circa mezz'ora;
- sono stati successivamente aggiunti 40 μl di sodio acetato e 250 μl di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico e le provette lasciate ad agitare per 10 min;
- il campione è stato sottoposto a centrifugazione a 16000 giri min^{-1} per 10 min e la fase acquosa trasferita in una nuova eppendorf da 2 ml;
- alla soluzione è stato aggiunto 1 ml di etanolo al 95% freddo ($\sim 0^{\circ}\text{C}$) e i tubi invertiti delicatamente fino alla comparsa della “medusa” di DNA;
- il DNA è stato nuovamente prelevato con una pipetta pasteur e lavato in etanolo 70% ;
- la “medusa” è stata quindi posta in una eppendorf da 1,5 ml ad asciugare per poi essere risospesa in 50 μl di TE 0,1 X.

Infine il DNA estratto è stato quantificato e calibrato ad una concentrazione di 100 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ con fluorimetria di bromuro di etidio e mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8%. Come riferimento si sono utilizzati campioni genomici standard con quantità nota di DNA.

Attraverso opportune diluizioni dal DNA di stock per i 25 campioni si è ottenuta una *master-plate* concentrata 2,5 $\text{ng } \mu^{-1}$ che ha fornito il materiale genomico di partenza per i successivi esperimenti.

- Marcatori SSR (micro satelliti)

L'analisi mediante i marcatori microsattelliti è stata effettuata per valutare il livello di omozigosi/eterozigosi nell'ambito dei tre cloni (NP2, NP4, NP5) inizialmente selezionati e coltivati nell'annata 2008-2009 e

successivamente sottoposti ad autofecondazione. Un set di 12 varietà di carciofo, rappresentative della variabilità genetica al momento presente nella specie, è stato inoltre inserito nelle analisi come materiale vegetale di riferimento a confronto. Sono state utilizzate coppie di primers SSR precedentemente sviluppate presso il DiVaPRA, settore Genetica Agraria, ed utilizzate per lo sviluppo di mappe genetico-molecolari in carciofo (Portis et al. 2009). Nel complesso sono stati presi in considerazione 125 marcatori SSR, isolati a partire da sequenze EST, isolate nell'ambito del *Compositeae Genome Project* e depositate in database (Scaglione et al. 2009) e scelti sulla base della loro distribuzione sui 17 gruppi linkare della mappa genetico-molecolare di carciofo attualmente disponibile.

Di seguito vengono descritte le fasi del protocollo SSR:

1) *Amplificazione delle regioni microsatellite*

Le reazioni di amplificazione SSR sono state condotte in un volume finale di 20 μl , aggiungendo a 5 μl di DNA genomico, concentrato 2,5 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$, una miscela di 15 μl .

La miscela di reazione per ogni pozzetto deve essere composta da:

- 7,4 μl di acqua;
- 4 μl di PCR Reaction buffer 5x;
- 1.2 μl di MgCl_2 ;
- 0,2 μl di dNTP;
- 0.2 μl del primer *forward*;
- 1 μl del primer *reverse*;
- 1 μl del fluoroforo IRD⁷⁰⁰ o IRD⁸⁰⁰ (Infra-Red Dye);
- 0,05 μl di Taq Polimerasi.

Le reazioni PCR sono state effettuate per mezzo di un thermal cycler (Perkin Elmer 9700) ed è stato utilizzato un programma con un andamento in *touchdown* da 60°C a 55°C.

La sequenza di cicli è così organizzata:

Profilo termico applicato per la reazione di amplificazione con td 60-55.

Cicli	T°	Durata	Reazione
1	95°C	5 min	denaturazione iniziale
11	94°C	30 sec	denaturazione
	da 60°C a 55°C (-0,5°C ogni ciclo)	30 sec	appaiamento
	72°C	2 min	estensione
24	94°C	30 sec	denaturazione
	55°C	30 sec	appaiamento
	72°C	2 min	estensione
1	72°C	3 min	estensione finale

Al termine della PCR i campioni sono mantenuti ad una temperatura di 4°C.

2) Elettroforesi su agarosio

I prodotti delle PCR sono stati controllati ad un volume di 4 µl su gel di agarosio all'1.5% utilizzando come riferimento un ladder DNA 100 bp per verificare l'avvenuta amplificazione. Osservando il gel al transilluminatore, si è inoltre stimata la concentrazione dei prodotti, variabile a seconda dell'intensità della banda, e si sono calcolate le diluizioni per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide al Li-cor.

3) Preparazione delle diluizioni

Per poter leggere la separazione degli amplificati sul gel di poliacrilammide è necessario che gli amplificati non siano troppo

concentrati, quindi per ognuna delle due piastre, sono state aggiunte ai pozzetti quantità di acqua sterilizzata variabili per ognuno dei 24 primers.

Disponendo di due piastre da sequenziale, con due diversi fluorofori (IRD⁷⁰⁰ e IRD⁸⁰⁰), per ottimizzare i tempi, è stato possibile realizzare un multiplexing. Quindi, ottenute delle concentrazioni uniformi di amplificato, avvalendosi di un pipetta multicanale, da ogni pozzetto delle due piastre sono stati prelevati 5 µl e sono stati trasferiti in un'unica piastra, rispettando l'ordine originale. Per diluire ulteriormente di 1:10, sono stati aggiunti nei pozzetti 40 µl di 'blu per licor' (contenente blu di bromofenolo) per portare ad un volume finale di 50 µl. Il blu ha anche lo scopo di facilitare il caricamento dei campioni facendoli scendere più facilmente all'interno dei pozzetti del gel.

4) Elettroforesi su gel di acrilammide e visualizzazione dei prodotti di amplificazione

Prima che i campioni vengano caricati per la separazione elettroforetica, è ancora necessario denaturarli su termoblocco a 95°C circa 5 minuti e riporli immediatamente in ghiaccio per impedire il riappaiamento dei filamenti di DNA.

L'apparecchio utilizzato per questa fase è un sequenziatore laser LI-COR® 4200 che prevede una corsa verticale dei campioni su un gel di poliacrilammide al 6,5% fatto polimerizzare almeno un'ora prima. Questo strumento è in grado di scindere le letture alle due differenti lunghezze d'onda (700 e 800 nm) dei due fluorofori, per questo due amplificati integranti IRD diversi possono essere miscelati ed analizzati sul sequenziatore contemporaneamente. Il gel è stato caricato utilizzando un sistema multicanale di siringhe Hamilton con volumi di circa 0.3 µl; ad ogni caricata le siringhe sono state sciacquate con acqua deionizzata. Inoltre, ai margini dei campioni è stata caricata una miscela dei ladder LI-COR® con

IRD⁷⁰⁰ e IRD⁸⁰⁰. La lettura ed elaborazione dei pattern elettroforetici così ottenuti è stata effettuata mediante software e-Seq (Jackson e Matthews, 2000).

- Marcatore AFLP

L'analisi AFLP è stata condotta seguendo il protocollo originale di Vos et al. (1995) a cui sono state apportate alcune modifiche successive per ottimizzare la visualizzazione dei profili elettroforetici mediante l'utilizzo del sequenziatore Li-cor.

Di seguito è descritto lo svolgimento operativo delle fasi previste dal protocollo:

1) *Restrizione e ligazione*

La prima fase consiste in una restrizione enzimatica: per ogni campione, 4 µl di DNA alla concentrazione di 100 ng µl⁻¹, sono stati incubati in un volume finale di 20 µl, a 37°C per 7 minuti (per l'enzima EcoRI) e a 65°C per 8 minuti (per l'enzima TaqI). Infatti in questo caso si sono adoperati enzimi '*fast*' che richiedono molto meno tempo per l'incubazione. I restanti ingredienti della miscela di restrizione sono:

- 12 µl di acqua sterile;
- 2 µl di buffer NEB 2 (10x)
- 5 U di enzima EcoRI (*rare cutter*)
- 5 U di enzima TaqI (*frequent cutter*)

Successivamente ai campioni ristretti è stata aggiunta la miscela di ligazione in un volume finale di 20 µl, composta da:

- 6 µl di acqua sterile;
- 4 µl di Buffer T4 (10x);
- 10 pmoli di adattatore EcoRI 2.5 µM (4 µl);
- 100 pmoli di adattatore TaqI 25 µM (4 µl);

- 1 μ l di Buffer martini bianco (1x)
- 2 μ l di DNAligasi T4 (4U μ l⁻¹).

I campioni sono stati posti in incubazione *overnight* a 16°C.

Gli adattatori sono stati preparati partendo da concentrazioni degli stock di 100 μ M dei singoli primer, *forward* (+) e *reverse* (-) e diluendo ciascuno di 1: 40;

- Adattatore *EcoRI*: 5 μ l di stock *AdaEcoRI+* e 5 μ l di stock *AdaEcoRI-* in 190 μ l di TE 0.1x;
- Adattatore *TaqI*: 50 μ l di stock *AdaTaqI+* e 50 μ l di stock *AdaTaqI-* in 100 μ l di TE 0,1X.

Il tutto viene incubato per 5 minuti a 65°C per velocizzare la reazione.

Come si può notare la quantità di adattatore *TaqI* è maggiore, ciò è dovuto al fatto che il corrispettivo enzima è un *frequent cutter* e quindi realizzerà più estremità da ligare.

A seguito sono illustrate le sequenze degli adattatori utilizzati.

Sequenze degli adattatori impiegati nella ligazione.

Adattatore <i>EcoRI</i>	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
Adattatore <i>TaqI</i>	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	3'-TACTCAGGACTCGC-5'

2) *Pre-amplificazione.*

Il DNA ristretto/ligato ottenuto è stato diluito 1:4 (5 μ l in 95 μ l di TE 0,1x).

