

Salvaguardia e conservazione di risorse genetiche di carciofo primaverile

Raffaella Tavazza^{1*}, Paola Crinò¹, Anna Ciancolini¹, Velia Papacchioli¹, Mario Augusto Pagnotta², Nestor Alonso Rey², Roberto Mariotti³ e Francesco Saccardo²

¹ ENEA C.R. Casaccia, Unità Sviluppo sostenibile ed innovazione del sistema agro-industriale, Roma

² Dipartimento DAFNE, Università della Tuscia Viterbo

³ Azienda Dimostrativa Arsial di Tarquinia, Località Portaccia, Tarquinia (VT)

Safeguard and conservation of spring globe artichoke genetic resources

Abstract. Genetic erosion taking place in Italian spring artichoke derives from introduction of the micropropagated clone C3 and the entry on the market of seed varieties that are more productive, these stalking local populations traditionally grown in Central and Southern Italy. The need to preserve these genetic resources at reasonable costs and under conditions ensuring genetic stability it is greatly felt in view of future plant breeding programs. Preserving existing genetic potential is therefore a very important goal to be achieved through collection, characterization and conservation of local heritage to be safeguarded. Possible strategies of safeguard action of the artichoke genetic variability according to the traditional approaches and/or using innovative methods of advanced biotechnologies are presented in this work. With the aim of recovering and characterizing landrace diversity for future breeding activities and/or germplasm conservation, 17 clones derived from plants cultivated in traditional areas of Latium region were collected, *in vitro* propagated and analysed using a combination of morphological descriptors and DNA markers (AFLP, SSR and ISSR). Three clones characterized by positive values for traits of agronomical interest have been selected within the traditional 'Romanesco' landraces such as Campagnano and Castellammare. Release of these clones is now in progress with the names Michelangelo, Donatello, and Raffaello. As in the last years alternative uses of artichoke could be related to biomass production, the potentiality of Italian spring artichoke genotypes has been analyzed for this trait. Biomass of artichoke genotypes, in particular Ascolano, was very high and potentially capable of producing high values of biocompound contents. Conserving *élite* genotypes as native populations for vegetatively propagated crops is difficult because seed storage is not an option. Since maintenance of

artichoke germplasm in seed form is restricted due to its heterozygosity, *in vitro* technologies provide a complementary approach to field gene banks, thus allowing *in vitro* preservation (slow growth storage) or in liquid nitrogen (cryoconservation) of plant material. In artichoke, the former led to reduce markedly the frequency of periodic sub-cultures through reduction of cellular metabolism without affecting viability and re-growth of shoot cultures.

Key words: germplasm, morphological descriptors, molecular markers, *in vitro* culture, *ex situ* conservation.

Introduzione

Il territorio italiano, in particolare le aree del Sud Italia, dove prevalgono piccole aziende a conduzione familiare, è particolarmente ricco di germoplasma orticolo rappresentato da ecotipi diversi strettamente legati alla memoria storica dei rispettivi luoghi di origine e diffusione. Conservare il potenziale genetico esistente è quindi un obiettivo estremamente importante da perseguire per tutte le specie vegetali attraverso la raccolta, caratterizzazione e conservazione del patrimonio locale da salvaguardare.

In base alla Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD), ratificata dallo Stato italiano nel 1994, la conservazione della biodiversità può essere attuata mediante due approcci indipendenti e complementari: *in situ* (art. 8) ed *ex situ* (art. 9). In generale, nell'individuare il tipo di approccio da utilizzare si fa riferimento a due classi di risorse genetiche: le specie selvatiche e quelle coltivate. Per queste ultime, le tecniche *ex situ* svolgono un ruolo di rilievo per la sopravvivenza dei genotipi a rischio di estinzione, favorendo gli studi scientifici e assicurando materiale per la loro reintroduzione e il loro impiego nei programmi di ibridazione.

Tra le piante ortive, il carciofo [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Hayek], originario del bacino del Mediterraneo e in espansione soprattutto nei com-

* raffaella.tavazza@enea.it

preursori orticoli italiani centro-meridionali, è rappresentato in Italia dal più ricco *pool* genico coltivato con gruppi varietali (Porceddu *et al.*, 1976; Mauromicale e Ierna, 2000) che si diversificano sulla base della morfologia del capolino ('Spinoso', 'Violetto', 'Romanesco', 'Catanese') e dell'epoca di produzione (autunno-vernina e primaverile). Di contro, la scarsa conoscenza della biodiversità esistente all'interno del patrimonio locale ha determinato una certa confusione sia nella terminologia che nella classificazione del germoplasma che spesso viene identificato con il nome della località di coltivazione (Bianco, 1990). La preferenza dell'agricoltore verso tipi commerciali più remunerativi, ha inoltre determinato una riduzione dei campi coltivati con ecotipi locali, innescando un fenomeno di erosione genetica che potrebbe portare in breve alla perdita della biodiversità esistente.

Numerose sono le iniziative volte alla salvaguardia della variabilità genetica del carciofo (Lanteri *et al.*, 2001; 2004b; Pagnotta *et al.*, 2004; Portis *et al.*, 2005; Romani *et al.*, 2006; Ilbi *et al.*, 2007; Trionfetti Nisini *et al.*, 2007; Crinò *et al.*, 2008; Mauro *et al.*, 2009; 2012; Pagnotta, 2010; Ciancolini *et al.*, 2012) e sempre maggiore è l'esigenza di individuare tecniche efficienti ed innovative volte a tutelare il germoplasma in via d'estinzione. La caratterizzazione morfologica basata sull'impiego di descrittori ad alta ereditabilità rappresenta il primo stadio che permette di differenziare le accessioni. Di contro, la caratterizzazione molecolare fornisce uno strumento valido e complementare a quella morfologica per stimare la diversità genetica delle collezioni e per classificare il germoplasma in funzione dei *pool* genici esistenti. Inoltre, le tecnologie molecolari permettono di identificare precocemente i genotipi di interesse (Lanteri *et al.*, 2004a e b; Sonnante *et al.*, 2004; 2006; Boury *et al.*, 2012), in maniera indipendente dalle condizioni pedoclimatiche, contribuendo a ridurre omonimie e sinonimie che generano una certa confusione nel riconoscimento del germoplasma.

