

Caratterizzazione di piante di carciofo “Spinoso sardo” micropropagate e attività di ricerca finalizzata all’avvio di una filiera vivaistica

Anna Barbara Pisanu¹, Maria Cadinu¹, Annamaria Repetto¹, Marco Testa¹, Sergio Lanteri², Ezio Portis², Davide Sanna¹, Marco Maxia¹, Limbo Baghino¹, Gianmario Mallica¹, Santino Meloni¹, Salvatore Beneventi¹, Roberto Pilia¹, Rosaria Pintore¹, Anna Tatti¹, Pietro Camedda¹, Beatrice Meloni¹, Gian Franco Pau¹ e Martino Muntoni¹

¹ AGRIS Sardegna, Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Vegetali, Cagliari

² Dipartimento Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, settore Genetica Agraria, Università di Torino

Characterization of micropropagated plants of artichoke “Spinoso sardo” and research aimed to start a nursery activity

Abstract. This paper reports the results of the activities carried out in the frame of the CARVARVI project by Agency Agris Sardinia. The genetic characterization of selected clones of “Spinoso sardo” and “Violetto di Provenza” artichoke was performed by the DISAFA of the University of Turin. Four selected clones of artichoke “Spinoso sardo” were characterized according to the UPOV descriptors to release a new variety of “Spinoso sardo”. Studies have been carried out to improve the root production of micropropagated seedlings using different culture media. The thermotherapy as a method of virus elimination was applied and molecular hybridization and RT-PCR for diagnostics have been used. In mother plants grown in pots inside the screen house, the possibility of increasing both the capacity of issuing offshoots through the suppression of apical dominance and the effectiveness of some root stimulating growth products were verified. Moreover the productive response of plants obtained by “ovoli” after shoot and root development in nurseries, different-sized and shaped was verified.

Key words: Propagation, artichoke, earliness, head production, ovoli, molecular fingerprinting, AFLP markers.

Introduzione

Il carciofo *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) rappresenta la specie ortiva più importante per il settore agricolo della Sardegna con 13.528 ha coltivati (ISTAT, 2012). L’ecotipo locale denominato

“Spinoso sardo” è la varietà più diffusa coltivata su circa 5500 ha (stima Agenzia Laore Sardegna 2012). I produttori lamentano una sensibile riduzione del potenziale produttivo di tale ecotipo, attribuita in parte alla degenerazione del materiale di propagazione per la presenza di patogeni che infettano la coltura. (Fodai *et al.*, 1983; Pasquini *et al.*, 2003; Cardarelli *et al.*, 2005). L’utilizzo di materiale di propagazione selezionato e garantito dal punto di vista fitosanitario è disciplinato in Italia dal Decreto Ministeriale 14 aprile 1997 che recepisce le direttive della Commissione 93/61/CEE del 2 luglio 1993 e n. 93/62/CEE del 5 luglio 1993. Il decreto prevede che i materiali di propagazione possono essere commercializzati unicamente se appartengono ad una varietà ammessa ufficialmente almeno in Italia o in un altro Stato membro dell’Unione Europea. Poiché nessuno degli ecotipi locali di carciofo è attualmente iscritto al Registro Nazionale delle Varietà vegetali, non è al momento autorizzata alcuna forma di commercializzazione del materiale di propagazione. Per questo motivo non esiste un’attività vivaistica professionale, e la moltiplicazione mediante prelievo di carducci e/o ovoli viene effettuata al di fuori di qualsiasi controllo fitosanitario. L’attività di selezione condotta presso le aziende dell’Agenzia Agris Sardegna sullo “Spinoso sardo” ha portato all’individuazione di alcuni cloni che si sono distinti per le loro caratteristiche produttive e qualitative ideali per il mercato fresco e il consumo a crudo. Per tre di questi è stata presentata nel luglio 2011 domanda d’iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà. A sostegno della coltivazione di questa varietà oltre al lavoro di selezione, è stato necessario proseguire l’attività di ricerca finalizzata ad (i) incrementare la percentuale di materiale risanato attraverso la coltura in vitro, (ii) perfezionare le metodiche diagnostiche e (iii) approfondire le conoscenze relative alla fase successiva di moltiplicazione in campo. I risultati di queste attività potranno supportare l’attivazione di una filiera vivaistica per l’approvvi-

* abpisanu@agrisricerca.it

gionamento di materiale di propagazione selezionato e controllato dal punto di vista fitosanitario.