Nella reazione di preamplificazione sono stati utilizzati primer caratterizzati dalla presenza di un solo nucleotide selettivo: primer *EcoRI*+A in combinazione con primer *TaqI*+T.

I primer utilizzati sono stati diluiti 1:20 partendo da una concentrazione di $1\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ per avere una concentrazione finale di $50\text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$, 5 μl di primer stock sono stati quindi diluiti in 95 μl di TE 0.1x. La miscela per la preamplificazione è stata preparata con:

- 7.4 μl di acqua sterile;
- 5.6 μl di una mix precostituita contenente (4 μl di 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1.2 μl di MgCl_2 25 mM, 0.4 μl di dNTP 10 mM);
- 0.9 μl di *EcoRI*+A ($50\text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$);
- 0.9 μl di *TaqI*+T ($50\text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$);
- 0.2 di *Taq* polimerasi;
- 5 μl di DNA ristretto/ligato diluito.

Di seguito vengono riportate le sequenze dei primer utilizzati, estesi di una base.

Sequenze dei primers impiegati per la pre-amplificazione. In neretto è evidenziata la base selettiva

Adattatore	5' -
<i>EcoRI</i> +A	GACTGCGTACCAATTCA- 3'
Adattatore	5' -
<i>TaqI</i> +T	GATGAGTCCTGAGCGAAT- 3'

Per la reazione di pre-amplificazione si è utilizzato thermal cycler (Perkin Elmer 9700) ed è stato applicato il seguente profilo termico:

Profilo termico applicato per la reazione di pre-amplificazione.

Cicli	T°	Durata	Reazione
25	94°C	1 min	denaturazione iniziale
	94°C	30 sec	denaturazione
	55°C	30 sec	appaiamento
	72°C	1 min	estensione
	72°C	10 min	estensione finale

Al termine, il prodotto pre-amplificato è stato controllato con un'elettroforesi su agarosio al 2% per verificare la presenza di uno *smear* dei frammenti a lunghezze comprese tra 100 e 1000 bp. In seguito gli stessi campioni hanno subito una diluizione 1:40 in TE 0.1x e sono stati conservati a 20°C come materiale di base per effettuare piastre repliche con 5 µl pronti per le successive amplificazioni in serie.

3) Amplificazione selettiva

Questa fase ha visto l'aggiunta di due basi selettive ad entrambi i primers impiegati nella pre-amplificazione. La mix che viene aggiunta ai 5 µl di DNA preamplificato diluito, per un volume finale di 20 µl, contiene gli stessi reagenti (eccetto i primers), nelle medesime quantità della fase precedente.

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

Profilo termico adottato per l'amplificazione dell'AFLP; td 65-56

Cicli	T°	Durata	Reazione
1	94°C	5 min	denaturazione iniziale
13	94°C	30 sec	denaturazione
	da 65°C a 56.6°C (-0,7°C ogni ciclo)	30 sec	appaiamento
	72°C	1 min	estensione
23	94°C	30 sec	denaturazione
	55°C	30 sec	appaiamento
	72°C	2 min	estensione
1	72°C	3 min	estensione finale

In totale sono state analizzate le seguenti 6 combinazioni di primers caratterizzate da 3 nucleotidi selettivi:

- Eco+ACA⁷⁰⁰/Taq+TAG
- Eco+ACG⁷⁰⁰/Taq+TAT
- Eco+ACA⁷⁰⁰/Taq+TCC
- Eco+ACT⁸⁰⁰/Taq+TAA
- Eco+ACA⁷⁰⁰//Taq+TAA
- Eco+ACT⁸⁰⁰/Taq+TCA

4) Preparazione delle diluizioni

Per poter rendere la procedura più sbrigativa e poter sequenziare quattro combinazioni con un'unica corsa, è stato effettuato un multiplexing.

Per ogni campione, è stato prelevato 1 μ l degli amplificati che presentavano nella combinazione dei primers un EcoRI marcato 700, mentre dagli amplificati caratterizzati da un EcoRI marcato 800, si sono prelevati 5 μ l. Entrambe le aliquote sono state miscelate nello stesso pozzetto e in ultimo si sono addizionati ancora 20 μ l di 'blu per licor'.

5) Elettroforesi su gel di poliacrilammide e visualizzazione dei prodotti di amplificazione

Anche per gli AFLP la corsa elettroforetica è stata condotta con gel di poliacrilammide al 6% in un sistema verticale dotato di lastre di vetro utilizzando il sequenziatore laser LI-COR® 4200. Precedentemente, i campioni sono stati denaturati a 95°C per 5 minuti e poi posti in ghiaccio. Il caricamento del gel è avvenuto seguendo le medesime procedure descritte per la tecnica SSR e anche in questo caso i dati sono stati elaborati mediante il software e-Seq (Jackson e Matthews, 2000).

17.2.2b Analisi dei dati molecolari

I profili elettroforetici documentati sono stati successivamente convertiti in matrice binaria su un foglio elettronico. Lo scoring delle bande polimorfiche è stato eseguito immettendo il valore '1' in caso di presenza del frammento amplificato oppure '0' per la sua assenza. Per i marcatori AFLP si è dato per assunto che ogni prodotto di PCR rappresenti un singolo locus, ed è stato attribuito una sigla ad ogni banda polimorfica, a seconda dei primer impiegati e della posizione del frammento sul gel, indicando il loro peso molecolare.

La matrice binaria è stata poi importata nel software NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) version 2.02 package (Rohlf 1993), per la valutazione delle distanze genetiche e per effettuare le analisi cluster. La caratterizzazione della variabilità genetica ha

previsto la stima di particolari coefficienti di Similarità Genetica (GS). I dati relativi all'insieme di marcatori molecolari raccolti nel campione di individui in esame sono stati utilizzati per costituire le matrici di similarità genetica calcolando i coefficienti relativi in tutte le possibili combinazioni a coppie tra tutti gli individui analizzati. La similarità genetica tra i diversi genotipi di carciofo è stata calcolata con il coefficiente di Dice per i marcatori SSR ed il coefficiente di Jaccard per i marcatori AFLP. Tali coefficienti sono stati applicati su tutte le coppie di campioni possibili, utilizzando il protocollo SIMQUAL (similarity of qualitative data).

L'indice di Dice (DSI = Dice Similarity Index) valuta la probabilità che una banda amplificata in un individuo sia amplificata anche in un altro individuo; si tratta di un metodo molto efficiente quando ciascun locus marcatore produce una singola banda (o al limite lo stesso numero di bande) per ciascun allele, vale a dire nel caso in cui esistano pochi o nessun 'allele nullo' (alleli che non producono nessuna banda), come nel caso dei marcatori co-dominanti: $DSI_{xy} = 2a / (a+b) + (a+c)$; dove a = numero di bande condivise tra gli individui x ed y; a+b = numero di bande presenti in x; a+c = numero di bande presenti in y.

L'indice di Jaccard (JSI=Jaccard's Similarity Index) prende in considerazione la collocazione delle bande sul gel piuttosto che considerare le bande prodotte da un singolo individuo; si tratta di un indice particolarmente efficace in caso di utilizzo di marcatori dominanti. Il denominatore è rappresentato dal numero totale di bande di peso differente, evidenziate negli individui messi a confronto, mentre il numeratore è rappresentato dal numero di siti del gel in cui entrambi gli individui presentano una banda: $JSI_{xy} = a / (a+b+c)$; dove a = numero di bande condivise tra gli individui x ed y; b = numero di bande presenti in x ed assenti in y; c = numero di bande presenti in y ed assenti in x.

Come anche per tutti gli altri coefficienti di similarità, anche per gli indici di Dice e di Jaccard un valore uguale a 1 indica identità tra x e y, mentre un indice pari a -1 indica completa divergenza tra i due individui.

Le matrici di similarità sono stata infine usate per costruire i dendrogrammi. A tale scopo è stato utilizzato il metodo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic average).

17.2.3 Risultati

17.2.3a Caratterizzazione bio-agronomica

Le caratteristiche salienti delle tre linee vengono riportate nelle schede varietali (Prospetti 1, 2 e 3). Da un esame comparato delle schede, delle tabelle 8 e 9 e delle figure 9, 10, 11, 12, 13 e 14 si evince come ciascuna linea sia chiaramente distinguibile e quindi individuabile sia sotto il profilo bio-morfologico e produttivo che sotto quello strettamente genetico-molecolare. La linea NP2, rispetto alle altre due linee, è caratterizzata da minore statura delle piante (92,3 cm) e lunghezza dello stelo florale (30,8 cm); nel contempo, presenta una maggiore dimensione delle foglie (146 x 80 cm); un più elevato peso del capolino principale (220 g), e di quelli di primo ordine (189 g). Inoltre, il capolino presenta una forma sub-sferica (indice di forma = 0,89) (tab. 9) con tendenza della parte apicale delle brattee al divaricamento.

La linea NP5 è caratterizzata da foglie più piccole (tab. 8), ma da uno stelo florale nettamente più lungo rispetto alle altre linee. Essa, inoltre, è leggermente più precoce e con forma sferica dei capolini (indice di forma = 1,01). La linea NP4 presenta capolini di forma leggermente allungata (indice di forma = 1,12) e con ricettacolo di maggiori dimensioni (tab. 9).

Da un punto di vista produttivo, si può rilevare come tutte le tre linee siano a maturazione primaverile dei capolini, e caratterizzate da buona contemporaneità di raccolta (durata media della raccolta di circa 70 giorni)

ed elevata capacità produttiva (tab. 8 e fig. 9). La linea NP2 ha manifestato la maggiore produzione ponderale con 2.278 g per pianta, mentre, la linea NP5 è stata quella che ha fornito il più elevato numero di capolini per pianta (20) (fig. 9).

