



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

**Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**



Indirizzo : Produttività delle piante coltivate

Ciclo XXVI

CARATTERIZZAZIONE GENETICA

IN CARCIOFO (*CYNARA CARDUNCULUS* VAR *SCOLYMUS* L.)

Dr.ssa Luana Sale

<i>Direttore della Scuola</i>	Prof.ssa Alba Pusino
<i>Referente di Indirizzo</i>	Prof.ssa Rosella Motzo
<i>Docente Guida</i>	Prof.ssa Giovanna Attene

A Elia

Luana Sale

Caratterizzazione genetica in Carciofo (Cynara cardunculus var. scolymus L.)

*Scuola di Dottorato di Ricerca in: Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari Indirizzo:
Produttività delle Piante Coltivate Università degli Studi di Sassari*

*“B' a' cosas chi pro las cumprendere bi chere'
tempus e isperienza; e cosas chi cand' un' at
isperienza non las cumprende' prusu. Cosas chi
pro vortuna s' irmenticana e cosas chi pro vortuna
s' ammentana; e cosas chi si credene irmenticatas e
chi inbezzes una die a s' improvisu torran' a
conca.”*

Mialinu Pira -Sos Sinnos-

INDICE

1	<u>Introduzione</u>	1
1.1	Origine e Domesticazione del Carciofo	1
1.2	Diffusione	5
1.3	Classificazione e caratteristiche botaniche	6
1.4	Caratteristiche qualitative	7
1.5	Classificazione agronomica	8
1.6	Impianto e coltivazione	9
1.7	Miglioramento genetico	12
1.8	Selezione Clonale	13
1.9	Panorama varietale Italiano	14
1.10	Il tipo varietale Spinoso Sardo	18
1.11	Il cardo selvatico	19
1.12	marcatori genetici	22
1.12.1	<i>Marcatori microsatelliti plastidiali (nuSSR)</i>	24
1.12.2	<i>Marcatori microsatelliti plastidiali (cpSSR)</i>	24
2	<u>Obiettivi della ricerca</u>	26
3	<u>Materiali e Metodi</u>	27
3.1	Collezione del materiale vegetale	27
3.2	La collezione di “ <i>Spinoso Sardo</i> ”	29
3.3	Collezione di cardo selvatico (<i>C. cardunculus</i> var. <i>sylvestris</i>)	29
3.4	Estrazione del DNA	30
3.5	Analisi dei marcatori nucleari (nuSSR)	32
3.5.1	<i>Amplificazione PCR</i>	34
3.5.2	<i>Elettroforesi su gel di poliacrilammide</i>	35
3.6	Analisi marcatori molecolari cloroplastici (cpSSR)	36
3.7	Analisi Statistiche	36
4	<u>Risultati e Discussione</u>	40
4.1	In quanti gruppi genetici è possibile classificare le varietà di carciofo coltivato?	41
4.1.1	<i>Analisi della variabilità nuSSR</i>	41
4.1.2	<i>Analisi della variabilità cpSSR</i>	48
4.1.3	<i>Corrispondenze tra gruppi genetici nuSSR e cpSSR</i>	48
4.1.4	<i>Corrispondenze tra analisi SSR (nuSSR e cpSSR) versus AFLP</i>	51

4.2	Quale è il livello di variabilità all'interno dei gruppi genetici di carciofo coltivato?	53
4.2.1	<i>Confronto della diversità genetica tra le varietà coltivate e il cardo selvatico</i>	55
4.2.2	<i>Confronto della struttura genetica tra le varietà coltivate e il cardo selvatico</i>	55
4.3	Caratterizzazione della collezione di Spinoso Sardo	61
5	<u>Conclusioni</u>	64
6	<u>Bibliografia</u>	66

Abstract

The globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.), presumably native of the Mediterranean Basin, is an horticultural species of relevant economic interest, mainly in the South of Italy. This crop is also highly important for the Sardinian agriculture, that recently has achieved for this local variety “Spinoso di Sardegna” the DOP (Protected Designation Origin) label.

The study of the genetic structure of plant populations represents a basilar task both for the parental choice in breeding programs and for a correct implementation of genome wide association studies (GWAS). Likewise, the comparison with the wild progenitor allow to deepen the knowledge of the domesticated species. In fact, it is possible to: evaluate the genetic diversity that is effectively present within a certain varietal collection; estimate the degree of the genetic differentiation among wild and cultivated gene pools; investigate whether the wild gene pool is a source of alleles that might be useful for breeding programs, and understand important aspects on the evolution and domestication of the cultivated materials.

The main aims of the PhD research activity were to: 1) determine and investigate the genetic diversity level and structure of a varietal collection of globe artichoke; 2) compare these materials with a collection of wild cardoon (the progenitor of the cultivated artichoke); 3) determine and investigate the genetic diversity of a collection of the cultivated variety “Spinoso Sardo”. These tasks were achieved by using nuclear and cytoplasmic microsatellite markers (nuSSR and cpSSR, respectively).

The analysis by means of nuSSRs has allowed the identification of different genetic groups associated to the most important varietal types (Catanesi, Romaneschi, Violetti and Spinosi). This confirmed what previously observed by means of other molecular markers, despite the genetic relationships among groups are not fully comparable. For the first time, it has been analyzed the cytoplasmic diversity in globe artichoke, that has been shown to be very low. It has been shown that, the identified genetic structures are related, at least in part, to the mutation rate of the different molecular markers used. Future studies of association mapping on this species might likely benefit from the information deriving from different types of molecular markers.

The cultivated and wild gene pools have shown a moderate-high differentiation level and a low gene-flow has been detected. Among the cultivated materials, the Spinosi, Violetti and Romaneschi types are closer to the wild cardoon. Moreover, based on the diversity levels and

the phylogenetic relationships, the genetic group containing the most of the Spinosi type, seems to have an older origin.

A multi-level approach based on linkage disequilibrium analysis, inbreeding level analysis, and association analysis between nuclear and cytoplasmic polymorphisms, point to a well defined clonal structure of the analyzed materials; yet, a clear role of sexual recombination during the evolution of the varieties of cultivated artichoke can be hypothesized. Comparison between the collection of cultivated varieties and that of wild cardoon has evidenced a very high variability of the collection of the cultivated varieties, though a relevant number of wild alleles were shown to be absent in the cultivated gene pool.

The collection of 'Spinoso Sardo' has not evidenced any diversity both for nuSSR and cpSSR markers. Nonetheless, the genetic profile of this variety emerge to be clearly differentiated from the other varietal types, that is crucial for varietal identification purposes. The poor genetic diversity observed in 'Spinoso Sardo' contrasts with the observed phenotypic diversity and the feasibility of clonal selection often reported for this species. This raise questions on the role of the transgenerational epigenetic variation as source of phenotypic diversity in the globe artichoke.

1.Introduzione

1.1 Origine e Domesticazione del carciofo

Le origini del carciofo (*Cynara scolymus* L.) sono da ricercarsi agli inizi della civiltà occidentale, infatti, come attestano gli scritti di alcuni autori dell'antichità questa specie era già conosciuta all'epoca dei Greci e dei Romani (Sonnante et al., 2007b). Diverse leggende riportano alla sua origine. Secondo la mitologia Greca, Cynara era una ninfa bellissima molto cara a Zeus, il quale avendolo rifiutato la trasformò in ortaggio dalla quale poi la specie avrebbe preso il nome. Nel *De Rustica* Columella ipotizza che il nome Cynara potrebbe derivare da “cinis” (cenere), essendo il terreno che ospitava le piante di carciofo solitamente cosparso di cenere (Munoz, 2005).

Il nome “*Carciofo*” deriva dall'arabo *alakra shuf* ed è agli arabi, che hanno dominato il sud del Mediterraneo durante il Medioevo, che è generalmente associata l'origine e la diffusione di questa specie (Sonnante et al., 2007b; Pagnotta e Noorani, 2014). Al contrario, la parola italiana, ora in disuso, *articiocco*, quella francese *artichau* e quella inglese *artichoke* sembrerebbero derivare dal neolatino *arti cactus* (Oliaro, 1969; Bianco et al, 1990), da cui si potrebbe desumere un ruolo primario dell'Italia nella diffusione del carciofo in Europa (Sonnante et al, 2007b).

Le prime descrizioni tassonomiche risalgono allo storico Teofrasto (300 a.C.) che nei suoi scritti parla dei “*cardui pineae*” probabilmente riferendosi al carciofo. Altre informazioni sono riportate da altri autori come Plinio, che descrive le caratteristiche culinarie e terapeutiche della pianta (Viani, 1929), indicando come fin dall'antichità questo ortaggio venisse sfruttato per le sue proprietà organolettiche e officinali. Sembra chiaro come gli autori volessero tramandare la coltura di questa specie, anche attraverso l'arte e le opere (Oliaro, 1969). A tal proposito, gli scritti di Marco Terenzio Varrone e Plinio Secondo descrivono le caratteristiche e le tecniche di coltivazione e propagazione diffuse al loro tempo e tutt'oggi tramandate (Oliaro, 1969).

Le prime notizie sulla coltivazione del carciofo risalgono ad un periodo compreso tra l'VIII ed il XV secolo, presumibilmente avvenuta presso monasteri (Lanteri e Portis, 2008). Le prime descrizioni delle diverse varietà di questa specie risalgono intorno al XVIII secolo, anche se si presume che si trattasse di cultivar già diffuse (Munoz, 2005).

L'origine geografica del genere *Cynara* è attualmente identificata con il bacino del Mediterraneo ed il nord-ovest dell'Africa (Sonnante et al., 2007a, 2007b), mentre il processo

di domesticazione del carciofo coltivato, che possa consentire di capire la sua origine ed il luogo in cui è avvenuta, è ancora oggetto di studio.

Al *gene pool* primario di carciofo coltivato appartiene sia il cardo selvatico *Cynara cardunculus* var. *sylvestris*, che il cardo coltivato (*C. cardunculus* L. subspecies *cardunculus*) e dal loro incrocio è possibile ottenere progenie fertili (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) (Rottenberg e Zohary, 1996).

Già De Candolle, nel 1886, propose che questa coltura potesse derivare dal cardo selvatico *C. cardunculus* L., ampiamente diffuso nei paesi del Mediterraneo occidentale. Successivamente, numerosi altri studi basati su caratteri morfologici (Wiklund, 1992), su incroci wild x coltivato (Zohary e Basnizky, 1975; Basnizki and Zohary, 1994; Rottenberg e Zohary, 1996; Rottenberg e Zohary, 2005), su analisi con marcatori isoenzimatici (Rottenberg et al., 1996), con marcatori molecolari RAPDs, (Sonnante et al., 2002), AFLPs (Sonnante et al., 2004; Lanteri et al., 2004a; Raccuia et al., 2004), basati su nrDNA e rDNA (Robba et al., 2005; Sonnante et al., 2007a) e SSR (Gatto et al., 2013), hanno consentito di confermare che il cardo selvatico è il progenitore del carciofo coltivato.

Parallelamente a questi studi, sono state condotte diverse analisi basate su marcatori nucleari e cloro plastici, che in passato sono stati ampiamente utilizzati per comprendere i processi evolutivi ed i processi di domesticazione di diverse specie coltivate (Provan, et al., 2001).

Il genere *Cynara* comprende sette specie tutte native del bacino del Mediterraneo, *C. syriaca* Boiss, *C. cornigera* Lindely (syn. *sibthorpiana* Boiss. et Heldr.), *C. algarbiensis* Cosson, *C. baetica* (Spreng.) Pau (syn. *alba* Boiss.), *C. humilis* L. and *C. cyrenaica* Maire & Weiller ed il complesso *C. cardunculus*, che include il carciofo coltivato, il cardo coltivato ed il cardo selvatico (Rottenberg e Zohary, 2005).

Le tre forme di *C. cardunculus* sono interfertili e la loro progenie è fertile, mentre esistono barriere riproduttive con le altre specie di *Cynara* (Rottenberge e Zohary, 1996). In particolare, è stato dimostrato che gli incroci tra *C. cardunculus* e le quattro specie selvatiche, *C. syriaca*, *C. cornigera*, *C. baetica* and *C. humilis* producono solo pochi semi e la progenie è generalmente sterile (Rottenberg e Zohary, 2005). Queste quattro specie selvatiche sono quindi attribuite ad un secondo *gene pool* rispetto al carciofo e al cardo coltivato (Rottenberg e Zohary, 2005) e la specie più vicina al complesso coltivato risulta essere *C. syriaca* (Zohary and Basnizki, 1975).

Ulteriori studi basati su sequenze ITS (Internal Transcribed Spacer region di nrDNA) e su ITS e ETS (External Transcribed Spacers) sul locus 18S-5.8S-25S rDNA, sono stati

rispettivamente condotti con l'obiettivo di chiarire i rapporti tra specie selvatiche (Robba et al., 2005) ed i rapporti filogenetici tra specie coltivate e progenitori selvatici (Sonnante et al., 2007a). Questi studi hanno permesso di approfondire la conoscenza sull'evoluzione della specie e capire che il complesso *C. cardunculus*, è molto più differenziato ed evoluto rispetto alle altre specie selvatiche (Sonnante et al., 2007a).

In particolare, uno studio recente ha sfruttato l'applicazione di 35 marcatori molecolari SSR su 801 individui di *Cynara cardunculus* provenienti da diversi Paesi del Mediterraneo, per analizzarne la variabilità genetica e ottenere ulteriori informazioni sulla domesticazione del carciofo coltivato (Gatto et al., 2013).

Il cardo selvatico è stato in passato distinto in tre diverse tipologie, siciliano, tunisino e catalano, in base ad analisi genetiche e morfologiche del capolino (Foury, 1989). I dati molecolari finora raccolti, confermano così come osservato morfologicamente, che il *C. cardunculus* non possa essere considerato omogeneo, in quanto è possibile fare una distinzione in due pool genici importanti: quello *orientale* (*C. cardunculus* L., subspecies *cardunculus*) caratterizzato da piante di taglia più piccola con lunghe spine sia sulle foglie che sulle brattee; quello *occidentale* (*C. cardunculus* subspecies *flavescens* Wikl.) costituito da piante con capolini più grandi, con spine ridotte sulle foglie e sulle brattee (Wiklund, 1992; Pignone e Sonnante, 2009).

I risultati dello studio di Gatto et al., (2013) hanno confermato come il cardo selvatico occidentale (Spagna e Portogallo) sia più vicino geneticamente al cardo coltivato (Wiklund, 1992; Foury, 1989; Sonnante et al., 2008). Inoltre, escludendo dall'analisi i genotipi occidentali, gli stessi autori hanno evidenziato come il cardo selvatico tunisino sia più distante geneticamente dal gruppo selvatico orientale, che comprende i genotipi italiani, greci e maltesi.

I risultati sull'analisi della diversità in cardo selvatico e coltivato proveniente da diversi paesi del Mediterraneo evidenziano come il cardo coltivato proveniente dal sud Italia presenti una maggiore diversità rispetto agli altri analizzati (Gatto et al., 2013). Questi risultati sono in accordo con quelli di studi precedenti condotti su dati storici ed etno-botanici (Pignone e Sonnante, 2004), che suggeriscono che il carciofo coltivato sia stato domesticato nel sud dell'Italia, in Sicilia, anche se non è da escludere che il processo di domesticazione abbia coinvolto anche la Sardegna (Figura 1) (Sonnante et al., 2007a).

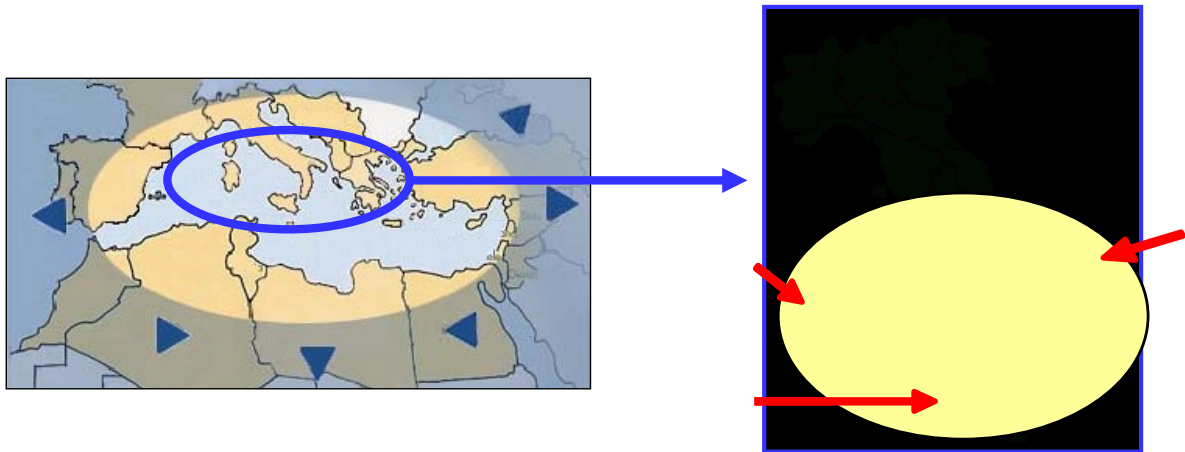


Figura 1 - Putativi areali di domesticazione del carciofo coltivato

Dal confronto dei dati sul processo di evoluzione e domesticazione del carciofo coltivato è stato possibile approfondire il processo di evoluzione dalla specie selvatica, delle due colture coltivate (cardo e carciofo), che presentano un sistema riproduttivo diverso all'interno della stessa specie (Gatto et al., 2013). Alcuni autori suggeriscono che il carciofo coltivato ed il cardo coltivato siano due colture semi-domesticate (Dempewolf et al., 2008), altri suggeriscono che esse siano state domesticate in tempi ed in luoghi differenti (Pignone e Sonnante, 2004; Sonnante et al., 2007b). Recentemente Gatto et al. (2013) hanno proposto due ipotesi. La prima è che il carciofo coltivato sia stato domesticato in tempi antecedenti al cardo coltivato a partire dal cardo orientale selvatico presente in Sicilia o nord Africa e che il cardo coltivato si sia originato dal cardo selvatico occidentale. La seconda ipotesi, proposta dagli autori come più realistica anche in base alla distribuzione geografica della specie, suggerisce che il cardo selvatico orientale rappresenti la forma ancestrale del cardo selvatico, da cui si sono successivamente originati sia il carciofo che il cardo coltivati. Quest'ultimo sarebbe successivamente tornato ad una forma ferale dando origine al cardo selvatico occidentale.

Qualunque sia l'origine della domesticazione del carciofo e del cardo, entrambe le forme coltivate rappresentano il risultato della pressione selettiva operata dall'uomo, attraverso il processo di domesticazione che ha lo scopo di selezionare quei caratteri ai fini dell'utilità della pianta stessa, vale a dire le dimensioni e colori dei capolini, la presenza o l'assenza delle spine etc., portando in questo modo allo sviluppo di nuove varietà. Tali evidenze, riscontrate non solo da un punto di vista morfologico, ma anche da un punto di vista molecolare rappresentano un punto di partenza fondamentale per avviare un processo di miglioramento genetico del carciofo coltivato, che permetta di estrarre dal gene pool selvatico

geni utili nella resistenza a malattie o stress ambientali o per altri caratteri morfologici, organolettici e curativi di particolare interesse (Pignone e Sonnante, 2009).

1.2 Diffusione

Il carciofo è una pianta erbacea, robusta e perenne a propagazione vegetativa, anche se inizialmente la sua coltivazione avveniva prevalentemente per via sessuata. Infatti questi diversi tipi di coltivazione hanno portato allo sviluppo di tipi varietali in grado di adattarsi in differenti aree (Foury, 1979). Circa il 90% della superficie coltivata nel mondo è concentrata nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo: Italia, Spagna, Francia, Grecia, Tunisia, Algeria, Marocco, Egitto, Turchia e Israele.

Nel mondo la coltivazione del carciofo investe una superficie di poco inferiore ai 130.000 ha con una produzione totale di 1.327.000 t (FAO 2011). In America, il maggior produttore di carciofi è il Perù (141,4 mila t), in Africa l'Egitto (176,3 mila t) in Asia il paese leader è la Cina (63.580 t).

Tra i paesi dell'Unione Europea l'Italia occupa una posizione predominante, con una produzione di 481,5 mila t, circa il 40% della produzione mondiale, su una superficie di 50.257 ha, a seguire la Spagna con 209,0 mila t su 16.606 ha e al terzo posto la Francia con 9.433 ha (FAO 2011).

In Italia, secondo dati ISTAT (2009), le regioni in cui il carciofo è maggiormente diffuso sono la Puglia con 17.085 ha e 173.448 t di capolini prodotti, a seguire la Sicilia con 14.240 ha e 159.064 t, al terzo posto la Sardegna con i 12.952 ha e 106.860 t che insieme rappresentano l'84,4% dell'intera produzione nazionale, seguono la Campania (2.003 ha), il Lazio (800 ha) e la Toscana (576 ha).

Negli ultimi anni in Italia la coltivazione di carciofo ha riscontrato diverse difficoltà soprattutto da un punto di vista economico, limitando pertanto la produzione delle carciofaie e la qualità dei capolini, rendendo la coltura poco competitiva (Bianco e Calabrese, 2009).

Spagna e Francia sfruttano la loro organizzazione in maniera compatta tale da soddisfare le esigenze della grande distribuzione, contrariamente a quanto riesce a fare l'Italia (Bianco e Calabrese, 2009).

1.3 Classificazione e caratteristiche botaniche

Il genere *Cynara* appartiene alla famiglia delle Asteraceae o Compositae. Questo genere comprende il complesso *Cynara cardunculus* al quale appartengono il carciofo coltivato (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), il cardo coltivato (*C. cardunculus* var. *altilis*) e il cardo selvatico (*C. cardunculus* var. *sylvestris*). Inizialmente la forma coltivata era considerata una specie separata, studi recenti hanno dimostrato che deriva dalla forma *wild-type* (Pignone e Sonnante, 2009). Le specie appartenenti a questo genere presentano un corredo cromosomico diploide ($2n=2x=34$) (Scarascia Mugnozza 1969).

Da un punto di vista botanico il carciofo è classificato come una pianta erbacea poliennale. Con l'accrescimento della pianta diventa sempre più evidente l'aspetto rizomatoso del fusto, detto anche ceppo o ceppaia, dal quale, in posizione basale, si dipartono germogli detti carducci, che originano foglie grandi alterne di colore verde più o meno intenso o talvolta grigiastre nella parte superiore. Lo sviluppo dei carducci non avviene in contemporanea, per questo motivo si possono trovare germogli di età differente. Le foglie possono raggiungere fino a 150 cm di altezza, sono riunite a rosetta, e provviste di nervature, solitamente le foglie giovani hanno il lembo lobato mentre quelle adulte bipennatosetto, la presenza o l'assenza di spine è una caratteristica varietale. Lo scapo florale viene emesso in autunno nelle cultivar rifioranti e in primavera in quelle non rifioranti. All'estremità di ogni ramificazione (1°, 2°, 3° e 4° ordine) si sviluppa un capolino di dimensioni decrescenti, man mano che aumenta l'ordine di ramificazioni. La forma e il colore dei capolini differiscono a seconda della cultivar.

Ogni capolino comprende una parte basale (il ricettacolo carnoso), sul quale sono inseriti i fiori di colore violaceo detti "*flosculi*"; tra i fiori, sono presenti, sul talamo, numerose setole bianche che costituiscono il "*pappo*". Il complesso di fiori e setole nei primi stadi viene indicato con il nome di "*peluria*". Sul ricettacolo si inseriscono le brattee o squame, le più interne tenere e carnose, le più esterne consistenti e fibrose. Il ricettacolo carnoso e le brattee interne costituiscono la porzione edule del carciofo, comunemente detto "cuore". Il frutto è un achenio allungato di colore bruno, unito al calice trasformato in pappo, per favorire la disseminazione. Il colore è variabile dal grigio chiaro al marrone scuro, con delle differenze a seconda della *cultivar* (Bianco, 1990).

La morfologia florale ed il meccanismo di antesi impediscono normalmente l'autoimpollinazione, per cui la fecondazione avviene per opera degli insetti. La moltiplicazione del carciofo avviene per via gamica (tramite il seme) o per via agamica utilizzando l'ovulo, il pollone o carduccio o porzioni del ceppo (Bianco e Pimpini, 1990).