Selezione clonale

Ordinariamente la propagazione del carciofo “Spinoso sardo” avviene mediante “ovoli”, gemme quiescenti prelevate dalle piante a fine ciclo produttivo. La consuetudine vuole che questo materiale di propagazione non venga sottoposto ad alcun tipo di selezione provocando un’elevata eterogeneità degli impianti. Ancora oggi non viene coltivata una varietà definita ma una popolazione clonale. Nasce dunque l’esigenza di selezionare delle varietà che garantiscano una certa stabilità genetica ed un’appropriata tecnica vivaistica atta a garantire un’adeguata qualità fisiologica e sanitaria del materiale di propagazione. In questo senso le Istituzioni hanno rivolto una notevole attenzione per la tutela e la valorizzazione del carciofo “Spinoso sardo”, sia per le peculiarità qualitative di questa varietà sia per l’importanza che riveste nella cultura e tradizione della Sardegna. Per quanto riguarda l’aspetto genetico è stata adottata, come base di avvio, una collezione di germoplasma presente in Sardegna, raccolta alla fine degli anni ’70, costantemente aggiornata e ancora aperta al reperimento di nuove accessioni. La collezione dei cloni raccolti sul territorio isolano è curata dall’AGRIS e su questa sono state effettuate diverse analisi per determinare l’effettiva differenza genetica e fenotipica. Le prime valutazioni hanno riguardato l’analisi storica dei dati produttivi e della precocità, consentendo la selezione di 9 cloni che sono stati caratterizzati agronomicamente (Mallica *et al.*, 2003), per tre di questi cloni è stata richiesta l’iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà. I nomi dei tre cloni, scelti tra quelli propri maschili della lingua sarda, sono Efis per indicare il clone 37 (fig. 1), caratterizzato da una maggiore precocità, Jaime per indicare il clone 110/14 (fig. 2), caratterizzato da una elevata produttività e Sauro per indicare il clone M (fig. 3), caratterizzato da una più intensa colorazione violetta delle brattee e dalla presenza di una leggera peluria sullo stelo. Nelle tabelle che seguono (tabb. 1-6) sono riportati i dati rilevati nella stagione 2010/2011, riferiti ai valori medi di 15 piante per tre replicazioni, seguendo il protocollo previsto dal Ministero per le prove di distinguibilità, uniformità e stabilità che prevede l’utilizzo dei descrittori UPOV.

Fingerprinting molecolare

Presso il DISAFA, Dipartimento di Scienze

Tab. 1 - Caratteristiche della pianta.* dati relativi al parcellone di 183 piante.

Tab.1 - Characteristics of the plant.

Parametri descrittivi con riferimento al codice della scheda di valutazione INRAN	Efis (clone37)	Jaime (clone 110/14)	Sauro (clone M)
01 - altezza pianta (cm)	78,2	77,7	79,9
04 - distanza tra capol. e foglia basale (cm)	39,0	35,8	39,5
08 - lunghezza foglia (cm)	121,1	127,7	121,5
10 - lobi principali (n°)	12,4	12,0	12,4
12 - lobi secondari (n°)	5,1	5,1	3,9
02 - getti laterali (n°)	2,7	3,0	1,9
piante tardive (%) *	0,5	1,6	0,5
piante fuori tipo (%) *	1,6	1,6	2,7

Tab. 2 - Produzione unitaria di capolini.

Tab. 2 - Production of capitula.

Produzione	Efis (clone37)	Jaime (clone 110/14)	Sauro (clone M)
Totale capolini commerciabili (n° * ha ⁻¹)	67.384	69.862	30.203
1° ordine (n° * pianta ⁻¹)	0,98	0,97	0,97
di cui non commerciabili (%)	27,9	11,3	38,4
2° ordine (n° * pianta ⁻¹)	2,6	2,7	1,7
di cui non commerciabili (%)	15,4	4,2	10,0
3° ordine (n° * pianta ⁻¹)	3,7	3,9	1,5
di cui non commerciabili (%)	0,0	0,3	0,7
4° ordine (n° * pianta ⁻¹)	1,4	0,9	0
di cui non commerciabili (%)	0	0	0

*dati relativi al parcellone di 183 piante; sono classificati non commerciabili i capolini con atrofia, marciume, deformazioni.

Tab. 3 - Precocità di produzione dei capolini di 1° ordine. * dati relativi al parcellone di 183 piante.

Tab. 3 - Precocity of 1° order capitula.

Giorni dal risveglio	Efis (clone37) %	Jaime (clone 110/14) %	Sauro (clone M) %
140	38	13	6
147	20	21	18
154	14	23	10
160	1	1	4
166	7	12	17
173	4	5	7
182	5	8	6
188	2	3	6
196	3	6	4
202	4	6	11
222	1	1	10
229	1	1	2

Agrarie, Forestali e Alimentari, settore Genetica Agraria, dell’Università degli Studi di Torino (ex

Tab. 4 - Caratteristiche biometriche dei capolini di 1° ordine.
 Tab. 4 - *Biometric features of 1° order capitula.*

Parametri	Efis (cl. 37)	Jaime (cl. 110/14)	Sauro (cl. M)
peso complessivo (g)	511,4	499,3	740,5
peso capolino (g)	103,1	98,5	113,3
lunghezza del capolino (cm)	8,7	8,0	9,2
diametro del capolino (cm)	6,4	6,2	6,5
peso dello stelo (g)	215,1	220,0	268,3
lunghezza dello stelo (cm)	40,9	39,5	43,2
diametro dello stelo a 10 cm (cm)	2,3	2,5	2,5
foglie presenti sullo stelo (n°)	3,1	3,0	4,1
diametro del ricettacolo (mm)	34,8	34,5	35,8
spessore del ricettacolo (mm)	9,4	9,2	10,8
lunghezza base brattea (mm)	14,7	14,6	13,7
larghezza base brattea (mm)	26,9	27,0	26,6
spessore base brattea (mm)	4,1	4,0	4,1
capolini sotto calibro <60mm (%)	0	0	0

Tab. 5 - Caratteristiche biometriche dei capolini di 2° ordine.
 Tab. 5 - *Biometric features of 2° order capitula.*

Parametri	Efis (cl. 37)	Jaime (cl. 110/14)	Sauro (cl. M)
peso complessivo (g)	230,6	225,3	296,8
peso capolino (g)	104,9	104,3	108,1
lunghezza del capolino (cm)	8,7	8,6	9,0
diametro del capolino (cm)	6,2	6,3	6,3
peso dello stelo (g)	79,7	80,4	95,0
lunghezza dello stelo (cm)	22,9	20,5	23,3
diametro dello stelo a 10 cm (cm)	3,3	2,2	2,2
foglie presenti sullo stelo (n°)	2,0	2,1	2,8
capolini sotto calibro <60mm (%)	3,1	4,1	14,1