La resa industriale netta delle tre linee ha oscillato tra 37% (NP5) e 38% (NP2 e NP4) (dati non mostrati).

E' opportuno rilevare che per tutti i caratteri esaminati non è stata rilevata interazione tra il genotipo e l'annata; ciò dimostra una equa risposta delle tre linee nella due annate di valutazione.

In rapporto all'annata è emerso come, nella media dei tre genotipi, nella seconda annata le piante abbiano manifestato un maggiore accrescimento (statura, dimensioni delle foglie e lunghezza dello stelo fiorale), e una più elevata precocità di maturazione dei capolini (tabelle 8 e 9). La produzione tra le due annate non è risultata, invece, statisticamente differente (dato non riportato).

17.2.3b Caratterizzazione molecolare

- Caratterizzazione delle linee NP2, NP4 ed NP5 mediante marcatori SSR

Nell'ambito delle 125 coppie di primers utilizzate, 115 hanno permesso di ottenere prodotti di amplificazione chiaramente interpretabili, i restanti 10 marcatori hanno invece fornito profili poco chiari o caratterizzati da eccessivo *stuttering* e pertanto sono stati esclusi dalle successive analisi.

La figura 10 riporta le relazioni filogenetiche stimate mediante l'analisi delle similarità evidenziate dal complesso degli alleli condivisi ed esclusivi nell'ambito dei tre cloni in analisi e dei 12 genotipi di carciofo utilizzati come termini di paragone e confronto. Come si può osservare i tre cloni NP risultano nettamente separati dai restanti genotipi, ad evidenziare

come siano caratterizzati da una base genetica nettamente differenziata dai tipi varietali di carciofo al momento in coltivazione.

I marcatori microsatelliti, in virtù della loro natura co-dominante, hanno inoltre consentito di stimare il livello di eterozigosi che, nell'ambito dei cloni NP è risultato il seguente:

- NP2: 26.1%
- NP4: 22.6 %
- NP5: 24.3 %

Tale livello di eterozigosi (corrisponde ad un livello di omozigosi di circa il 74-77% a seconda del clone) è risultato nettamente inferiore a quanto rilevato nei genotipi di confronto (fig. 11). Dalla figura 11 che riporta il livello di eterozigosi evidenziato nell'ambito di tutti i campioni in analisi, è possibile osservare come tale livello negli altri genotipi di carciofo sia in media del 58 %, variando da un minimo del 46% ad un massimo del 70%.

Caratterizzazione delle progenie da autofecondazione e da impollinazione controllata mediante marcatori AFLP

I lotti di seme ottenuti dall'autofecondazione dei progenitori NP2, NP4 ed NP5 sono stati posti in coltivazione nell'annata 2009/2010. Sulle tre progenie ottenute, nella primavera successiva si è proceduto all'analisi molecolare AFLP di tutti gli individui, per eliminare quelli geneticamente più distanti e sottoporre a incrocio controllato quelli rimanenti.

Il dendrogramma riportato in figura 12, evidenzia le relazioni filogenetiche evidenziate nell'ambito delle progenie analizzate. Come si può osservare i marcatori AFLP hanno consentito la caratterizzazione (fingerprinting molecolare) di ciascuno dei genotipi oggetto di analisi. I genotipi sono risultati suddivisi in tre grandi gruppi (o cluster) raggruppati

individui appartenenti alle progenie NP2, NP4 ed NP5. Nell'ambito di ciascun cluster è stato, inoltre, possibile evidenziare la presenza sia di sotto-cluster, caratterizzati da genotipi più simili tra di loro, che di genotipi più divergenti. Allo scopo di ridurre ulteriormente il livello di eterozigosi all'interno della varietà Nobre (e di conseguenza aumentare l'uniformità nell'ambito di ciascuna progenie), si è scelto di eliminare i genotipi che sono risultati più divergenti nell'analisi filogenetica, e di selezionare i sotto-cluster comprendenti gli individui geneticamente più simili, in modo da ottenere seme da impollinazione controllata potenzialmente caratterizzato da una elevata uniformità. In particolare sono stati scelti 4 sotto-cluster, uno per ciascuna progenie NP2 ed NP5, e due sotto-cluster nell'ambito della progenie NP4 (denominati NP4A ed NP4B). Tali cluster di genotipi selezionati, successivamente sottoposti ad impollinazione controllata, sono indicati sulla destra della figura 12.

In figura 13 viene riportato il dendrogramma ottenuto analizzando unicamente i genotipi selezionati nell'ambito delle progenie da autofecondazione dei progenitori NP2, NP4, NP5, e suddivisi nei 4 cluster precedentemente descritti.

I genotipi selezionati sono stati quindi isolati per produrre seme in isolamento spaziale, mediante impollinazione controllata, per ciascuno dei 4 cluster selezionati. E' stato così prodotto un lotto di seme per ciascun gruppo, messo in coltivazione nell'annata successiva (2010/2011). Come per l'annata precedente si è proceduto all'analisi molecolare AFLP di tutti gli individui posti in coltivazione. Il dendrogramma riportato in figura 14, riporta le relazioni filogenetiche evidenziate nell'ambito delle progenie analizzate. Come evidenziato nell'annata precedente i marcatori AFLP hanno consentito di ottenere il fingerprinting molecolare di ciascuna pianta

oggetto di analisi. I genotipi sono risultati suddivisi in quattro grandi cluster, raggruppanti individui appartenenti alle progenie NP2, NP5 NP4A ed NP4B.

17.3 Prova C) Variazione della produzione di acheni e dell'accrescimento della pianta in rapporto ai cicli di autofecondazione ed impollinazione controllata

17.3.1 Scopo della prova

La costituzione di varietà non ibride a propagazione per seme, attesa la struttura genetica largamente eterozigote del carciofo, è basata sulla capacità della progenie di contenere gli effetti della depressione da inbreeding conseguente al processo di autofecondazione (Pecaut, 1993; Mauromicale e Ierna, 2001). Quest'ultimo si rende necessario per ridurre il livello di eterozigosi di una progenie e ottenere quella uniformità biomorfologica tra le piante che è indispensabile per la costituzione di una determinata varietà propagata per seme. Con questa prova abbiamo voluto valutare gli effetti dei cicli di autofecondazione/impollinazione controllata in tre cloni ottenuti da una varietà sintetica 'Nobre' UPF, non sufficientemente uniforme, propagata per seme. A tal fine sono state analizzate le caratteristiche riproduttive con particolare riguardo alla produzione di acheni, nonché l'accrescimento e lo sviluppo delle progenie ottenute.

17.3.2 Materiali e metodi

Le ricerche sono state condotte in agro di Cassibile (Siracusa) nelle annate 2008-2009/2009-2010/2010-2011 su terreno a tessitura argilloso-sabbiosa presentante le caratteristiche del terreno della prova A). Sono stati

utilizzati tre cloni selezionati nell'ambito della varietà brasiliana Nobre UPF e denominati NP1, NP2 e NP3 le cui caratteristiche salienti vengono riportate nelle schede descrittive dei prospetti n° 1, 2, e 3 della prova B). I cloni selezionati da una progenie ottenuta in libera fecondazione e presentante il livello di eterozigosi riportato nella prova B) sono stati impiantati alla fine dell'estate 2008 a mezzo ovoli o parti di ceppaia. Ciascun clone comprendeva da 7 a 10 piante. A fine maggio 2009, 5-8 giorni prima della fioritura, le piante di ciascun clone sono state isolate e sottoposte alla prima autofecondazione controllata mediante la procedura riportata nella prova precedente (prova B). Un lotto di seme ottenuto all'inizio di agosto è stato seminato nel settembre 2009. Le piante appartenenti a ciascuna delle tre progenie sono state sottoposte alla fine della primavera 2010 al secondo ciclo riproduttivo basato sull'incrocio controllato tra genotipi caratterizzati da un'elevata uniformità genetica con le stesse procedure dell'anno precedente. Un lotto di seme di ciascuna delle tre progenie, ottenuto ad inizio agosto 2010, è stato seminato nel successivo settembre e le piante coltivate fino all'estate 2011 per la produzione di acheni.

In ciascun anno è stato adottato un investimento unitario di 1 pianta m^{-2} , ed applicata la tecnica colturale conforme a quella ordinariamente in uso nella coltura del carciofo ed orientata ad assecondare le esigenze idriche e nutritive delle piante, soprattutto durante la fase di fioritura e maturazione degli acheni.

In figura 15 vengono riportate le temperature minime e massime durante l'intervallo fioritura-maturazione degli acheni nei 3 anni.

In ciascuno dei tre anni di prova, sono stati rilevati: la statura della pianta all'antesi dei fiori, la lunghezza e il diametro massimo dello stelo florale principale, la lunghezza e la larghezza delle foglie mediane (18^a-22^a foglia), quali variabili caratterizzanti l'accrescimento delle piante.

Il numero di fiori per capolino e per pianta, il numero e peso degli acheni per capolino e per pianta, il peso 1000 acheni e la vitalità del polline sono stati, invece, scelti e rilevati quali variabili caratterizzanti la fase riproduttiva delle piante.

Per la valutazione della fertilità del polline si è proceduto come di seguito riportato. Durante il periodo di piena fioritura, in quattro epoche successive, è stato prelevato un congruo campione di polline da 4 capolini di ciascuna progenie e portato tempestivamente in laboratorio per verificarne il livello di vitalità. Quest'ultimo è stato effettuato con l'ausilio di un microscopio ottico dopo aver fatto colorare il polline con una soluzione di aceto-carminio.

E' stato calcolato l'indice di allegazione mediante il rapporto tra numero di acheni prodotti per pianta e numero di fiori differenziati per pianta.