1.4 Caratteristiche qualitative

Fin dall'antichità, il carciofo è stato considerato una pianta molto importante anche per le sue proprietà terapeutiche, in quanto è costituito da composti che presentano effetti benefici e come tale viene considerato un ottimo diuretico, coleretico, epatoprotettore e stimolante gastro-intestinale. E' indicato nelle diete in quanto è l'ortaggio tra i più ipocalorici ma dall'altissimo valore nutritivo (Cannella, 2009). Da sempre gli estratti di carciofo sono stati utilizzati dalla medicina tradizionale per la presenza di diversi componenti importanti per la nostra salute (Miccadei et al., 2004). Nel carciofo infatti, sono presenti varie sostanze: sali minerali (ferro, sodio, potassio, calcio etc), fibra, provitamine (carotenoidi: luteina), vitamine (tiamina, riboflavina, vitamina C ecc...) e composti fenolici a loro volta suddivisibili in acidi idrossicinnaminici (es. acido clorogenico, caffeico, ferulico), antociani (es. cianidine 3-caffeilglucosidi) e flavonoidi (es. luteolina, apigenina, quercetina) (Alamanni et al., 2001).

I capolini contengono circa il 15 % di sostanza secca e hanno un'elevata qualità nutrizionale e dietetica, sia per il contenuto in proteine (2,9 % di sostanze azotate) che di aminoacidi, fra i quali sono particolarmente rappresentati l'acido aspartico, l'acido glutammico, l'arginina, la prolina, la leucina, la lisina e l'alanina (Lattanzio et al., 1979), che per il valore energetico (6,8 % di carboidrati) (Munoz, 2005).

Importante anche la presenza di altri composti definiti "non nutrienti" ma che svolgono azioni protettive di grande interesse per la salute umana quali: l'inulina, la cinarina e i fitosteroli (Cannella, 2009).

L'inulina, è un carboidrato appartenente al gruppo dei frutto-oligosaccaridi, composto endogeno di notevole interesse, ha attività dietetica, è resistente agli attacchi enzimatici nello stomaco mentre nell'intestino ha un'azione equilibratrice sulla microflora intestinale.

La cinarina (estere dicaffeico dell'acido chinico) è quella sostanza che conferisce il sapore amarognolo alla pianta, ha attività diuretica e coleretica e favorisce la secrezione biliare a livello delle cellule epatiche (Cannella, 2009). Studi recenti hanno dimostrato che gli estratti del carciofo sono efficaci contro l'aterosclerosi in quanto riducono la produzione di colesterolo e aumentano la secrezione biliare (Cannella, 2009).

I fitosteroli sono dei composti steroidei la cui funzione principale è quella di inibire la produzione di colesterolo nell'intestino esercitando un'azione ipocolesterolemizzante (Cannella, 2009)

Sono altresì presenti principi bioattivi ad attività chemioprotettiva, in quanto la parte edule, oltre alle foglie, contiene sostanze polifenoliche le cui concentrazioni variano in relazione allo stato di accrescimento e sviluppo della pianta. Le principali molecole

appartengono alla famiglia dei flavonoidi e degli acidi caffeolchinici. Tra i flavonoidi: la luteolina, l'apigenina, la quercetina, lo scolimoside e il ciranotriossido. Tra gli acidi caffeolchinici: l'acido clorogenico, l'acido caffeico, l'acido criptoclorogenico e l'acido ferulico (Rondanelli et al., 2009). Si tratta di composti in grado di proteggere numerose molecole biologiche, come proteine, DNA e lipidi dai danni ossidativi dovuti all'azione dei radicali liberi (Gebhardt, 1997; Brown e Rice-Ewans, 1998; Perez Garcia et al., 2000) La presenza e/o la concentrazione dei diversi composti varia sia in relazione ai diversi organi della pianta (foglie, capolini, radici) che all'età della stessa.

1.5 Classificazione agronomica

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 morfo-metriche dei capolini. Considerando l'epoca di raccolta, si distinguono varietà a produzione autunnale e varietà a produzione primaverile, vale a dire:

- **Precoci:** appartengono le varietà dette anche riflorenti, la cui produzione avviene da ottobre novembre e continua in primavera a volte fino a maggio. Queste varietà sono generalmente caratterizzate da un capolino medio-piccolo. Queste comprendono quelle coltivate al Sud e nelle isole (gruppo dei Catanesi e degli Spinosi).
- **Tardive:** si tratta in prevalenza di varietà coltivate nelle aree costiere dell'Italia centro-settentrionale (Romanesco e Violetto di Toscana) la cui produzione può durare da febbraio-marzo fino a maggio-giugno. Questi carciofi sviluppano un capolino molto più grande, rispetto alle cultivar precoci.

La classificazione da un punto di vista morfologico basa la suddivisione delle varietà in:

- **Spinosi:** hanno la caratteristica di avere un capolino di forma conica con grandi spine. Come ad esempio lo Spinoso di Albenga, lo Spinoso di Sicilia e lo Spinoso Sardo. Il loro ciclo solitamente è precoce, rappresenta un'eccezione lo Spinoso di Palermo il quale ha un ciclo tardivo.
- **Non spinosi:** questi capolini si presentano generalmente allungati e di forma da ellissoidale a cilindro-conica con sfumature di colore viola, ne sono un classico esempio il violetto di Toscana e il Catanese. Anche il diffuso Romanesco è una cultivar inerme con capolini di colore violetto e forma sferica.

All'interno di queste classificazioni possono essere riscontrate numerose altre differenziazioni, quali per es. colore, forma, dimensioni del capolino. L'Italia tutt'oggi è considerata uno dei Paesi più ricchi in biodiversità cinaricola. Studi recenti hanno dimostrato che l'elevata biodiversità in questa specie ha permesso di incrementare la qualità del prodotto sia in termini di continuità temporale (elevato numero di capolini di ordine superiore al 1°) sia nel diversificare le caratteristiche morfologiche (pezzatura, forma, colore etc...), consentendo un maggior riscontro economico da parte degli agricoltori (Mauromicale et al., 2011). Nonostante la cinaricoltura italiana presenti un'elevata biodiversità essa si basa per lo più sulla coltivazione di pochi tipi varietali che, per diverse caratteristiche, hanno riscosso interesse da parte di cinaricoltori e consumatori (Mauromicale et al., 2011). La salvaguardia della biodiversità nel carciofo dovrebbe essere sfruttata per la ricerca e sviluppo di nuovi genotipi e l'identificazione di differenti e nuovi areali di produzione.

1.6 Impianto e coltivazione

La coltivazione del carciofo può avere una durata variabile da 1-2 anni, fino a 8-10 e più. In Puglia, Sicilia e Sardegna viene espantato dopo 1-2 anni, mentre nel Lazio e in Toscana la sua durata può variare dai 3-4 anni fino a 8-10 anni (Muroni, 2006).

L'impianto della carciofaia (Figura 2) può avvenire attraverso la propagazione vegetativa (riproduzione clonale) o per seme. Per la propagazione vegetativa si utilizzano ovuli, carducci, parti di ceppo e piantine ottenute da colture in vitro, di seguito se ne riporta una breve descrizione:

- *Propagazione per ovuli*: sistema utilizzato soprattutto nelle regioni (sud Italia, Sardegna compresa) in cui si pratica la forzatura che consente, con varietà idonee (riflorenti), l'anticipo dell'entrata in produzione delle piante. Gli ovuli sono porzioni legnose prelevate dal rizoma delle piante provvisti di gemma apicale e gemme laterali. Misurano mediamente 3-5 cm di lunghezza e 1-2 cm di diametro. Il prelievo dalle piante madri entrate in riposo vegetativo in tarda primavera, avviene all'inizio dell'estate. Gli ovuli più idonei per il nuovo impianto sono quelli che si formano nella parte più profonda del ceppo perché raggiungono dimensioni maggiori con più sostanze di riserva e perciò in grado di originare piante più precoci e produttive.



Figura 2 - Carciofaia nella fase che precede l'emissione dei capolini

- *Propagazione per carducci*: pratica colturale tipica delle regioni centro-settentrionali dove non si attua la forzatura. I carducci sono germogli che si sviluppano dal rizoma dal quale vengono prelevati perché in grado di radicare e produrre perciò una nuova pianta. Vengono prodotti durante l'intero ciclo colturale, dall'autunno alla primavera. I migliori da mettere a dimora sono lunghi 20-40 cm, presentano 4-5 foglie e un sufficiente numero di radici utili per un pronto attecchimento. Una buona radicazione può essere ottenuta con un passaggio in vivaio prima dell'impianto definitivo.
- *Propagazione per parti di ceppo*: come per gli ovuli, l'impianto avviene precocemente in estate per le varietà dotate di rizoma poco sviluppato e che differenziano pochi ovuli o quando, in annate particolari per accidentali squilibri, gli ovuli non si differenziano (Muroni 2006). I ceppi espantati vengono frazionati per produrre le "zampe" che messe a dimora origineranno le nuove piante. Il sistema non ha grande diffusione perché origina impianti non uniformi e con accentuata scalarità di produzione.
- *Propagazione da piantine ottenute da coltura in vitro*: le piante prodotte attraverso la micropropagazione di apici vegetativi prelevati da carducci vengono destinate alla produzione di materiale da propagazione (ovuli o carducci). I vantaggi derivanti da questa tecnica sono dovuti alla possibilità di produrre piante libere da microrganismi patogeni (funghi e batteri) e da virus (Bianco, 1990). Altri vantaggi sono legati al maggiore vigore vegetativo, uniformità, contemporaneità di emissione dei capolini e produttività della coltura. Uno dei problemi da risolvere con l'utilizzo di questa tecnica

riguarda la perdita di precocità con un ritorno allo stadio giovanile delle piante, che si manifesta nelle cultivar rifioranti (Frau et al., 2007).

L'impianto per seme è una tecnica poco diffusa perché legata alla possibilità di disporre di varietà idonee ottenute con il miglioramento genetico. Si possono utilizzare seminatrici che mettono a dimora gli acheni su letto di semina perfettamente preparato, a profondità di circa 2 cm. La semina viene eseguita entro l'estate. Nel caso si utilizzassero sementi ibride, il loro elevato costo obbliga il passaggio in vivaio per l'ottenimento di piantine in contenitori alveolati (Micozzi et al., 2009).

Le epoche in cui le carciofaie vengono impiantate sono riferibili a 3 periodi dell'anno:

1. *Impianto estivo*: viene attuato a partire dalla seconda metà di giugno fino ai primi di agosto nelle aree irrigue dell'Italia meridionale, Sardegna compresa. Si determina in tal modo la forzatura della coltura utilizzando gli ovuli come materiale di propagazione. I primi capolini saranno sul mercato già da ottobre.
2. *Impianto autunnale*: viene eseguito tra ottobre e novembre e lo sviluppo delle piante, a partire da carducci, avviene grazie alle favorevoli condizioni climatiche che si verificano nelle regioni meridionali. Per la carciofaia impiantata in autunno i primi capolini si avranno in primavera ma la maggior parte della produzione commerciale avverrà a partire dal secondo anno.
3. *Impianto primaverile*: è l'unica modalità possibile nelle regioni settentrionali a clima freddo. L'impianto viene eseguito utilizzando carducci provenienti da piante in piena attività vegetativa. Anche in questo caso si tratta di carciofaie poliennali che iniziano a produrre a partire dal secondo anno.

1.7 Miglioramento genetico

Il carciofo è una specie che negli ultimi anni ha mostrato una progressiva riduzione nella produttività, diverse sono le problematiche che hanno portato a questa situazione, un esempio può essere l'assenza di attività vivaistica innovativa, l'aumento dei prezzi per le cure della raccolta, la difficoltà nel gestire le colture a causa della variabilità che si riscontra nelle coltivazioni. Queste si basano sulla coltivazione di piante propagate per via vegetativa, caratterizzate spesso da un elevato livello di variabilità fenotipica.

In Italia la biodiversità presente a livello locale e sfruttabile col miglioramento genetico è scarsamente conosciuta, tanto che spesso si fa confusione sulla classificazione del germoplasma disponibile e capita anche che una stessa popolazione possa essere indicata con diversi sinonimi in relazione al materiale di provenienza. Ad esempio il Catanese viene definito Siracusano, Niscemese, Gagliardo ecc.

Il panorama varietale italiano è stato essenzialmente creato mediante un processo di selezione all'interno di ecotipi locali propagati tramite ovoli, carducci e parti di ceppaia (Saccardo, 2009). L'aspetto negativo del miglioramento genetico mediante propagazione agamica è che sfrutta solo la variabilità genetica e eventuali mutazioni presenti all'interno della popolazione, ma in particolare comporta la creazione di carciofaie altamente inquinate da patogeni e virus (Saccardo, 2009). Data l'importanza economica che riveste la coltura del carciofo a livello mondiale e soprattutto in Italia, è necessario sviluppare nuove varietà e ibridi in modo da rispondere alle esigenze del mercato sempre più attento anche agli aspetti nutrizionali e terapeutici a cui questa coltura può dare risposte significative.

Obiettivi importanti nel miglioramento genetico del carciofo devono essere volti alla creazione di varietà più produttive, con una maggiore contemporaneità di emissione di capolini, resistenti ad attacchi parassitari e agli stress idrici e termici (freddo in particolare), nonché ad importanti fisiopatie quali l'atrofia del capolino a cui sono soggette soprattutto le varietà precoci rifioranti.

Così come ormai per tutte le colture, anche per il miglioramento genetico del carciofo si rendono necessario metodologie innovative.

A tal proposito sono state messe a punto delle metodiche di analisi molecolare (es. marcatori molecolari SSR o AFLP) con lo scopo di ottimizzare i programmi di *breeding* e selezione per migliorare le caratteristiche produttive e qualitative della specie (Lanteri e al 2004b). Le tecniche di analisi molecolare hanno, inoltre, trovato applicazione nella caratterizzazione varietale consentendo di rendere identificabili, proteggere i diritti del produttore e distinguere ecotipi varietali riconosciuti come prodotti DOP (Lanteri e al. 2006).

Le potenzialità del miglioramento genetico, quindi, mirano ad approfondire le conoscenze relative alle regioni genomiche coinvolte nell'espressioni di caratteri agronomicamente utili, dalla produttività alla precocità e alla resistenza agli stress.

Questo tipo di analisi non si limita a un processo di selezione clonale ma anche all'impiego di tecniche di ingegneria genetica e di selezione assistita attraverso l'utilizzo di tecniche molecolari ormai collaudate ed efficaci in molte specie.

1.8 Selezione Clonale

Il miglioramento genetico del carciofo è consistito principalmente in un lavoro di selezione nell'ambito di varietà multiclionali (Saccardo, 2009). È risaputo che il carciofo in generale e soprattutto le varietà rifioranti, presentano delle difficoltà alla riproduzione per seme, per questo motivo vengono applicati programmi di selezione clonale con lo scopo di migliorare geneticamente le varietà commercialmente più interessanti (Mallica et al., 2004). Gli esempi di nuove costituzioni varietali per questa specie non sono molti, tra questi, i più significativi sono rappresentati dal Terom e Tema 2000, selezioni clonali derivate dal "Violetto di Toscana" ed i cloni "C3" e "C4" ottenuti dal "Romanesco" (Mallica et al., 2004).

Il processo di selezione clonale consiste nell'identificare all'interno di varietà multiclionali, individui particolarmente promettenti per caratteristiche produttive e qualitative che possano garantire stabilità genetica ed essere riprodotti attraverso razionali tecniche vivaistiche. Base di partenza per la scelta dei materiali su cui operare la selezione deve essere l'esplorazione della diversità presente negli areali di coltivazione della varietà.

In Sardegna dalla seconda metà degli anni settanta l'Agenzia AGRIS (Agenzia Regionale per la Ricerca Scientifica) presso le sue aziende ha avviato un'attività di selezione clonale sulla varietà "Spinoso Sardo". I criteri di scelta delle piante su cui operare la selezione sono stati:

- elevata produttività,
- precocità nell'emissione dei capolini,
- ramificazione dello scapo florale,
- contemporaneità dell'emissione dei capolini principali,
- resistenza all'atrofia del capolino.

Per la varietà "Spinoso Sardo" sono stati necessari numerosi cicli di selezione per ottenere un numero sufficiente di cloni. Si tratta di un'attività tutt'ora in corso ma che ha

portato nel tempo all'individuazione di cloni con caratteristiche interessanti (Mallica et al., 2004).

La selezione clonale è una tecnica efficace e come tanti altri processi presenta anche molti svantaggi. Tra questi ultimi sono considerati degli esempi significativi (Martometti, 2003):

- l'insorgenza di malattie facilmente trasmissibili tra le piante,
- alterazioni dello stato fisiologico,
- il manifestarsi di mutazioni;
- inoltre è una tecnica molto lenta e soprattutto molto costosa per le numerose manipolazioni necessarie al controllo durante la riproduzione.

Affinché la selezione clonale possa portare un effettivo e duraturo miglioramento alle coltivazioni è necessario che sia accompagnata da adeguate tecniche vivaistiche che garantiscano l'uniformità del materiale e un'ottimale stato sanitario.

1.9 Panorama varietale Italiano

La coltivazione di carciofo trova le condizioni ottimali di crescita nelle regioni centro meridionali, essendo una coltura tipica dell'areale mediterraneo (Musu, 2011). In Italia la maggior parte della produzione cinaricola viene affidata a tipi varietali propagati per via agamica, altamente eterozigoti e caratterizzate da una composizione varietale multiclonale a base genetica molto ampia (Lanteri et al., 2001; Lanteri et al., 2004; Portis et al., 2005).

I criteri d'identificazione varietale sono generalmente ricondotti a cinque parametri principali:

- Forma del capolino: cilindrica, conica, ovoidale, sferica;
- Precocità rispetto all'epoca di inizio raccolta: precoci, medio precoci, intermedi, medio tardivi, tardivi;
- Epoca d'inizio di raccolta (autunnali, primaverili);
- Presenza o assenza di spine: inermi (foglie o capolini inermi); poco spinescenti (foglie inermi e capolini spinescenti); spinescenti (foglie e capolini spinescenti);
- Colore delle brattee esterne: verde-chiaro, verde, verde intenso, verde con sfumature violette, verde con sfumature violette all'apice, violetto con sfumature verdi, violetto, violetto intenso (Dellacecca et al., 1974).

Come detto in precedenza (vedi paragrafo Diffusione) la coltivazione di carciofo è concentrata prevalentemente nel sud dell'Italia e nelle Isole. Nelle diverse regioni prevalgono differenti tipi varietali. In particolare in Sicilia la varietà più diffusa è il “Violetto di Sicilia” (Figura 3), coltivato prevalentemente sul versante orientale dell'Isola, assume diverse denominazioni a seconda della zona di provenienza degli organi di moltiplicazione, per esempio “Catanese”, “Niscemese”, “Siracusano” *etc.*



Figura 3 - Tipo varietale “*Violetto di Sicilia*”

Si tratta di una varietà precoce (inizio produzione a settembre – ottobre) caratterizzata da capolini di medie dimensioni, di forma conica e di colore violaceo (Mauromicale 1987) con un'elevata capacità produttiva anche se soggetta a fenomeni di atrofia del capolino che causa spesso grosse perdite di prodotto (Lo Monaco, 2012). Sul versante occidentale della Sicilia si coltiva il “Violetto Spinoso di Palermo”, costituito da capolini di medie dimensioni, ovoidali, di colore verde e sfumature violette con spine di colore giallastro.

In questa regione viene anche coltivato il “Violetto di Toscana” (Figura 4) costituito da capolini inermi, di forma ovoidale-allungata con brattee di colore violaceo (Mauromicale e Ierna, 2000).



Figura 4 - Tipo varietale “*Violetto di Toscana*”

In Puglia il panorama varietale è più ampio, le varietà maggiormente diffuse sono “Centofoglie di Rutigliano”, “Carciofo di Monopoli”, “Molese tardivo”, “Verde di Putignano”, “Violetto di Putignano”, “Bianco tarantino”, “Carciofo di Carovigno”, “Carciofo di Lucera”, “Carciofo del Salento”.

Altre varietà diffuse in diverse regioni sono: “Locale di Cuneo”, “Moretto”, “Locale di Fano”, “Precoce di Jesi”, “Violetto di Chioggia”, “Tonda di Paestum” (Figura 5), “Violetto di Teramo”, “Violetto di Albenga” (Mauromicale e Ierna, 2000).



Figura 5 - Tipo varietale “*Tonda di Paestum*”

In Sardegna lo “Spinoso Sardo” è la varietà prevalente, coltivata su circa il 45% dei 13.200 ha investiti a carciofaia (Stima Agenzia Laore Sardegna, 2013), il 18% è coltivato con la varietà “Tema 2000” e circa 11% è coltivato con “Violetto di Provenza”, “Romanesco” e altre varietà tra cui il “Masedu” il cui nome in lingua sarda significa “senza spine”. Si presenta come una pianta di piccole dimensioni caratterizzata con un capolino di forma cilindrica di medie dimensioni e brattee di colore verde con sfumature violacee. L’epoca di produzione è precoce, con produzione di circa 7-8 capolini per pianta, anch’essa è soggetta, come lo “Spinoso Sardo”, all’atrofia del capolino (Pisanu et al., 2009).

In Campania e nel Lazio è presente circa il 5% della produzione nazionale dove ritroviamo la tipologia “Romanesco” (Figura 6) che produce capolini di grandi dimensioni, globosi, caratterizzati da una produttività tardiva (inizio Febbraio-Marzo). Riconducibili a tale tipologia, sono le varietà “Castellamare”, il “Campagnano”, il “Grato” e il clone Romanesco “C3” (Mauromicale, 1987). Tale cultivar presenta ottime caratteristiche organolettiche dei capolini e una buona contemporaneità di emissione degli stessi. Lo svantaggio è l’elevato costo del materiale di propagazione e la produzione di capolini secondari di scarsa idoneità per l’industria conserviera (Mauromicale, 1987).

Una certa diffusione stanno avendo alcuni tipi varietali di provenienza estera, un esempio dei quali è rappresentato dal “Violetto di Provenza”, coltivato in maniera crescente in Sicilia, Puglia e Sardegna (Mauromicale e Ierna, 2000).



Figura 6 - Tipo varietale “Romanesco”

1.10. Il tipo varietale Spinoso Sardo

In Sardegna il carciofo rappresenta la principale coltura ortiva. La cultivar di maggior diffusione è lo *Spinoso Sardo* (Figura 7). Secondo una stima dell’Agenzia regionale di assistenza tecnica (Laore), gli ettari destinati a questa varietà erano così ripartiti: Campidano di Cagliari e Sulcis (circa 2.300 ha), Oristanese (circa 1.000 ha) e Sassarese (circa 2.500 ha) (Cadinu et al., 2007). Negli ultimi anni si assiste però ad una progressiva riduzione delle superfici coltivate con questo ecotipo, dovuta principalmente all’azione di patogeni che hanno danneggiato il materiale di propagazione e di conseguenza ridotto il potenziale produttivo (Pisanu et al., 2013). Da circa vent’anni l’Agenzia Agris presso le proprie aziende ha condotto un programma di selezione clonale per lo *Spinoso Sardo* che ha consentito di individuare dei cloni con distinte caratteristiche morfologiche e qualitative per tre dei quali è stata richiesta l’iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà (Pisanu, et al., 2013). Il tipo *Spinoso Sardo* è caratterizzato da piante di altezza variabile tra i 70 e i 140 cm, le foglie hanno dimensioni differenti soprattutto nei primi stadi vegetativi, costituite da spine gialle sulle brattee e di colore verde con ampie sfumature violette-brunaste, lobate e pennatosette. Il capolino ha dimensioni medie con altezza 13 cm e diametro 7,5, la forma è conico-allungata e mediamente compatta.



Figura 7 - Tipo varietale “Spinoso Sardo”

Le brattee esterne sono di colore verde con sfumature violette. Si tratta di una cultivar rifiorente, soggetta all'atrofia del capolino soprattutto laddove viene praticata la forzatura, per la produzione fuori stagione (Pisanu et al., 2009). Il ciclo produttivo inizia a ottobre e continua fino a gennaio-febbraio e in media, ogni pianta produce da 8 a 10 capolini il cui peso è compreso fra i 160 e i 220 g (Pisanu et al., 2009).

La produzione cinaricola nell'Isola non è solo destinata all'autoconsumo ma è una produzione specializzata orientata verso altri mercati, soprattutto nel Nord dell'Italia dove lo *Spinoso Sardo* è particolarmente apprezzato. Una politica commerciale rivolta ai mercati nazionali e internazionali necessita, quindi, di valorizzare il prodotto tutelandolo attraverso il marchio DOP. Negli ultimi anni la Regione Sardegna ha cercato di migliorare sempre di più le produzioni cinaricole con l'intento di tutelare i produttori e i consumatori di *Spinoso sardo*, ma soprattutto di ottenere il Marchio DOP da parte dell'U.E.. Obiettivo raggiunto il 25 Febbraio 2011, con la pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della proposta di disciplinare per la DOP (Denominazione per Origine Protetta) per il "Carciofo Spinoso di Sardegna" (Gazzetta Ufficiale n° 52, 2011).