Tab. 6 - Caratteristiche biometriche dei capolini di 3° ordine.
 Tab. 6 - *Biometric features of 3° order capitula.*

Parametri	Efis (cl. 37)	Jaime (cl. 110/14)	Sauro (cl. M)
peso complessivo (g)	152,0	149,5	218,2
peso capolino (g)	91,3	92,0	94,1
lunghezza del capolino (cm)	8,7	8,3	9,1
diametro del capolino (cm)	6,1	6,1	6,1
peso dello stelo (g)	39,4	46,3	60,4
lunghezza dello stelo (cm)	18,2	17,3	21,0
diametro dello stelo a 10 cm (cm)	1,6	15,8	3,3
foglie presenti sullo stelo (n°)	1,6	1,8	2,7
capolini sotto calibro <60mm (%)	75,0	72,5	69,0

DIVAPRA), è stato effettuato il *fingerprinting* molecolare dei cloni selezionati mediante applicazione di marcatori AFLP (*Amplified Fragment Polymorphism*). L'analisi AFLP è stata condotta sui nove cloni inizialmente selezionati nell'ambito della



Fig. 1 - Clone 37 di carciofo "Spinoso sardo".
 Fig. 1 - Clone 37 of "Spinoso sardo" artichoke.



Fig. 2 - Clone 110/14 di carciofo "Spinoso sardo".
 Fig. 2 - Clone 110/14 of "Spinoso sardo" artichoke.



Fig. 3 - Clone M di carciofo "Spinoso sardo".
 Fig. 3 - Clone M of "Spinoso sardo" artichoke.

tipologia “Spinoso sardo” e su quattro cloni di “Violetto di Provenza” utilizzati come termini di paragone. Sulla base di studi precedentemente effettuati (Lanteri *et al.* 2004a, 2004b; Portis *et al.*, 2005) sono state selezionate 26 combinazioni di primer (PCs), basate sulla copia di enzimi di restrizione *EcoRI/TaqI* (E/T), in grado di fornire profili elettroforetici chiari, riproducibili ed informativi. L’applicazione di tali PCs ha generato 955 frammenti AFLP, di questi 122 hanno evidenziato polimorfismo (12,8 %), la media di polimorfismi per primer è risultata essere di 4,7 frammenti/combinazione.

Dai profili di amplificazione sono stati ottenuti parametri statistici quali: *Polymorphic Information Content* (PIC), il *Resolving power* (Rp), il *Marker Index* (MI) che hanno successivamente permesso di identificare le 4 combinazioni di primer maggiormente informative (E+ACA/T+TAG, E+ACG/T+TAT, E+ACA/T+TCC, E+ACT/T+TAA), in grado di amplificare un totale di 35 bande polimorfiche e che consentono di ottenere il *fingerprinting*, cioè identificare in modo inequivocabile, ciascuno dei cloni selezionati. Un ulteriore dato emerso dalle analisi è il numero di bande esclusive, cioè di quelle bande che sono uniche e distintive di una sola accessione/clone. Otto combinazioni di primer hanno permesso di amplificare un totale di 12 bande esclusive nell’ambito di quattro cloni (Spinoso sardo M e 108/11; Violetto di Provenza 3 e 5).

In figura 4 viene riportato il dendrogramma UPGMA basato sulle similarità genetiche rilevate per ciascuna coppia di cloni, che evidenzia, come atteso, una netta separazione tra i cloni appartenenti alla due tipologie varietali. Il *fingerprinting* molecolare ottenuto ha un interesse applicativo non solo per l’attribuzione ad uno specifico genotipo, del materiale propagato-

vegetativamente in vivaio, ma anche per garantire i diritti del costituente di nuovi genotipi che potranno essere registrati nel Registro nazionale delle nuove costituzioni varietali.

Miglioramento delle rese di radicazione del materiale ottenuto *in vitro* attraverso l’utilizzo di diversi substrati di coltura

Viste le basse percentuali di piante radicate ottenute, si è ritenuto opportuno realizzare una prova sperimentale che mettesse a confronto diversi substrati di radicazione. La prova è stata condotta presso il laboratorio di Micropropagazione di Uta. Come materiale di partenza sono stati utilizzati carducci del clone 39 di “Spinoso sardo” provenienti dall’azienda di Oristano e prelevati nel mese di novembre 2009. Il materiale è stato moltiplicato *in vitro* utilizzando il protocollo sperimentale messo a punto presso il laboratorio (Repetto *et al.*, 1996). I germogli sono stati avviati alla fase di radicazione nel mese di marzo mettendo a confronto 4 diversi substrati per quattro replicazioni. Ogni tesi è stata realizzata utilizzando 8 barattoli contenenti 6 germogli per un totale di 48 germogli per replicazione. I substrati utilizzati sono stati i seguenti:

- Tesi 1 substrato normalmente utilizzato contenente acido indolacetico e naftalenacetico, dopo 24 ore di induzione in un substrato liquido contenente gli stessi ormoni a concentrazione elevata;
- Tesi 2 substrato con 10 mg/l di acido indolacetico per una settimana, seguito da trasferimento in un substrato privo di ormoni;
- Tesi 3 uguale alla tesi 1 ma con la sostituzione dell’acido indolacetico con l’indolbutirrico;
- Tesi 4 uguale alla tesi 2 ma con la sostituzione