A fronte della caratterizzazione del germoplasma, la propagazione vegetativa delle tipologie primaverili di carciofo si avvale oggi di sistemi di coltura *in vitro* che trovano applicazione nella rapida propagazione dei genotipi selezionati, nella diffusione e nel trasferimento di materiale di propagazione (Ancora *et al.*, 1981; Pecaute *et al.*, 1992; 1993), consentendo di modificare le tecniche agronomiche tradizionalmente usate (Ancora e Saccardo, 1987). Inoltre, le tecnologie *in vitro* contribuiscono, con metodi complementari o alternativi, alla conservazione *ex situ* del germoplasma tanto da rappresentare una potenziale soluzione

ne ai problemi di conservazione delle specie a propagazione agamica.

Per preservare il germoplasma di carciofo primaverile e il valore ad esso associato, nell'ambito del progetto MiPAAF "CAR-VARVI", è stato svolto un programma mirato alla caratterizzazione, moltiplicazione e conservazione *ex situ* di carciofo primaverile di cui è stata studiata l'identità genetica e la stabilità.

Materiali e metodi

Caratterizzazione e selezione di cloni/accessioni ottenute da popolazioni autoctone

Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione è stata effettuata su 17 genotipi di carciofo primaverile provenienti da coltivazioni tradizionali locali del Centro-Sud Italia e moltiplicati mediante propagazione *in vitro* (Ancora *et al.*, 2011). I genotipi (60 piante/genotipo) sono stati allevati presso i campi dell'Azienda Dimostrativa ARSIAL di Cerveteri (Roma), applicando le tecniche colturali a basso input chimico di solito utilizzate nella zona. Il trapianto in campo è stato effettuato il 17 agosto 2007, secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con quattro repliche di 20 piante ciascuna (distanza sulla fila: 1,3 m; distanza tra le file: 1,0 m; densità di trapianto: 0,76 piante·m²). Le caratterizzazioni morfologiche dei genotipi, relative a tre anni (2008, 2009 e 2010) e condotte su 12 piante per genotipo (3 piante per replica), sono state finalizzate alla selezione del germoplasma per (a) produzione edule (2008 e 2009) e (b) produzione di biomassa (2009 e 2010). Nel primo caso, sono stati utilizzati 47 descrittori UPOV (*International Union for the Protection of New Varieties of Plants*) (Crinò *et al.*, 2008; Ciancolini *et al.*, 2012; Noorani *et al.*, 2012), applicati su 3 piante centrali per replica dal tempo di comparsa del capolino principale fino alla maturità commerciale della pianta. Gli stessi genotipi sono stati anche caratterizzati e selezionati per la produzione di biomassa finalizzata all'estrazione di biocomposti di interesse per l'industria farmaceutica. A tal scopo è stato utilizzato, su tre piante per replica, un set di 11 descrittori, tra cui altezza e diametro della pianta, lunghezza e numero delle foglie, indice visivo di biomassa, peso fresco e secco della pianta, volto a quantizzare la biomassa prodotta da ciascun genotipo.

Al fine di studiare eventuali interazioni genotipo x ambiente finalizzate alla produzione edule, 20 piante/genotipo, limitatamente a 4 ecotipi marchigiani denominati Montelupone A, Montelupone B, Jesino e Ascolano, sono state allevate nei due areali di coltivazione, Cerveteri (Roma) e Monsampolo del Tronto

(AP) in collaborazione con il CRA-ORA (Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Unità di ricerca per l'orticoltura).

Caratterizzazione molecolare

Campioni dei germogli fogliari di ciascun clone di carciofo sono stati prelevati, conservati a -80 °C, triturati in azoto liquido e utilizzati per l'estrazione del DNA mediante colonnine dei kit d'estrazione Invitrogen e/o EURx (Pagnotta *et al.*, 2012). Il DNA così ottenuto è stato quantificato tramite elettroforesi su gel di agarosio 1% in presenza di bromuro di etidio e misurazione spettrofotometrica. Una parte del DNA è stato conservato e la restante parte è stata utilizzata per la caratterizzazione molecolare.

Il DNA è stato amplificato mediante PCR seguendo le procedure descritte da Boury *et al.* (2012) e Ciancolini *et al.* (2012), utilizzando *primer* di marcatori molecolari di tipo AFLP, ISSR e SSR (Ciancolini *et al.*, 2012). Gli ampliconi sono stati discriminati mediante sequenziatore ABI 3130 xl e successiva analisi con software Gene Map.

Caratterizzazione per tolleranza a V. dahliae

Non essendo disponibili ad oggi genotipi di carciofo resistenti a *V. dahliae*, nel presente lavoro sono state investigate possibili fonti efficaci di resistenza in genotipi di cardo coltivato (*C. cardunculus* var. *altilis* DC) e selvatico (*C. cardunculus* var. *sylvestris* Lam.). A tal fine, sono state effettuate inoculazioni artificiali in ambiente controllato (T 24 ± 2 °C; fotoperiodo: 16 h luce e 8 h buio) con un isolato italiano di *V. dahliae* fornito dal Prof. F. Ciccarese dell'Università di Bari, su 29 accessioni di cardo coltivato, 15 di cardo selvatico ed un controllo suscettibile di carciofo. Il saggio è consistito nel taglio delle radici e nella successiva immersione delle stesse, per circa 15 min., in una sospensione conidica (1x10⁶ CFU/ml⁻¹). Sono state inoculate 64 piantine/accessione allo stadio di 2-3 foglie vere per un totale di 44 accessioni. Dopo circa 1 mese, per ogni accessione, è stata rilevata:

- la percentuale di piantine infette,
- l'indice di severità di malattia valutato sulla base dell'ingiallimento e disseccamento fogliare secondo una scala 0-4 (0= nessuna foglia infetta; 4= piantina morta),
- l'imbrunimento vascolare nello stelo principale al livello del colletto di ogni piantina secondo una scala 0-4 scala (0= nessuna colorazione evidente; 4= colorazione evidente e piantina morta).