L'utilizzo di strumenti di valutazione sicuri può coadiuvare un processo di valorizzazione delle produzioni. Tra questi strumenti un ruolo importante è rivestito dalle tecniche di analisi molecolare del DNA (marcatori molecolari). Questo tipo di analisi permette di raggiungere dei livelli di conoscenza del prodotto molto più affidabili rispetto a metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteri morfologici, che sono facilmente influenzabili dall'ambiente, e consente perciò di rispondere ai requisiti di tracciabilità sempre più richiesti soprattutto per i prodotti di pregio.

1.11 Il cardo selvatico

In Italia il cardo selvatico è diffuso soprattutto in Sicilia, Sardegna, isole minori e in diverse regioni meridionali, sebbene alcune popolazioni siano state individuate anche in Maremma Toscana e nel Teramense. Gli habitat che colonizza sono rappresentati soprattutto da terreni aridi e incolti, anche se cresce meglio in terreni profondi, argillosi e ben esposti al sole. Essendo una specie mediterranea non è in grado di sopravvivere a inverni rigidi, pur tollerando temperature di -5° C. Il cardo selvatico è una specie poliennale, prevalentemente allogama ad impollinazione entomofila realizzata per la maggior parte da api. Presenta foglie cotiledonari obovali lunghe 3-5 cm. con apici arrotondati generalmente glabri o ricoperti da corti peli. Le prime foglie sono ellittiche, lunghe 3-20 cm e dotate di sottili spine gialle. La plantula produce nel primo anno di vita un profondo fittone e foglie disposte a

rosetta che muoiono generalmente alla prima estate per essere rimesse ad inizio autunno con la comparsa delle piogge. Le piante adulte presentano fusti eretti di tipo costoluto e ramificati in prossimità dell'apice. Le foglie basali, lobate o divise, presentano generalmente lobi con spine rigide giallastre, lunghe fino a 2 cm. La pagina inferiore è ricoperta di peli lanosi che vanno dal bianco al grigio. Le foglie apicali sono alternate e decorrenti verso il basso. Le foglie adulte hanno picciolo e nervature spessi e carnosì, che costituiscono un prodotto utilizzato nell'alimentazione. Presenta radici fittonanti e profonde in grado di penetrare anche ad una profondità di circa 2 metri, permettendo alla pianta di sopravvivere in condizioni di carenza idrica. In autunno le gemme radicali producono una nuova rosetta di foglie, mentre in primavera si ha la fioritura, con il disseccamento dei fiori stessi in estate (Quagliotti, 1966). La fioritura avviene generalmente tra aprile e giugno. I capolini fiorali (Fig. 8) hanno un diametro da 3 a 15 cm e posseggono fiori ermafroditi e stighi molto sviluppati, di colore viola o talvolta bianco. Il ricettacolo è ricoperto di una fitta peluria e costituisce anch'esso un prodotto utilizzato nell'alimentazione. I frutti sono acheni, quelli maturi e ben formati si presentano di colore scuro spesso con striature longitudinali dal nero al verde, che diffondono grazie a lunghi pappi piumosi.



Figura 8 - Capolino di cardo selvatico (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*)

Il cardo selvatico è una risorsa naturale di grande pregio che può avere diverse applicazioni soprattutto nel settore industriale come fonte per la produzione di polpa di cellulosa o biocombustibile (Foti *et al.*, 1999; Gominho *et al.*, 2001). Prove di estrazione di olio dagli acheni condotte da Foti *et al.*, 1999 e Curt *et al.*, 2001 indicano la presenza del 24-26% sul peso secco. Si tratta di olio con buone caratteristiche qualitative utilizzabili per scopi alimentari, grazie alla presenza di: *acido oleico* (25%) e *acido linoleico* (59.74%) in rapporto bilanciato e *alfa-tocoferolo* (54.6 mg-100g), simile a quello presente in oli di mais e girasole; inoltre i rimanenti residui di estrazione sono utilizzabili nell'alimentazione animale grazie all'elevato apporto proteico (24%) (Maccarone *et al.*; 1999). La composizione degli acidi grassi ne permetterebbe il suo utilizzo anche a scopo energetico come fonte alternativa (biodisel). (Maccarone *et al.*; 1999) Analogamente alle forme coltivate, anche il cardo selvatico può trovare applicazione nell'industria farmaceutica per l'estrazione di bio-molecole. La grande quantità di biomassa fornita dalla specie selvatica suggerisce la possibile coltivazione per la successiva estrazione di composti utili nella farmacopea (Foti *et al.*, 1999). Test farmacologici eseguiti su estratti di foglie hanno confermato la presenza di sostanze biofarmaceutiche importanti. Tra le principali prevale l'*inulina*, carboidrato complesso del gruppo dei fruttoligosaccaridi (FOS), estraibile dalle radici del cardo selvatico (Causey *et al.* 2000).

L'inulina agisce come una fibra probiotica resistente agli attacchi enzimatici dello stomaco, perciò in grado di arrivare nel tratto intestinale dove svolge un'azione equilibrante a livello della flora batterica. La sua presenza è in grado di favorire l'attività dei fermenti lattici utili per la corretta digestione, a scapito di quelli nocivi; inoltre non altera il tasso glicemico, perciò è utilizzabile anche da parte dei diabetici (Causey *et al.* 2000; Ernest e Feldheim, 2000). Un'altra presenza importante sono le *sostanze antiossidanti*, rappresentate da un gruppo di composti polifenolici di cui si è già trattato a proposito delle caratteristiche qualitative del carciofo, a cui si rimanda. Il cardo selvatico rappresenta anche una sorgente di geni utili per il miglioramento delle specie coltivate nei programmi di *breeding*. Gli incroci di *Cynara cardunculus* var. *scolymus* e *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* danno origine a prole fertile, perciò il cardo selvatico rappresenta il *gene pool* primario per il carciofo coltivato. Per rendere possibili queste applicazioni è necessario disporre di genotipi di cardo selvatico con le migliori potenzialità produttive in funzione delle finalità desiderate: genotipi produttori di maggiori quantità di biomassa quando l'obiettivo desiderato è l'estrazione delle fibre, buoni sintetizzatori di biomolecole se si desidera lo sfruttamento farmaceutico, che abbiano migliori caratteristiche morfometriche se sono destinati al consumo alimentare oppure caratteristiche

genotipiche e genetiche peculiari quando si desidera intraprendere programmi di incrocio o reincrocio per il miglioramento delle forma coltivata. E' necessario perciò condurre la selezione tra le piante che possiedono i caratteri di interesse e, affinché ciò sia possibile, deve esistere variabilità genetica per il carattere in esame. Uno dei possibili approcci, per individuare e studiare la variabilità genetica è la caratterizzazione molecolare delle risorse genetiche relative ad una determinata specie, in seguito si potranno utilizzare le informazioni genetiche ottenute per scegliere tra le piante (o le popolazioni) analizzate quelle più distanti geneticamente al fine di massimizzare la probabilità di avere variabilità genetica anche per altri caratteri di interesse. Il *rationale* si fonda, infatti, sull'assunto che esista una correlazione (positiva) tra distanze molecolari e differenze anche per altri caratteri di interesse. In questo modo, scegliendo piante (o popolazioni) molto distanti geneticamente o lavorando con gruppi di piante in cui è stata massimizzata la diversità molecolare si può accrescere la probabilità che esse siano più variabili anche per altri caratteri, compresi quelli di interesse. I vantaggi possono essere molteplici. Ad esempio, l'esecuzione di incroci con parentali più contrastati geneticamente consente di ottenere progenie segreganti più variabili facilitando lo studio dell'associazione tra marcatori molecolari e caratteri quantitativi o la selezione. Quando l'obiettivo è fare *screening* alla ricerca di individui interessanti per un dato carattere (e.g. resistenze, elevata concentrazione di determinate molecole, etc.) sarà possibile condurre i test, soprattutto i più costosi, su un numero inferiore di piante (quelle più diversificate geneticamente).

Nel caso in cui fossero individuate piante interessanti per un certo carattere, anche per il cardo selvatico potrebbero essere utilizzate le stesse strategie proposte per il coltivato, come la selezione clonale (Deidda, 1967; Abbate e Noto, 1981; Pecaut, 1993; Mauromicale e Copani, 1989), l'incrocio e la selezione su progenie da incrocio (Baznisky e Zohari, 1987, 1994; Miller, 1975; Scarascia-Mugnozza e Pacucci, 1976; Tesi, 1976).

1.12 I marcatori genetici

Un marcatore genetico ideale deve presentare un alto livello di variabilità, deve essere multiallelico, codominante (in grado di discriminare gli omozigoti dagli eterozigoti), non epistatico (vale a dire la manifestazione di un locus non deve essere influenzata dall'informazione genetica presente in un'altra zona del genoma) e non deve essere influenzato dall'ambiente (Tanksley, 1983).

Sulla base delle diverse caratteristiche i marcatori genetici vengono classificati in:

- *Marcatori morfo-fenologici;*

- *Marcatori biochimici;*
- *Marcatori molecolari.*

Il primo gruppo, lo dice la parola stessa, viene utilizzato per analisi fenotipiche. Questo tipo di marcatori non risponde alle caratteristiche sopra elencate infatti presentano degli svantaggi quali (Tanksley, 1983):

- hanno un basso livello di polimorfismo;
- sono influenzati dall'azione dell'ambiente e perciò difficilmente stabili;
- molti di essi necessitano di un determinato stadio della pianta, per poter essere rilevati.

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

I marcatori biochimici o proteici si basano sull'analisi di isoenzimi e proteine enzimatiche. Gli isoenzimi sono forme diverse di un medesimo enzima con la stessa specificità di substrato. Tale polimorfismo dipende da mutazioni che hanno portato alla formazione di serie alleliche multiple allo stesso *locus* (Barcaccia et al., 2000).

I marcatori molecolari si basano sull'analisi del DNA, rivelando punti di variabilità dello stesso (Jones et al. 1997; Winter e Kahl, 1995). Essi rappresentano per la ricerca degli strumenti eccezionali, poiché consentono di identificare specifiche sequenze nucleotidiche e pertanto di analizzare i polimorfismi di particolari geni o regioni cromosomiche.

Tali differenze (polimorfismi) sono dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc. (Barcaccia e Falcinelli, 2006). Il potere discriminante di questi *loci* si basa sull'individuazione di variazioni a livello della sequenza nucleotidica, maggiore è il numero dei polimorfismi, maggiore sarà il potere discriminante del marcatore (Barcaccia e Falcinelli, 2006). Rispetto ad altri marcatori genetici i marcatori molecolari presentano numerosi vantaggi, in quanto: I) coprono qualsiasi parte del genoma (trascritta e non, comprendente quindi anche regioni di regolazione); II) non subiscono interferenza da parte dell'ambiente e dallo stadio di sviluppo della pianta, trattandosi di differenze a livello del DNA; III) non presentano effetti epistatici o pleiotropici e in molti casi sono codominanti, consentendo di distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti; VI) nella maggior parte dei casi i polimorfismi molecolari sono neutri vale a dire che non hanno effetti a livello fenotipico se non quello di permettere di determinare il genotipo (Sias, 2006).

1.12.1 Marcatori microsatelliti nucleari (nuSSR)

I marcatori molecolari SSR (*Single Sequence Repeats*) vengono anche definiti Microsatelliti in quanto piccole sequenze ripetute in tandem da 2 a 6 bp disperse apparentemente a caso per tutto il genoma degli organismi superiori (Schlotteret *et al.*, 2000). Il polimorfismo ad un dato locus microsatellite tra diversi individui è dovuto alla sua variazione di lunghezza, questo dipende da quante volte viene ripetuto il motivo di base. Si ritiene che questa variabilità sia dovuta *in vivo* ad uno slittamento (*slippage*) della DNA polimerasi durante il processo di replicazione (Levinson e Gutman 1987) e/o da crossing-over ineguale durante la meiosi. Questi marcatori sono, inoltre, considerati ideali per la mappatura genica e per la caratterizzazione della diversità genetica sia delle specie forestali che delle colture a livello inter e intra specie e anche inter e intra varietale a causa dell'alto tasso di mutazione (Lee, 1997; Mitchell *et al.*, 1997; Matus *et Hayes* 2002).

Le differenze di lunghezza degli alleli di un locus microsatellite sono analizzabili utilizzando il gel di poliacrilammide che ha un potere di risoluzione elevato (Lagoda *et al.*, 1998). L'uso di sequenziatori si è dimostrato una soluzione ancora più efficiente. I vantaggi dei microsatelliti sono notevoli: sono ripetibili, hanno un elevato polimorfismo, possibilità di automazione e sono codominanti. Gli SSR sono stati proposti per lo studio nei vegetali nel 1993 da Morgante e Olivieri. Da allora hanno trovato applicazioni in moltissimi campi con un notevole impatto nel miglioramento genetico. In particolare sono stati utilizzati per il *fingerprinting* varietale, la costruzione di mappe genetiche, negli studi di associazione con i geni di importanza agraria (*gene tagging*, analisi **QTL**) e in programmi di selezione assistita (**Marker Assisted Selection MAS**) (Gupta e Varshney 2000; Yamamoto *et al.* 2002). Grazie alla codominanza e al multiallelismo hanno trovato larghissimo impiego anche in studi di ecologia e genetica delle popolazioni (Shagai-Marroof *et al.* 1994; Bowers *et al.* 1996; Provan *et al.* 1999; Li *et al.* 2000; Turpeinen *et al.* 2001).

1.12.2 Marcatori microsatelliti plastidiali (cpSSR)

Il genoma del cloroplasto ha generalmente una organizzazione altamente conservata (Raubeson e Jansen, 2005). E' costituito da un singolo cromosoma circolare con una struttura quadripartita che comprende due copie di una ripetizione invertita (IR) di differenti dimensioni, che separano le grandi e piccole regioni a copia singola (LSC e SSC) (Saski., *et al.*, 2007). Negli ultimi anni, la conoscenza dei genomi cloroplastici è in continua evoluzione (Saski *et al.*, 2007). Il DNA cloroplastico ha diverse caratteristiche che lo rendono interessante per studi genetici: non è ricombinate, viene ereditato per via uniparentale ed è aploide (Provan

et al., 2001). Con l'analisi dei cpSSR sono stati condotti diversi studi per es. nelle piante di riso, mais, tabacco. Si conoscono buona parte delle sequenze dei genomi palstidiali, all'interno delle quali è stato possibile studiare la frequenza dei microsatelliti (Powell et al., 1995). Vendramin et al. (1996) hanno dimostrato che è possibile utilizzare oligonucleotidi disegnati per una singola specie anche in specie appartenenti allo stesso genere per esempio nelle *Pinaceae*. Altri autori come Weising a Garner (1999) in *Nicotiana tabacum* hanno identificato un set di *primers* per l'analisi del polimorfismo dei cpSSR in numerose famiglie di Angiosperme, mentre Chung e Staub nel 2003 hanno disegnato 13 *primers* universali basandosi sulla specificità di sequenza di altre specie. Inoltre lo studio di questi marcatori ha permesso di determinare la struttura della variabilità genetica nelle popolazioni vegetali e di capire quale fosse l'influenza dei fattori demografici come la deriva genetica e i *bottlenecks* (Ennos et al., 1999). E' importante sottolineare il fatto che gli ultimi studi relativi ai cpSSR hanno mostrato un livello di polimorfismo intraspecifico spesso superiore rispetto a quello osservato con altri marcatori molecolari. Un esempio è riportato nel lavoro di Provan et al. del 1999, nel quale su diverse specie appartenenti al genere *Oryza*, precedentemente analizzate con cpRFLPs (Provan et al. 1997), quando analizzate con i cpSSRs hanno mostrato un livello di diversità 4 volte superiore. Inoltre, il confronto tra marcatori nucleari e plastidiali ha consentito di arricchire le conoscenze riguardati le relazioni genetiche tra le piante coltivate e i loro progenitori e il ruolo dell'introgresione genica nell'evoluzione delle colture (Doebly, 1992). Il lavoro sui cpSSR portato avanti in questa tesi di dottorato rappresenta uno dei primi contributi allo studio del DNA cloroplastico nel genere *Cynara*.

2. Obiettivi della ricerca

L'obiettivo principale di questa ricerca è stato quello di studiare le caratteristiche del *gene pool* di carciofo coltivato utilizzando marcatori molecolari microsatelliti (SSR), nucleari e citoplasmatici. A tale fine, la ricerca si è articolata perseguendo tre linee di attività:

1) Caratterizzazione genetica di una collezione di varietà di carciofo coltivato.

Il primo obiettivo è stato quello di determinare il livello e la struttura della variabilità genetica presente in una collezione di varietà di carciofo coltivato. Questo rappresenta un prerequisito fondamentale sia per la scelta dei parentali nei programmi di incrocio che per la corretta implementazione di strategie di mappatura genica per associazione (Genome Wide Association Studies, GWAS).

2) Caratterizzazione genetica di una collezione di individui della varietà coltivata «Spinoso sardo».

In questo caso, l'obiettivo della ricerca è stato quello di determinare la quota di diversità genetica SSR nell'ambito della varietà di carciofo Spinoso Sardo, una tipicità della cinaricoltura della Sardegna, insignita della denominazione DOP (Di Origine Protetta). Il fine principale della ricerca è stato quello di stabilire se tale cultivar è un clone o una popolazione multiclone, i.e. un miscuglio di più cloni. Il raggiungimento di questo obiettivo è fondamentale per la messa in atto di adeguate misure di tutela e valorizzazione di tale cultivar, sia direttamente sfruttando i materiali disponibili e diffusi in coltivazione, che utilizzando questi materiali in programmi di miglioramento genetico.

3) Confronto tra la collezione di carciofo coltivato e una collezione di cardo selvatico.

In questo caso le attività hanno mirato a perseguire tre obiettivi:

- Confronto dei livelli di diversità genetica della collezione di carciofo coltivato e quelli di una collezione di cardo selvatico, il progenitore selvatico del carciofo coltivato.
- Stima del grado di divergenza genetica tra il *gene pool* coltivato e quello selvatico.
- Stima del livello di introgressione del *gene pool* selvatico nel *gene pool* coltivato (e viceversa) e studio delle relazioni filogenetiche tra i diversi gruppi di materiale coltivato e selvatico.

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiale vegetale

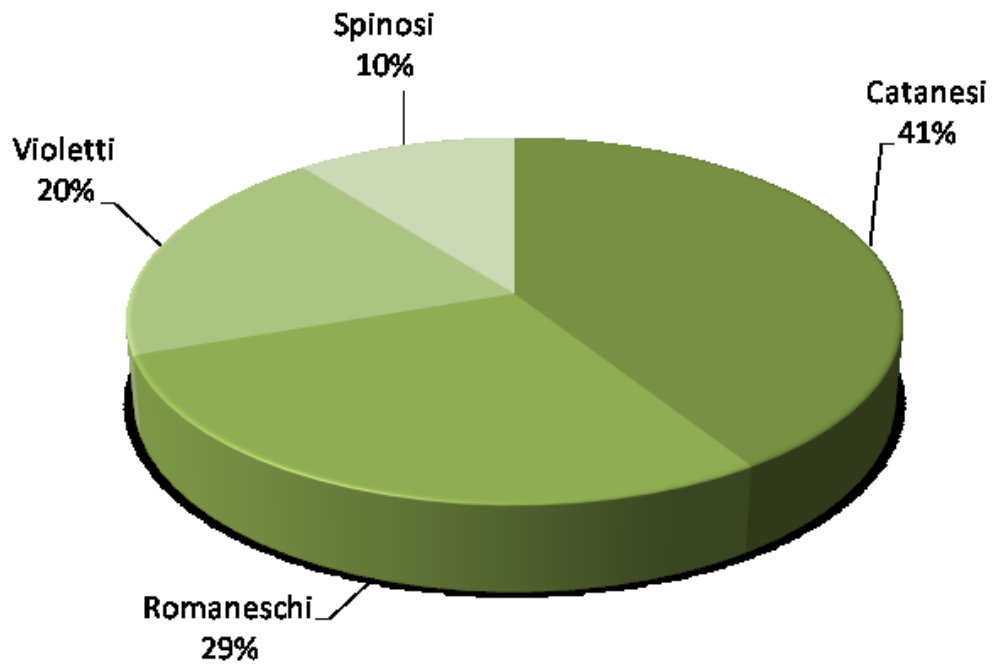
Il materiale vegetale oggetto di studio è costituito da 95 varietà di carciofo coltivato provenienti da diverse aree geografiche del mondo (Italia, Francia, Spagna, Egitto, Argentina, USA e Tunisia) e appartenenti ad una collezione mantenuta presso l'Azienda Palloni dell'AGRIS (Agenzia per la Ricerca in Agricoltura della Regione Sardegna) ad Oristano, Sardegna, Italia (Tabella 1).

Tabella 1- Elenco delle 95 varietà di carciofo coltivato studiate.

Codice	Varietà	Codice	Varietà	Codice	Varietà
V1	Violetto di Provenza	V31	Di palermo	V62	Campagnano
V2	V.P.45	V32	Spinoso di Gela	V63	Grosso Orvietano
V3	V.P. 49	V33	Spinoso di Sciacca	V64	Di Vasto
V4	V.P. 558	V34	Spinoso di Palermo	V65	Romano
V5	Spinoso Violetto di Liguria	V35	Locale di Ostuni	V66	Mazzaferrata
V6	Locale di Mola	V36	Precoce Violetto di Chioggia	V67	Nostrano Violetto di Pesaro
V7	Niscemese	V37	Locale di Chioggia Fano	V68	Violetto di Maremma
V8	Catanese	V38	Gagliardo Sgrò	V69	Violetto di Putignano
V10	Catanese II	V40	Violetto French	V70	Violetto di Toscana
V11	Locale di Sibari	V41	Macau	V71	Violetto di S.Luca
V12	Di Niscemi	V43	Blanc Granais	V73	Violetto di Toscana II
V13	Violetto precoce	V44	Gross Camus	V74	violetto di Putignano II
V14	Siracusano	V45	Locale di Cuneo	V75	Empolese
V15	Violetto di Gapeau	V46	CB 641	V76	Violetto
V16	Violetto D'Algerie	V47	Castellamare	V77	EB 9
V17	AVM 7	V48	Tonda di Paestum	V78	Bayrampasa
V18	Hierois	V49	Camard	V79	A.Pigna
V19	CP 11	V50	Pasquaiolo	V80	Bianco Tarantino
V20	Bamafsigi	V51	Pietrelcina	V81	Verde di Pesaro
V21	Precoce 928	V52	Locale di Strancona	V82	Green Globe Thornles
V22	Romana	V53	Di ogni mese	V83	Verde di Putignanano
V23	V.di Provenza selez. INRA	V54	Centofoglie	V84	Testa di ferro
V24	Precoce INRA 932	V55	Mazzaferrata di Termoli	V85	Violet de Campagne
V25	Sakiz	V56	Castellamare II	V86	Green Globe
V26	Violetto d Margot	V57	Di Teramo	V89	Selezione 67
V27	968	V58	Locale di Montelupo	V91	Caribou
V28	Blanco	V59	Di Viterbo	V93	Camus Micro
V29	Baladi	V60	Romanesco	V94	Spinoso Sardo micropropagato
V30	R35	V61	Selezione Romanesco	V95	Cacique

Questa stessa collezione è stata precedentemente caratterizzata mediante marcatori molecolari AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; Lanteri et al. 2004). Le varietà analizzate appartengono a 4 tipi varietali principali (Figura 9). Le varie tipologie sono pertanto tutte ben rappresentate in collezione.

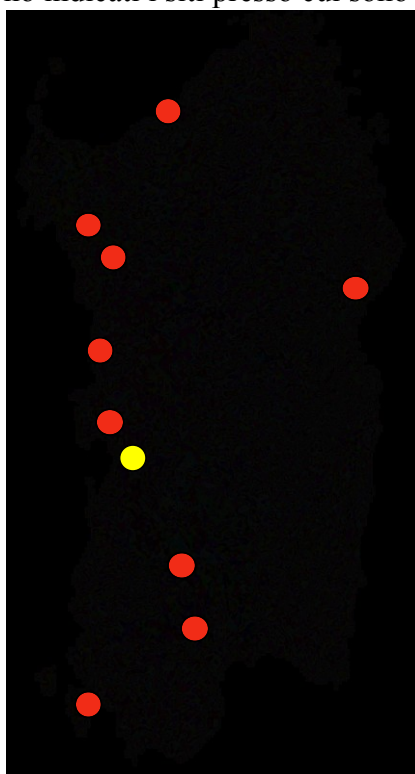
Figura 9 - Ripartizione percentuale dei 4 tipi varietali di carciofo coltivato nell'ambito della collezione analizzata.