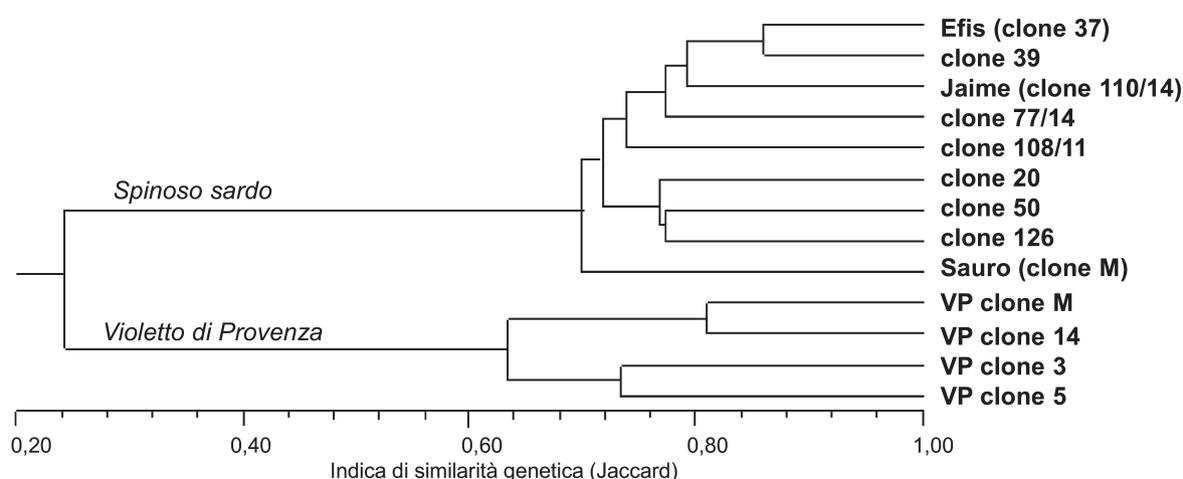


Fig. 4 - Dendrogramma UPGMA riportante la distanza genetica tra i cloni analizzati valutata mediante marcatori AFLP.
Fig. 4 - UPGMA-based phylogeny of clonal selections as derived from AFLP genotyping.

dell'acido indolacetico con l'acido indolbutirrico.

I germogli sono stati allevati in cella climatica a 22 ± 1 °C, con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio e un'intensità luminosa di 4.000 lux. I rilevamenti effettuati ogni 15 giorni hanno avuto inizio nel mese di aprile 2010 e hanno riguardato il numero di piante con radici ben sviluppate (almeno tre radici di lunghezza superiore a 1,5 cm) e il numero di piante con radici poco sviluppate. Con riferimento all'obiettivo primario, l'analisi dei dati (tab. 7) ha messo in evidenza una più elevata percentuale di piante ben radicate nelle tesi 1 e 3 che non differiscono significativamente tra di loro (86,46% e 96,71% rispettivamente). La più bassa percentuale di radicazione si è invece ottenuta con la tesi 2 (21,88%). Anche rispetto ai tempi di emissione delle radici i risultati migliori sono stati ottenuti nelle tesi 1 e 3 le cui piante hanno presentato radici ben sviluppate e numerose. Le piante radicate, dopo l'acclimatazione, sono state trasferite in campo ai primi di agosto 2010 per valutare eventuali influenze dei trattamenti sulla precocità e sulla produttività. I rilevamenti effettuati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le diverse tesi.

Diagnostica

Al fine di ottenere piante madri virus esenti si è cercato di verificare quali fossero le metodiche analitiche e di estrazione più adatte al controllo virologico e contemporaneamente sono state testate due tecniche di risanamento: (i) coltura dell'apice meristemico e (ii) termoterapia separatamente o congiunte (Testa *et al.* 2013).

In prove preliminari che avevano lo scopo di monitorare la presenza del *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) su carciofo, sono state campionate piante infette dalle quali sono stati prelevati carducci utilizzati per l'espianto dell'apice meristemico (Repetto *et al.*, 1996, Babes *et al.*, 2003; Pasquini *et al.*, 2003).

Tab. 7 - Influenza dei diversi substrati di radicazione sullo sviluppo degli apparati radicali di piantine di carciofo "Spinoso sardo" clone 39 ottenute *in vitro*.

Tab. 7 - Influence of different media on rooting development of artichoke plants obtained *in vitro*.

Tesi	radici ben sviluppate		radici poco sviluppate	
	N°	%	N°	%
tesi 1	41,5 a	86,46 a	4,5 b	9,38 ab
tesi 2	10,5 c	21,88 c	8,3 a	17,18 ab
tesi 3	44,5 a	92,71 a	2,5 b	5,21 b
tesi 4	29 b	60,42 b	4,8 ab	9,9 ab

Nell'ambito della stessa colonna lettere diverse indicano differenze tra le medie statisticamente significative $p=0,05$ (test Duncan).

I carducci sono stati numerati singolarmente e analizzati con le tecniche sotto descritte. Oltre al TSWV sono stati ricercati: *Artichoke Latent Virus* (ArLV), *Artichoke Italian Latent Virus* (AILV), *Turnip Mosaic Virus* (TuMV).