Conservazione in campo catalogo

Novantanove cloni appartenenti a diverse tipologie

di carciofo e provenienti da areali delle Regioni Lazio, Toscana, Campania, Marche, Sardegna e Sicilia, assieme a due accessioni spagnole, sono stati allevati in singola fila e a piante spaziate (1 m sulla fila e 1,3 m fra le file) con trapianto estivo effettuato presso il Centro Dimostrativo ARSIAL di Cerveteri (Roma).

Conservazione in vitro a breve termine

Per la messa in coltura *in vitro* di carciofo, sono stati utilizzati apici vegetativi prelevati da carducci di piante allevate nel campo catalogo e precedentemente selezionate per caratteristiche morfo-produttive. La sterilizzazione degli apici è stata effettuata con una soluzione di cloruro di mercurio (5 g l⁻¹) e ipoclorito di sodio 0,5% (v/v) addizionata con 3-4 gocce di Tween 80; sono seguiti tre lavaggi con acqua sterile. Gli apici sono stati quindi posti in coltura su terreno di moltiplicazione Gik [mezzo di coltura di base descritto da Tavazza *et al.* (2004), a cui sono stati aggiunti kinetina (Kin) 2 mg l⁻¹, acido indol-3-butirrico (IBA) 0,1 mg l⁻¹, saccarosio 3% e Plant agar 7 g l⁻¹; pH 5.8], e mantenuti in camera di crescita a condizioni standard di temperatura (19 ± 1 °C) e di fotoperiodo (16 h di luce ad intensità di 37,5 µE m⁻² s⁻¹).

Conservazione in vitro a medio termine

Al fine di sviluppare un protocollo di conservazione a medio termine, volto ad individuare un mezzo di coltura ottimale per ridurre la frequenza delle sub-colture, gli esperimenti sono stati condotti con 7 cloni rappresentativi di tre tipologie (precoce, tardiva, intermedia) di carciofo 'Romanesco'.

Per le prove di conservazione, sono stati utilizzati espunti provenienti dalla collezione *in vitro* a breve termine mantenuta nelle condizioni standard precedentemente riportate. Dopo quattro cicli di moltiplicazione (20 giorni/ciclo), sono state ottenute 168 piante per clone. Per la prova di conservazione in crescita rallentata, sono stati saggiati 7 terreni di coltura che differivano dal substrato di moltiplicazione Gik per la diversa componente glucidica (combinazioni di saccarosio/mannitolo o saccarosio/glucosio a diverse concentrazioni). Per ciascun terreno, sono stati utilizzati 25 espunti/clone suddivisi in 5 contenitori di vetro da 500 ml; gli espunti sono stati conservati per 6 o 12 mesi, in assenza di sub-culture, nelle condizioni standard di crescita. Alla fine del periodo di conservazione (6 e 12 mesi), gli espunti sono stati ripuliti dalle parti morte e trasferiti sul terreno fresco di moltiplicazione per consentirne la ripresa.

La valutazione, effettuata a 6 e 12 mesi dalla messa in coltura su 12 espunti per clone/terreno, ha tenuto conto, non solo dell'effettiva riduzione della

crescita e qualità degli espianti, ma anche della loro capacità di recuperare l'originale attività proliferativa al momento del ritorno nelle condizioni standard di coltura. Il tasso di moltiplicazione è stato calcolato come numero di germogli ottenuti mediamente da ogni espianto. L'attitudine alla radicazione delle piantine rigenerate dopo conservazione è stata saggiata trasferendo 10 piante per clone/terreno, per 30 giorni in un terreno di allungamento e successivamente su un terreno di radicazione (Tavazza *et al.*, 2004). Sia nella fase di moltiplicazione che di radicazione, le colture sono state mantenute alle stesse condizioni di crescita precedentemente descritte. Gli espianti radicati sono stati ambientati dopo trasferimento su un miscuglio di torba (50%), perlite (30%) e terriccio (20%).

Identità genetica

Una parte del materiale rigenerato *in vitro* di carciofo è stata sottoposta ad analisi di *genetic fidelity* per identificare eventuali diversità genetiche tra l'espianto di partenza e le piante rigenerate dopo conservazione. Sono stati messi a confronto i profili molecolari ottenuti dalle piante madri con quelli ottenuti dagli espianti conservati a 6 e a 12 mesi. I profili molecolari sono stati generati su DNA estratto dai relativi stadi di coltura (piante madri, conservazione dopo 6 mesi e dopo 12 mesi) per ciascun terreno di coltura utilizzato. Il totale delle analisi effettuate è stato pari a 147 campioni (7 cloni x 7 piante x 3 stadi di coltura). Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando 4 marcatori ISSR e 4 SSR, in un volume finale di 10 µl contenente 10 ng di DNA, 0.3 µM di *primer*, 100 µM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) e una unità di Taq polimerasi con un ciclo di amplificazione che comprendeva un *hot start* di 5 minuti a 94 °C, seguito da 39 cicli di 1 minuto a 96 °C, 1 minuto a 60 °C e 2 minuti a 72 °C. Alla fine dei 39 cicli si è inserita una fase di *extension* di 10 minuti a 72 °C. Le amplificazioni sono state poi separate mediante sequenziatore ABI 3130 xl e l'analisi degli ampliconi è stata fatta con software Gene Map. Ciascuna possibile banda per ciascun marcatore è stata considerata come un singolo *locus* con due possibili alleli (presenza e assenza). I profili sono stati quindi convertiti in una matrice 1/0 utilizzata per la successiva analisi statistica.