3.2 La collezione di “Spinoso Sardo”

Sono stati analizzati 105 individui di Spinoso sardo allevati presso l’AGRIS di Oristano e campionati in carciofaie situate in diverse aree importanti per la cinaricoltura della Sardegna. Da Nord a Sud queste sono: Valledoria, Ittiri, Olmedo, Bosa, Orosei, Cabras, Samassi, Villasor e Sant’Antioco (Figura 10).

Figura 10 - Aree geografiche in cui sono stati campionati gli individui di Spinoso Sardo. In giallo è indicata il sito presso cui è conservata la collezione, presso l’azienda sperimentale AGRIS (Oristano) e in rosso sono indicati i siti presso cui sono stati reperiti i materiali.



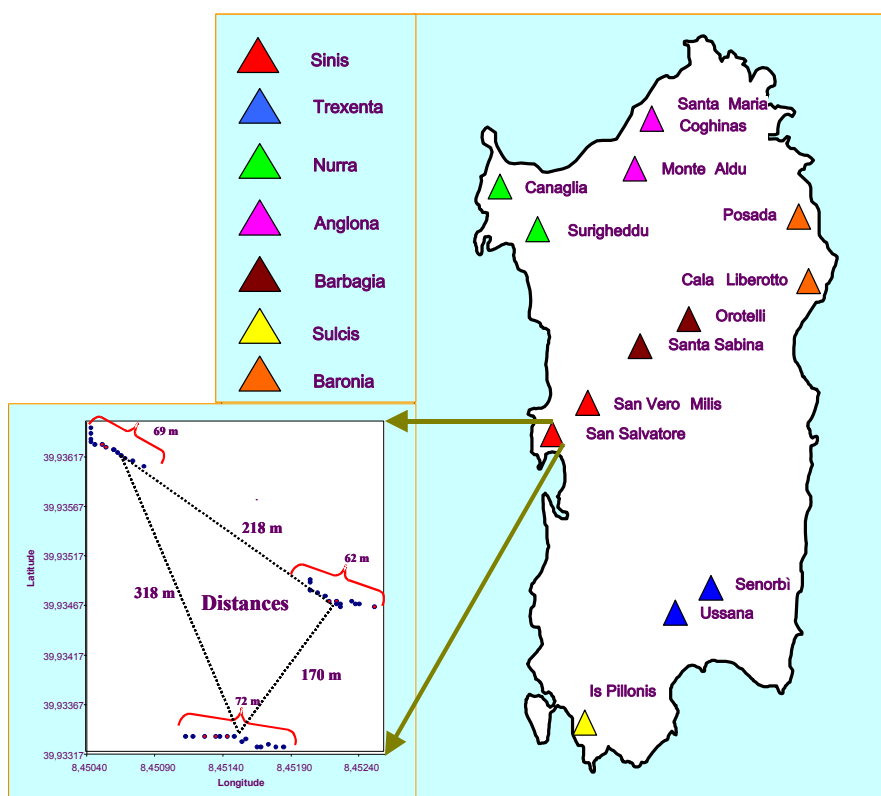
3.3 La collezione di cardo selvatico (*C. cardunculus* var. *sylvestris*)

Per meglio comprendere le caratteristiche della collezione di varietà di carciofo coltivato è stato effettuato un confronto anche con una collezione di cardo selvatico.

Questo è stato possibile grazie al fatto che presso la Sezione di Agronomia Coltivazioni Erbacee e Genetica del Dipartimento di Agraria, dell’Università degli Studi di Sassari è disponibile una collezione di cardo selvatico (*C. cardunculus* var. *sylvestris*). Questa è stata eseguita in Sardegna nel 2003 adottando un metodo di campionamento gerarchico; sulla base delle caratteristiche e della distribuzione della specie erano state individuate sette aree geografiche; all’interno di ogni area due località (=popolazioni); per ciascuna delle località (popolazione) tre transetti. Per ogni transetto sono state campionate 15 piante (Figura 11) per

un totale di 45 piante per località e di 585 piante per l'intera collezione. Per questo studio sono state prese in considerazione 117 piante (9 piante per popolazione, estraendo a caso tre piante da ciascuno dei tre transetti) per ognuna delle 13 popolazioni.

Figura 11- Siti di campionamento di *C. cardunculus* var. *sylvestris* in Sardegna. Sulla sinistra, nel caso della popolazione “San Salvatore” è esemplificata la modalità di campionamento entro ciascun sito.



3.4 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA vegetale delle varietà commerciali di carciofo coltivato e dei cloni della cultivar Spinoso sardo è avvenuto a partire da giovani foglie prelevate dalle piante in collezione presso l'Azienda Palloni di Agris di Oristano.

Per il carciofo selvatico i semi di ciascuno dei 117 individui estratti dalla collezione di base sono stati fatti germinare in piastre Petri in camera di crescita a temperatura controllata di 20°C. I semi germinati sono stati trapiantati in plateaux (un seme per alveolo) e lasciati crescere per circa un mese. Dalle giovani plantule sono state quindi prelevate due foglioline e utilizzate per l'estrazione del DNA.

L'estrazione del DNA è stata fatta seguendo il protocollo da Doyle e Doyle (1990), al quale sono state apportate alcune modifiche.

In una eppendorf da 1,5 ml è stata macinata in azoto liquido una quantità variabile da 0,15 a 0,30 g di tessuto fresco.

Sono stati successivamente aggiunti 800µl di tampone di lisi CTAB (2% di CTAB; 0,1 M di Tris HCl 1M, pH 8,0; 20mM di EDTA 0,5 M, pH 8,0; 1,4 M di NaCl; 0,2% di β-mercaptoetanololo).

In seguito i campioni sono stati incubati per 90 minuti a 65°C, miscelati con un volume di cloroformio: alcol isoamilico (24:1 v:v) e centrifugati a 14 krpm per 10 minuti.

Il surnatante ottenuto è stato trasferito in una nuova eppendorf e il DNA è stato precipitato aggiungendo 800µl di isopropanolo freddo, mescolando le soluzioni ed incubando a -20°C per circa 30-40 minuti; dopo una centrifugazione a 4°C di 20 minuti a 14krpm il pellet precipitato è stato sottoposto ad un lavaggio con 100 µl di isopropanolo freddo (70%), lasciato asciugare all'aria e risospeso accuratamente in 500µl di tampone TE 1X (10mM Tris HCl 1M, pH8,0; 0.1 mM EDTA 0,5 M, pH 8,0).

I campioni sono stati incubati a 37°C per 60 minuti in seguito all'aggiunta di 1µl di RNAsi DNAsi-free (10mg/ml). Successivamente sono stati miscelati con un volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1, v:v:v) e centrifugati a 14krpm per 10 minuti.

In seguito al trasferimento del surnatante in un nuovo tubo eppendorf, i residui di fenolo sono stati rimossi mediante l'aggiunta di 500µl di cloroformio:alcol isoamilico (24:1 v:v) ed il DNA presente nella fase acquosa è stato recuperato dopo centrifugazione a 14krpm per 10 minuti.

Il DNA è stato infine precipitato con l'aggiunta di 1,5 volumi di etanolo 95% freddo e posto a -20°C per 30 minuti. Dopo una centrifugazione di 20 min a 14krpm a 4°C, il pellet precipitato è stato sottoposto a due lavaggi mediante 100µl di etanolo freddo 70%, lasciato asciugare all'aria e risospeso in 50 µl di tampone TE 1X (10mM Tris HCl 1 M, pH 8; 0,1 mM EDTA 0,5 M, pH 8,0).

Il DNA estratto è stato sottoposto a determinazione quali-quantitativa mediante analisi con lo spettrofotometro (GENEQUANT II, Pharmacia Biotech LTD, Cambridge, England) e conservato a meno 20°C.

Per verificare l'integrità del DNA estratto si è anche effettuata una analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1%. Il gel di agarosio è stato preparato sciogliendo un grammo di agarosio in polvere in 100ml di soluzione tampone TBE 1X (Tris/Borate/EDTA). Per consentire la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il bromuro di etidio che ha la

capacità di intercalarsi tra le basi di DNA ed emettere luce fluorescente in seguito all'esposizione di raggi ultravioletti.

Il DNA estratto è stato utilizzato successivamente per la caratterizzazione molecolare mediante l'applicazione di marcatori miscrosatelliti (nuSSR e cpSSR).

3.5 Analisi con marcatori SSR nucleari (nuSSR)

Nel complesso sono stati analizzati 20 loci nuSSR, tra i quali, 12 sono stati utilizzati per la caratterizzazione delle varietà commerciali, 8 per quella di cardo selvatico e 19 per la collezione di cloni della cultivar Spinoso Sardo. Otto loci analizzati sono in comune tra le tre categorie di materiale vegetale (Tabella 2).

Tabella 2 - Loci nuSSR analizzati in questo studio.

<i>Marcatore</i>	<i>Cultivar</i>	<i>Cardo</i>	<i>Spinoso</i>	<i>Programma</i>		<i>Riferimento</i>
<i>SSR</i>	<i>domesticata</i>	<i>selvatico</i>	<i>sardo</i>	<i>PCR</i>	<i>T_a°C</i>	<i>bibliografico</i>
CELMS 01			x	2	49	<i>Acquadro et al., 2009</i>
CELMS 03	x		x	1	53	"
CELMS 04			x	1	55	"
CELMS 05	x		x	1	53	"
CELMS 10			x	1	53	"
CELMS 11			x	1	55	"
CELMS 14	x	x	x	1	53	"
CELMS 15			x	1	55	"
CELMS 40	x	x	x	1	52	"
CELMS 41			x	1	53	"
CELMS 48	x		x	2	49	"
CELMS 58			x	1	55	"
CDAT 01	x	x	x	3	52	<i>Lanteri et al., 2004</i>
CDAT 02	x	x	x	3	48	"
CDAT 03	x	x	x	3	54	"
CDAT 04	x			3	52	"
CLIB 02	x	x	x	3	57	"
CLIB 03	x	x	x	3	57	"
CLIB 12	x	x	x	3	55	"
CyEM 223			x	4	59	<i>Scaglione et al. 2009</i>

L'analisi molecolare dell'intera collezione è stata fatta utilizzando marcatori molecolari SSR già sviluppati in carciofo e disponibili in letteratura (Acquadro et al., 2009; Lanteri et al., 2004; Scaglione et al., 2009). Inizialmente, è stata condotta una analisi preliminare su un campione di 4 genotipi (tre varietà commerciali Tema, Violetto di Provenza e Romanesco C3 ed un individuo di Spinoso Sardo). I risultati ottenuti in questa analisi preliminare hanno consentito di identificare 20 loci SSR altamente informativi, riproducibili e stabili (Tabella 2 e 3).

Tabella 3 - Dettagli del motivo ripetuto dei 20 loci nuSSR analizzati e sequenze *forward* e *reverse* dei *primers* utilizzati per l'amplificazione.

<i>Locus</i>	<i>Motivo ripetuto</i>	<i>Foward primers (5'-3')</i>	<i>Reverse primers (5'-3')</i>
CELMS 01	(AG) ₁₇	CAACACAGAAGCGAGGTCA	GAATGAGCCGGATTAGCATT
CELMS 03	(TC) ₁₈ (AC) ₇	GATCAATACGTCGTCGCAGA	CTGAGGCTACCAAGGGTTTG
CELMS 04	(GA) ₁₉	TTTGTCAACCCATACGCAAC	AATCCAATCATATTACCATGTAATA
CELMS 05	(CT) ₂₂ (CAG) ₄	CCCACCTTCTTATCCCATCA	TGGACGTCTGTTTCCTCCTC
CELMS 10	(AG) ₂₅	TCAGACTTCAGCACCACTC	GTCGTTCTGGATTCCCACAT
CELMS 11	(TC) ₂₁ (TTTG) ₃	GCGAATCAATCCCTTGCTC	AAGCCATGGATGAAGCAGAG
CELMS 14	(AC) ₁₃ (TC) ₇ (AC) ₁₀ (TC) ₉	TCCAGCCATGCAAGAAAAGTAT	CCATCCTGAATCCATAACCAGT
CELMS 15	(CA) ₁₅ (TA) ₅ (ATGT) ₁₀ (TG) ₅	TGGATGGAAACTCTTCACAG	TACAGTCCCGATGTGGGTATTT
CELMS 40	(ATC) ₄ (ATC) ₁₆ (TCT) ₉	TGGATTAAGGCACACACTGAAC	TGATGATAACAAAGGAGGGGAT
CELMS 41	(ATG) ₁₁ (GAT) ₉	CCAAAGCCTTCAGAGCATTC	GGAATGATGTATGGATCGCC
CELMS 48	(CTG) ₅ (CTG) ₇	ATAACAGGACGAGGTGTGGAAG	CTACAGTTGCTTATTGGTCCCC
CELMS 58	(AG) ₁₈ (AGAA) ₃	GGATTCCATTGGACTTACAGG	GGTTTGCCTATCTGTCTTTCTT
CDAT 01	(TGA) ₅ T.A(TGA) ₅ T.(GTG) ₅	AATGAAGGAAGCACAACCTG	CGGAATCATGCTAACCATTA
CDAT 02	(TGA) ₅ T	GCGCTGCAAAGTTATTT	TGAGTTCTTAATCATCATCTTC
CDAT 03	(GTG) ₅	ACCCTGTTCCCTTTACCT	GGATTCAATGGGTGGTAT
CDAT 04	(TC) ₁₁	CCGAACAGTATGTCCTGA	AGTCATGTACCTGCTCCA
CLIB 02	(CA) ₁₁	GTTTCAACAGCAGGCAACAC	GTTTCAACAGCAGGCAACAC
CLIB 03	(CA) ₁₁	GTTTCAACAGCAGGCAACAC	TGGTCTGTTTCCATTTTCTG
CLIB 12	(GT) ₆ (TA) ₃	TGGACTACTGCAAGAAGAAAC	CATGGACTTTACCTTTACC
CyEM223	CAC	GCGTCTGGTGATGATGAAGAT	AAAAAGAGCGATACCCGAAAG

Il protocollo utilizzato per l'analisi SSR è suddiviso in tre fasi principali: 1) Amplificazione mediante PCR; 2) risoluzione degli amplificati mediante elettroforesi su gel di poliaccrilammide; 3) Analisi statistica dei pattern elettroforetici.

3.5.1 Amplificazione PCR

Per i *primers* della serie “CELMS” le reazioni PCR sono state condotte in volumi finali di 20µl contenenti: buffer 1X (200 mM TRIS-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), MgCl²⁺ 1,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, 0,5 µM di ciascun *primer*, circa 50 ng/µL di DNA e 1 U/µL di Taq polimerasi (*Applied Biosystem*).

Per quanto riguarda il gruppo dei CDAT, la reazione PCR è stata ottimizzata in un volume finale di 25µl costituiti da: buffer 1X (200 mM TRIS-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), MgCl²⁺ 50 mM, dNTP mix 0,2 mM, 0,5 µM di ciascun *primer*, circa 50 ng/µL di DNA e 1 U/µL di Taq polimerasi (*Applied Biosystem*).

Infine, per locus CyEM223 sono state utilizzate le seguenti concentrazioni: buffer 1X (200 mM TRIS-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), MgCl²⁺ 25 mM, dNTP mix 0,2 mM, 0,04 µM di ciascun *primer*, circa 50 ng/µL di DNA e 5 U/µL di Taq polimerasi (*Applied Biosystem*).

I programmi di amplificazione utilizzati per i diversi *primers* (Tabella 2) sono stati leggermente modificati rispetto a quelli indicati in letteratura in modo da ottenere dei prodotti PCR chiari e ripetibili nei nostri materiali vegetali.:

Programma PCR n.1: La reazione di amplificazione è stata condotta con il GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (*Applied Biosystem*), utilizzando il seguente programma.

94°C per 5 minuti
 94°C per 30 secondi
 Ta°C per 30 secondi
 72 °C per 1 minuto
 72°C per 1 minuto
 10°C ∞

} per 35 cicli

Programma PCR n.2: come Programma 1 ma in questo caso è stata effettuata la Touch Down riducendo la temperatura, a partire da 55°C di 0,5°C per ogni ciclo di amplificazione fino ad arrivare a 49°C.

Programma PCR n. 3: per questi loci è stato necessario effettuare la Touch Down partendo da una temperatura di annealing di 57°C.

94°C per 5 minuti
 94°C per 1 minuto
 Ta° C per 1 minuto
 72 °C per 1 minuto
 10°C ∞

} per 35 cicli

Programma PCR n. 4: come Programma 1 ma è stata effettuata la Touch Down riducendo la temperatura, a partire da 63°C di 0,7°C per ogni ciclo di amplificazione fino ad arrivare a 59°C.

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

3.5.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti.

Il gel è stato preparato miscelando urea 7,5M, Acrilammide e Bis-Acrilammide in un rapporto di 19:1 e i cofattori TEMED e APS (1g di $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e 9ml H_2O) per ottenere la polimerizzazione del gel. Il tampone di corsa conteneva TBE 1X (Tris-borato EDTA). Prima del caricamento dei campioni, è stata effettuata una precorsa di 15 minuti a 70W fino al raggiungimento di una temperatura di 35-36°C. L'elettroforesi è stata quindi condotta a 80W per 40 minuti.

I frammenti di DNA separati durante la corsa elettroforetica, sono stati visualizzati utilizzando la colorazione con nitrato di argento seguendo il protocollo di Benbouza et al. (2006). La scelta di utilizzare il metodo Benbouza è dovuta al fatto che, rispetto al metodo tradizionale (Bassam et al., 1991), consente di ridurre i tempi di sviluppo e di riutilizzare alcune soluzioni (maggiore economicità), al pari di una risoluzione finale, e quindi una nitidezza delle bande, di eguale livello.

Il protocollo di visualizzazione delle bande prevede:

- una fase di fissazione con 1 L di Fix Solution (a 4 °C) costituita da EtOH 10% (10 mL) e $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ allo 0,5% (5 mL) per 7 min.;
- una fase di colorazione con una soluzione costituita da 1 L di H_2O e AgNO_3 allo 0,15% (1.5g) per 10 min.;
- una fase di lavaggio in 1 L di acqua milliQ per 10-15 secondi;
- una fase di sviluppo che prevede l'immersione del gel in una soluzione costituita da 1 L di NaOH 1,5% (15 g) e la sua agitazione sino alla comparsa delle bande (circa 10 min.).

Alle soluzioni di colorazione e sviluppo vengono stati aggiunti rispettivamente 3 e 4 ml di formaldeide al 37%. Una volta visibili le bande, il gel viene immerso nella soluzione fissatrice per bloccare la reazione di sviluppo (Benbouza, et al. 2006).

3.6 Analisi con marcatori SSR cloroplastici (cpSSR)

La collezione di cultivar di carciofo coltivato è stata ulteriormente analizzata attraverso marcatori SSR cloroplastici (cpSSR) al fine di confrontare la diversità genetica nucleare con quella citoplasmatica. Per queste analisi sono stati saggiati 22 marcatori SSR cloroplastici (Chung and Staub, 2003) riportati in Tabella 4. La reazione PCR è stata eseguita come indicato da Chung e Staub 2003.

Tabella 4 - Elenco dei cpSSR sulla collezione di varietà commerciali di carciofo coltivato.

Locus	Motivo ripetuto	Locus	Motivo ripetuto
cpSSR-1	(T) ₁₀ ^c	cpSSR-12	(A) ₈
cpSSR-2	(A) ₁₁ ^c	cpSSR-13	(T) ₉
cpSSR-3	(T) ₁₁ ^c	cpSSR-14	(T) ₁₄ ^c
cpSSR-4	(T) ₈	cpSSR-15	(T) ₉
cpSSR-5	(T) ₁₀ ^c	cpSSR-16	(T)C(T) ₂ ^c
cpSSR-6	(T) ₈	cpSSR-17	(A) ₁₃
cpSSR-7	(T) ₁₁	cpSSR-18	(A) ₈
cpSSR-8	(T) ₅ C(T) ₁₇ ^c	cpSSR-19	(T) ₈
cpSSR-9	(A) ₁₃	cpSSR-20	(A) ₈
cpSSR-10	(A) ₁₃ ^c	cpSSR-21	(T) ₁₃
cpSSR-11	(T) ₆ C(T) ₁₄ ^c	cpSSR-22	(T) ₈

3.7 Analisi Statistiche

Per studiare la variabilità genetica sono state calcolate le seguenti statistiche descrittive: il numero di alleli osservato (n_a), il numero di alleli effettivo (n_e), l'eterozigosità attesa (H_e) e le statistiche F di Wright, F_{ST} e F_{IS} .

Il numero di alleli effettivo è dato dalla formula $n_e = 1/\sum p_i^2$, dove p_i rappresenta la frequenza dell' i^{esimo} allele ad un determinato locus (Kimura e Crow, 1964). L'eterozigosità attesa (H_e) rappresenta la frazione di individui eterozigoti attesa in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg (Nei, 1973). Questa misura rappresenta anche la probabilità che campionando alleli ad un locus (in una popolazione) questi siano diversi. Il coefficiente di F_{ST} originariamente è stato definito dalla formula: $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$, dove H_T è la diversità genetica della popolazione totale e H_S è la diversità media delle sottopopolazioni (Wright, 1951). Pertanto l' F_{ST} misura l'*inbreeding* dovuto alla suddivisione delle popolazioni e costituisce, nel contempo una misura di distanza genetica tra popolazioni (Nei, 1978).

Minore è il flusso genico tra popolazioni, maggiore è l' F_{ST} ; maggiore è l' F_{ST} , minore è il flusso genico. L' F_{ST} così definito è sempre compreso tra 0 (quando tutte le popolazioni hanno le stesse frequenze alleliche) e 1 (quando le popolazioni non condividono nessun allele, i.e. quando hanno raggiunto la fissazione per alleli alternativi).

Inoltre, è stato calcolato il coefficiente di inbreeding F_{IS} , per i vari gruppo di materie coltivato e per le popolazioni di cardo selvatico. Per ciascun campione considerato, il coefficiente è calcolato come $F_{IS}=(H_E-H_o)/H_o$ dove H_e rappresenta la frazione di individui eterozigoti attesa in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg (Nei, 1973) e H_o la frazione di individui eterozigoti osservata. Nel caso del coefficiente di inbreeding, è stata ottenuto il valore di F_{IS} corretto tenendo in considerazione il potenziale effetto degli alleli nulli utilizzando il programma INEST (Chybicki e Burczyk, 2009), utilizzando l'opzione "individual inbreeding model (IIM)" settando un Gibbs sampler di 105 iterazioni.

Per il calcolo delle statistiche F_{ST} ed F_{IS} si è utilizzato il software Arlequin vers.3.1.5. (Excoffier e Lischer, 2010). Per far questo è stata effettuata un'analisi della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier et al. 1992) scomponendo la varianza nei diversi livelli gerarchici presenti nella popolazione analizzata: tra gruppi, entro gruppi e tra individui entro gruppi. Il frame work utilizzato è stato il "Genotypic data, one population, within- individual level" (pag. 151 del manuale di Arlequin). Inoltre sono stati calcolati gli F_{IS} "population specific". La significatività delle statistiche F è stata saggiata tramite test di permutazione (100000 reps).

Ciascuna coppia di *primer* nuSSR identifica un singolo *locus* nel genoma. I marcatori SSR sono codominanti, cioè consentono di distinguere i genotipi eterozigoti dagli omozigoti e di distinguere i diversi genotipi eterozigoti (oltre che i diversi omozigoti). Sul gel, un individuo omozigote appare come un'unica "banda" di DNA. Infatti, poiché il carciofo ha un corredo cromosomico diploide ($2n=2x=34$), tramite PCR vengono amplificati frammenti che contengono l'SSR che ha la stessa lunghezza su entrambi i cromosomi omologhi. Un individuo eterozigote appare invece caratterizzato da due bande, i.e. per lo stesso locus, l'SSR ha diversa lunghezza sui due cromosomi omologhi.

Per studiare la struttura genetica nuSSR della collezione di 95 Varietà di carciofo coltivato, è stato utilizzato il software STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007; Hubisz et al. 2009). Questo software utilizza un algoritmo di clusterizzazione "model-based" e di tipo Bayesiano. L'assunto del software è che, nel campione totale, lo scostamento dalle condizioni di equilibrio H-W e l'elevato *linkage disequilibrium* siano conseguenza della coesistenza di individui provenienti da popolazioni con diversi pool-genici

(i.e. da popolazioni con diverse frequenze alleliche). Il software assume pertanto l'esistenza *a priori* di un determinato numero (K) di gruppi genetici ("true populations"). Quindi, assegna gli individui ai K gruppi utilizzando come criterio la minimizzazione (all'interno dei gruppi) dello scostamento dalle condizioni di equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) e dei livelli di *linkage disequilibrium* tra loci (Pritchard e Wen., 2003). Per ciascun individuo, viene calcolata la probabilità di appartenenza a ciascuno dei K gruppi ipotizzati (*coefficient of membership*, q). Di *default*, il software assegna ciascun individuo al gruppo per il quale mostra il maggiore valore di q. Tuttavia, per avere un maggiore livello di stringenza, un individuo è generalmente attribuito al gruppo per il quale q supera un determinato valore soglia (es. $q > 0.8$). Gli individui che non soddisfano tale criterio vengono definiti *admixed*, i.e. tali genotipi possono essere considerati determinati dal contributo dei pool genici di diverse popolazioni.