Inizialmente è stata utilizzata la tecnica di risanamento con espianto dell'apice meristemico solo relativamente al virus TSWV in quanto il ritrovamento di altri virus è stato sporadico. Per saggiare la stessa tecnica tal quale o abbinata alla termoterapia, sono state infettate meccanicamente delle piante di carciofo, con i virus ArLV e AILV, ottenendo risultati poco soddisfacenti. Si è deciso quindi di utilizzare materiale infetto *in vitro* rappresentato da romanesco cv C3, gentilmente messo a disposizione dal CRA-PAV di Roma, che è stato moltiplicato fino all'ottenimento di un centinaio di piantine per tipologia di infezione. Una parte delle piantine *in vitro*-infette dai due virus latenti sono state sottoposte a termoterapia seguita dal prelievo dell'apice meristemico mentre per le rimanenti si è eseguito il solo prelievo dell'apice.

La diagnosi è stata eseguita con le metodiche *tissue imprint* e *dot-blot hybridization* utilizzando sonde a DNA specifiche per ogni virus di interesse, marcate con digossigenina. L'ibridazione molecolare è stata effettuata su una membrana di nylon quadrettata, prelevando una goccia della soluzione ottenuta con le modalità descritte. Successivamente le membrane sono state fissate con luce UV, preibridate, ibridate e sviluppate con CDP-Star (Roche) come da metodica descritta dalla ditta. Sono state utilizzate delle sonde marcate con digoxigenina TSWV-specifiche, prodotte amplificando il gene di TSWV N come descritto da Vaira *et al.* (1995), mentre per i virus ArLV, AILV, e TuMV, sono state utilizzate sonde marcate con digoxigenina commerciali (AGRITEST S.r.l.).

Le piante madri virus esenti sono state allevate sia in screen-house con ciclo poliennale sia in pieno campo, in coltura annuale e testate periodicamente. Le esperienze acquisite attraverso questi studi hanno permesso di attivare un protocollo per produrre piante madri virus-esenti da destinare alla costituzione di campi di moltiplicazione controllati. La metodica più rapida ed affidabile, dato il gran numero di campioni da testare in fase di pre espianto, è risultata essere quella del *tissue imprint hybridization*. Nella fase di post espianto (con piantine *in vitro*) la sensibilità analitica è risultata leggermente superiore utilizzando la metodica *dot-blot hybridization* con tampone di estrazione (prove non pubblicate). L'estrazione di RNA totale seguito da *dot-blot hybridization* ottenuto con l'estratto di RNA determina una sensibilità notevolmente superiore.

Alcuni campioni testati sono risultati infetti da AILV in post espianto, pur essendo risultati negativi in pre espianto. Ciò può essere dovuto alla bassa concentrazione del virus al momento dell'analisi; infatti da alcuni studi (Repetto *et al.*, 1996) emerge che il periodo ottimale per rilevare i virus latenti del carciofo è quello compreso tra settembre a novembre. Superato tale periodo si possono evidenziare dei falsi negativi.

Per quanto riguarda il TSW la percentuale di risanamento è risultata soddisfacente. Si passa da 67 campioni infetti in pre espianto a 1 in post espianto nella prova 1 (tab. 8) e da 37 in pre espianto a 20 in post espianto nella prova 2. Un altro dato interessante, rilevato nel 2009, riguarda l'utilizzo per l'estrazione di un kit con colonnina di campioni risultati precedentemente sani (con estrazione e DBH) risultati positivi usando l'estratto di RNA totale. Da ciò si deduce che in fase di post espianto è preferibile utilizzare un estratto di RNA totale piuttosto che uno con tampone, aumentando notevolmente la sensibilità dell'ibridazione. Sono stati effettuati inoltre test diagnostici utilizzando l'ibridazione molecolare (sonde a DNA) per la ricerca dei virus ArLV, AILV e TSVW.

Termoterapia

L'obiettivo di questa prova è stato quello di verificare l'applicabilità e l'efficacia della termoterapia abbinata alla coltura di apici meristemati ai fini della produzione di piante madri di carciofo "Spinoso sardo". A questo scopo è stata allestita presso il laboratorio di Micropropagazione una cella per la termoterapia. Le problematiche affrontate hanno riguardato: modalità e tempi di innalzamento ed esposizione a temperature elevate (38 °C). Sono stati testati tre protocolli di termoterapia per valutare il più idoneo a consentire una maggiore sopravvivenza degli espianti:

- innalzamento lento delle temperature - raggiungimento graduale di 38 °C in 15 giorni ed esposizione per 10 giorni;
- alte temperature ad intermittenza - esposizione a 38 °C per 6 ore alternate con normali temperature per 18 ore per un periodo di 18 giorni;
- innalzamento rapido delle temperature - raggiun-

gimento di 38 °C in 7 giorni e esposizione per 10 giorni.

Dei tre trattamenti termoterapici testati, solo quello ad innalzamento rapido delle temperature è risultato idoneo. Le piante sottoposte agli altri due trattamenti non sono sopravvissute.

Con il solo prelievo dell'apice meristemato su piantine infette da ArLV la percentuale di risanamento ha superato il 50%, mentre per le piantine infette con AILV è stata inferiore al 5%. Dopo la termoterapia la percentuale di risanamento è stata del 100% ma il numero di piante sopravvissute è stato molto ridotto. È stato evidenziato che le piante infette da AILV sono più vigorose e sopportano bene la termoterapia, mentre quelle infette da ArLV manifestano un accrescimento stentato e non sopravvivono al trattamento.