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) secondo un disegno fattoriale a due vie genotipo x anno. Le medie sono state confrontate mediante l'*LSD test* o il *Tukey's test* solo quando l'*F* è risultato significativo per $P \leq 0.05$.

17.3.2a *Caratterizzazione molecolare*

La caratterizzazione molecolare è stata effettuata mediante marcatori AFLP secondo il protocollo descritto nel capitolo precedente. I profili elettroforetici sono stati documentati attraverso il software e-Seq (Jackson e Matthews, 2000) e sono stati successivamente convertiti in matrice binaria su un foglio elettronico. I frammenti polimorfici così evidenziati sono stati analizzati, in base alla loro frequenza nei campioni in analisi, mediante la valutazione del *Polimorphic Information Content* (PIC) (Anderson et al. 1993) calcolato applicando la formula semplificata dell'eterozigosi attesa: $PIC = 2p(1-p)$; dove p è la percentuale di piante in cui il marcatore è

risultato presente. In questo modo è stato pertanto possibile stimare il decremento di eterozigosi nelle progenie in analisi.

La caratterizzazione della variabilità genetica ha previsto la stima coefficiente di Jaccard, secondo il metodo adottato e descritto nel paragrafo precedente. In particolare, allo scopo di evidenziare la distribuzione della variabilità genetica, è stata effettuata l'analisi per coordinate principali (PCoA - Principal Coordinate Analysis) basata sulla matrice triangolare delle stime di similarità genetica; le prime tre coordinate sono state ricavate graficamente sulla base dei vettori estratti (Eigen vectors). Tutti i calcoli sono stati eseguiti utilizzando il software NTSYS versione 2.02 (Rohlf 1993).

17.3.3 Risultati

17.3.3a Produzione di acheni e accrescimento della pianta

L'analisi dei risultati riportati nelle tabelle 10 e 11 mette in evidenza come alcune caratteristiche riproduttive quali la produzione di acheni, il peso 1000 semi, l'indice di allegagione e la percentuale di polline abortito, sono apparse significativamente e marcatamente influenzate dal numero di autofecondazioni, impollinazione controllata dal genotipo, e dalla loro interazione. Più in particolare, la produzione di acheni è significativamente diminuita passando dalle piante clonate dalla progenie di Nobre UPF (1° anno) e quelle proveniente da una autofecondazione (2° anno) e da una autofecondazione più una fecondazione controllata (3° anno) (tab. 10). L'entità del decremento produttivo è apparso tuttavia dipendere dal genotipo (tab. 11), atteso che la produzione di acheni, passando, dal 1° al 2° anno, è significativamente diminuita del 54% (da 98 a 45 g pianta⁻¹) in NP2, e del 74% (da 56 a 14 g pianta⁻¹) in NP4, e in misura non significativa, del 7% (da 100 a 93 g pianta⁻¹) in NP5. In ogni caso, al 3° anno, cioè dopo 2

autofecondazioni, in tutti i genotipi, la produzione di acheni è risultata pressochè nulla, avendo oscillato tra 0,2 (NP5) e 3,7 (NP4) g pianta⁻¹.

Le differenze produttive su esposte sono apparse dipendere in larga misura dal numero di semi prodotti da ciascuna pianta, avendo il peso 1000 semi mostrato variazioni più modeste e non sempre riconducibili all'annata (tab. 11). L'indice di allegagione ha mostrato un forte e significativo ridimensionamento con l'aumentare del numero di autofecondazioni impollinazioni controllate (tab. 11). Esso, infatti, nella media dei genotipi, è passato dal 39% del 1° anno, al 20% del 2° anno e soltanto allo 0.5% del 3° anno. L'analisi delle correlazioni riportata in tabella 12 conferma come la produzione di acheni per pianta sia apparsa maggiormente influenzata dal numero di acheni per pianta, dal numero e peso di acheni per capolino e dall'indice di allegagione e per nulla influenzata al peso 1000 acheni e dal numero di fiori per capolino.

Con riferimento alle variabili caratterizzanti l'accrescimento della pianta, pur avendo accertato una significativa influenza del numero di autofecondazioni, del genotipo e in alcuni casi della loro interazioni, l'entità delle differenze tra i trattamenti è risultata di gran lunga meno evidente rispetto alle variabili caratterizzanti la fase riproduttiva (tabelle 13 e 14). Infatti, la statura della pianta, nella media dei genotipi, è risultata più elevata (106 cm) nelle piante provenienti da una autofecondazione (2° anno), rispetto a quelle provenienti direttamente dalla clonazione all'interno della progenie e non ancora autofecondate (101 cm) (1° anno). La statura delle piante dopo due autofecondazioni/impollinazioni controllate (3° anno), pari a 104 cm, non si è statisticamente differenziate da quella degli altri due trattamenti (tab. 14).

Le altre variabili esaminate hanno sempre rivelato valori più elevati nelle piante provenienti da una fecondazione (2° anno), ma con differenze, che seppure quasi sempre significative, sono risultate piuttosto contenute

essendo comprese tra il 7% e il 9%, rispetto alle piante degli altri due trattamenti (tab. 14).

Con riferimento al genotipo, la linea NP2 è apparsa caratterizzata da statura e lunghezza dello stelo florale principale più contenuta e da maggiore diametro dello stelo e dimensione delle foglie rispetto alle linee NP4 e NP5. (tabella 13). Da segnalare come la linea NP5, pur presentando la stessa statura (108 cm) della linea NP4 ha evidenziato uno stelo florale più lungo di 9 cm (40 cm contro 31 cm).

17.3.3b Caratterizzazione delle progenie da autofecondazione e da impollinazione controllata mediante marcatori AFLP

I lotti di seme ottenuti dall'autofecondazione dei progenitori NP2, NP4 ed NP5 sono stati posti in coltivazione nell'annata 2009/2010. Sulle tre progenie ottenute, nella primavera successiva si è proceduto all'analisi molecolare AFLP di tutti gli individui, per eliminare quelli geneticamente più distanti e sottoporre a incrocio controllato quelli rimanenti. In figura 16A) viene riportata l'analisi PcoA che evidenzia la distribuzione della variabilità genetica evidenziata nell'ambito dei genotipi selezionati. Come si può osservare, e come già evidenziato dall'analisi UPGMA riportata nel precedente capitolo, i genotipi sono risultati suddivisi nei tre grandi cluster raggruppati individui appartenenti alle progenie NP2, NP4 ed NP5. I tre cluster risultano collocati nello stesso quadrante nel quale sono presenti i loro progenitori. In figura 16A) si può inoltre apprezzare la suddivisione del cluster NP4 nei sottocluster NP4A e NP4B.

Come precedentemente riportato, tali cluster di genotipi selezionati sono stati sottoposti ad impollinazione controllata, è stato così prodotto un lotto di seme per ciascun gruppo, messo in coltivazione nell'annata successiva (2010/2011). In figura 16B) viene riportata l'analisi PcoA che

evidenzia la variabilità presente nell'ambito delle progenie ottenute. Come evidenziato nell'annata precedente i genotipi sono risultati suddivisi in quattro grandi cluster, raggruppati individui appartenenti alle progenie NP2, NP5 NP4A ed NP4B.

La figura 16C), infine, riporta l'analisi PcoA complessiva che permette di osservare la distribuzione della variabilità nelle due annate di coltivazione, unitamente a quella dei progenitori dei materiali analizzati. Le progenie risultano completamente sovrapposte ed il livello di divergenza tra genotipi nell'ambito di una stessa progenie appare analogo nelle due annate di coltivazione.

In tabella 15 vengono riportate le statistiche AFLP rilevate nell'ambito delle progenie ottenute a partire da autofecondazione e coltivate nell'annata 2009/2010 (secondo anno) e delle progenie ottenute da impollinazione controllata, e coltivate nell'annata 2010/2011 (terzo anno). Nell'ambito di ciascuna progenie si può evidenziare un significativo decremento del livello di polimorfismo rilevato nel secondo anno rispetto a quanto evidenziato nel terzo anno. Tale decremento ha, pertanto, avuto effetto sulla valutazione della eterozigosità attesa, stimata mediante l'indice PIC (*Polimorphic Information Content*) che ha subito un netto decremento in ciascuna delle progenie in analisi.

Come evidenziato nel capitolo precedente, i marcatori microsatelliti, in virtù della loro natura co-dominante, hanno consentito di stimare il livello di eterozigosi nell'ambito dei progenitori NP, che è risultato il seguente:

- NP2: 26.1%
- NP4: 22.6 %
- NP5: 24.3 %

Tale livello di eterozigosi (corrispondente ad un livello di omozigosi di circa il 74-77% a seconda del clone) potrebbe, pertanto, giustificare il livello di depressione da inbreeding rilevato nell'anno seguente nelle

progenie da autofecondazione, per quanto riguarda la produzione di acheni. Tale depressione è risultata più marcata per le progenie NP4 (che hanno prodotto solo 14.4 g pianta⁻¹); d'altra parte il progenitore NP4 era risultato caratterizzato da un più marcato livello di omozigosi e, a sua volta, aveva fornito la minore produzione di acheni (56.4 g pianta⁻¹) se paragonata agli altri due progenitori.

A seguito di selezione delle piante nell'ambito delle progenie da autofecondazione, e loro impollinazione controllata, la variabilità genetica è stata ulteriormente ridotta ed il livello di eterozigosi ha subito un ulteriore decremento. L'analisi AFLP (tabella 15) ha infatti evidenziato un decremento degli indici PIC da valori di circa 0.2 a valori che si sono attestati sullo 0.15 per le progenie NP2 ed NP5, ma che sono scesi fino allo 0.09 per le progenie NP4, per le quali la separazione in due sottocluster ha provocato una riduzione della variabilità tra genotipi ancora più marcata. Questo ulteriore incremento del livello di omozigosi ha aumentato la depressione da inbreeding per il carattere relativo alla produzione di acheni, consentendo solo limitatissime produzioni di seme nell'ambito di tutte le progenie in analisi.