Il software restituisce anche un valore di probabilità per ciascuna soluzione identificata (LnPD). Pertanto, al fine di identificare la "migliore soluzione", devono essere eseguite più simulazioni per ogni K e per valori di K crescenti.

Al fine di calcolare il numero più probabile di gruppi genetici nel nostro dataset, è stato applicato il metodo di Evanno et al. (2005). Questo consiste nel calcolo di una statistica *ad hoc* ΔK , che indica il valore di K in corrispondenza del quale la funzione LnPD(K) raggiunge il plateau, i.e. il valore di K oltre il quale la probabilità di spiegare meglio il dataset diviene trascurabile. Per ciascun K sono state eseguite 20 simulazioni (100000 *burn-in*, 200000 runs). Per le simulazioni è stato scelto il modello con *admixture* (Falush et al 2003). Le simulazioni sono state condotte senza utilizzare l'informazione fenotipica (tipi varietali) come *prior*. Per calcolare ΔK è stata utilizzato il software Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) (Earl et al. 2012).

Le relazioni tra i gruppi indentificati da Structure sono state studiate mediante la costruzione di un albero filogenetico con il metodo Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) basato su matrici di "net-nucleotide distance" implementato nello stesso software.

Per completezza, la struttura genetica delle popolazioni è stata ulteriormente studiata mediante l'analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi è stata condotta mediante il software GeneAlex (Peakall e Smouse, 2012).

La stima del linkage disequilibrium (LD) tra i loci analizzati è stata calcolata utilizzando il software MultiLocus 1.3 (Agapow and Burt, 2001) per il calcolo dell'indice r_d , che misura il valore del LD multilocus. Questo indice deriva dall'indice di associazione multilocus (IA) (Brown et al. 1980) che è stato modificato per evitare la sua dipendenza dal

numero di loci utilizzato per l'analisi. Le stime di significatività della statistica sono state condotte con lo *shuffling* degli alleli tra individui (1,000 reps).

Le analisi della varianza e di contingenza sono state eseguite con JMP ver. 7.00 (SAS Insitute Inc.,2007).

4. Risultati e Discussione

I livelli di polimorfismo dei 20 loci microsatellite sono stati calcolati nei 3 gruppi di materiali vegetali (varietà di carciofo coltivato, cardo selvatico e cloni di Spinoso Sardo) e sono sintetizzati in Tabella 5.

Tabella 5 – Numero di alleli osservato (na) e polymorphism index content (PIC) ottenuti nei tre gruppi di materiali vegetali analizzati

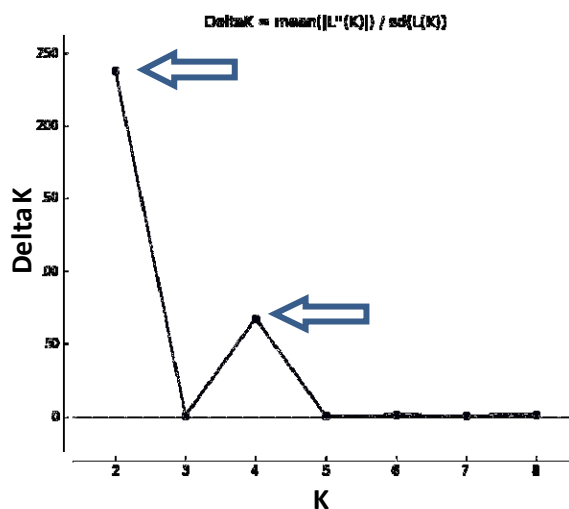
NOME	VARIETA'		CARDIO SELVATICO		SPINOSO SARDO	
	na	PIC	na	PIC	na	PIC
LOCUS						
CELMS 01					2	0.000
CELMS 03	3	0.643			1	0.000
CELMS 04					1	0.000
CELMS 05	7	0.813			1	0.000
CELMS 10					1	0.000
CELMS 11					1	0.000
CELMS 14	4	0.188	15	0.876	1	0.000
CELMS 15					2	0.000
CELMS 40	4	0.712	7	0.655	1	0.000
CELMS 41					2	0.000
CELMS 48	5	0.675			1	0.000
CELMS 58					2	0.000
CDAT01	6	0.773	3	0.332	1	0.000
CDAT02	6	0.510	2	0.283	1	0.000
CDAT 03	3	0.311	1	0	1	0.000
CDAT04	7	0.672				
CLIB 02	4	0.545	8	0.758	1	0.000
CLIB 03	4	0.539	6	0.664	1	0.000
CLIB 12	4	0.691	4	0.456	1	0.000
CYEM 223					2	0.000
Totale	57		46		24	
Media per locus	4.75	0.589	5.75	0.503	1.21	0.000

4.1 In quanti gruppi genetici è possibile classificare le varietà di carciofo coltivato?

4.1.1 Analisi della variabilità nuSSR

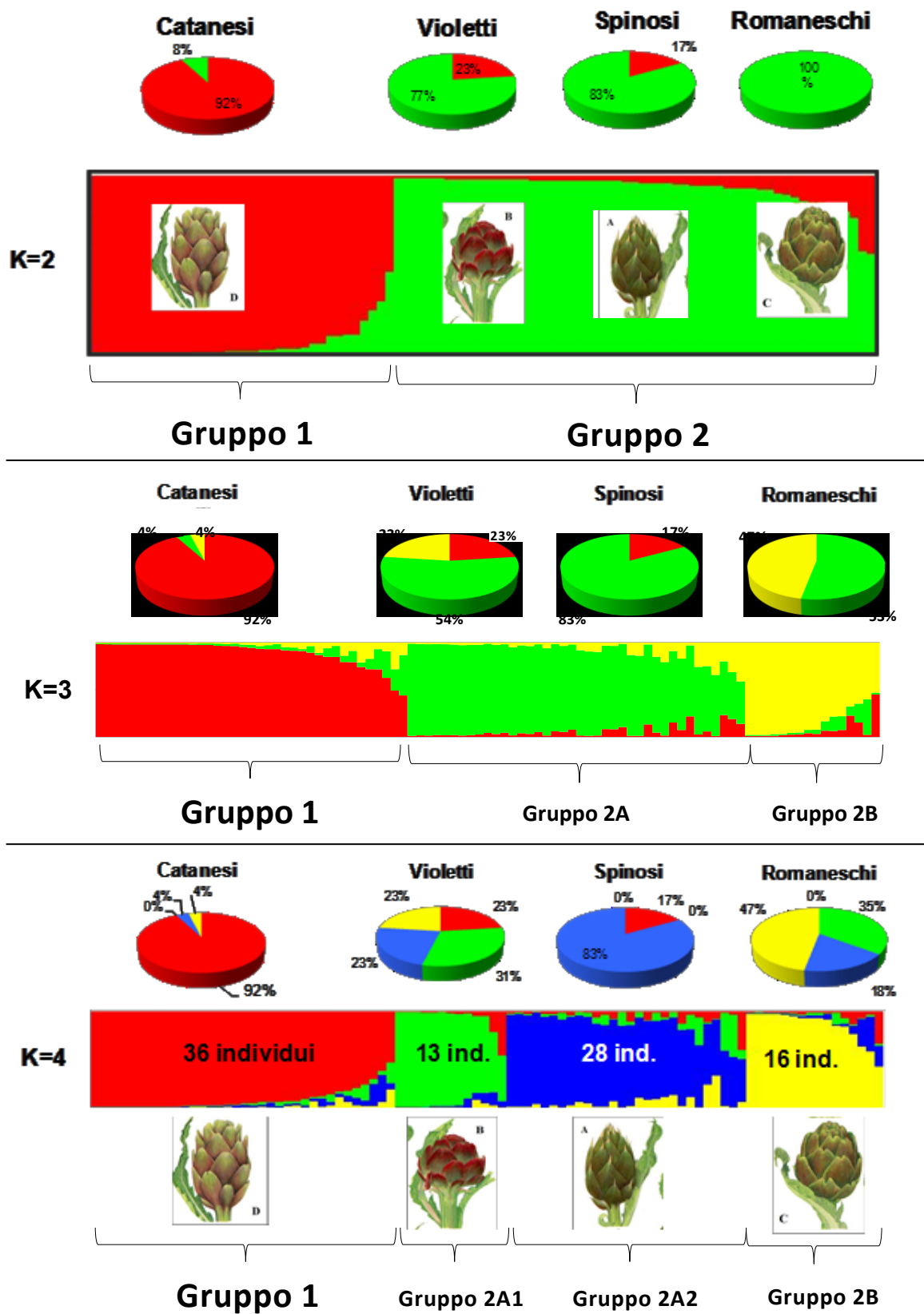
L'analisi condotta per determinare il numero più probabile di gruppi genetici nuSSR (K) all'interno del *dataset* di 93 varietà di carciofo coltivato, ha portato a individuare un picco principale di probabilità in corrispondenza di K=2 e un picco secondario per K=4 (Figura 12).

Figura 12 – Andamento di ΔK in funzione di K.



In Figura 13 viene pertanto riportata la *clustering history* ottenuta con Structure da K=2 a K=4. ipotizzando l'esistenza di due gruppi, 36 varietà appartengono al gruppo 1 e 57 al gruppo 2 (Figura 13). A K=3, il gruppo 2 si divide in due sub-cluster, il 2A ed il 2B comprendenti 16 e 41 individui, rispettivamente. A K=4 si osserva l'ulteriore suddivisione del gruppo 2A nei gruppi 2A1 (13 individui) e 2A2 (28 individui).

Figura 13. Risultati dell'analisi cluster condotta con Structure da K=2 a K=4. I diagrammi a torta in corrispondenza dei gruppi di Structure, indicano per ogni tipo varietale (Catanesi, Violetti, Spinosi e Romaneschi) la % di individui attribuita ai gruppi indentificati da Structure.



Complessivamente, la struttura genetica identificata è piuttosto ben definita. Infatti, per le partizioni a $K=2, 3$ e 4 , la percentuale di individui attribuita ai gruppi genetici con $q>0.80$ è elevata essendo compresa, in media, tra $71,9$ ($K=3$) e $84,5$ ($K=2$) (Tabella 6). Inoltre, tutti i gruppi possiedono una percentuale di individui con $q>0,80$ superiore al 60% ed in vari casi superiore all' 80% .

Tabella 6 – Numero (n.) e percentuale (%) di individui attribuiti ai gruppi genetici con $q>0.80$. Tra parentesi è riportata la numerosità di ciascun gruppo. La percentuale (%) è stata calcolata rispetto alla numerosità di ciascun gruppo. I dati sono riportati per $K=2, 3$ e 4 .

K = 2			K = 3			K = 4		
	n. ind.	%		n. ind.	%		n. ind.	%
Gruppo 1 (36)	33	91,7	Gruppo 1 (36)	29	80,1	Gruppo 1 (36)	31	86,1
Gruppo 2 (57)	44	77,2	Gruppo 2A (41)	30	73,2	Gruppo 2A1 (13)	9	69,2
						Gruppo 2A2 (28)	18	64,3
			Gruppo 2B (16)	10	62,5	Gruppo 2B (16)	12	75,0
Media		84,5			71,9			73,7

Al fine di meglio comprendere il significato della struttura genetica identificata, è stata saggiata la corrispondenza tra i gruppi genetici (determinati in base a Structure) e i tipi varietali. Come mostrato in Figura 13, è risultato che il 92% dei Catanesi appartiene al Gruppo 1, mentre il 77% dei Violetti, l' 83% degli Spinosi ed il 100% dei Romaneschi, appartengono al Gruppo 2. La classificazione a $K=2$ di Structure ha, pertanto, una evidente corrispondenza fenotipica, i.e. il “*gene pool*” dei Catanesi è differenziato da quello degli altri gruppi varietali. Il livello di divergenza genetica è tuttavia medio-basso essendo l' $F_{ST} = 0,127$ ($P<0.0001$), i.e. il $12,7\%$ della varianza totale è spiegato dalle differenze tra Catanesi e altri tipi varietali.

Tabella 7 – Distribuzione di frequenza (%) dei tipi varietali tra i gruppi genetici. In questo caso, sono stati considerati solo gli individui attribuiti ai gruppi con $q>0.80$.

Tipologia varietale	Gruppo genetico			
	1	2A1	2A2	2B
Catanesi	96		4	
Violetti	0	64	9	27
Spinosi	0	0	100	
Romaneschi	0	13	27	60

A $K=3$, il gruppo 2B risulta arricchito rispetto al gruppo 2A di individui classificati come Romaneschi e privo di Spinosi. Il gruppo 2A invece comprende la quasi totalità degli Spinosi e la maggioranza dei Violetti. La divergenza tra il gruppo 2B e il gruppo 2A è risultata, anche in questo caso, moderato-bassa essendo $F_{ST}=0,119$ ($P<0,0001$).

Infine, la stessa analisi è stata svolta anche per $K=4$ (Figura 13). In questo caso, il gruppo 2A si divide in due sottogruppi: il primo (2A1) contiene la maggioranza relativa dei Violetti; l'altro (2A2) risulta associato alla tipologia degli Spinosi. Infatti, l'83% degli Spinosi appartiene a questo gruppo. La differenziazione genetica tra i gruppi 2A1 e 2A2 è moderato-bassa essendo $F_{ST} = 0,110$ ($P<0,0001$).

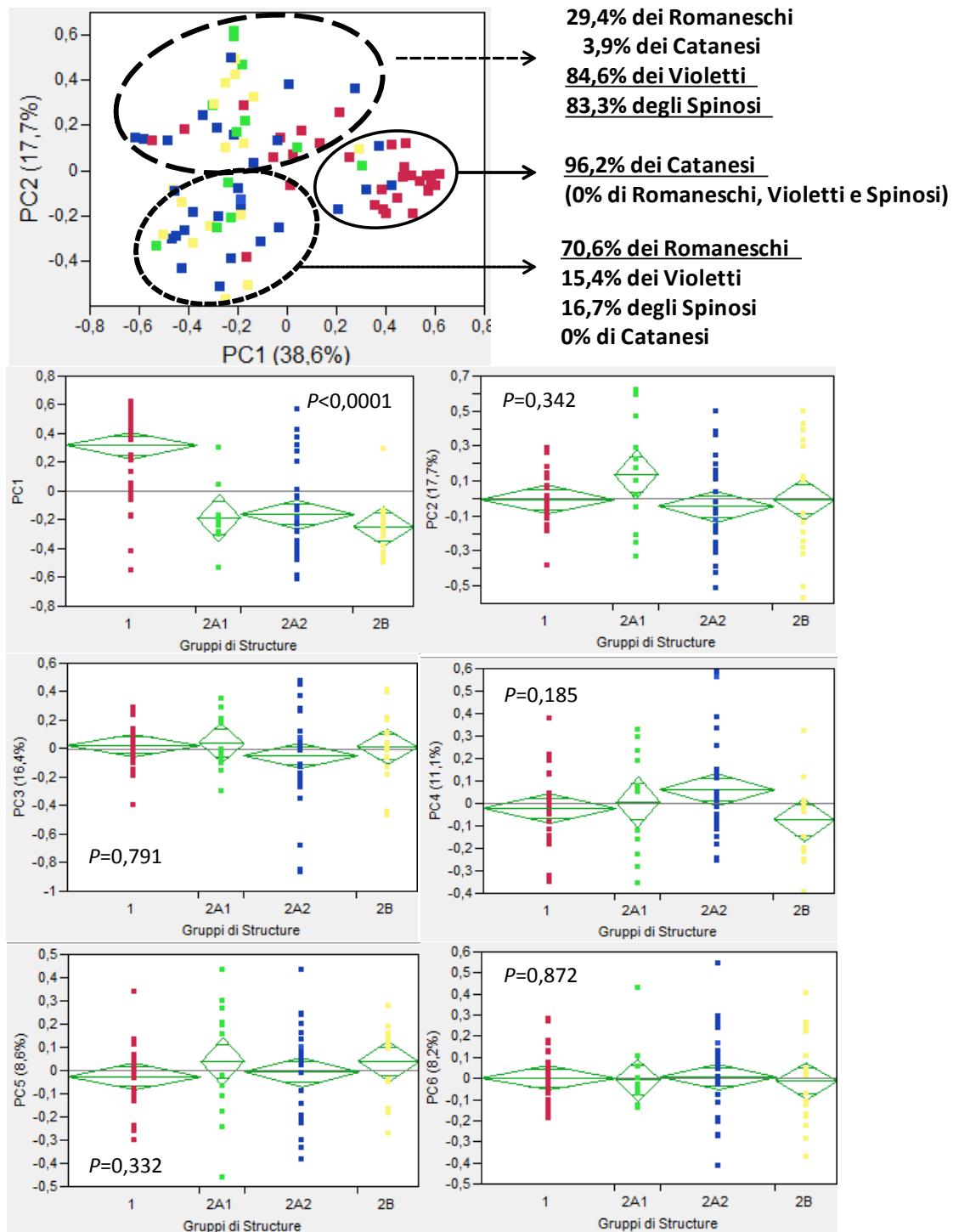
Nel complesso, l'associazione tra i quattro gruppi genetici (nuSSR) e i quattro tipi varietali è statisticamente altamente significativa ($\chi^2= 81,3$; $g.l. =9$, $P <1 \times 10^{-4}$, $n=65$) e abbastanza forte ($R^2 = 0,49$). Inoltre, tale associazione si rinforza notevolmente quando viene saggiata utilizzando soltanto gli individui per i quali $q>0,80$, $R^2 = 0,65$ ($\chi^2= 87,9$; $g.l. =9$, $P <10^{-4}$, $n=55$). Tale effetto riguarda tutti i gruppi (Tabella 6): infatti, la frazione di catanesi assegnati al gruppo 1 passa dal 92% (Figura 13, $K=4$) al 96% (Tabella 7) con una variazione di +4%; la frazione di violetti assegnati al gruppo 2A1 passa dal 31% al 64% (+33%); quella degli Spinosi assegnati al gruppo 2A2 passa dall'83% al 100% (+17%); quella di Romaneschi assegnati al gruppo 2B dal 47% al 60% (+13%). In conclusione, se si considerano solo i genotipi per i quali $q>0,80$ ogni gruppo genetico contiene la maggioranza assoluta (>50%) di un diverso tipo varietale (Tabella 6).

L'AMOVA applicata considerando come popolazioni i quattro gruppi di Structure ha consentito di stimare un F_{ST} pari a 0.212 ($P<0,0001$) il quale indica un livello di divergenza moderato. Questo valore diventa 0.347 ($P<0,0001$) se si considerano per ogni gruppo solo gli individui con $q>0,80$.

L'analisi del linkage disequilibrium multilocus ha permesso di evidenziare un valore globale di $r_d=0,12$ ($P<0,001$). All'interno dei gruppi il livello di LD in media si riduce del 14.6% essendo variabile da un minimo di 0,03 (gruppo 2A2, associato agli Spinosi) a 0,13 (gruppi 1 e 2B associati ai Catanesi e ai Romaneschi, rispettivamente), con il gruppo 2A1 associato ai violetti con $r_d=0,11$ ($P<0,01$). Quando analizzato nei gruppi con ridotto numero di individui *admixed* ($q>0,8$), il valore medio di r_d raddoppia ($r_d=0,24$) il che suggerisce la presenza di clonalità o ulteriori strutture genetiche nascoste entro gruppi.

L'analisi delle componenti principali (PCA) evidenzia che la variabilità genetica molecolare nuSSR può essere riassunta da 6 componenti principali (PC) (Figura 14). Le prime due componenti spiegano cumulativamente più del 50%, indicando una chiara struttura di correlazione tra le variabili (loci) analizzate.

Figura. 14 Analisi delle componenti principali (PCA) e confronto con l'analisi model-based di Structure.



La PCA supporta il risultato di Structure ottenuto assumendo $K=2$ (Figura 14). L'analisi cluster di Structure e l'analisi PCA concordano pertanto nell'indicare la separazione dei Catanesi dagli altri. Infatti, la prima componente principale (che spiega il 38,6% della varianza nuSSR totale), seppur con qualche eccezione, separa gli individui appartenenti al gruppo 1 di Structure da quelli appartenenti al gruppo 2 (Figura 13).

Queste conclusioni sono supportate dall'analisi della varianza non parametrica di Wilcoxon dalla quale risulta che i 4 gruppi di Structure mostrano un diverso valore medio per la PC1 ($P < 0,0001$): il gruppo 1 mostra il valore più elevato mentre gli altri gruppi sono caratterizzati da valori simili (Figura 14). Invece, la PCA non concorda con quella model-based di Structure nell'indicare la separazione tra i gruppi 2B, 2A1 e 2A2. Nonostante la seconda componente principale (che spiega il 17,7% della varianza totale) tenda a distinguere due gruppi, questi, tuttavia risultano ognuno costituito da individui appartenenti ai gruppi 1, 2A1, 2A2 e 2B di Structure. Infatti i 4 gruppi di Structure hanno medie per la PC2 che non sono statisticamente diverse (Wilcoxon-test, $P=0,342$). Inoltre, i 4 gruppi di Structure mostrano valori medi statisticamente non diversi per tutte le altre 4 componenti principali (valori di P compresi tra 0,185 e 0,872; Figura 14). Tuttavia, quando si analizza la distribuzione dei genotipi per cui è nota la tipologia varietale di appartenenza, risulta abbastanza ben delineata anche la divisione tra (la maggior parte dei) romaneschi (che mostrano valori negativi della PC2) *versus* (la maggior parte dei) Spinosi e Violetti (valori positivi di PC2) (Figura 14). Questo indica una maggiore concordanza dei due metodi quando si utilizzano per l'analisi gli individui notoriamente attribuiti alle varie tipologie, e si osserva una bassa concordanza tra metodi nella classificazione degli individui per i quali la tipologia varietale non è nota. Tuttavia, per l'analisi delle componenti principali, contrariamente a quanto osservato con Structure, Spinosi e Violetti formano un unico raggruppamento. Questo è vero anche quando si considerano le componenti PC3-PC6 (non mostrato). La classificazione ottenuta con Structure a $K=4$ è stata pertanto ritenuta quella più informativa e utile per proseguire anche le successive analisi.

In conclusione, in base all'analisi del polimorfismo nuSSR è possibile affermare che la suddivisione maggiore nell'ambito della collezione di varietà di carciofo coltivato è quella tra i Catanesi *versus* le altre tipologie varietali. Inoltre, l'algoritmo di Structure sembrerebbe essere più efficiente della PCA poiché in grado di evidenziare strutture genetiche che hanno una corrispondenza fenotipica, seppur parziale, anche con le tipologie dei Violetti e degli Spinosi.

Inoltre, è stata osservata una migliore corrispondenza tra gruppi genetici e tipologie varietali quando sono stati considerati soltanto individui caratterizzati da modesta o assente *admixture* ($q > 0,80$) e una maggiore concordanza tra i risultati della PCA e Structure quando sono stati utilizzati per le analisi soltanto gli individui già notoriamente identificabili come rappresentativi delle varie tipologie varietali.

Complessivamente, questo suggerisce che i diversi tipi varietali potrebbero corrispondere anche a diversi gene pool, (almeno due, verosimilmente quattro) di carciofo coltivato.

Lo studio della ripartizione della varianza molecolare a livello di individuo e di popolazione è uno strumento molto utile per studiare il ruolo della ricombinazione genetica negli organismi diploidi (Halkett et al., 2005). Tradizionalmente questo studio viene affrontato attraverso il calcolo delle statistiche F. In questo ambito è di particolare utilità la stima del coefficiente di Inbreeding, F_{IS} , che quantifica lo scostamento dell'eterozigosità osservata (H_o) da quanto atteso in base all'equilibrio Hardy-Weinberg. A tal fine, è stato utilizzato il *framework* della Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA) (Excoffier et al., 1992).