Moltiplicazione per carducci di piante madri allevate fuori suolo in *screen-house*

Considerato l'alto costo di produzione delle piante di carciofo risanate mediante coltura *in vitro* si è ritenuto necessario individuare una tecnica di propagazione vegetativa delle piante madri che garantisca un elevato tasso di moltiplicazione. Per la cv di carciofo "Romanesco" si è rivelata efficace la tecnica di moltiplicazione mediante carducci prelevati da piante allevate fuori suolo in ambiente protetto a cui è stata praticata la soppressione della gemma apicale (Micozzi *et al.* 2003). Per verificare l'efficacia di questa tecnica sulle piante micropropagate di carciofo "Spinoso sardo" sono state realizzate nell'autunno 2009 alcune prove sperimentali nelle quali è stata valutata l'influenza dei seguenti fattori sulla produzione di carducci e sull'attitudine di questi alla radicazione: substrato di coltivazione, tecnica di soppressione della gemma apicale e volume del substrato. Le prove sono state condotte in *screen-house* per preservare le piante madri dalla contaminazione di agenti patogeni esterni.

Influenza del substrato di coltivazione e della tecnica di soppressione della gemma apicale sulla capacità di emissione dei carducci

Per la coltivazione delle piante fuori suolo sono

Tab. 8 - Risultati delle prove di espianto e coltura di apice meristemato 2009 - 2010. Legenda: DBH = dot blot hybridization; TIH = tissue imprint hybridization.

Tab. 8 - Results of explant and culture of meristem tip test. Legenda: DBH = dot blot hybridization; TIH = tissue imprint hybridization.

Data	Metodica	n° apici pre-espianto pos/tot				Data	Metodica	n° apici post-espianto pos/tot				Prova
		ArLV	AILV	TuMV	TSWV			ArLV	AILV	TuMV	TSWV	
04/03/09	TIH	0/67	0/0	0/0	67/67	06/05/09	DBH	0/67	1/67	0/67	41/67	1
12/06/09	RNA tot e DBH	-	-	-	6/6							
22/12/09	TIH	0/37	0/37	0/37	37/37	25/04/10	DBH	0/37	5/67	0/37	20/37	2

stati posti a confronto due diversi substrati: perlite 100% e miscela di perlite 50% - terriccio commerciale 25% - terra 25%, adottando in tutte le tesi un volume di substrato di 30 litri per vaso. È stato utilizzato uno schema sperimentale, a blocco randomizzato con tre ripetizioni prevedendo la suddivisione di ciascuna parcella principale in due sub parcelle nelle quali è stata adottata una diversa tecnica di soppressione della gemma apicale:

- capitozzatura di tutta la parte apicale della pianta mediante taglio;
- accecamento della gemma apicale mediante somministrazione di alcune gocce di olio minerale giallo.

Il trapianto in *screen-house* è stato effettuato nel mese di settembre 2009, la soppressione della gemma apicale è avvenuta nel mese di novembre quando le piante avevano raggiunto uno sviluppo vegetativo caratterizzato dalla presenza di circa 8-9 foglie. La prima somministrazione di olio minerale giallo effettuata a novembre 2009 non si è rivelata del tutto efficace nel determinare l'accecamento della gemma apicale, pertanto si è reso necessario ripetere la somministrazione nel mese di dicembre 2009.

Il prelievo dei carducci è stato effettuato il 18 febbraio 2010 e il 17 maggio 2010. L'analisi della varianza non ha messo in evidenza differenze statisticamente significative tra i diversi substrati. L'utilizzo di olio minerale giallo non ha consentito su tutte le piante la soppressione completa della gemma apicale

che in alcuni casi ha differenziato un capolino di dimensioni trascurabili. Questo non ha comunque condizionato in misura significativa il numero di carducci ottenuti che è stato mediamente di 13,5 carducci per pianta nel prelievo di febbraio e 2,2 in quello di maggio (tabb. 9 e 10).

Influenza del volume del substrato di coltivazione sulla capacità di emissione dei carducci

Lo scopo di questa prova era verificare l'influenza del volume di substrato sull'attitudine della pianta all'emissione dei carducci. Le piante madri di carciofo micropropagate sono state allevate in vasi contenenti una miscela di perlite 50%, terriccio commerciale 25% e terra 25%. Lo schema sperimentale, a blocco randomizzato con tre repliche, prevedeva il confronto tra diversi volumi di substrato: 30 - 40 - 50 litri. Ciascuna parcella era costituita da 8 vasi su ognuno dei quali è stata allevata una sola pianta. Il trapianto in *screen house* è stato effettuato nel mese di ottobre 2009, la soppressione della gemma apicale è avvenuta per capitozzatura nel mese di dicembre quando le piante avevano raggiunto uno sviluppo vegetativo caratterizzato dalla presenza di circa 8-9 foglie. Il prelievo dei carducci è stato effettuato il 24 marzo 2010 e il 17 maggio 2010. I dati sono stati sottoposti all'analisi della Varianza che non ha messo in evidenza differenze statisticamente significative tra le tesi. In questa prova sono stati ottenuti mediamente 5,2 e 2,6 carducci per pianta rispettivamente a febbraio e maggio (tab. 11).

Tab. 9 - Influenza del substrato e del trattamento sul numero di carducci prelevati a febbraio 2010.
Tab. 9 - Influence of the media and the treatment on the number of buds taken in February 2010.