17.4 Prove D) Tecniche per la produzione di acheni in nuove linee di carciofo a propagazione gamica

17.4.1 Scopo della prova

Tra le innovazioni recentemente proposte per promuovere avanzamenti sostanziali nella coltivazione del carciofo, la propagazione per 'seme' (achenio sotto il profilo botanico), in luogo della tradizionale propagazione agamica a mezzo carducci, ovoli o parti di ceppaia, appare quella più idonea a consentire un concreto ammodernamento nella gestione

agronomica della coltura (Mauromicale e Ierna, 2000; Mauro et al., 2011). La propagazione per 'seme' è resa possibile dall'impiego di genotipi (linee inbred, ibridi F₁, varietà sintetiche) (Pecaut, 1993; Mauromicale e Ierna, 2000) con struttura genetica ben determinata e sostanzialmente differenti dai cloni attualmente coltivati che, come è noto, a causa dell'elevata allogamia, sono notevolmente eterozigoti, e danno progenie con grande variabilità morfologica quando propagati per 'seme'. Una volta costituiti i genotipi a propagazione gamica, è necessario mettere a punto un idoneo itinerario tecnico per la produzione di 'seme'. Lo scopo di questa linea di ricerca è stato quello di studiare gli effetti di alcune tecniche quali l'isolamento spaziale delle piante durante la fase di fioritura e la parziale eliminazione dei capolini sulle caratteristiche della produzione di acheni in linee di carciofo propagato per seme.

17.4.2 Materiali e metodi

Sono state condotte due prove nell'annata 2008/2009 in agro di Cassibile (SR) su terreno a tessitura argilloso-sabbiosa. Nella prima prova, sono stati posti allo studio 3 genotipi (NP2, NP4, NP5) e l'isolamento spaziale delle piante, più l'impollinazione controllata, a confronto con piante allevate in pien'aria ed in libera impollinazione. Sulle piante utilizzate nella prova sono stati rimossi i capolini di 2° e 3° ordine, per facilitare i processi di impollinazione, allegagione e accrescimento degli acheni.

La seconda prova è stata condotta sempre sulle tre linee NP2, NP4 e NP5, utilizzando le piante allevate sotto isolatori e ponendo a confronto: piante sulle quali venivano rimossi i capolini di 2° e 3° ordine con piante sulle quali venivano lasciati tutti i capolini. Le 3 linee di carciofo (NP2, NP4, NP5), sufficientemente uniformi sotto il profilo genetico, sono state ottenute mediante un lungo lavoro, dapprima di selezione massale e

successivamente di autofecondazione controllata a partire da una varietà sintetica brasiliana, denominata Nobre UPF (vedi prove B e C). L'eliminazione dei capolini di 2° e 3° ordine, ove prevista, è stata effettuata in corrispondenza dello stadio D (Foury, 1967). L'isolamento delle piante è stato realizzato, a mezzo di rete antibombi (7 x 3mm), 3-4 giorni prima dell'antesi; l'introduzione dell'impollinatore *Bombus terrestris* è avvenuta 2 giorni dopo l'antesi del capolino principale ed è continuata per tutto il periodo di fioritura dei capolini. In ogni isolatore contenente 10 piante veniva introdotta un'arnia con circa 300 pronubi. E' stata valutata la produzione di acheni per pianta, dopo aver trebbiato i capolini ad inizio agosto con una mini trebbia, e le variabili ad essa connesse: numero e peso di acheni per capolino, numero di capolini per pianta, peso 1000 semi. Durante il periodo della fioritura sono stati determinati il numero di fiori per capolino e per pianta, la vitalità del polline e la produzione di polline per capolino. E' stato calcolato l'indice di allegagione, quale rapporto tra numero di acheni prodotti e numero di fiori per capolino e per pianta. E' stata valutata la capacità di attrazione dei pronubi da parte dei fiori del capolino, contando il numero di pronubi (*Bombus terrestris*) presenti nell'infiorescenza durante il periodo dell'antesi in 4 momenti della giornata (h 7.00, 10.00, 14.00 e 16.00).

Sugli acheni prodotti all'interno degli isolatori, al fine di valutarne la qualità agronomica, sono stati rilevati anche il contenuto di umidità alla raccolta e la germinabilità dopo 3-5-12 mesi dalla raccolta. Le prove di germinazione sono state effettuate al buio e alla temperatura di $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Come substrato di germinazione sono stati utilizzati 2 fogli di carta Whatman $\neq 3$ inumidita con 9 ml di acqua distillata e posti in capsula Petri di 9 cm di diametro. Ogni trattamento che includeva 50 semi è stato replicato 4 volte. I rilievi sulla germinazione sono stati eseguiti ogni 24 ore, a partire dal 1° seme germinato e fino a quando per tre giorni consecutivi

non è stato registrato nessun seme germinato. In corrispondenza di ciascun rilievo sono stati contati e quindi rimossi i semi germinati e se necessario si è provveduto a ripristinare il più conveniente grado di umidità del substrato di germinazione. Al fine di acquisire indicazioni sull'energia germinativa, è stato calcolato il tempo medio di germinazione (TMG) mediante la formula:

$$TMG = \frac{\sum (n \cdot d)}{\sum n}$$

dove n è il numero di semi germinati, d è il numero d'ordine del giorno in cui è stato eseguito il conteggio, e $\sum n$ rappresenta il numero totale di semi germinati.

In entrambe le prove i due fattori allo studio genotipo x isolamento spaziale (prova 1) e genotipo x numero capolini/pianta (prova 2) sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) a due vie. Le medie sono state confrontate mediante il *Tukey's test* HSD o l'*LSD test*.

17.4.3 Risultati

La produzione di acheni è risultata significativamente influenzata dal genotipo avendo oscillato tra 48,9 (NP4) e 99,5 (NP5) g pianta⁻¹ (tab. 16). Tale variazione è risultata dipendente dal numero di semi prodotti per pianta ($r=0.973^{***}$) (dato non riportato), atteso che il peso 1000 acheni non ha subito oscillazioni significative per effetto del genotipo (tab. 16). Il numero di acheni per pianta, compreso tra 1165 di NP4 e 2168 di NP5, è dipeso dal numero di acheni per capolino, il quale, a sua volta, è risultato dipendere dalla percentuale di allegagione (tab.16). Quest'ultima infatti ha raggiunto il valore più alto (39%) in NP5 e quello più basso in NP4 (28%). Da notare come il numero di acheni per capolino non sia apparso influenzato dal numero dei fiori per capolino, il quale non è risultato significativamente influenzato dal genotipo (tab. 16).

E' interessante segnalare come il numero dei capolini per pianta non abbia mostrato variazioni significative né in rapporto al genotipo, né

all'ambiente di coltivazione. Per contro, la produzione di seme per capolino è risultata significativamente influenzata dal genotipo avendo oscillato tra 12.6 g (NP4) e 20.8 g (NP5).

In rapporto all'ambiente di coltivazione, pur non emergendo differenze significative a livello di produzione di acheni, il numero di acheni raccolto nelle piante allevate sotto isolatori è risultato significativamente superiore a quello delle piante coltivate in piena aria (1913 vs. 1404 per pianta). Anche in questo caso, le variazioni sono dipese dalla variazione nella percentuale di allegagione (39 vs. 29%).

Con riferimento alla prova 2, riguardante la produzione di seme in rapporto al genotipo e al numero di capolini lasciati sulla pianta, sono stati confermati in linea di massima gli effetti del genotipo già accertati nella prova precedente. L'effetto numero capolini lasciati sulla pianta, pur non raggiungendo la significatività statistica per la produzione di seme, è risultato significativo e di particolare interesse per alcune delle variabili studiate (tab. 17). Le piante dalle quali sono stati rimossi i capolini di 2° e 3° ordine hanno prodotto una maggiore resa in seme per capolino (18,5 contro 11,4 g) in conseguenza di un più alto numero di acheni per capolino rispetto alla pianta sulla quale sono stati lasciati tutti i capolini (413 contro 263). Questo risultato è apparso dipendere dal più elevato livello di allegagione dei frutti riscontrato nelle piante dove sono stati rimossi i capolini di 2° e 3° ordine (38,6 contro 29,6) (tab. 17). Infatti, il numero di fiori per pianta è risultato significativamente più elevato nelle piante con tutti i capolini rispetto a quelle dove sono stati rimossi i capolini di 2° e 3° ordine (6739 contro 4933), anche se in queste ultime, il numero dei fiori per capolino è risultato superiore (1079 contro 878). I risultati relativi al numero dei fiori per capolino vanno messi in relazione con le dimensioni dei capolini che ovviamente diminuiscono con il progredire dell'ordine di formazione (capolino principale > capolino 1° ordine > capolino 2° ordine

> capolino 3° ordine) (dato non riportato). Ad ogni modo, la maggiore percentuale di allegagione riscontrata nelle piante dove sono stati asportati i capolini di 2° e 3° ordine è stata verosimilmente favorita dal più elevato numero di pronubi riscontrati sui capolini durante la fioritura (39 contro 14 per capolino) (tab. 17).

I trattamenti studiati nelle due prove non hanno significativamente influenzato la percentuale di umidità degli acheni, la quale è risultata relativamente bassa, compresa tra il 3,5% ed il 5,1% (dati non riportati).