L'AMOVA ha evidenziato un coefficiente F_{IS} fortemente negativo (-0,29), indicando in media un eccesso di eterozigoti entro gruppi rispetto a quanto atteso in base all'equilibrio Hardy-Weinberg. Tale risultato è di estrema importanza almeno per due distinti motivi. Il primo è che valori negativi di F_{IS} suggeriscono assenza o debole presenza di strutture genetiche nascoste all'interno dei singoli gruppi (Halkett et al., 2005). Infatti, in presenza di struttura all'interno dei gruppi è atteso che il coefficiente F_{IS} sia positivo. La seconda ragione, è che un forte e negativo F_{IS} è atteso in conseguenza della riproduzione clonale. Mentre valori (non fortemente) negativi di F_{IS} possono essere osservati in piccole popolazioni di piante dioiche o monoiche auto-incompatibili, valori di F_{IS} fortemente negativi possono essere considerati come la “*ultimate signature*” (la firma inequivocabile) della riproduzione clonale in organismi diploidi (Halkett et al., 2005).

L'eccesso di eterozigosità è dovuto soprattutto a due dei 4 gruppi. Gli F_{IS} gruppo-specifici variano da un minimo di -0,58 (Catanesi) ad un massimo di 0,13 per i Violetti con valori di -0,33 per i Romaneschi e 0,10 per gli Spinosi.

L' F_{IS} medio tra gruppi diventa più negativo quando si considerano i soli individui con $q > 0,80$ (-0,39).

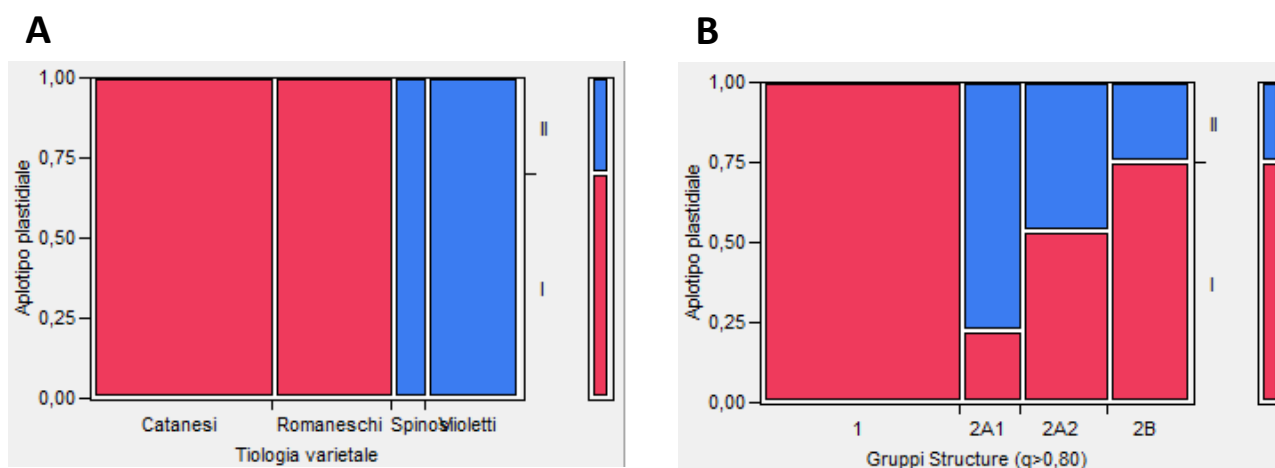
Inoltre, è anche interessante osservare che rari eventi di ricombinazione sessuale possono tradursi in una elevata varianza tra i loci nel valore di F_{IS} (Halkett et al., 2005). Nel

nostro caso i valori di varianza dell' F_{IS} variano da un minimo di 0,07, per il gruppo degli Spinosi, a 0,19 per i Romaneschi e i Catanesi ed un massimo di 0,33 per il gruppo dei Violetti. Questi elevati valori di varianza sono in linea con i risultati attesi per popolazioni a riproduzione clonale (Halkett et al., 2005).

4.1.2 Analisi della variabilità cpSSR

La collezione di carciofo coltivato è risultata caratterizzata da un bassissimo livello di variabilità citoplasmatica. Infatti, il livello di polimorfismo è <5%: dei 22 loci cpSSR saggiati, soltanto uno, il locus cpSSR-11, è risultato polimorfico. Esso possiede due alleli che definiscono due aplotipi, aplotipo I e aplotipo II. L'aplotipo plastidiale I è posseduto dal 61% delle varietà esaminate, mentre l'aplotipo II dal 39% degli individui. È di grande importanza rilevare che è stata osservata una associazione completa tra aplotipo plastidiale e tipologia varietale ($\chi^2 = 74,00$; g.l. = 3; $P < 10^{-4}$; $R^2=1,00$; $n=61$). In particolare, tutti gli individui Catanesi e Romaneschi condividono l'aplotipo I. Tutti gli individui Violetti e Spinosi condividono l'aplotipo II (Figura 15A).

Figura 15 – Associazione tra aplotipi plastidiali e tipologia varietale (A) e tra aplotipi plastidiali e gruppi di Structure ($q>0,80$) (B).



4.1.3 Corrispondenze tra gruppi genetici nuSSR e cpSSR

I quattro gruppi genetici ottenuti in base all'analisi nuSSR sono risultati associati in modo statisticamente significativo agli aplotipi plastidiali ($\chi^2=33,0$ g.l.=3, $P<10^{-4}$, $n=83$, $R^2 = 0,31$). Inoltre, l'associazione tra gruppi genetici nuSSR e aplotipi plastidiali aumenta se si considerano per il calcolo soltanto gli individui per i quali in base all'analisi Structure nuSSR

$q > 0.80$, i.e. gli individui con un basso livello di admixture ($\chi^2 = 31,0$ g.l. = 3, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,43$; $n=64$) (Figura 15B).

Tale incremento di concordanza tra filogenesi nucleare e citoplasmatica al crescere delle “condizioni di stringenza” adottate per l’assegnazione degli individui ai rispettivi gruppi genetici, suggerisce l’esistenza di una sottostante e antica struttura clonale delle varietà di carciofo coltivato parzialmente “confusa” da mutazioni e/o fenomeni più recenti di flusso genico in conseguenza di ibridazione sessuale tra varietà appartenenti a diversi *gene pool*.

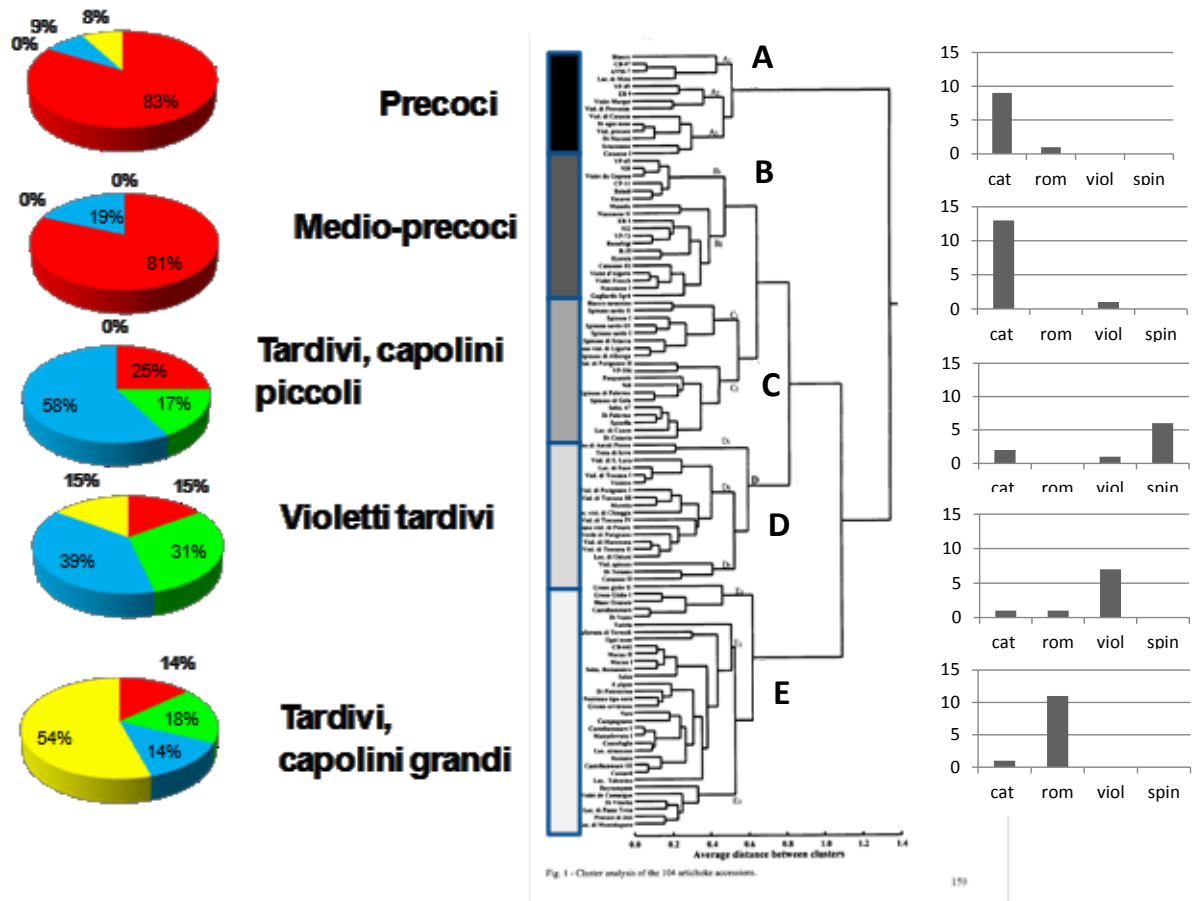
In letteratura sono disponibili relativamente pochi lavori che hanno studiato la struttura genetica delle varietà di carciofo. In uno studio, un gruppo di varietà di carciofo è state caratterizzato su base morfo-fenologica (Elia e Miccolis, 1996). Più recentemente, Lanteri et al. (2004) hanno analizzato una collezione di carciofo coltivato utilizzando marcatori AFLP. Poche varietà (16) sono state anche analizzate mediante SSR da Gatto et al. (2013) soprattutto per rendere possibile il confronto con il cardo selvatico. Questi dati rappresentano un’ottima base di confronto per i dati ottenuti in questo lavoro.

Nello studio di Elia e Miccolis (1996), sono state valutate 104 varietà di cui 76 in comune con quelle analizzate nel presente lavoro. Sulla base di otto caratteri quantitativi (larghezza del capolino principale, rapporto lunghezza/larghezza del capolino principale, epoca media di raccolta, inizio della raccolta, totale capolini raccolti, peso medio dei capolini secondari, lunghezza della foglia più lunga) ed attraverso l’analisi cluster multivariata è stato possibile classificare le varietà in 5 gruppi fenotipici principali: (A) precoci, (B) medio precoci, (C) tardivi con capolini piccoli, (D) violetti tardivi ed (E) tardivi con capolini grandi (Elia e Miccolis, 1996).

L’associazione tra i gruppi di Elia e Miccolis (1996; A-E) ed i quattro gruppi (1, 2B, 2A1, 2A2) identificati dall’analisi nuSSR con Structure, è mostrata in Figura 16.

I gruppi dei precoci e dei medio-precoci (i gruppi A e B di Elia e Miccolis) comprendono in larga maggioranza individui appartenenti al Gruppo 1 di Structure (l’83% e l’81%, rispettivamente). I gruppi “tardivi con capolini piccoli” e “violetti tardivi”, i.e. i gruppi C e D, comprendono in prevalenza individui attribuiti al sottogruppo 2A2 (il 58% ed il 39%, rispettivamente). Tuttavia, il gruppo C contiene meno individui appartenenti al gruppo 2A1 rispetto al gruppo D, il quale è anche formato (per il 15%) da individui attribuiti al gruppo 2B. Il gruppo dei “tardivi con capolini grandi” (gruppo E) è costituito, infine, da una maggioranza (54%) di individui appartenenti al gruppo 2B.

Figura 16 - Al centro è riportata la classificazione di Elia e Miccolis (1996) di 104 varietà di carciofo coltivato in base caratteri morfo-fenologici. Per le varietà in comune tra Elia e Miccolis (1996) ed il presente studio sono riportati: a sinistra, per ciascuno dei 5 gruppi principali identificati su base fenotipica (indicati a destra dalle lettere dalla A alla E in senso discendente) è riportata la % di individui attribuiti ai 4 gruppi (1, 2B, 2A1 e 2A2) identificati in base all'analisi nuSSR ed il software Structure; a destra, distribuzione di frequenza dei 4 tipi varietali entro ciascun cluster morfo-fenotipico.

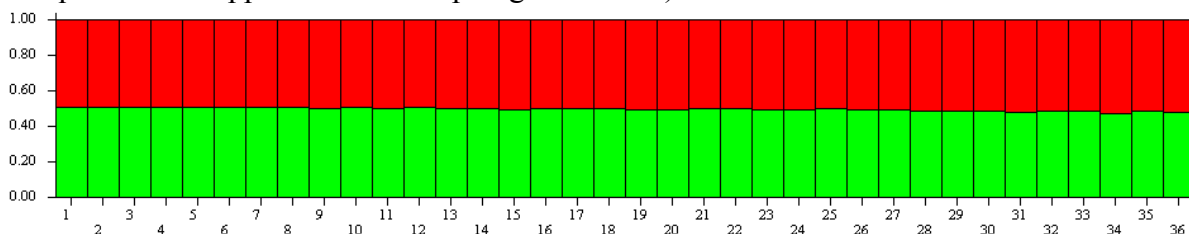


L'analisi dell'associazione tra i gruppi nuSSR identificati da Structure e i gruppi fenotipici identificati da Elia e Miccolis (1996) è risultata statisticamente altamente significativa ($\chi^2 = 52,4$, g.l.=12, $P < 10^{-4}$, $R^2 = 0,22$, $n=76$). Questo, rinforza il significato biologico della struttura genetica identificata tramite l'analisi nuSSR e sottolinea l'esistenza di una correlazione tra variabilità fenotipica e genetica non limitata ai soli caratteri su cui si basa la definizione delle principali tipologie varietali. Inoltre ciò suggerisce che il valore medio di molti caratteri fenotipici vari tra i quattro gruppi genetici identificati. Pertanto, un carattere quantitativo che ha la media più elevata in un dato gruppo sarà anche (statisticamente) associato a qualsiasi allele che si trovi ad elevata frequenza in quel gruppo. Inoltre, ogni marcatore che ha frequenze alleliche diverse nei diversi gruppi sarà in linkage disequilibrium

con altri marcatori lungo tutto il genoma. Questo negli studi di *association mapping* può comportare la comparsa di “associazioni spurie” o “falsi positivi” (cioè di associazioni tra un fenotipo e marcatori che non sono associati a nessun locus QTL). Tali dati sottolineano pertanto la necessità fondamentale di tenere in considerazione la struttura genetica nuSSR identificata in eventuali studi di *association mapping* (Ewens e Spielman, 1995; Pritchard e Rosenberg, 1999; Pritchard et al., 2000; Atwell et al., 2010).

Dal confronto tra l’analisi di Elia e Miccolis (1996) e quella nuSSR emerge che, nell’ambito della tipologia catanese, esiste una forte dicotomia per caratteristiche fenotipiche. Infatti, alcuni Catanesi appartengono al cluster A (quello maggiormente divergente dagli altri) mentre altri appartengono, soprattutto, al cluster B che è più affine al cluster C nel quale prevalgono i tipi spinosi. Tuttavia, entrambi i gruppi fenotipici A e B sono risultati associati allo stesso gruppo nuSSR, il gruppo 1. Per capire se tale dicotomia fenotipica è anche osservabile a livello genetico, gli individui appartenenti al gruppo 1 di Structure sono stati analizzati separatamente. Tuttavia, tale analisi non ha evidenziato l’esistenza di struttura genetica all’interno del gruppo 1 (Figura 17).

Figura 17 – Risultato dell’analisi cluster all’interno del Gruppo 1 (costituito da 36 individui dei quali il 92% appartenenti alla tipologia catanese).



4.1.4 Corrispondenze tra analisi SSR (nuSSR e cpSSR) versus AFLP

La stessa collezione di varietà commerciali analizzata in questo lavoro è stata precedentemente studiata utilizzando marcatori AFLP (Lanteri et al. 2004). Questi hanno consentito di classificare le varietà di carciofo in 4 gruppi principali chiamati A1 (comprendente i Catanesi), A2 (comprendente i Romaneschi), B1 (comprendente Spinosi e Violetti) e B2 (comprendenti Spinosi e Violetti). L’associazione tra i gruppi AFLP e nuSSR, è risultata statisticamente significativa a $K=4$ ($\chi^2=103,3$; g.l.=9; $P<10^{-4}$; $R^2=0,47$; $n=83$). La differenza principale tra i risultati conseguiti tramite i due metodi di indagine è che mentre per l’analisi AFLP i Catanesi si raggruppano insieme ai Romaneschi (Cluster A1 e A2 della Figura 2 di Lanteri et al., 2004) e gli Spinosi con i Violetti (cluster B1 e B2 della figura 2 di

Lanteri et al., 2004), per l'analisi SSR (vedi figura 13) la prima separazione è tra i Catanesi e tutti gli altri. Questo concorda con quanto osservato da Gatto et al. (2013) utilizzando un ridotto numero (16) di accessioni (si veda Figura 3 dei materiali supplementari di tali autori) utilizzando 35 microsatelliti, i.e. lo stesso tipo di marcatori utilizzato per questo lavoro di tesi.

Pertanto, nuSSR e AFLP delineano relazioni filogenetiche parzialmente contrastanti. Tuttavia, nonostante l'eccezione di alcuni genotipi Catanesi (gruppo B di Elia e Miccolis), la “*clustering history*” (Catanesi -> Romaneschi-> Violetti e Spinosi) ottenuta con l'analisi fenotipica di Elia e Miccolis (1996) somiglia maggiormente a quella evidenziata dai nuSSR rispetto a quella inferita con AFLP (Lanteri et al., 2004). La caratterizzazione varietale ottenuta con marcatori AFLP e SSR ha portato a diverse conclusioni anche in altre specie vegetali (e.g. Belay et al., 2003; Uptmoor et al., 2003) Le ragioni di discrepanza tra analisi SSR ed AFLP possono essere molteplici. I marcatori AFLP essendo dominanti non consentono di discriminare gli individui eterozigoti dagli omozigoti né i diversi eterozigoti. Questo è invece possibile con marcatori SSR che sono codominanti. Sebbene esistano diversi metodi statistici che limitano questo problema, il mancato riconoscimento degli eterozigoti può portare a stime non precise della divergenza genetica tra individui e popolazioni (e.g. Zhivotovsky et al., 1999). Tuttavia va anche ricordato che i marcatori AFLP e SSR sono caratterizzati da diversi meccanismi mutazionali e, soprattutto, da diversi tassi mutazionali da 10^{-6} a 10^{-5} per gli AFLP a 10^{-3} a 10^{-4} per gli SSR (Mariette et al., 2001; Vigouroux et al., 2002; Gaudeul et al., 2004; Thuillet et al., 2005; Kropf et al., 2009; Garoia et al., 2007). Questo significa che i diversi tipi di marcatore descrivono scenari e processi evolutivi accaduti in diverse epoche evolutive (Bitocchi et al., 2012).

L'analisi della variabilità plastidiale ha consentito di mettere in evidenza due aplotipi plastidiali. Contrariamente a quanto osservato per i nuSSR, la corrispondenza tra i cpSSR e gli AFLP è totale ($\chi^2 = 103,9$; d.f. = 3; $P = 10^{-4}$; $R^2 = 1.00$; $n = 82$): infatti all'aplotipo I corrispondono individui classificati unicamente nei gruppi A1 e A2, mentre all'aplotipo II soltanto individui classificati come Violetti e Spinosi.

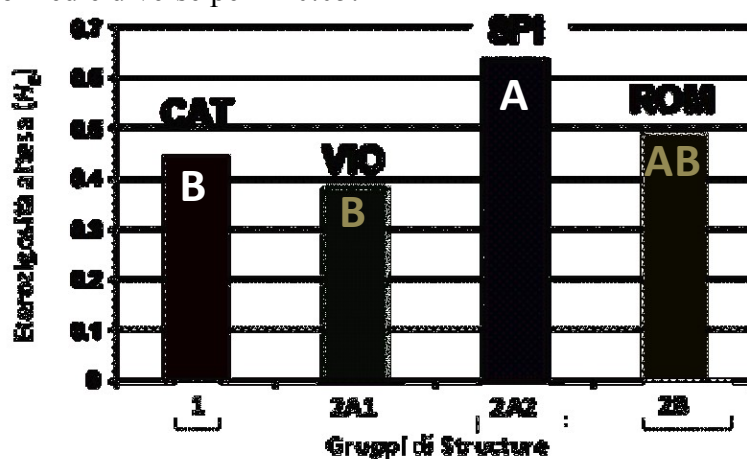
In letteratura, molti autori riportano incongruenza tra la struttura delle popolazioni determinata con marcatori citoplasmatici e con marcatori nucleari spesso imputata alla diversa modalità di eredità dei due marcatori, uni-parentale nel primo caso e bi-parentale nel secondo (Provan et al., 2001; Petit et al., 2005; Pelsner et al., 2010). In questo studio, la classificazione citoplasmatica (cpSSR) corrisponde totalmente a quella nucleare AFLP ma non a quella

nucleare SSR. Al riguardo, è interessante notare che i tassi di mutazione dei cpSSR (10^{-3} - 10^{-5} , Marshall et al., 2002; Provan et al., 1999) sono paragonabili a quelli degli AFLP.

4.2 Quale è il livello di variabilità all'interno dei gruppi genetici di carciofo coltivato?

La variabilità genetica presente all'interno di ciascun gruppo è stata stimata calcolando il livello di eterozigosità attesa in base all'equilibrio Hardy-Weinberg e correggendo per la dimensione del campione (H_e ; Nei, 1987). Come mostrato in Figura 18, i gruppi varietali presentano livelli di diversità genetica statisticamente differenti ($P=0,022$ per il test non parametrico di Wilcoxon). Il valore più elevato di H_e è stato osservato per il gruppo 2A2 ($H_e = 0,65$) a cui sono associati gli Spinosi. I gruppi 2B e 1 (a cui sono associati Romaneschi e Catanesi) si collocano in una posizione intermedia con un valore H_e di 0,49 e 0,44, rispettivamente. La diversità genetica più bassa è stata osservata per il gruppo 2A1 (associato ai Violetti) con $H_e = 0,38$. Pertanto, rispetto al gruppo 2A2 (quello più variabile) il gruppo 2B presenta una variabilità che è inferiore del 25%; tale differenza è del 32% nel caso del gruppo 1 e giunge al 42% nel caso del gruppo 2A1.

Figura 18 – Diversità genetica (H_e) osservata nei quattro gruppi di Structure. Per ogni gruppo è riportata (sopra l'istogramma) la tipologia varietale risultata associata. I 4 gruppi possiedono livelli di diversità genetica statisticamente differenti al test di Wilcoxon ($P=0,022$). La separazione delle medie è stata ottenuta mediante il test di Tukey-Kramer. Gruppi con lettere diverse presentano medie diverse per $P<0.05$.



Questo, anche se in misura minore, è confermato dai valori di H_e osservati all'interno dei gruppi varietali (Catanesi = 0,47, Romaneschi = 0,56, Violetti=0,49, Spinosi = 0,59).

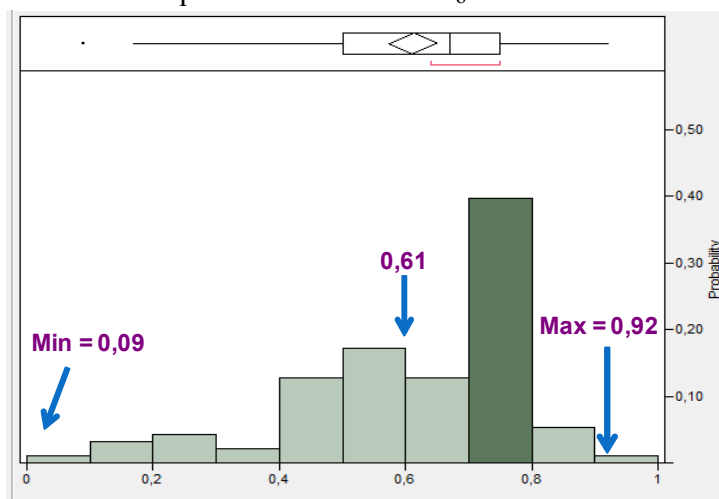
Tale risultato suggerisce che il gruppo a cui sono associati gli Spinosi, giacché caratterizzato da una maggiore variabilità, potrebbe essere quello più antico. Infatti, se si assume che i 4 gruppi di Structure rappresentano 4 stirpi clonali (*clonal lineages*) e si ipotizza

un modo di riproduzione di tipo esclusivamente clonale, si può desumere che ad una storia evolutiva più lunga corrisponda anche un maggior accumulo di mutazioni. Questo *rationale* è stato recentemente applicato, utilizzando 12 marcatori microsatelliti, per determinare la variabilità intra clonale e per stimare l'età dei cloni in *Dioscorea rotundata* (Scarcelli et al., 2013).