Risultati

Caratterizzazione e selezione di cloni/accessioni ottenuti da popolazioni autoctone

Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica ha interessato 10 cloni della tipologia Romanesco e 7 genotipi autoctoni

delle Regioni Marche, Toscana e Campania. I dati rilevati (fig. 1) annualmente nel periodo febbraio-maggio hanno consentito di individuare e selezionare otto cloni interessanti da un punto di vista produttivo, in termini di epoca di produzione, quantità e qualità dei capolini. Per 3 di questi (S17, S20, S22), è stata richiesta l'iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà con i nomi di Michelangelo, Raffaello e Donatello (fig. 2). Questi cloni si sono differenziati per precocità, dimensione e peso del capolino, produzione, spessore del ricettacolo e *patterns* molecolari. In particolare, Michelangelo e Raffaello sono stati caratterizzati da piante compatte, produttive e omogenee per forma del capolino e presenza del mucrone. Donatello ha presentato invece piante alte con capolini inermi e di media dimensione, produzione tardiva (fine marzo) e limitata ad un breve periodo di circa 23 giorni. Nella riunione dell'1 dicembre 2012, la Commissione Sementi MiPAAF ha espresso parere favorevole per l'iscrizione delle suddette varietà nel registro Varietale di Specie Ortive a nome dell'Università della Tuscia e ARSIAL.

L'analisi morfologica condotta nei due ambienti di coltivazione (Lazio e Marche) sui 4 ecotipi marchigiani ha evidenziato un maggiore vigore, in termini di dimensione della pianta e del capolino, delle piante allevate sul versante tirrenico rispetto a quelle allevate sul versante adriatico.

Le caratteristiche relative alla produzione della biomassa nei genotipi è risultata essere ben rappresentata utilizzando solo 6 descrittori quali altezza e diametro della pianta, lunghezza e numero delle foglie, indice visivo di biomassa e peso secco della pianta. I risultati dell'analisi morfologica hanno evidenziato differenze significative tra i genotipi consentendo di identificare l'ecotipo Ascolano come quello in grado di produrre la maggiore quantità di biomassa.

Caratterizzazione molecolare

I dati molecolari sulle accessioni 'Romanesco' analizzate hanno evidenziato la presenza di una variabilità genetica non particolarmente ampia nel materiale collezionato; la distanza genetica di Nei fra le accessioni varia da 0,03 a 0,17. In particolare, alcune accessioni sono risultate particolarmente simili e vicine dal punto di vista genetico (fig. 3), mentre altre, quali l'accessione S20, sono più distanti da tutte le altre. Le accessioni provenienti da regioni differenti del Lazio hanno mostrato una tendenza a raggrupparsi assieme, talvolta includendo qualche accessione laziale (fig. 3).

Questi dati hanno fornito importanti indicazioni sulle accessioni da conservare in una *core collection* che mantenga la stessa variabilità della collezione

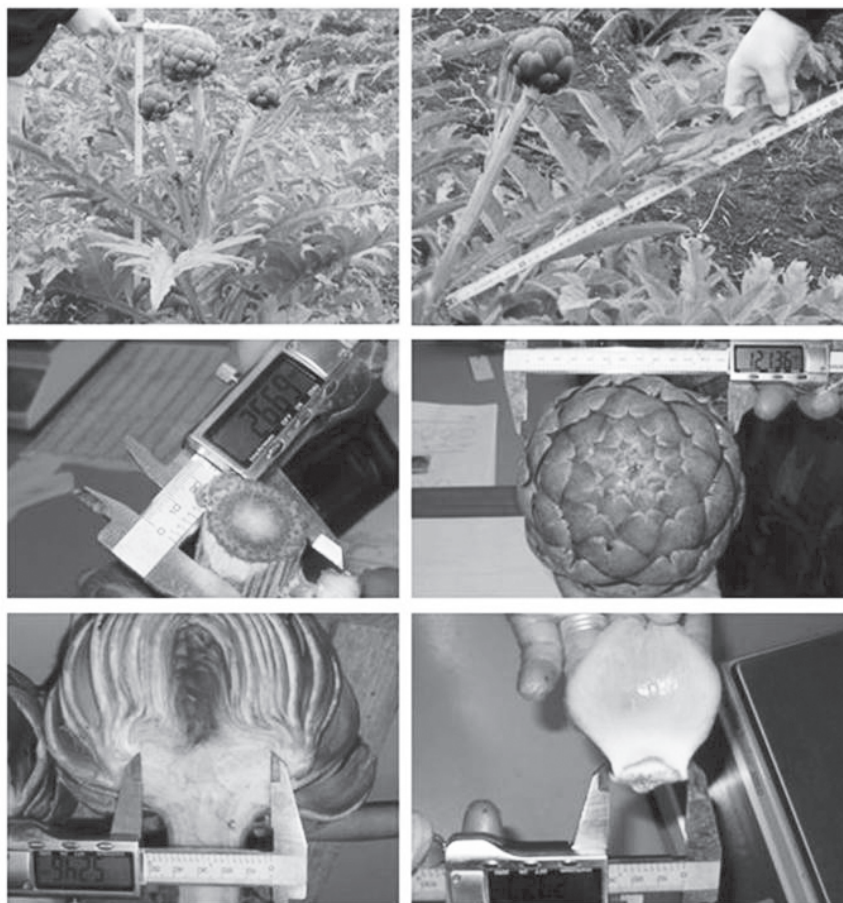


Fig. 1 - Esempi di descrittori utilizzati nella caratterizzazione morfologica del germoplasma.
Fig. 1 - Examples of the descriptors utilized for the morphological characterization of the germplasm.