Le prove di germinabilità hanno messo in evidenza gli effetti significativi del genotipo e dell'età del seme (tab. 18). Avuto riguardo al genotipo, e nella media delle tre età del seme, è emersa la migliore "performance" di NP5, che ha rivelato una germinabilità dell'86% e un TMG di 5,7 giorni. Per contro, NP4 ha mostrato la più bassa germinabilità (68%). Con riferimento all'età del seme, la germinabilità del seme è diminuita significativamente passando dal seme di 3 e 5 mesi di età (84,6 e 80,6, rispettivamente) a quello di un anno (68,9%).

17.5 Prova E) Selezione clonale in spinoso di Palermo

17.5.1 Motivazione della ricerca

Negli ultimi anni, al fine di incrementare le rese, diversificare la produzione sotto il profilo qualitativo e meglio regolare il calendario di produzione, la cinaricoltura siciliana ha visto la diffusione in coltura di nuove cultivar (*Romanesco C3*, *Terom*, *Tema 2000*, *Apollo*, *Spinoso sardo*, *Violetto di Provenza*, a propagazione vegetativa). Ciò ha comportato, in alcuni casi, fenomeni di mescolanza varietale tra le nuove cultivar ed il germoplasma autoctono, una pericolosa degenerazione bio-fisiologica a causa della scarsa attenzione verso la selezione del materiale di

propagazione ed una erosione genetica delle due varietà indigene siciliane (*Violetto di Sicilia* e *Spinoso di Palermo*). Con questa linea di ricerca, utilizzando i risultati di un precedente lavoro sulla struttura genetica-molecolare dello *Spinoso di Palermo* (Portis et al., 2005), è stato intrapreso un accurato lavoro di selezione clonale. Partendo da 26 cloni, individuati nelle aree cinaricole della Sicilia occidentale con forte presenza dello *Spinoso di Palermo*, questo lavoro ha consentito di isolarne cinque, sulla base delle loro caratteristiche agronomiche. Per questi cloni è stata effettuata una puntuale caratterizzazione bio-agronomica, genetica-molecolare e chimico-nutrizionale, con particolare riferimento al profilo fenolico dei capolini. In questa elaborato, si riportano le caratteristiche bio-agronomiche salienti dei cloni in esame.

17.5.2 Materiali e metodi

17.5.2a Materiale vegetale, sede ed epoca delle ricerche

Durante l'inverno 2007, 26 cloni di carciofo appartenenti al tipo varietale autoctono 'Spinoso di Palermo' sono stati raccolti in quattro località della Sicilia occidentale: Buonfornello (37° 58' N 13° 52' E, 12 m slm), Caccamo (37° 55' N 13° 40' E, 521 m slm), Cerda (37° 54' N 13° 49' E, 274 m slm) e Licata (37° 06' N 13° 56' E, 8 m slm). Dette aree sono state scelte in quanto storicamente rappresentative dell'areale di coltivazione dello 'Spinoso di Palermo', e perché è stata preliminarmente accertata, sulla base di uno studio mediante marcatori AFLP, la presenza di una elevata variabilità genetica (Portis et al., 2005). In ogni area, sono stati selezionate da 3 a 8 piante, sulla base del grado di ramificazione di steli floreali (quale indice di potenzialità produttiva), della precocità di formazione del capolino e di alcune caratteristiche dei capolini (dimensioni, colore, forma e compattezza) dal valore mercantile molto ricercato. Da ciascuna pianta scelta, sono stati raccolti da 4 a 8 ovoli, i quali sono stati

tempestivamente trapiantati in agro di Cassibile (Siracusa, 36° 58' N, 15° 11' E, 53 m slm) nell'estate successiva. Il numero di individui per ogni clone è stato aumentato nel corso del successivo anno, prelevando e trapiantando i carducci mano mano formati. Ciò ha permesso di ottenere nell'estate successiva un numero di ovoli tali da generare un numero di individui per clone pari ad almeno 60. Nell'ambito dei 26 cloni così ottenuti, sono stati selezionati 5 cloni sulla base della loro capacità produttiva, precocità, contemporaneità e qualità dei capolini per una più approfondita caratterizzazione durante i due successivi anni (2008-2009 e 2009-2010). I primi di agosto 2008 gli 'ovoli' appartenenti ad ogni clone selezionato sono stati raccolti da piante madri e trapiantati, secondo un sesto di 0,80 x 1,25 m (1 pianta m⁻²). Il materiale è stato organizzato secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con 3 repliche, ciascuna composta da 20 piante. La conduzione agronomica della prova (fertilizzazione, irrigazione, gestione delle malerbe e dei parassiti) è stata effettuata secondo le consuetudini locali, e secondo criteri di uniformità per tutte le unità sperimentali. All'inizio del secondo anno di prova, alla fine del mese di agosto 2009, la carciofaia sperimentale è stata risvegliata previo taglio della frazione epigea disseccata per mezzo di irrigazione a micro portata di erogazione.

17.5.2b Caratterizzazione bio-agronomica

I cloni selezionati sono stati caratterizzati nel corso di due annate consecutive (2008-2009 e 2009-2010). I capolini, raccolti allo stadio di maturazione commerciale, (stadio D) secondo Foury (1967) sono stati privati dello stelo florale e pesati, al fine di determinarne il peso fresco. Nel complesso, hanno rappresentato oggetto di rilievo le seguenti cinque variabili: giorni alla prima raccolta (DFH), quale indice di precocità ed espressi come il numero di giorni intercorrenti fra il trapianto (o il risveglio)

della carciofaia e la raccolta del capolino principale; numero di capolini sulla pianta alla raccolta del capolino principale (CRP), quale indice di contemporaneità di emissione; numero di capolini pianta⁻¹ alla 31 gennaio, quale indice di precocità commerciale; resa (Y) espressa come kg di capolini pianta⁻¹; numero di capolini per pianta (NH); peso del capolino principale (MW), di primo (FW), secondo (SW) e terzo (TW) ordine; peso medio di tutti i capolini secondari (LW).

17.5.2c Elaborazione dei dati

I dati sono stati prima sottoposti a test di Levene per verificarne l'omogeneità delle varianze, quindi ad una analisi della varianza (ANOVA) a due vie (clone x anno), in accordo con il disegno sperimentale adottato in campo. I dati percentuali sono stati sottoposti alla trasformazione angolare prima dell'ANOVA (dati reali vengono riportati e discussi). Sono stati altresì calcolati il coefficiente di variabilità (c.v.) di ogni carattere e l'errore standard della differenza (SED). Le componenti della varianza dei principali caratteri allo studio sono state stimate sulla base di un modello fattoriale in cui i fattori cloni ed anno sono stati considerati con effetto *random*. La varianza fenotipica di ogni carattere (σ_p^2) è stata considerata essere composta della varianza genotipica (σ_g^2) e la varianza ambientale (σ_e^2), in accordo con l'equazione ($\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2$) dove σ_g^2 è stata stimata utilizzando i valori delle varianze attese (EMS):

$$\begin{aligned} \text{EMS}_{clone} - \text{EMS}_{clone \times anno} &= r y \sigma_g^2 ; \\ (\sigma_e^2 + r \sigma_{gy}^2 + r y \sigma_g^2) - (\sigma_e^2 + r \sigma_{gy}^2) &= r y \sigma_g^2 \end{aligned}$$

dove r e y sono il numero di repliche (3) e di anni (2), rispettivamente. Poiché $\sigma_e^2 = \text{EMS dell'errore}$, la varianza fenotipica è stata calcolata in accordo con l'equazione $\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \text{EMS dell'errore}$.

L'ereditabilità in senso ampio (h^2_B) di ciascun carattere è stata calcolata come il rapporto tra la varianza genotipica e la varianza fenotipica (σ^2_g/σ^2_p) mentre, al fine di confrontare i diversi caratteri, sono stati calcolati il coefficiente di variazione genotipica (g_{cv}) e il coefficiente di variazione fenotipica (p_{cv}), secondo le equazioni: $g_{cv} = (\sqrt{\sigma^2_g} / x) 100$ e $p_{cv} = (\sqrt{\sigma^2_p} / x) 100$.

17.5.3 Risultati

17.5.3 Caratterizzazione bio-agronomica dei cloni

La tabella 19 riporta i valori della varianza relative ai fattori principali ed alla loro interazione. Tutti i 10 caratteri allo studio hanno mostrato una buona variabilità fra i cloni, mentre l'effetto anno è risultato non significativo solo in rapporto al carattere MW. Le variabili DFH, CRP, H 31/1 e TW sono risultate significativamente influenzate dall'interazione 'clone x anno' (tab. 19). Nel complesso, le variabili allo studio hanno mostrato un coefficiente di variabilità compreso fra 4 (MW) e 15% (SW) (tab. 20). Il numero di giorni intercorsi fra l'impianto (o il risveglio) e la prima raccolta (DFH) è risultato, nella media dei due anni, pari a 153. Il clone Ce.3 ha mostrato i valori più elevati (163 giorni), mentre i cloni Ca.4 e Ce.7 sono risultati i più precoci (144 giorni in media) (tab. 20).

Il numero di capolini presenti sulla pianta alla raccolta del capolino principale (CRP) è risultato poco diversificato in rapporto al genotipo, avendo solo il clone Ce.3 fatto registrare un più basso CRP (3,7 capolini pianta⁻¹) (tab. 20).

Più ampia variabilità è stata riscontrata in rapporto al numero di capolini pianta⁻¹ raccolti al 31 gennaio (H31/1), carattere che ha evidenziato elevata precocità commerciale nel clone Ce.7 (2,8 capolini pianta⁻¹), intermedia nei cloni Ca.4 e Ce.3 (2,0 e 1,9 capolini pianta⁻¹,

rispettivamente), e bassa nei cloni Ca.6 e Ca.1 (1,5 e 1,2 capolini pianta⁻¹) (tab. 20).