Tuttavia, si può alternativamente ipotizzare che i pattern di variabilità osservati siano il frutto dell'interazione tra propagazione vegetativa e riproduzione sessuale (McKey et al., 2010). Infatti, come anche dimostrato per altre colture, anche per il carciofo è possibile che gli effetti della ricombinazione sessuale siano stati incorporati nel ciclo di coltivazione nel momento in cui gli agricoltori hanno propagato clonalmente (casualmente o intenzionalmente) una pianta spontanea (*volunteer*) comparsa nel loro campo e originatasi da riproduzione sessuale (i.e., da incrocio occasionale).

I valori di eterozigosità osservata (H_o) delle varietà commerciali sono compresi tra lo 0,09% e il 92%, con un valore medio del 61% ed una mediana di 0,69 (Figura 19). Il 40% delle varietà esaminate mostra valori di eterozigosità compresi tra il 70% e l'80%. Il valore medio di eterozigosità (0,61) osservato in questo studio (con 93 varietà) è simile a quello ottenuto da Gatto et al. (2013) con 16 varietà (0,72).

Figura 19 – Distribuzione di frequenza dei valori di H_o delle varietà di carciofo coltivato.



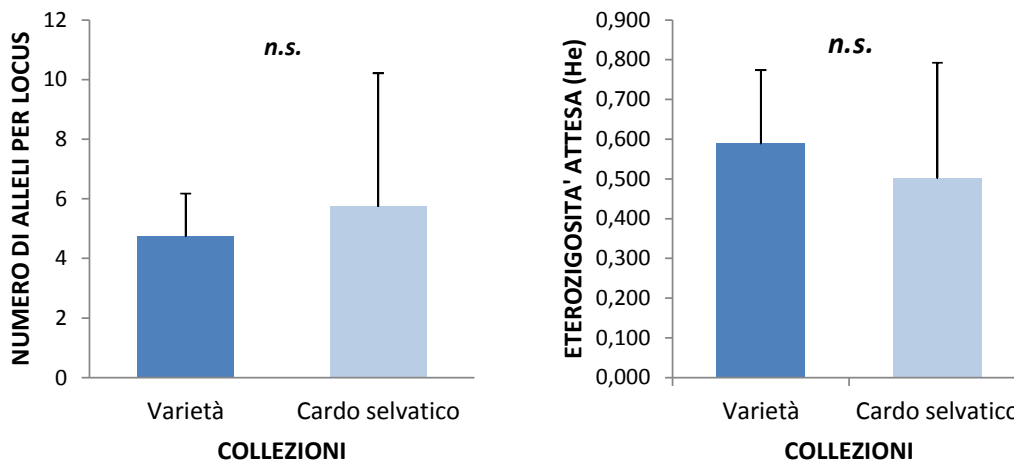
È stato ipotizzato che l'elevata eterozigosità dei materiali coltivati possa essere il risultato di selezione per vigore ibrido durante il processo di domesticazione del carciofo

coltivato. Ciò presuppone che comunque vi sia un legame tra vigore ibrido dei caratteri sotto selezione ed eterozigosità molecolare dei geni saggiati (Sonnante et al., 2007b, 2008).

4.2.1 Confronto della diversità genetica tra le varietà coltivate e il cardo selvatico

Le due collezioni condividono il 43% degli alleli. E' interessante notare che, nonostante la ristretta area geografica di campionamento (solo la Sardegna), il 32% degli alleli sono esclusivi della collezione di cardo selvatico a fronte del 25% di alleli esclusivi del coltivato. I materiali coltivati presentano un numero di alleli osservato per locus (n_a) minore rispetto al selvatico; viceversa, il valore di eterozigosità attesa (H_e) risulta essere superiore nelle varietà rispetto al selvatico (Figura 20). Le due collezioni non presentano valori statisticamente diversi per nessuno di queste due statistiche ($P > 0.05$ in entrambi i casi). I valori di n_a sono stati confrontati con quelli ottenuti sulle popolazioni di cardo selvatico e coltivato da Gatto et al. (2013). In dettaglio, i valori osservati per cardo selvatico collezionato in Sardegna è simile al valore del cardo selvatico del gene pool orientale (4,31) e nettamente superiore al valore osservato per il cardo selvatico del gene pool occidentale (2,94). Questo suggerisce o un'elevata variabilità del materiale sardo o la compresenza in Sardegna dei materiali provenienti dai due gene pool di cardo selvatico (sia occidentale che orientale).

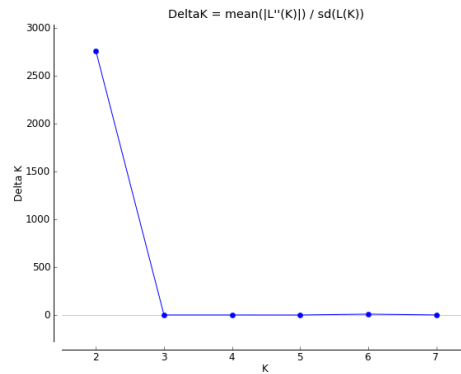
Figura 20 – Confronto tra le collezioni di carciofo domestico e cardo selvatico per numero di alleli (n_a) e numero di alleli effettivo (n_e) per locus. Le differenze sono state saggiate mediante paired t-test, n.s.= non significativo ($P > 0,05$)



4.2.2 Confronto della struttura genetica tra le varietà coltivate e il cardo selvatico

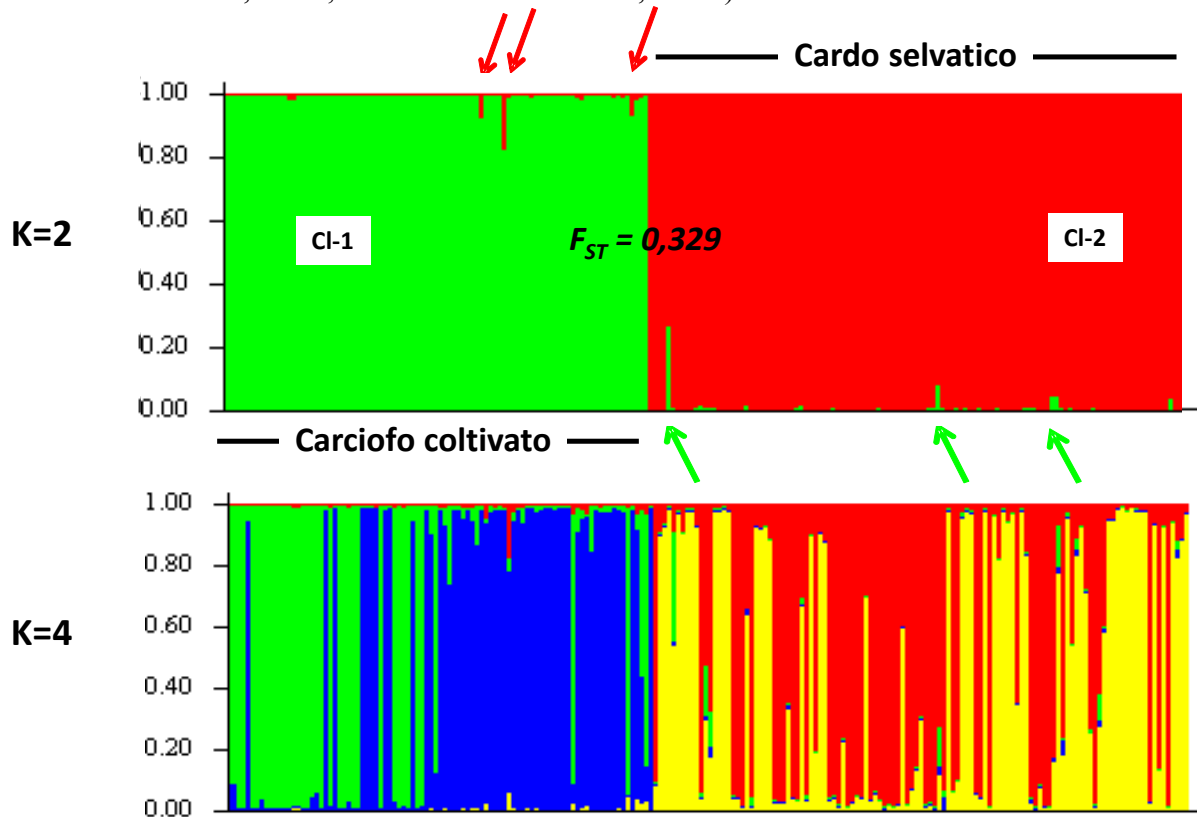
Al fine di studiare le relazioni esistenti tra materiale coltivato e selvatico, è stata anche condotta una analisi cluster con 210 individui, tra cui 93 di varietà coltivate e 117 di cardo selvatico. Il metodo di Evanno et al. (2005) ha fornito un elevato supporto per l'esistenza di due gruppi ($\Delta K=2751$, Figura 21).

Figura 21 – Risultato del metodo di Evanno et al. (2005) applicato all'analisi Structure con 210 individui di cui 93 di carciofo coltivato e 117 di cardo selvatico.

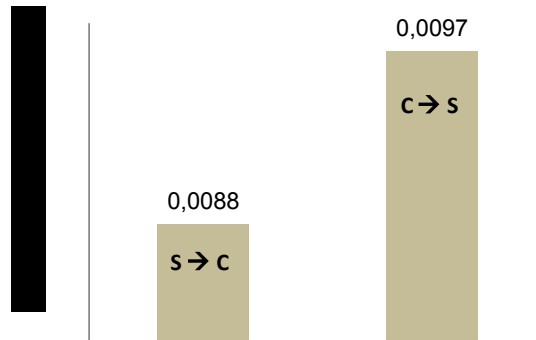


Per $K=2$ i tipi coltivati e selvatici vengono attribuiti a due clusters molto ben definiti (Figura 22). Infatti, tutte le varietà commerciali vengono assegnate al Cl-1 con un coefficiente di appartenenza, q , compreso tra 0,81 e 1,00 e che è risultato in media pari a 0,99. Similmente, tutti gli individui di cardo selvatico sono stati attribuiti al Cl-2 con q variabili tra 0,75 e 1,00 e con un valore medio pari a 0,99. Questo si riflette in un livello di suddivisione delle popolazioni piuttosto elevato misurato da un FST pari 0,329 ($P < 10^{-5}$). Nel complesso questo suggerisce un basso flusso genico tra domesticati e selvatici. Tuttavia, tre varietà mostrano un contributo da parte del gene pool selvatico non trascurabile essendo compreso tra il 5% ed il 19% (Figura 22, $K=2$). Similmente, tra i tipi selvatici spiccano cinque individui che mostrano un contributo del gene pool coltivato compreso tra il 5% ed il 25% (Figura 22, $K=2$).

Figura 22 – Confronto tra carciofo coltivato e cardo selvatico mediante il software Structure assumendo K=2 e K=4. Le frecce indicano potenziali introgressioni tra pool genici (da coltivato a selvatico, rosso; da selvatico a coltivato, verde).

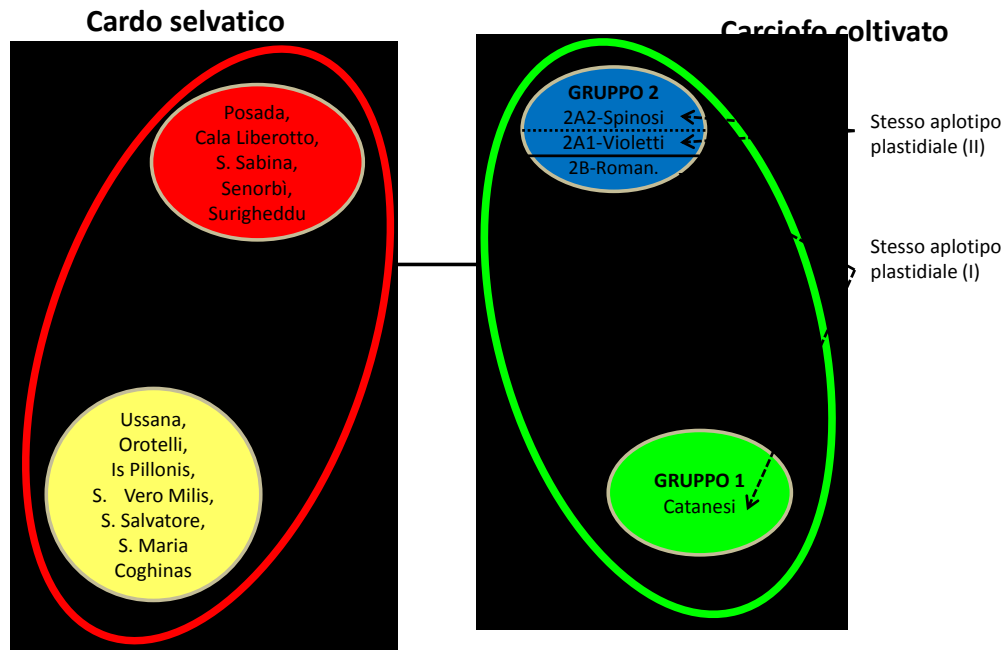


Nonostante, in media, i contributi del gene pool selvatico al gene pool coltivato ed il contributo del gene pool coltivato al gene pool selvatico siano risultati molto bassi (0.88% e 0.97%, rispettivamente; Figura 23) è comunque interessante notare che il flusso genico da coltivato a selvatico è risultato di circa il 10% più elevato che da selvatico a coltivato. Nonostante tale differenza non sia risultata statisticamente significativa (test non-parametrico di Wilcoxon: $P > 0.05$), questa asimmetria è attesa quando nel domesticato opera la selezione purificatrice mediata dagli agricoltori (Papa e Gepts, 2003). Infatti gli agricoltori in presenza di ibridi domesticato x selvatico tendono ad escluderli per via di caratteristiche morfologiche non appetibili, riducendo così la possibilità di introgressione da selvatico a domesticato. Diverse forze selettive possono operare anche contro l'ibrido selvatico x domesticato, ma questi ibridi presentano un vigore ibrido marcato che potrebbe favorirne la sopravvivenza in un ambiente naturale (Papa e Gepts, 2003).

Figura 23 - Flusso genico tra i gene pool selvatico (S) e coltivato (C) stimato assumendo $K=2$.

L'analisi a $K=2$ non è comunque esaustiva. Infatti, a $K=3$ si ha la separazione tra il cardo selvatico da una parte e due raggruppamenti di carciofo coltivato dall'altra (non mostrato). A $K=4$, l'analisi cluster evidenzia anche due raggruppamenti all'interno del materiale selvatico (Figura 22, $K=4$; Figura 24).

Figura 24 – Relazioni tra i quattro gruppi genetici identificati da Structure a $K=4$ utilizzando 93 varietà domestiche di carciofo e 117 individui di cardo selvatico. L'albero filogenetico è stato ottenuto mediante il metodo Neighbor-Joining implementato in Structure. Per il carciofo coltivato viene anche riportata la suddivisione entro il gruppo 2 tra i gruppi 2B, 2A1 e 2A2 correlati alle tipologie Romaneschi, Violetti e Spinosi, rispettivamente (vedi Figura 13). Sulla destra, è anche riportato il pattern di variabilità citoplasmatica (vedi Figura 15).



La suddivisione osservata nell'ambito del coltivato è quella già descritta fra le varietà del il Gruppo 1 (comprendente la quasi totalità dei Catanesi) ed il gruppo 2 (comprendente la maggior parte dei Romaneschi, degli Spinosi e dei Violetti). La suddivisione osservata nell'ambito del cardo selvatico non sembra avere una chiara struttura geografica. Infatti entrambi i gruppi di cardo selvatico comprendendo materiali provenienti da popolazioni vicine appartenenti alla stessa area geografica (es. Cala Liberotto, Posada in un gruppo; S. Vero Milis e San Salvatore nell'altro) ma nel contempo anche da popolazioni molto distanti tra loro (Figura 24 e Figura 11 dei Materiali e Metodi). Tale struttura potrebbe riflettere la presenza in Sardegna di entrambi i pool genici di cardo selvatico (quello occidentale e quello orientale) come suggerito da analisi fenotipiche condotte su questi materiali (Rau et al., in preparazione) e, parzialmente, anche dai risultati di Gatto et al. (2013).

Il confronto con i materiali selvatici è stato anche utilizzato per saggiare l'ipotesi evolucionistica per la quale il processo di domesticazione del carciofo avrebbe in primo luogo portato agli Spinosi e successivamente ai Violetti, ai Romaneschi ed infine ai Catanesi (Barbieri 1959; Lanteri et al 2004a).

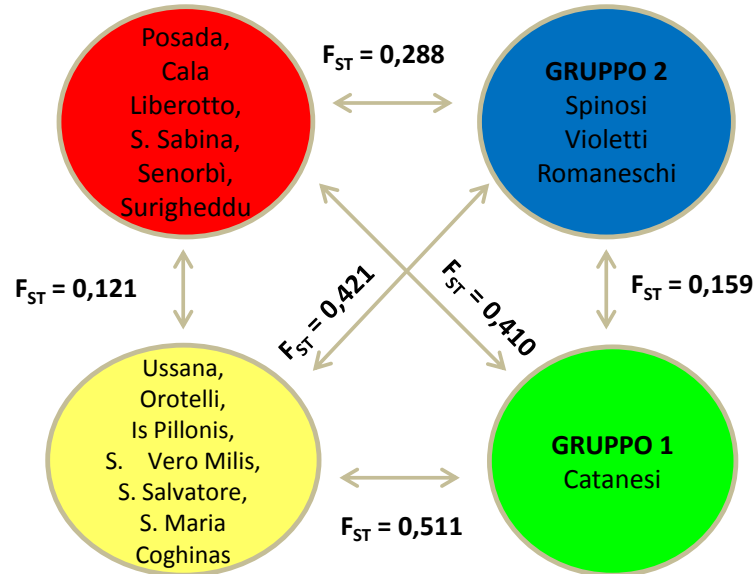
L'analisi filogenetica condotta in base al polimorfismo SSR ha messo in evidenza una minore distanza genetica ($F_{ST}=0.288$) tra il gruppo di coltivati comprendente quasi tutti gli Spinosi, i Violetti e i Romaneschi (il gruppo 2 identificato da Structure all'interno delle varietà coltivate) e un gruppo di selvatici comprendente individui provenienti da diverse località della Sardegna (Figura 25). Questa distanza è circa del 30% inferiore a quella osservata con il secondo cluster di materiali selvatici ($F_{ST}=0.421$). Il gruppo dei Catanesi è geneticamente più distante dai materiali selvatici; anche in questo caso, tuttavia la distanza con il primo cluster di cardo selvatico ($F_{ST}=0.410$) è di circa il 20% inferiore rispetto al secondo ($F_{ST}=0.511$). La suddivisione osservata all'interno dei materiali selvatici e coltivati è all'incirca della stessa entità ($F_{ST} = 0.121$ e $F_{ST}=0.159$; rispettivamente; Figura 25).

In conclusione, l'analisi filogenetica in primis suggerisce che la domesticazione dei Catanesi sia stata successiva a quella degli altri tre tipi varietali. Inoltre, i dati suggeriscono che i diversi gene pool di cardo selvatico potrebbero avere contribuito differentemente al processo di domesticazione.

Gli Spinosi, che si è ipotizzato possano essere stati domesticati per primi (Barbieri 1959), sono più vicini al cardo selvatico, ma si accompagnano ai Romaneschi ed ai Violetti (Figura 13 K=3 e Figura 24). Tuttavia, sia l'analisi cluster di Structure che l'analisi PCA

condotte sulle sole varietà indicano che Spinosi e Violetti sono più distanti dai Catanesi di quanto non lo siano i Romaneschi (Figure 13 e 14).

Figura 25 – Distanze genetiche (F_{ST}) tra i gruppi di cardo selvatico e carciofo coltivato identificati a $K=4$ utilizzando 210 individui (93 di carciofo coltivato e 117 di cardo selvatico).



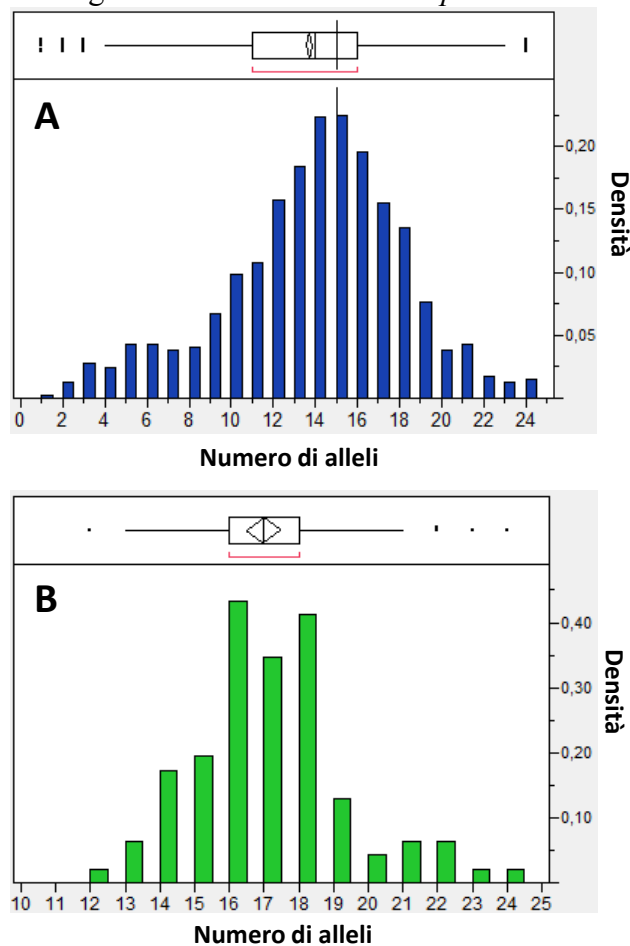
L'analisi cloroplastica in parte conferma la maggiore affinità tra Romaneschi e Catanesi che condividono l'aplotipo plastidiale I, mentre Violetti e Spinosi condividono l'aplotipo II. Inoltre, l'analisi della diversità genetica entro gruppi ha evidenziato che il gruppo a cui afferiscono la maggior parte degli Spinosi è quello con la maggiore diversità genetica (Figura 18). Se si ipotizza che la quantità di mutazioni accumulate sia proporzionale all'età di un clone (Scarcelli et al., 2013) e nell'ipotesi che la domesticazione possa avere prodotto una riduzione di diversità, sembrerebbe possibile ipotizzare che gli Spinosi siano stati i primi ad essere domesticati, prima dei Romaneschi e dei Violetti, ed infine, dei Catanesi. In precedenti studi è stato ipotizzato che le tipologie varietali spinose si siano evolute parallelamente alle tipologie non spinose (Lanteri et al., 2004a). Tali dati sono in accordo con i risultati plastidiali ottenuti ma non con i dati ottenuti a livello nucleare in cui i romaneschi risultano più vicini a spinosi e violetti.

4.3 Caratterizzazione della collezione di Spinoso Sardo

La caratterizzazione della collezione di 105 individui di Spinoso Sardo allevati presso l'AGRIS di Oristano e campionati in carciofaie situate in diverse (e importanti per la cinaricoltura) aree della Sardegna ha evidenziato la totale assenza di variabilità ai loci SSR analizzati, i.e. tutti i 105 individui hanno mostrato lo stesso profilo genetico.

La Figura 26 mostra la distribuzione di frequenza delle distanze genetiche tra le 4278 [93x(93-1)] coppie di varietà commerciali calcolate in base all'analisi di 12 loci nuSSR.

Figura 26 - (A) Distanze genetiche tra le coppie di varietà di carciofo coltivato. (B) Distribuzione delle distanze di genetiche tra spinoso sardo e le altre varietà di carciofo. La parte superiore di entrambi i grafici mostra l'*outlier box plot*.



Le varietà analizzate, in media differiscono per $13,7 \pm 4,3$ alleli (mediana=14 alleli), i.e. sono distinguibili per oltre il 50% degli alleli. Inoltre, due varietà di carciofo coltivato differiscono al minimo per 1 allele (i.e. per circa il 4% degli alleli) e al massimo per 24 alleli (il 100% degli alleli) (Figura 26A). Pertanto, nonostante il numero non elevato di marcatori

utilizzato per le analisi, tutte le varietà studiate hanno mostrato un profilo genetico nuSSR unico.