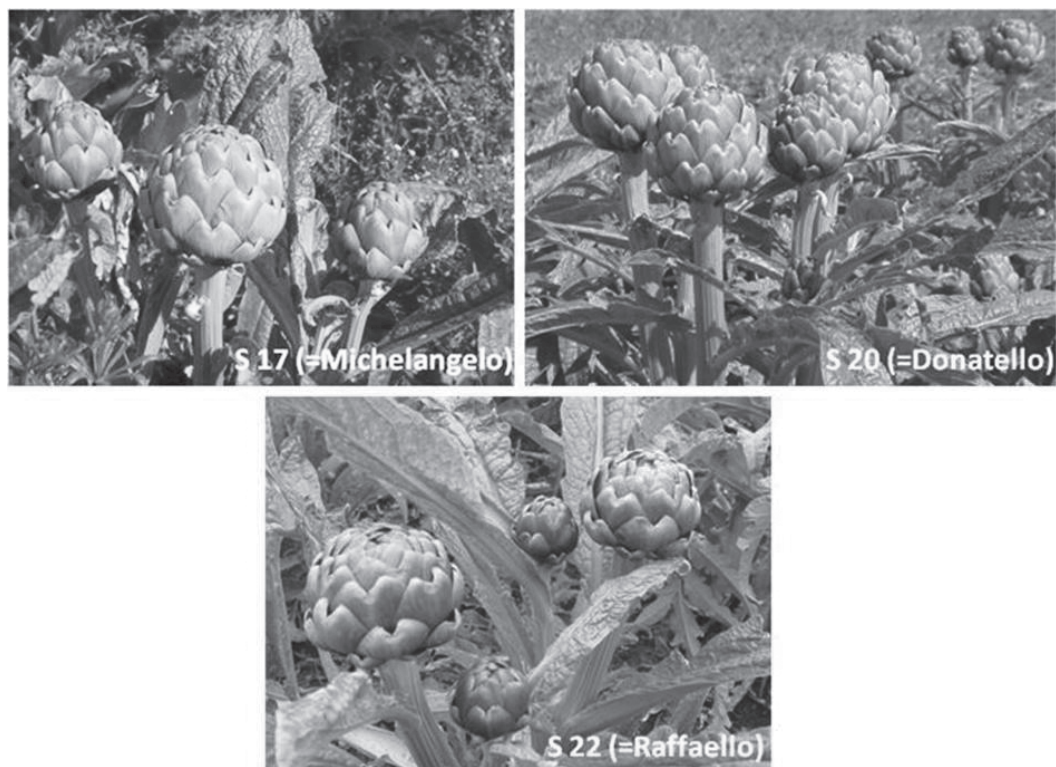


Fig. 2 - Cloni di carciofo in corso di iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà.
Fig. 2 - Clones of globe artichoke under release by the National Variety Register.

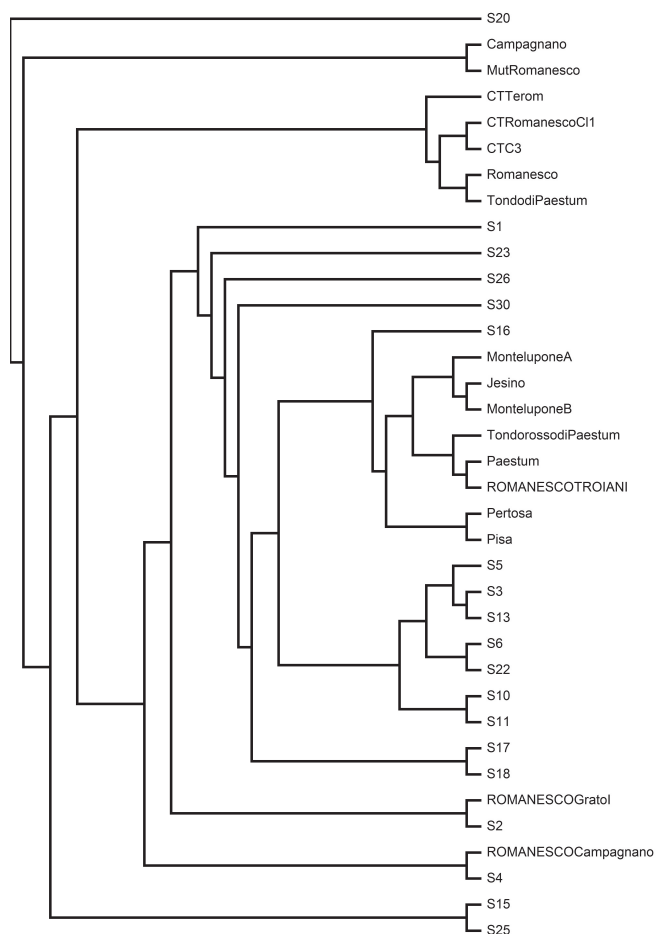


Fig. 3 - Dendrogramma delle distanze genetiche fra accessioni di carciofo.

Fig. 3 - Dendrogram of the genetic distances among the accessions of spring artichoke.

globale, riducendo il numero di accessioni da conservare. È da notare che è stato rilevato un altissimo numero di “alleli privati” (450) cioè di bande presenti in singole accessioni; le accessioni con il più alto numero di alleli privati sono state Campagnano (59) e Terom (45). La presenza di alleli privati dà una buona indicazione sulla possibilità di avere *fingerprinting* molecolari (cioè profili di amplificazione univoca) per caratterizzare e proteggere da eventuali usi fraudolenti il germoplasma a disposizione. Il marcatore che ha identificato più alleli privati è stato l’ISSR 841, marcatore che sarà senz’altro da inserire nella registrazione e nell’eventuale brevetto del materiale.

Caratterizzazione per tolleranza a *V. dahliae*

Dei genotipi analizzati, provenienti da piante selezionate e autofecondante, due accessioni di cardo selvatico assieme ad una di cardo coltivato sono risultate mediamente resistenti al patogeno mentre le altre hanno mostrato gravi sintomi a livello fogliare e vascolare della pianta. I genotipi resistenti al fungo sono stati utilizzati come portinnesti in un programma

di innesto carciofo/cardo finalizzato all’utilizzazione e valorizzazione di genotipi di carciofo di pregio ma suscettibili a *V. dahliae*. E’ inoltre in corso un programma di ibridazioni per trasferire in carciofo resistenze presenti in cardo.