In rapporto alla resa, il valore medio, nella media dei due anni, è risultato pari a 2,13 kg pianta⁻¹, ed ha oscillato entro valori di 1,95 (media dei cloni Ca.4, Ce.3 e Ce.7) e 2,44 kg pianta⁻¹ (cloni Ca.1 e Ca.6) (tab. 20).

Il numero di capolini per pianta è risultato in media pari a 13,8 (tab. 20). Detto carattere ha mostrato valori significativamente più elevati nei cloni Ca.1 e Ca.6 (rispettivamente 16,3 e 14,9 capolini pianta⁻¹), e significativamente più basso nei cloni Ce.7 (13,1), Ca.4 (12,6) e Ce.3 (12,0 capolini pianta⁻¹), con una differenza, fra i valori estremi, pari a 4,3 capolini pianta⁻¹ (tab. 20).

In rapporto al peso del capolino principale, risultato in media pari a 209 g, i valori più elevati sono stati riscontrati nei cloni Ca.6 (220 g), Ca.1 (215 g) e Ca.4 (209 g), mentre valori significativamente più bassi sono stati registrati in rapporto ai cloni Ce.7 (204 g) e Ce.3 (200 g) (tab. 20).

Il peso del capolino di 1° ordine (FW) ha oscillato entro valori di 192 g (media dei cloni Ce.7 e Ca.4) e 179 g (Ca.1), con valori intermedi nei cloni Ca.6 e Ce.3 (tab. 20).

Il peso dei capolini di secondo (SW) e terzo ordine (TW) è risultato più elevato nei cloni Ca.6 (170 e 94 g, rispettivamente), Ca.1 (170 e 85 g, rispettivamente), e significativamente più contenuto nei restanti 3 cloni (tab. 20).

Il peso dei capolini secondari, pari a 151 g nella media dei fattori allo studio, è risultato significativamente più elevato nei cloni Ca.6 e Ce.3 (rispettivamente 159 e 156 g), intermedio nel clone Ca.4 (152 g) e più basso nei cloni Ce.7 (145 g) e Ca.1 (143 g) (tab. 20).

17.5.3b Componenti della varianza ed ereditabilità dei caratteri

La tabella 21 riporta la stima delle componenti della varianza, i coefficienti di variabilità genotipica e fenotipica, e l'ereditabilità in senso ampio dei caratteri allo studio. I coefficienti di variabilità genotipica e fenotipica sono risultati elevati per i caratteri Y (rispettivamente 23,8 e 35,6%) e NH (26,5 e 38,9%), più contenuti per i restanti caratteri (tab. 21). In accordo con la natura poligenica dei caratteri allo studio, l'ereditabilità in senso ampio (h^2_B) ha mostrato sempre valori inferiori a 0,50. La maggiore ereditabilità è stata riscontrata per i caratteri Y (0,44), NH (0,46). I caratteri MW ed LW hanno mostrato valori di ereditabilità intermedia (0,31 e 0,29, rispettivamente), mentre il carattere DFH ha mostrato il valore più basso (0,10) (tab. 21).

DISCUSSIONE

18.1 PROVA B) Costituzione e caratterizzazione bioagronomica e molecolare di tre nuove linee di carciofo a propagazione gamica

I risultati acquisiti in questa prova hanno messo in evidenza come nel carciofo le tecniche molecolari (marcatori AFLP) applicate ai metodi di miglioramento genetico convenzionali quali selezione, clonazione ed autofecondazione abbiano consentito di ottenere 3 genotipi dall'apprezzabile valore agronomico, dalla buona uniformità e distinguibilità fenotipica. La nuova procedura di lavoro messa a punto dimostra altresì, che partendo da una varietà eterogenea quale Nobre UPF dopo solo due anni è stato possibile ottenere genotipi di carciofo a propagazione per seme presentatinti una omozigosi di circa il 20% idonee a essere iscritte al Catalogo Nazionale delle Varietà. I risultati acquistano, ancor più rilevanza se si pensa che la prima cultivar americana propagata per seme, "Green Globe" è stata ottenuta dopo 20 anni di selezione massale (Pecaut, 1993; Bagget et al., 1982) e che la cultivar israeliana "Talpiot", la prima coltivata in Europa, è stata costituita a partire dalla linea "JaJa" (ottenuta in Francia dopo 4-5 autofecondazioni del "Precoce di Jesi") dopo alcuni anni di lavoro di breeding svolto in Israele (Basinzki e Zohary, 1987; Pecaut, 1993).

Un altro aspetto emerso dalla prova e che merita attenzione è legato alla capacità produttiva dei genotipi selezionati, atteso che la loro produzione per pianta è risultata compresa tra 2.0 e 2,3 kg pari a una resa di 20-23 t ha⁻¹. Queste rese, sono pressochè doppie di quelle medie nazionali e pari o superiori a quelle degli ibridi F₁ attualmente in coltura (Mauro et al., 2011; Calabrese 2004), il cui costo del seme è ritenuto attualmente eccessivo.

Il risultato sulla capacità produttiva delle linee NP assume ancora una maggiore rilevanza se si pensa che generalmente le epoche tardive di semina (settembre) e di trapianto (ottobre), quali quelle utilizzate nell'esperimento, deprimono significativamente le rese del carciofo da seme (Mauromicale et al., 1997 a; Mauromicale e Ierna, 2000). Le semine tardive, d'altro canto, possono consentire di risparmiare significativi quantità di acqua di irrigazione.

La buona contemporaneità di maturazione dei capolini, che permette di concentrare in circa un mese e mezzo il periodo della raccolta, la buona resa industriale del prodotto (37-38%) pari a quella degli ibridi F₁ attualmente diffuse in coltura (Calabrese, 2004) e le ottime caratteristiche di qualità dei capolini (buona compattezza, assenza di pigmenti antocianici nelle brattee, soprattutto interne, e limitato sviluppo del pappo florale) fanno ritenere che le linee selezionate possono avere una idonea e proficua destinazione industriale, al pari degli ibridi F₁ attualmente in coltura. In questo caso il probabile contenimento del costo di produzione del seme in considerazione dei metodi di miglioramento genetico e delle tecniche di produzione sementiera messe a punto con il lavoro di questa tesi potrebbe consentire l'auspicata semina diretta della coltura, utilizzando le seminatrici del frumento con ovvi vantaggi sui costi di produzione.

18.2 Prova C) Variazione della produzione di acheni e dell'accresciuto della pianta in rapporto ai cicli di autofecondazione ed impollinazione incrociata

I risultati di questa prova hanno dimostrato come l'aumento della omozigosi, determinata da successivi cicli autofecondazione e impollinazione controllata, abbia determinato nelle progenie una marcata e significativa depressione da inbreeding sulla fase riproduttiva senza interferire in misura altrettanto apprezzabile e univoca sull'accrescimento della pianta. Il fenomeno, nel suo complesso, viene per la prima volta segnalato nella letteratura specifica, atteso che gli effetti depressivi dell'aumento della omozigosi sulla riproduzione del carciofo erano stati già segnalati da Foury (1967, 1969), Pecaute e Foury (1992) e Pecaute (1993), ma non erano mai state documentate evidenze di questo tenore sulla fase vegetativa. In buona sostanza il limite più grande imposto dall'aumento della omozigosi oltre certi livelli (circa l'80%) è rappresentato praticamente dalla impossibilità di produrre seme in quantità sufficienti per permettere la diffusione in coltura delle varietà costituite. Valori di omozigosi pari o superiori all'85%, di fatto, impediscono la formazione di seme per effetto dei fenomeni depressivi sull'allegagione dei frutti in virtù di una più ridotta vitalità del polline e di una probabile diminuzione della quantità del polline medesimo (dato non riportato, perché acquisita solo in alcuni trattamenti di queste prove). Il fenomeno merita ovviamente di essere attentamente valutato in più approfonditi e mirati studi. In ogni caso il risultato più significativo dal punto di vista applicativo di queste prove è che sembra possa essere accettabile un compromesso tra una buona ma non eccezionale uniformità bio-agronomica della progenie ottenibile fino ad una omozigosi dell'80% circa e una buona capacità di produzione di seme. Questo compromesso potrebbe abbassare notevolmente il costo del "seme",

attualmente proibitivo per gli ibridi F_1 e agevolare sicuramente la diffusione in coltura di questi genotipi.

18.3 Prova D) Tecniche per la produzione di acheni in nuove linee di carciofo a propagazione gamica

Uno dei punti critici della diffusione in coltura delle varietà a propagazione per seme è senza dubbio legato alla difficoltà di produrre “seme”, acheni sotto il profilo botanico in quantità sufficienti e con idonee caratteristiche germinative. Con questa ricerca, abbiamo messo a punto un itinerario tecnico basato sull’isolamento spaziale delle piante e sull’impiego, per la prima volta, del *Bombus terrestris*, comunemente utilizzato nelle serre siciliane per facilitare l’allegagione del pomodoro, quale vettore impollinatore dei fiori di carciofo. In precedenza, l’impollinazione dei fiori di carciofo era stata realizzata soltanto con *Apis mellifera* (Foury, 1967; Bazniski, 2007).

E’ interessante rilevare come la suddetta tecnica basata sull’isolamento spaziale e sull’utilizzo dei pronubi ha consentito di ottenere un numero medio di semi per pianta significativamente superiore a quello delle piante coltivate in pien’aria (1913 contro 1404) in virtù di una migliore allegagione.