Tesi	piante indotte		carducci con radice	carducci senza radice	scarto	carducci totali
	n	%				
Substrato						
Perlite	3,0	25,0	5,38	2,26	1,86	9,50
50% perlite 25% terra 25% terriccio	3,33	27,78		2,58	3,15	12,06
Trattamento						
capitozza tura	0,25	2,08	9,10	4,46	4,90	18,46
accecamento con olio minerale giallo	9,25	77,08	8,44	2,81	2,63	13,88

Tab. 10 - Influenza del substrato e del trattamento sul numero di carducci prelevati a maggio 2010.
Tab. 10 - Influence of the media and the treatment on the number of buds taken in May 2010.

Tesi	piante presenti	carducci grandi	carducci piccoli	scarto	carducci
	n				
Substrato					
Perlite	11	21,83	5,33	0,67	2,46
50% perlite 25% terra 25% terriccio	11,83	19,5	4,83	1,33	2,05
Trattamento					
capitozzatura	11,67	20,33	5,17	1,17	2,17
accecamento con olio minerale giallo	11,17	21	5	0,83	2,35

Tab. 11 - Influenza del volume del substrato sui carducci prelevati a febbraio e maggio 2010.
 Tab. 11 - Influence of the volume of the media on the buds taken in February and May 2010.

Volume del substrato	Carducci prelevati a febbraio			Carducci prelevati a maggio		
	totali n/pianta	con radici %	senza radici %	totali n/pianta	con radici %	senza radici %
30 litri	4,75	98,33	1,67	2,39	73,61	25,00
40 litri	5,00	99,17	0,83	2,63	62,15	34,72
50 litri	5,96	93,28	6,72	2,75	75,08	19,21

Le piante madri micropropagate di carciofo “Spinoso sardo” allevate in vaso e sottoposte a capitozzatura non hanno dimostrato sufficiente attitudine all’emissione dei carducci che è avvenuta solo quando la porzione basale del fusto aveva raggiunto un elevato grado di maturazione dei tessuti, pertanto non si ritiene opportuno suggerire l’adozione di questa tecnica nella pratica vivaistica ordinaria.

Valutazione di diverse tipologie di ovoli per la propagazione del carciofo “Spinoso sardo”

Per propagare il carciofo “Spinoso sardo” sono comunemente utilizzati gli ovoli, gemme dormienti di forma sigaroide di peso compreso tra 20 e 35 g. Alcune ricerche precedenti hanno evidenziato che gli ovoli plurigemma e quelli con internodi raccorciati danno produzioni meno precoci (Ledda e Muroni, 2007). Poiché la micropropagazione del meristema apicale nelle varietà precoci di carciofo, come lo “Spinoso sardo” comporta la perdita di questo carattere in percentuale rilevante (Pécaut e Martin, 1992), soprattutto se si procede oltre la quarta o la quinta subcoltura (Cadinu *et al.*, 2006), le piante madri micropropagate devono essere ulteriormente moltiplicate per ovoli al fine di aumentare la disponibilità di piante selezionate e risanate.

Lo scopo di questo lavoro era verificare la possibilità di migliorare il potenziale di moltiplicazione di queste piante utilizzando, oltre agli ovoli sigaroidi di 20-35 g, quelli di peso inferiore a 20 g, e le singole gemme che sono presenti sul rizoma al termine della stagione produttiva. Gli ovoli di piccola dimensione non sono comunemente usati in quanto necessitano di una fase di pregermogliamento e radicazione in vivaio. Sono state valutate le caratteristiche di piante ottenute con diversi tipi di materiali di moltiplicazione, valutando la precocità e la produttività delle piante e la qualità dei capolini in termini di peso e dimensioni. Le prove sono state effettuate in due anni consecutivi, 2009 e 2010, presso l’azienda Agris di Uta utilizzando il clone 37. Sono stati confrontati diversi tipi di materiali di moltiplicazione: ovoli sigaroidi piccoli, medio piccoli, medi e grandi, ovoli corti piccoli e

gemme singole. (Pisanu *et al.* 2013). Relativamente alla produzione di capolini principali e di secondo ordine nel primo anno non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le tesi. Al contrario nel secondo anno le piante ottenute da gemme non hanno prodotto precocemente come nel 2009. Questo è probabilmente dovuto agli effetti negativi delle temperature particolarmente elevate nelle due settimane successive al trapianto. Le differenze nella produzione di capolini secondari (secondo e terzo ordine) non sono risultate statisticamente significative.

Conclusioni

Allo stato attuale per la propagazione del carciofo non è possibile soddisfare le condizioni previste dal Decreto Ministeriale relativo alla regolamentazione della produzione e commercializzazione del materiale di moltiplicazione vegetale di provenienza vivaistica in quanto la richiesta di iscrizione dei cloni al Registro Nazionale delle Varietà non è stata accolta a causa della presenza di una quota di piante fuori tipo (che presentano habitus selvatico) superiore a quella ammessa dal regolamento. Sono in corso ulteriori esperienze per verificare se sia possibile superare questo problema, in alternativa si potrebbe propendere per l’iscrizione dei cloni selezionati al Registro delle Varietà da Conservazione. Per quanto riguarda la messa a punto della fase di radicazione in vitro, si è ritenuto opportuno continuare a utilizzare il substrato di radicazione in uso presso il nostro laboratorio e rivolgere l’interesse futuro verso altre tecniche quali la micorrizzazione.