Conservazione in campo catalogo

A fronte dei reperimenti effettuati negli anni per le tipologie primaverili, è stato allestito un campo catalogo presso l’azienda dimostrativa ARSIAL di Cerveteri. Questo comprende anche germoplasma rappresentativo delle maggiori tipologie italiane e straniere (tab. 1).

Conservazione in vitro breve termine

Al fine di preservare i genotipi presenti all’interno del campo catalogo, oggetto di possibili contaminazioni e/o calamità naturali, è stata parallelamente allestita una collezione *in vitro* dei cloni. A riguardo, si è partiti da apici vegetativi prelevati direttamente dalle piante madri sottoposte precedentemente a selezione genetica e agronomica. Il materiale di propagazione è stato saggiato per l’attitudine alla propagazione vegetativa. La sperimentazione ha riguardato la sterilizzazione e la crescita degli espianti assieme alle fasi successive della coltura *in vitro*.

La fase di allestimento delle colture ha comportato molti problemi per l’elevata contaminazione batterica riscontrata soprattutto in alcuni espianti provenienti dalle tipologie marchigiane ed è apparsa fortemente influenzata dal periodo di prelievo degli espianti in campo.

A seconda della cultivar analizzata, sono state ottenute percentuali di apici vitali e sterili mediamente comprese tra il 70 e il 90%. La fase successiva di mantenimento ha mostrato un migliore adattamento,

Tab. 1 - Germoplasma presente nella collezione *in vivo* e *in vitro*.
Tab.1 - Germplasm collection *in vivo* and *in vitro*.

Provenienza	Campo catalogo	Collezione <i>in vitro</i>
	(n. cloni)	
Regione Lazio	35	25
Regione Marche	10	4
Regione Campania	2	2
Regione Toscana	4	1
Regione Sardegna	46	
Regione Sicilia	2	
Spagna	2	
Genotipo maschio sterile (MS 6)		1
Linee americane		2
Totale	101	35

da parte delle cultivar ‘Romanesco’ e affini rispetto alle altre, alle condizioni *in vitro* ottimizzate in precedenti esperimenti. Dopo un periodo di stabilizzazione in coltura (2-4 mesi), variabile a seconda del genotipo, mediante sub-colture effettuate a intervalli di 4 settimane, è stata allestita una collezione *in vitro* per la conservazione a breve-termine di carciofo (fig. 4). Nella collezione sono attualmente presenti 35 cloni giudicati particolarmente interessanti per la cinaricoltura primaverile e rappresentati ciascuno da 10 copie/clone (tab. 1). Sono inclusi un clone maschio sterile e due linee americane, importanti per i programmi di ibridazione del carciofo.

Conservazione in vitro a medio termine

La conservazione *in vitro* in crescita rallentata, adottata nel lavoro, ha avuto come finalità il prolungamento dei tempi di sub-coltura per la messa a punto di un protocollo di conservazione a medio termine di cloni di carciofo. A tal fine, composti osmoticamente attivi quali il mannitolo e il glucosio sono stati aggiunti al normale substrato Gik di moltiplicazione per ridurre il metabolismo cellulare degli espianti di carciofo, mantenendone intatte la vitalità e la capacità di riprendere la proliferazione quando riportate in condizioni standard di coltura.

Dopo circa 4-5 sub-colture, è stato possibile ottenere un quantitativo sufficiente di materiale di propagazione da utilizzare negli esperimenti di conservazione. Tutti i substrati saggianti hanno consentito di allungare notevolmente gli intervalli di trasferimento su

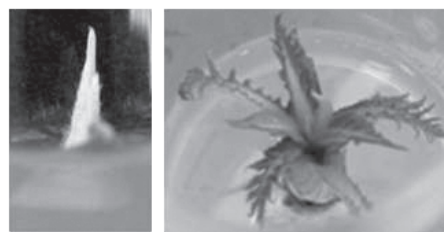
terreno fresco dei materiali conservati *in vitro*, con un pronto recupero del materiale sia dopo 6 che 12 mesi di conservazione. Nonostante le differenze nell’accrecimento osservate tra i cloni, al momento del ritorno nelle condizioni standard di coltura, abbiano evidenziato una risposta di tipo genotipo-dipendente; tutti i cloni hanno mostrato una buona capacità proliferativa. Dopo circa 2 settimane, alla base degli espianti si sono sviluppate le gemme ascellari che, in 5 settimane, hanno raggiunto la lunghezza di 2-3 cm. I migliori risultati sono stati ottenuti con i substrati contenenti 2 o 4% di glucosio in combinazione con il saccarosio. Infatti, gli espianti di tutti i cloni conservati su questi substrati hanno riacquisito l’attività proliferativa più velocemente e con un maggior numero di germogli, quando trasferiti nelle condizioni standard di coltura. Il numero di nuovi germogli per espianto è variato da un minimo di 2 ad un massimo di 5. Inoltre, i germogli ottenuti nella fase di proliferazione hanno evidenziato, in generale, una buona attitudine alla radicazione *in vitro* (50-71%) che è risultata clone-dipendente. Dopo 3 settimane, l’80% delle piantine radicate ha superato la fase di acclimatazione.

Identità genetica

L’influenza del terreno sulla stabilità genetica del materiale micropropagato è stata monitorata tramite analisi del DNA con marcatori molecolari SSR e ISSR. I risultati ottenuti con gli ISSR hanno evidenziato un certo livello di variabilità genetica imputabile alle condizioni di coltura e dipendenti dall’interazione



Stadio 0 – Selezione e preparazione dell’espianto



Stadio 1 – Messa in coltura dell’espianto



Stadio 2 – Moltiplicazione



Stadio 3 – Collezione *in vitro* del germoplasma

Fig. 4 - Costituzione di una collezione *in vitro* a breve termine del germoplasma di carciofo.