In ogni caso, la produzione di “seme” ha sovente raggiunto o superato i 2000 semi pianta⁻¹, valore di gran lunga superiore a quella di qualche centinaio per pianta ottenuto in Francia da Pecaut e Foury (1992) e vicino a quello potenziale teorico fissato, sempre dagli stessi autori, pari a 2-3000 semi pianta⁻¹. In relazione ai fattori allo studio, interessante e significativo è risultato l’effetto del genotipo. La linea NP5, in entrambe le prove, ha prodotto 99 g e oltre 2100 semi per pianta, valori statisticamente

non differenti di quelli di NP2, ma notevolmente superiori a quelli di NP4 (circa 56 g e 1350 semi per pianta). Quest'ultimo risultato potrebbe essere messo in relazione al maggior livello di omozigosi riscontrato in NP4 (77,4%) e alla probabile conseguente maggiore depressione da inbreeding (Pecaut e Foury, 1992).

La parziale eliminazione dei capolini, pur non influenzando la produzione di acheni per pianta, ne ha significativamente incrementato il loro numero per capolino in virtù di una maggiore allegagione, a sua volta verosimilmente favorita dal più elevato numero di pronubi riscontrati nel capolino. Quest'ultimo risultato potrebbe essere attribuito alla maggiore capacità di attrazione dei pronubi, poiché il più basso numero di capolini nelle piante dove era prevista la loro parziale rimozione, rispetto alle piante dove sono stati lasciati tutti (4.7 contro 13.7), ha abbassato notevolmente il livello di competizione intercapolino.

Il risultato lascia ipotizzare come in condizioni ambientali caratterizzati da scarsa presenza di impollinatori potrebbe essere più efficace ai fini della produzione sementiera rimuovere i capolini di 2° e 3° ordine, per attenuare gli effetti della maggiore competizione tra capolini indotte dal loro elevato numero per pianta.

18.4 Prova E) Selezione clonale nella popolazione siciliana di 'Spinoso di Palermo'

Uno degli effetti della crescente diffusione della coltivazione del carciofo su scala globale, risiede nel reale pericolo di erosione genetica del germoplasma autoctono, dovute all'introduzione di cultivar esotiche, più produttive e rispondenti alle necessità di una agricoltura intensiva (Sonnante et al., 2007; Lanteri e Portis, 2008). La selezione clonale in seno

alle cultivar tradizionali propagate per via agamica, è stata proposta come una strategia-chiave in grado di migliorare detto germoplasma e promuoverne al contempo un processo su larga scala di conservazione *in situ* (Mauromicale e Ierna, 2000; Mauro et al., 2011). Nel presente elaborato, sono stati presentati i risultati di un lavoro di selezione clonale operato in situ in seno alla cultivar ‘Spinoso di Palermo’. I 5 cloni identificati, hanno mostrato ottime prestazioni agronomiche ed una buona variabilità in seno alle caratteristiche bio-agronomiche attenzionate, ciò che ne incoraggia una approfondita caratterizzazione con marcatori molecolari, al fine di mettere a punto test di tipo molecolare finalizzati all’identificazione univoca del genotipo.

In accordo con la natura multifattoriale dei caratteri oggetto di rilevamento, l’influenza ambientale sull’espressione del valore agronomico dei cloni è stata elevata. Ciò nonostante, la “performance” dei cloni hanno manifestato una discreta stabilità in rapporto a 4 caratteri, in particolare il numero di capolini per pianta, la resa in termini ponderali (Y), il peso del capolino principale (MW) ed il peso dei capolini secondari (LW). Tali caratteri sono risultati associati ad un elevato coefficiente di variabilità genetica ($8.1 \leq g_{cv} \leq 26.5$) e fenotipica ($14.6 \leq p_{cv} \leq 38.9$), la qual cosa ne indica una buona predisposizione al miglioramento attraverso la selezione clonale. Per contro, la precocità dei cloni (DFH) è risultata associata ad una forte interazione ‘clone x anno’, e ad una bassa h^2_B (0.10), il che ne suggerisce più limitate possibilità di miglioramento attraverso la selezione clonale. Il risultato appare ampiamente giustificato dalla bibliografia sull’argomento, la quale ha messo in evidenza il ruolo decisivo delle condizioni climatiche sulla precocità attese, soprattutto, le esigenze in “basse temperature” di tipi autunnali per l’induzione florigena (Basnizki, 1985; Mauromicale, 1986; Pecaut, 1993; Mauromicale, 1994). Tuttavia, l’aspetto più rilevante appare essere l’ampia diversificazione dei cloni sotto

il profilo produttivo (con differenze di quasi 0.54 kg pianta⁻¹), associata a livelli medio-elevati della ereditabilità ($h^2_B = 0.44$), il che suggerisce buone possibilità di miglioramento della capacità produttiva nei programmi di selezione. In accordo con quanto asserito, nel presente esperimento è stato possibile identificare due cloni (Ca.1 e Ca.6) con capacità produttiva quasi doppia rispetto a quella comunemente rilevabile nelle carciofaie di ‘Spinoso di Palermo’ (Mauromicale, 1987).

In uno studio riguardante un gruppo di genotipi di carciofo di diversa origine, Lòpez Anido et al. (1998) hanno evidenziato la possibilità di migliorare nel contempo il potenziale produttivo dei genotipi e le caratteristiche ponderali dei capolini. Similmente Mauro et al. (2009) in genotipi provenienti da orti familiari siciliani, hanno evidenziato la stretta associazione fra la capacità produttiva e le caratteristiche ponderali dei capolini. Nella presente ricerca, è emerso che la resa dei cloni è risultata correlata alla capacità degli stessi di produrre capolini da carducci laterali, piuttosto che alle caratteristiche ponderali dei capolini (dati non riportati). Il dato, di estrema importanza ai fini della implementazione della capacità produttiva, merita attenta valutazione in successivi lavori.

Per quanto concerne le caratteristiche dei capolini, alti valori di g_{cv} e p_{cv} sono emersi in rapporto al peso unitario medio del capolino principale e di quelli secondari, con valori di h^2_B di 0.31 e 0.29, rispettivamente. Ciò porta ragionevolmente a concludere che, attraverso un corretto programma di selezione clonale, è possibile migliorare le caratteristiche merceologiche dei capolini. In tal senso, i cloni Ca.6 e Ca.4 hanno mostrato elevati pesi medi dei capolini, caratteristica che potrebbe essere proficuamente sfruttata per migliorare la competitività commerciale dello ‘Spinoso di Palermo’.

19. Conclusioni generali

La complessa articolazione delle ricerche di questa tesi di dottorato, pur nella specificità delle conoscenze acquisite con le singole prove, consente, anche, di poter formulare in modo sintetico alcune considerazioni conclusive. Più in generale, è stato messo a punto un itinerario di miglioramento genetico del carciofo in grado di trarre profitto sia dai metodi tradizionali che dalle tecniche molecolari. Esso, inoltre, si è rivelato in grado di realizzare risultati positivi sia per le cultivar a propagazione gamica che per quelle a propagazione agamica. In tal senso, si è cercato di corrispondere in modo concreto alle richieste di innovazioni biologiche in grado, anche, di ammodernare gli schemi colturali da parte dei cinaricoltori e degli altri attori del sistema “carciofo”.

Nello specifico, i risultati acquisiti hanno fundamentalmente permesso di:

- 1) delineare le sequenze fenologiche del carciofo propagato per seme e determinare, per la prima volta, le somme termiche necessarie per il raggiungimento di una determinata fenofase. Inoltre, sono stati individuati e descritti 15 stadi di sviluppo del capolino con particolare riguardo alle fasi di fioritura e di maturazione dell’achenio. Le conoscenze acquisite potranno essere di forte supporto sia all’attività di miglioramento genetico che a quella di produzione sementiera;

- 2) validare la bontà del lavoro di messa a punto delle tecniche di miglioramento genetico tradizionali, combinate e coordinate in modo sinergico con quelle molecolari. Le procedure hanno consentito di ottimizzare i tempi e migliorare in misura significativa l’efficienza del lavoro di costituzione di nuovi genotipi a propagazione gamica;

3) accertare la validità agronomica ed applicativa dei genotipi ottenuti con le tecniche di cui al punto 2, i quali ben caratterizzati sotto il profilo biologico, morfologico, produttivo e molecolare possono ambire, in considerazione della loro uniformità, omogeneità, distinguibilità e capacità produttiva, ad essere proposti per l'iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà;

4) quantificare gli effetti della depressione da *inbreeding*, indotta da cicli di autofecondazione e impollinazione controllata per ridurre l'eterozigosi, sia sulla fase riproduttiva che sull'accrescimento e sullo sviluppo della pianta. In tal senso, sembra che una omozigosi del 20% possa rappresentare un giusto compromesso tra la necessità di avere progenie uniformi e l'esigenza di produrre seme in quantità e di qualità idonee alla diffusione delle varietà ottenute;

5) esprimere un giudizio positivo sulle tecniche di produzione sementiera studiate e la piena rispondenza di *Bombus terrestris* anche per l'impollinazione dei fiori di carciofo. In tal senso, è stato accertato che il numero di "semi" per capolino è la componente della resa più importante e che esso è fortemente influenzato dal livello di allegagione. Il "seme" prodotto ha presentato una germinabilità accettabile se confrontata con quella riportata nella letteratura specifica;

6) mettere in evidenza la validità della selezione clonale della popolazione autoctona 'Spinoso di Palermo', atteso che i cloni selezionati e caratterizzati hanno presentato un ottimo valore agronomico, in termini di precocità, resa e qualità del prodotto. I cloni selezionati, se velocemente moltiplicati - attraverso la micropropagazione e le tecniche vivaistiche recentemente messe a punto - e introdotti in coltura possono contribuire a rallentare o

anche arrestare l'erosione genetica in atto nelle due popolazioni autoctone siciliane.