Relativamente all’attività diagnostica, le esperienze condotte hanno consentito di perfezionare un protocollo per l’esecuzione di test diagnostici finalizzati a garantire lo stato fitosanitario delle piante madri. Riguardo alle tecniche di risanamento invece la termoterapia non è risultata idonea in quanto gran parte delle piante di carciofo micropropagate non sono sopravvissute al trattamento.

Infine, a sostegno dell’attività vivaistica è stata verificata la possibilità di aumentare il tasso di moltiplicazione delle piante madri di carciofo utilizzando

tutto il materiale presente nel rizoma delle stesse al termine della stagione produttiva. Ovoli di piccole dimensioni e gemme possono essere utilizzati con successo per propagare le piante madri di carciofo “Spinoso sardo”.

Riassunto

Si riportano alcuni risultati ottenuti nell’ambito del progetto nazionale CARVARVI. Tre cloni selezionati di carciofo “Spinoso sardo” sono stati proposti per l’iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà e caratterizzati geneticamente dal DISAFA dell’Università di Torino. Sono stati effettuati studi per migliorare la resa in radicazione di piantine micropropagate utilizzando diversi substrati di coltura. È stata applicata la termoterapia per il risanamento e l’ibridazione molecolare e RT-PCR per la diagnostica. È stata verificata la possibilità di favorire l’emissione dei carducci, su piante madri, l’efficacia di prodotti rizogeni e bio-stimolanti e la risposta produttiva di piantine ottenute a partire da ovoli pre-germogliati di diversa dimensione e forma.

Parole chiave: propagazione, carciofo, precocità, produzione di capolini, ovoli, *fingerprinting* molecolare, marcatori AFLP.

Bibliografia

- BABES G., LUMIA V., PASQUINI G., DI LERNIA G., BARBA M., 2003. *Production of virus free artichoke germoplasm*. Acta Horticulturae 660: 467-472.
- CADINU M., MALLICA G., BAGHINO L., REPETTO A., FRAU A., MELONI S. 2006. *Progressi nella coltura in vitro e nel miglioramento genetico del carciofo Spinoso sardo*. Atti del Convegno conclusivo Progetto MiPAF Carciofo 2003-2006., Roma 19-21 aprile 2006, 70-72.
- CARDARELLI M., ROULPHAED Y., SACCARDO F., COLLA G., 2005. *An innovative vegetative propagation system for large-scale production of globe artichoke transplants. Part II. Propagation system validation*. HortThechnol. 15(2): 812-816.
- FODDAI A., CORDA P., IDINI G. 1983. *Influenza del potyvirus latente del carciofo spinoso sardo sulla produttività delle piante in pieno campo. I risultati del primo anno di impianto*. Rivista di Patologia Vegetale - J Plant Pathol 19: 29-35.
- Istituto Nazionale di Statistica. 2012. *Stima delle superfici e produzioni delle coltivazioni agrarie Tav. C08*.
- 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 108: 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.) ‘Spinoso sardo’*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79: 863-870.
- LEDDA L. AND MURONI S. 2007. *Influenza della tipologia dell’ovolo e della temperatura sul ciclo vegetativo e produzione in carciofo*. Atti del XXXVII convegno della Società Italiana di Agronomia, Catania 13-14 settembre 2007, 93-94;
- MALLICA G.M., BAGHINO L., CADINU M., REPETTO A., LANTERI S., PORTIS E., SABA E. 2003. *Yield and biometric characteristics of 9 clones selected from the population of ‘Spinoso sardo’ artichokes*. Acta Horticulturae 660: 83-89.
- MICOZZI F., SACCARDO F., TEMPERINI O., 2003. *Studio di una nuova tecnica di propagazione vegetativa per il carciofo*. Atti “Giornate nazionali di studio sul carciofo: vivaismo e strategie di sviluppo” - Samassi (CA) 4-5 dicembre 2003. 28-31
- PASQUINI G., BARBA M., PAPANICE M., GALLITELLI D., 2003. *Produzione di germoplasma di carciofo virus esente*. Atti “Giornate nazionali di studio sul carciofo: vivaismo e strategie di sviluppo” - Samassi (CA) 4-5 dicembre 2003. 60-63
- PÉCAUT, P. AND MARTIN, F. 1992. *Non conformity of in vitro propagated plants of early Mediterranean varieties of globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Acta Hort. 300: 363-366
- 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: 1591-1598.
- PISANU A.B., CADINU M., MELONI S., BENEVENTI S., MAXIA M., BAGHINO L. AND MUNTONI M. 2013 *Evaluation of different types of ‘ovoli’ for propagating ‘Spinoso sardo’ artichoke*. in press. Acta Horticulturae. in press.
- REPETTO A., CADINU M., LEONI S., GALLITELLI D., SALDARELLI P., BARBAROSSA L., GRIECO F., 1996. *Effetto della coltura in vitro di apici meristemati sull’ottenimento di piante di carciofo ‘Spinoso sardo’ e ‘Masedu’ virus esenti*. Notiziario per la protezione delle piante 7: 189-195
- TESTA M., CADINU M., PILIA R., PINTORE R. AND BAGHINO L. 2013. *Virus elimination in artichoke: comparison between different methods of extraction and detection procedures*. Acta Horticulturae. in press.
- VAIRA A.M., SEMERIA L., CRESPI S., LISA V., ALLAVENA, A. AND ACCOTTO G.P. 1995. *Resistance to Tospoviruses in Nicotiana benthamiana transformed with the N gene of tomato spotted wilt virus: correlation between transgene expression and protection in primary transformants*. Mol. Plant- Microbe Interact. 8: 66-73.