Fig. 4 - Medium-term collection of artichoke.

clone/terreno. I dati hanno rilevato che alcuni terreni sono più adatti alla conservazione mantenendo più stabili i genotipi; inoltre, l'ulteriore conservazione in assenza di sub-culture (passaggio da 6 a 12 mesi di conservazione) non ha evidenziato ulteriori significativi cambiamenti fra materiale conservato e piante madri. Questi risultati hanno dimostrato la possibilità di utilizzare la cultura *in vitro* per la conservazione a medio termine del germoplasma di carciofo. L'introduzione di nuovi genotipi all'interno della collezione dovrà essere preceduta da uno studio relativo alla risposta del nuovo genotipo/substrato di conservazione adottato. Al fine di studiare la corrispondenza tra la variabilità osservata a livello molecolare e una possibile variazione a livello fenotipico, le piante afferenti a ciascuna combinazione clone/terreno saranno studiate mediante una caratterizzazione morfologica in campo.

Conclusioni

Il mantenimento della diversità delle risorse genetiche attraverso tecniche di conservazione *ex situ* rappresenta una metodologia in grado di fornire una soluzione alle varie sfide che devono affrontare gli agricoltori come, ad esempio, il cambiamento climatico, la comparsa di nuovi parassiti e malattie. Le collezioni di germoplasma *ex situ* rappresentano infatti una fonte inestimabile di geni in grado di consentire ai miglioratori di rispondere alle nuove richieste poste dai sistemi produttivi e far fronte sia alle emergenze fitopatologiche sia a quelle di tutela ambientale. È pertanto indispensabile conoscere le caratteristiche del germoplasma da preservare.

Nella descrizione delle collezioni, generalmente si distinguono due aspetti complementari tra loro: la caratterizzazione e la valutazione, che permettono entrambi di differenziare le accessioni e di determinare la loro utilità potenziale. Il progetto CARVARVI, assieme a quello europeo CYNARES, hanno condotto al reperimento di diverse accessioni di carciofo, alla caratterizzazione e alla selezione di 17 linee e 3 varietà. L'impiego di descrittori morfologici per il carciofo primaverile (Crinò *et al.*, 2008; Ciancolini *et al.*, 2012; Pagnotta *et al.*, 2012), insieme all'analisi molecolare, ha portato alla tipizzazione genotipica e alla creazione di una *core collection* di carciofo primaverile.

Per quanto riguarda le strategie di conservazione *ex situ* di specie vegetali, queste sono diverse in funzione della natura e delle caratteristiche del patrimonio genetico da conservare. Di tutte le forme di conservazione *ex situ* utilizzate per il carciofo, le più dif-

fuse sono la collezione in campo, che conserva genotipi di interesse attraverso la moltiplicazione conservativa in campi cataloghi, e la collezione *in vitro*.

I principali vantaggi di quest'ultima tipologia di collezione del germoplasma risiedono negli spazi ridotti richiesti, nella facilità di scambio dei genotipi e nella riduzione dei rischi di perdite accidentali dovute a fattori biotici ed abiotici. La conservazione *in vitro* di colture di germogli a medio termine è una tecnica a basso costo importante per la conservazione *ex situ* di piante a propagazione vegetativa. Quest'ultima inoltre rappresenta una parte importante della filiera produttiva dei laboratori commerciali di micropropagazione in quanto permette di ridurre consistentemente la frequenza delle sub-culture (da 20-30 giorni ad almeno un anno) e i rischi di contaminazione ad esse connessi. Inoltre, l'immediata disponibilità di materiale vegetale *in vitro* risulta importante sia per attività commerciali (vendita di piantine) che di ricerca. In aggiunta, la coltura *in vitro* in crescita rallentata permette di conservare facilmente un grande numero di piante rispondenti dal punto di vista genetico al materiale di partenza (*true-to-type*). Tra le collezioni del germoplasma, sono in via di costituzione le banche del DNA e quelle del seme. Quest'ultima acquisterà importanza in vista del ruolo che la propagazione del carciofo via seme sta acquistando con il diffondersi degli ibridi F₁.

Riassunto

L'erosione genetica in atto nel carciofo primaverile trae origine dall'introduzione del clone micropropagato C3 nelle aree tipiche di coltivazione del carciofo 'Romanesco' e dall'entrata in commercio di varietà da seme produttive che stanno insidiando le popolazioni locali tradizionalmente coltivate nel Centro-Sud Italia. La necessità di conservare le risorse genetiche, a costi ragionevoli e in condizioni che assicurino ai genotipi di rimanere geneticamente stabili, è alla base dei futuri programmi di miglioramento genetico. Il lavoro presenta possibili strategie d'intervento per la tutela della variabilità genetica del carciofo secondo gli approcci tradizionali e/o utilizzando metodologie proprie delle biotecnologie vegetali avanzate.

Parole chiave: germoplasma, descrittori morfologici, marcatori molecolari, coltura *in vitro*, conservazione *ex situ*.

Bibliografia

ANCORA G., BELLI-DONINI M.L., CUOZZO L., 1981. *Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid in vitro micropropagation*. Sci. Hort. 14 (3): 207-213.

- ANCORA G., SACCARDO F. 1987. *Carciofo: nuove tecniche di propagazione*. L'Informatore agrario 4: 53-55.
- ANCORA G., CRINÒ P., TAVAZZA R., PAGNOTTA M.A., TEMPERINI O., CAMPANELLI R., SACCARDO F. 2011. *The first three clones selected from the traditional artichoke romanesco populations and proposed for the release of new varieties*. Acta Horticulturae 942: 125-131.
- BIANCO V.V. 1990. *Carciofo (Cynara scolymus L.)*. In: Bianco V.V. and Pimpini F. (eds), *Orticoltura*. Patron Editore (Bologna): 209-251.
- BOURY S., JACOB A.-M.E., EGEA-GILABERT C., FERNÁNDEZ J.A., SONNANTE G., PIGNONE D., REY N.A., PAGNOTTA M.A. 2012. *Assessment of genetic variation in an artichoke european collection by means of molecular markers*. Acta Hort. 942: 81-87.
- CIANCOLINI A., REY NA, PAGNOTTA MA, CRINÒ P. 2012. *Characterization of Italian spring globe artichoke germplasm: morphological and molecular profiles*. Euphytica 186(2): 433-443.
- CRINÒ P., R TAVAZZA, NA REY MUÑOZ, P TRIONFETTI NISINI, F SACCARDO, G ANCORA. 2008 *Recovery, morphological and molecular characterization of globe artichoke 'Romanesco' landraces*. Genetic Resources and Crop Evolution 55 (6): 823-833.
- DEL PIANO L., ABET M., SORRENTINO C., SICIGNANO M., ENOTRIO T. 2012. *ISSR and SSR analysis of Italian globe artichoke 'Pietrelcina' landrace*. Acta Hort. 929: pp. 183-190.
- ILBI H., DÜZYAMAN E., ESER B. 2007. *Assessment of genetic variation among local artichoke varieties by RAPDs and morphological characters*. Acta Hort. 729: 105-109.
- LANTERI S., DI LEO I., LEDDA L., MAMELI M.G., PORTIS E. 2001. *RAPD variation within and among populations of globe artichoke cultivar 'Spinoso sardo'*. Plant Breed 120: 243-246.
- LANTERI S., SABA E., CADINU M., MALLICA G.M., BAGHINO L., PORTIS E., 2004a. *Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke*. Theoretical and Applied Genetics 10: 1534-1544.
- LANTERI S., ACQUADRO A., SABA E., PORTIS E. 2004b. *Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (Cynara cardunculus L. var. scolymus L.)*. J. Hort. Sci. Biotech. 79: 863-870.
- MAURO R.P., PORTIS E., LANTERI S., MAUROMICALE G. 2012. *Genotypic and bio-agronomical characterization of an early Sicilian landrace of globe artichoke*. Euphytica 186 (2): 357-366.
- MAURO R.P., PORTIS E., ACQUADRO A., LOMBARDO S., MAUROMICALE G., LANTERI S., 2009. *genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implications for evolution and domestication of the species*. Conservation Genetics 10: 431-440.
- MAUROMICALE G. AND IERNA A. 2000. *Panorama varietale e miglioramento genetico del carciofo*. L'Informatore Agrario 56: 39-45.
- NOORANI A, REY NA, SACCARDO F, PAGNOTTA MA, CRINÒ P, DULLOO E 2012. *Diversity assessment of seven italian globe artichoke varieties using agromorphological parameters*. Acta Hort. 942: 95-101.
- PAGNOTTA M.A., CARDARELLI M.T., REY MUÑOZ N.A., TUCCI M., SACCARDO F. 2004. *Assessment of genetic variation in artichoke of 'Romanesco' type by molecular markers*. Acta Hort. 660: 99-104.
- PAGNOTTA M.A. 2010. *Genetic Resources of Cynara spp. an AGR GEN RES European Project CYNARES*. Kew Bulletin 65 (4): 555-560.
- PAGNOTTA M.A., SACCARDO F., TEMPERINI O., REY N.-A., NOORANI A., LO BIANCO C., CRINÒ P., TAVAZZA R., CUOZZO L., PAPACCHIOLI V., SONNANTE G., PIGNONE D., MORGESSE A., SARLI G., DE LISI A., RACCUA S., DI VENERE D., JACOB A.-M., BAZINET C., BOURY S., ARTES F., EGEA-GILABERT C., FERNÁNDEZ J.-A., MACUA J.-I., LAHOZ I., JOUY C., ALERCIA A. 2012. *Characterization of the Cynara European Genetic Resources*. Acta Hort. (ISHS) 942: 89-93.
- PÉCAUT P., FOURY M. 1992. *Non-conformity of in vitro propagated plants of early Mediterranean varieties of globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Acta Horticulturae 300: 363-366.
- PÉCAUT P., FOURY M. 1993. *Variation occurring after natural and in vitro multiplication of early Mediterranean cultivars of globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Agronomie 13 (10): 909-919.
- PORCEDDU E., DELLACECCA V., BIANCO V.V. 1976. *Classificazione numerica di cultivar di carciofo*. Atti II Congresso Internazionale Carciofo, Bari., Ed. Minerva Media, Torino, 1105-1119
- PORTIS E., MAUROMICALE G, BARCHI L., MAURO R., LANTERI S. 2005. *Population structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke germplasm from Sicily Island*. Plant Science 168 (6): 1591-1598.
- ROMANI A, PINELLI P., CANTINI C., CIMATO A., HEIMLER D. 2006. *Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (Cynara scolymus L.)*. Food Chemistry 95: 221-225.
- SONNANTE G, DE PAOLIS A., PIGNONE D. 2004. *Relationships among artichoke cultivars and some related wild taxa based on AFLP markers*. Plant Genetic Resources: Characteriz and Utiliz. 1: 125-133.
- SONNANTE G., DE PAOLIS A., CARLUCCIO A.V., PIGNONE D. 2006. *Characterization of newly isolated microsatellite markers from artichoke*. Proc. 50th Italian Society of Agriculture Genetics Annual Congress, 10-14 settembre 2006, Ischia (Napoli).
- TAVAZZA R., PAPACCHIOLI V., ANCORA G. 2004. *An improved medium for in vitro propagation of globe artichoke (Cynara scolymus L.) cv. Spinoso sardo*. Acta Hort. 660: 91-97.
- TRIONFETTI NISINI P., PAGNOTTA M.A., CRINÒ P., CUOZZO L., TAVAZZA R., ANCORA G. 2007. *Recovery and characterization of Italian artichoke traditional landraces of 'Romanesco' type*. Acta Hort. 730: 101-106.