Al riguardo, l'identità genetica di tutti i 105 individui di Spinoso Sardo anche con 19 loci nuSSR (+7 loci rispetto all'analisi varietale), sottolinea la scarsissima variabilità genetica (almeno nel caso dei nuSSR) presente nella varietà Spinoso Sardo. Comunque, lo spinoso sardo è risultato caratterizzato da un profilo ben distinto da quelli delle altre varietà essendo diverso, al minimo per il 50% degli alleli (12) ed al massimo per il 100% degli alleli (24), con una media ed una mediana pari a 17 ± 2.27 (Figura 26B).

Questo studio ha evidenziato l'assenza di variabilità per marcatori SSR in una collezione di 105 cloni di Spinoso Sardo provenienti da tutto il territorio regionale. Tuttavia, gli stessi marcatori sono stati in grado di definire la struttura genetica delle varietà e di rilevare una elevata variabilità genetica nelle popolazioni di cardo selvatico e di studiare le relazioni filogenetiche tra materiali coltivati e selvatici. Nel complesso sembra possibile affermare che la variabilità genetica SSR in Spinoso Sardo è, quanto meno, molto bassa. Precedenti esperienze condotte con marcatori AFLP su 20 cloni hanno evidenziato un livello di polimorfismo piuttosto basso ma comunque non nullo, pari al 12% contro il 70% osservato per le varietà commerciali e l'85% di una collezione di cardo selvatico (Saba, 2003). La distinguibilità degli individui di Spinoso Sardo è stata osservata in vari lavori (Lanteri et al., 2004a,b) insieme anche ad un moderato livello di divergenza genetica tra diversi campi coltivati ($F_{ST}=0,28$; Lanteri et al., 2001). Cosa potrebbe significare la differenza tra lo 0% di polimorfismo osservato per SSR ed il 12% per AFLP?. Alcune ragioni tecniche potrebbero spiegare tale discrepanza; ad esempio gli AFLP mostrano una maggiore sensibilità alla eventuale degradazione del DNA; inoltre esiste la possibilità che alcune bande AFLP provengano dall'amplificazione del DNA di altri organismi presenti nella pianta (funghi, batteri, virus) (Sukno et al., 2002). Questo è particolarmente vero per le piante a riproduzione clonale (McKey et al., 2010). Entrambi tali limiti sono superati dagli SSR che sono locus specifici. Tuttavia, tali discrepanze possono essere imputate anche a ragioni biologiche. Infatti l'evoluzione in condizioni di stretta clonalità è più dinamica di quanto inizialmente ipotizzato (McKey et al., 2010). Le mutazioni somatiche possono essere così frequenti che l'esatta identità genetica dei 'clonemates' è assolutamente improbabile (Lushai & Loxdale, 2002). Inoltre, nelle piante domestiche propagate clonalmente vi sono diversi esempi dell'impatto delle mutazioni somatiche nella creazione di variabilità genetica in grado di contribuire

all'evoluzione adattativa (Whitham e Slobodchikoff, 1981). Sotto questa ipotesi, il fatto che si osservi che la variabilità osservata con gli AFLP è maggiore che con gli SSR potrebbe essere giustificato dalla maggiore capacità di “scansione” del genoma, e dunque di mettere in luce mutazioni somatiche, dei primi rispetto ai secondi. Inoltre, gli SSR hanno un meccanismo mutazionale (almeno in parte) legato alla meiosi (Ellegren, 2004; Schlötterer, 2000) la quale ha un ruolo molto più limitato o nullo nei sistemi a riproduzione clonale. Inoltre, recentemente in vitis vinifera indagini genomiche tra diversi cloni della varietà Pinot (in grado di produrre vini con diverse caratteristiche) hanno evidenziato in un tratto di 600 Mb nessuna variazione SSR, una relativamente bassa variazione SNP ma un elevato polimorfismo dovuto ad elementi genetici mobili (Carrier et al., 2012). L'analisi AFLP può, in parte, rilevare polimorfismo dovuto ad elementi trasponibili, ma non l'analisi SSR.

Inoltre, sebbene la nostra analisi genetica indichi che le possibilità per la selezione clonale siano limitate, tuttavia, altre esperienze sembrerebbero suggerire il contrario. Il confronto tra diversi cloni (Muntoni e Poddie 2002) ha consentito di identificare biotipi distinguibili sulla base di caratteristiche agronomiche e commerciali. Tali caratteristiche sono risultate stabili anche dopo moltiplicazione in vitro di questi biotipi. Di 80 cloni analizzati, 9 sono stati selezionati e caratterizzati per caratteri agronomici e biometrici e per stabilità produttiva (Mallica et al. 2004). I cloni 110/14 e 108/11 hanno mostrato un elevato potenziale produttivo mentre il clone 39 ha mostrato una produzione più precoce.

Questo suggerisce che, seppur limitata, la variabilità genetica intra-clonale consente comunque margini per la selezione clonale. Tuttavia, una spiegazione alternativa in grado di armonizzare la bassa variabilità genetica osservata (SSR ed AFLP) in Spinoso Sardo e la presenza di variabilità fenotipica potrebbe essere l'esistenza di variabilità epigenetica trans-generazionale ereditabile. Questa eventualità è ancora dibattuta per le specie che si riproducono via seme, ma è possibile in specie a propagazione vegetativa (McKey et al., 2010). Ad esempio, variabilità epigenetica è stata osservata in una collezione fenotipicamente variabile di accessioni di banana molto poco polimorfica per marcatori AFLP ed SSR, ma variabile nei pattern di metilazione della citosina (Noyer et al., 2005). Il presente studio suggerisce pertanto la necessità di ulteriori indagini ad hoc per verificare questa ipotesi di lavoro.

5. Conclusioni

Il presente lavoro ha consentito di acquisire importanti informazioni circa l'organizzazione della variabilità genetica in una collezione di varietà di carciofo.

L'analisi nuSSR, ha consentito di documentare l'esistenza di diversi gruppi genetici, probabilmente correlati alle più importanti tipologie varietali (Catanesi, Romaneschi, Violetti e Spinosi). Questo conferma quanto osservato precedentemente con altri marcatori molecolari, anche se le relazioni genetiche tra i gruppi identificati con le varie tecniche di indagine non coincidono completamente.

Per la prima volta è stata documentata la variabilità citoplasmatica in carciofo che per i cpSSR è risultata bassissima.

Il confronto tra diversi tipi di marcatore indica che le strutture genetiche identificate dipendono, almeno in parte, dai diversi tassi mutazionali dei marcatori.

Futuri studi di association mapping potrebbero avvantaggiarsi delle informazioni provenienti da più studi condotti con diversi tipi di marcatore.

Un approccio multicriterio, basato sulla analisi del linkage disequilibrium, del livello di inbreeding, e della associazione tra polimorfismo del genoma nucleare e citoplasmatico, indica una struttura clonale ben definita dei materiali ma anche un ruolo per la ricombinazione sessuale durante l'evoluzione delle varietà coltivate di carciofo.

Il confronto con una collezione di cardo selvatico, ha consentito di concludere che la collezione di varietà commerciali è molto variabile, ma che tuttavia è possibile trovare nel selvatico una elevata quota di alleli non presenti nel gene pool coltivato.

E' stata messa in evidenza un'elevata eterozigosità dei materiali coltivati suggerendo l'esistenza di selezione per elevata eterozigosità (vigore ibrido) in conseguenza della domesticazione.

I gene pool coltivati e selvatici mostrano un livello di differenziazione genetica moderato-alto, il livello di flusso genico tra pool genici è molto basso.

Tra i materiali coltivati Spinosi, Violetti e Romaneschi sono più affini al cardo selvatico; inoltre, in base ai livelli di diversità genetica e alle relazioni filogenetiche osservate, un gruppo genetico (quello contenente la maggior parte degli spinosi) potrebbe essere il più antico.

La collezione di individui di spinoso sardo non ha mostrato variabilità per marcatori nuSSR. Tuttavia, il profilo genetico risulta ben differenziabile da quello delle altre varietà

commerciali in studio. Tale situazione è sostanzialmente favorevole quando l'obiettivo sia l'identificazione varietale.

Tuttavia, la scarsa variabilità genetica osservata in Spinoso Sardo contrasta con la variabilità fenotipica spesso osservata e con le esperienze di selezione clonale e solleva la questione del ruolo della variazione epigenetica come fonte di variabilità fenotipica in carciofo.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari



Indirizzo : Produttività delle piante coltivate

Ciclo XXVI

Bibliografia

- AA.VV. (2006). Il carciofo: dal laboratorio al mercato. Atti del Convegno conclusivo progetto MIPAAF "Carciofo", ISPaVe, Roma 19-21 Aprile.
- Abbate V., Noto G. (1981). Variabilità ambientale e genotipica in popolazioni siciliane di *Cynara scolymus* ed isolamento di nuovi cloni di Violetto di Sicilia. Atti III Cong. Int. Studi sul carciofo. Ed. Laterza (Bari): 797-807.
- Acquadro A., Lanteri S., Scaglione D., Arens P., Vosman B., Portis E. (2009). Genetic mapping and annotation of genomic microsatellites isolated from globe artichoke. *Theor Appl Genet* 118:1573-1587.
- Adzet T. and Puigmacia M. (1985). High-performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus* L. leaves. *J. Chromatogr.* 348: 447-452.
- Agapow P.M. and Burt A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1(1-2), 101-102.
- Alamanni M.C. and Cossu, M. (2001). Preliminary investigations for characterization of polyphenolic fraction of *Cynara scolymus* var. *Spinoso Sardo*. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, pag. 30.
- Alvisi F. (1967). Il carciofo produzione e commercializzazione. IRVAM, pag.318.
- Ancora G. e Saccardo F. (1987). Carciofo: nuove tecniche di propagazione. *Informatore Agrario*, 43.
- Anido F.S.L., Firpo I.T., García S.M. and Cointy, E.L. (1998). Estimation of genetic parameters for yield traits in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Euphytica*, 103(1), 61-66.pag. 43.

- Atwell S., Huang Y.S., Vilhjálmsson B.J., Willems G., Horton M., Li Y. and Nordborg M. (2010). Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature*, 465(7298), 627-631.
- Barbieri R. (1959) Osservazioni sulla biologia del carciofo ‘Spinoso Sardo (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) Studi Sass Ann Fac Agric 19–36.
- Barcaccia G. e Falcinelli M. (2006). Genetica e genomica. Liguori.
- Barcaccia G., Albertini E., Rosellini D., Tavoletti S. and Veronesi F. (2000). Inheritance and mapping of 2 n-egg production in diploid alfalfa. *Genome*, 43(3), 528-537.
- Basnizki J., Zohary D. (1987). A seed plat cultivar of globe artichoke. *HortSci* 22:678:679.
- Basnizky J., Zohary D. (1994). Breeding of seed – Planted artichoke. *Plant Breed Rev* 12: 253-269.
- Bassam B.J., Caetano-Anollés G. e Gresshoff P.M. (1991). Fast and sensitive silver-staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 196(1), 80-83.
- Beckman C.H. (2001). “Phenolic-storing cells: key sto programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants”. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* (57).
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L. and Trujillo I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 736-744.
- Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. and Mergeai G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, 10(2), 77.
- Bianco A., Kostarelos K. and Prato M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 9(6), 674-679.
- Bianco V.V. Carciofo (*Cynara Scolymus*). In Bianco V.V. e Pimpini F. (1990). *Orticoltura*. Patron Editore. Bologna.
- Bianco V.V., Calabrese N. (2009). Botanica, Morfologia e Fisiologia 12-17, in *Il carciofo e il cardo*, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana *Coltura&Coltura* coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed.Script, Bologna.

- Bowers J.E., Dangi G.S., Vignani R. and Meredith C.P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39(4), 628-633.
- Brown J.E., Rice-Evans C.A. (1998). Luteolin rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro, *Free Radic. Res.* 29247-255.
- Cadinu M., Mallica G.M., Lanteri S., Repetto A., Frau A., Portis E., Baghino L., Pisanu A.B. (2007). Possibilità di rilancio per lo Spinoso sardo – *Inf.tore Agr.* 22: 44-46.
- Calabrese N., Bianco V.V. (2000). Effect of gibberellic acid on yield and quality of seed grown artichoke (*Cynara cardunculus* (L) var. *scolymus* (L) Fiori). *Acta Horti* 514:25–32.
- Cannella C. (2009). Alimentazione, Aspetti nutrizionali 46-49, in *Il carciofo e il cardo*, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana *Coltura&Coltura* coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed.Script, Bologna.
- Causey J.L., Feirtag J.M., Gallaher D.D., Tunland B.C. and Slavin J.L. (2000). Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition Research*,20(2), 191-201.
- Chergia A.P.R. (2013). Studio dei principali fattori che influenzano l'insorgenza dell'atrofia del capolino in carciofo *Spinoso Sardo*. Tesi di Dottorato.
- Chung S.M. and Staub J.E. (2003). The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (4), 757-767.
- Chybicki I.J., and Burczyk J. (2009). Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity*, 100(1), 106-113.
- Curt M.D., Sanchez G., Fernandez J. (2001). The potential of *Cynara Cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass and Bioenergy* 23: 33-46.
- Debenedetti S.L., Palacios P.S., Wilson E.G., Coussio J.D. (1993). HPLC analysis of caffeoylquinic acids contents in Argentine medicinal plants. *Acta Horti* 333: 191-199.
- Deidda M. (1967). Contributo al miglioramento genetico del carciofo. *Atti I Congresso Int. Di Studi sul Carciofo*. Bari. Ed. Minerva Medica (Torino): 157-174.

- Dellacecca V., Pace M. (1974). Influenza del materiale di propagazione sulla precocità di produzione della carciofaia. In: Nuovi studi sul carciofo. Ed. Minerva Medica Italica, Torino.
- Dempewolf H., Rieseberg L.H. and Cronk Q.C. (2008). Crop domestication in the Compositae: a family-wide trait assessment. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(8), 1141-1157.
- Di Venere D., Linsalata V., Pace B., Bianca V.V. and Perrino P. (2000). Polyphenol and inulin content in a collection of artichoke. In IV International Congress on Artichoke 681 (pp. 453-460).
- Doebley J. (1992). Molecular systematics and crop evolution. In *Molecular systematics of plants* (pp. 202-222). Springer US.
- Doyle J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-14.
- Doz M. (2012). Valutazione Agronomica di Ricino (*Ricinus communis* L.) e Cardo (*Cynara cardunculus* L.) per la Produzione di Biodiesel in Ambiente Mediterraneo. Tesi dottorato.
- Earl Dent A. and von Holdt Bridgett M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Elia A. and Miccolis V. (1996). Relationship among 104 artichoke *Cynara scolymus* L. accessions using cluster analysis. *Adv. Hort. Sci.* 10:158–162.
- Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435-445.
- Ennos R.A., Sinclair W.T., Hu X.S. and Langdon A. (1999). Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. *Molecular systematics and plant evolution*, 1-19.
- Ernst M. and Feldheim W. (2000). Fructans in higher plants and in human nutrition. *J Appl Bot-Angew Bot* 74 (1-2): 5-9.

- Estoup A., and Angers B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and experimental considerations. *Advances in Molecular Ecology*, ed Carvalho G (IOS Press, Amsterdam), pp 55–86.
- Evanno G., Regnaut S. and Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Ewens W.J. and Spielman R.S. (1995) The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am J Hum Genet* 57:455–464.
- Excoffier L., Smouse P.E. and Quattro J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Excoffier L. and Lischer H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Falush D., Stephens M. and Pritchard J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.
- Falush D., Stephens M. and Pritchard J.K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574-578.
- FAOSTAT 2010. <http://faostat.fao.org>
- Fernández González J. y García Muller M. (2004). “Sistema de separación fraccionada de la biomasa integral de cardo, *Cynara cardunculus*”. Instituto Madrileño de Investigación Agraria. Universidad Politécnica de Madrid. 11 pp - 2004.
- Fernández J., Curt M.D., Aguado P.L. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. or energy and other uses. Departamento de Produccion Vegetal: Botanica y Proteccion Vegetal, Universidad, Politecnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain.
- Foti S. e Mauromicale G. (1994). Sul miglioramento del calendario di produzione del carciofo e delle caratteristiche di qualità del prodotto mediante la diffusione di nuove varietà. *Sementi elette*, 40, 19-29.

- Foti, S., Mauromicale, G., Raccuia, S. A., Fallico, B., Fanella, F. and Maccarone, E. (1999). Possible alternative utilization of *Cynara* spp.: I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain. *Industrial Crops and Products*, 10(3), 219-228.
- Foury C. (1969). Étude de la biologie florale de l'artichaut *Cynara scolymus* L. : Application a la sélection 2. Étude des descendances obtenues en fécondation contrôllée. *Ann Amélior Plantes* 19(1): 23-52.
- Foury C. (1979). Quelques aspects pratiques de la sélection gènealogique de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.) Presentation. Crèation delignées. *Ann. Amélior. Plantes* 29: 382-418.
- Foury C. (1989). Ressources génétiques et diversification de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) *Acta Horti* 242:155-166.
- Frau A., Cadinu M., Repetto A., Pilia R., Zedda A., Beneventi S. (2007). Piante fuori tipo nella coltura in vitro del carciofo: ricerca di parametri per uno screening precoce. VIII Giornate Scientifiche SOI. Sassari, 8-12 maggio 2007.
- Garoia F., Guarniero I., Grifoni D., Marzola S.A and Tinti F. (2007). Comparative analysis of AFLPs and SSRs efficiency in resolving population genetic structure of Mediterranean *Solea vulgaris*. *Molecular Ecology*, 16(7), 1377-1387.
- Gatto A., De Paola D., Bagnoli F., Vendramin G.G. and Sonnante G. (2013). Population structure of *Cynara cardunculus* complex and the origin of the conspecific crops artichoke and cardoon. *Annals of botany*, 112(5), 855-865.
- Gaudeul M., Till-Bottraud I., Barjon F. and Manel S. (2004). Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L.(Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, 92(6), 508-518.
- Gebhardt R. and Fausel M. (1997). Artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 11 (5): 669-672.
- Gominho J., Fernandez J., Pereira H. (2001). *Cynara Cardunculus* L. : a new fibre crop for pulp and paper production. *Ind Crop. Prod.* 13: 1-10.
- Gupta P.K. and Varshney R.K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163-185.

- Halkett F., Simon J.C. and Balloux, F. (2005). Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(4), 194-201.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M. and Pritchard J.K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322-1332.
- Istituto di Servizi per Il Mercato Agricolo Alimentare. ISMEA 2010.
- Istituto Nazionale di Statistica 2012. Stima delle superfici e produzioni delle coltivazioni agrarie.
- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., Van De Wiel C., Bredemejer G., Vosmn B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini M., Maestri E., Malcevschi A., Marmilori N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. - *Mol Breeding*, 3 (5): 381-390.
- Kimura M. and Crow J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725.
- Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y. and Shibata H. (1997). Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1335(3), 335-342.
- Kraft K. (1997). Artichoke leaf extract - recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine* 4.4: 369-378.
- Kropf M., Comes H.P. and Kadereit J.W. (2009). An AFLP clock for the absolute dating of shallow-time evolutionary history based on the intraspecific divergence of southwestern European alpine plant species. *Molecular Ecology*, 18(4), 697-708.
- Lagoda P.J., Dambier D., Grapin A., Baurens F.C., Lanaud C. and Noyer J.L. (1998). Non radioactive sequence tagged microsatellite site analyses: A method transferable to the tropics. *Electrophoresis*, 19(2), 152-157.
- Lanteri S. and Portis E. (2008). Globe artichoke and cardoon. In *Vegetables I* (pp. 49-74). Springer New York.

- Lanteri S., Acquadro A., Comino C., Mauro R., Mauromicale G., Portis E. (2006). A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, SSAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 112:347–357.
- Lanteri S., Acquadro A., Saba E. Portis E. (2004b). Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (*Cynara scolymus* var. *cardunculus* L.) ‘*Spinoso sardo*’. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 79, pp. 863-870.
- Lanteri S., Di Leo I., Ledda L., Mameli M.G., Portis E. (2001). RAPD variation within and among populations of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), cv ‘*Spinoso sardo*’. *Plant Breeding* 120 (3): 243-247.
- 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, pp 1534-1544.
- Lattanzio V., Lafiandra D., Morone Fortunato I. (1979). Composizione chimica e valore nutritivo del carciofo (*Cynara scolymus* L.) In: Atti 3° Congresso Internazionale sul carciofo, Bari; Tip. Laterza, Bari: 117-125.
- Lee J., Huang C.J. and Shin Y. (1997). On stationary tests in the presence of structural breaks. *Economics Letters*, 55(2), 165-172.
- Levinson G. and Gutman G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*, 4(3), 203-221.
- Lo Monaco A. (2012). Biologia fiorale, produzione di seme e miglioramento genetico del carciofo. Tesi Dottorato. Università degli studi di Catania.
- Lushai G. U. G. S. and Loxdale, H. D. (2002). The biological improbability of a clone. *Genetical research*, 79(1), 1-10.
- Maccarone E., Fallico B., Fanella F., Mauromicale G., Raccuia S. A. and Foti, S. (1999). Possible alternative utilization of *Cynara* spp.: II. Chemical characterization of their grain oil. *Industrial crops and products*, 10(3), 229-237.
- Mallica G., Baghino L., Cadinu M. and Repetto A. (2004). Risultati della selezione clonale sulla cultivar di carciofo ‘*Spinoso sardo*’. *Italus Hortus*, 11, 25-28.

- Mariette S., Chagné D., Lézier C., Pastuszka P., Raffin A., Plomion C. and Kremer, A. (2001). Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, 86(4), 469-479.
- Maroof M.S., Biyashev R.M., Yang G.P., Zhang Q. and Allard R.W. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5466-5470.
- Marshall H.D., Newton C., Ritland K. (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 367–378.
- Martometti E.S. (2003). Selezione clonale ed analisi della variabilità in *Cynara cardunculus* var *scolymus* L. tipo varietale “*Spinoso Sardo*”. Tesi di Laurea. Università degli studi di Sassari.
- Matus I.A. and Hayes P.M. (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45(6), 1095-1106.
- Mauromicale G. (1987). Panorama varietale del carciofo e sua prevedibile evoluzione. *Inf Agr* 5: 69-75.
- Mauromicale G. e Mauro R.P. (2011). Valorizzazione della Biodiversità Cinaricola.
- Mauromicale G., Copani V. (1989). Caratteristiche biologiche e produzione di cloni diversi di carciofo isolati in popolazioni Siciliane di Violetto di Sicilia. *Tecnica agricola* 41(4): 3-17.
- Mauromicale G., Ierna A. (2000). Panorama varietale e miglioramento genetico del carciofo. *L'Informatore Agrario*, 56 (26), 39-45.
- Mauromicale G., Morello N., Ierna A. (2000). Nuove varietà per migliorare la cinaricoltura siciliana. *InfAgr* 26: 47-51.
- McKey D., Elias M., Pujol B. and Duputié, A. (2010). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist*, 186(2), 318-332.
- Miccadei S., Bugianesi R., Di Venere D., Cardinali A., Linsalata V., Foddai, M.S. and Maiani G. (2004). Efficacia protettiva da danno ossidativi di frazioni polifenoliche da *Cynara scolymus* in epatociti di ratto. *Italus Hortus*, 11(5), 86-89.

- Micozzi F., Pace B., Calabrese N. (2009). Ricerca, Tecnica vivaistica 332-341, in Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana Coltura&Coltura coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna.
- Miller T.(1975). New artichoke clones. New Zeland J. Agr. 131(1):33-35.
- Mitchell S.E., Kresovich S., Jester C.A., Hernandez C.J. and Szewc-McFadden A.K. (1997). Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. Crop Science, 37(2), 617-624.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R. & Sasaki T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular breeding, 3(2), 87-103.
- Muñoz N.A.R.(2005). Salvaguardia e caratterizzazione morfologica e molecolare di ecotipi di carciofo di tipo Romanesco. Tesi Dottorato
- Muntoni M. and Poddie M. (2002). Clonal selection of. *Italus Hortus*, 9.
- Muroni S. (2006). Studio dell'influenza dei fattori meteorologici sulla fenologia delle principali specie orticole da pieno campo e messa a punto dei modelli semplificati per la previsione della durata del ciclo colturale. Tesi di dottorato. Università degli Studi di Sassari.
- Musu V. (2011). Dinamica della nutrizione minerale in carciofo:determinazione della curva di crescita dei principali tipi varietali coltivati in Sardegna. Università degli Studi di Sassari. Tesi di Laurea.
- Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided population. Proceeding of the National Academy of Science, USA, 70: 3321-3323.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89(3), 583-590.
- Noyer J.L., Causse S., Tomekpe K., Bouet A. and Baurens F.C. (2005). A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers.Genetica, 124(1), 61-69.
- Oliaro T. (1969). Lineamenti di una storia del carciofo. In: Atti I Congr. Int. Carciofo. Bari. Ed, Minerva Medica, Torino.

- Pagnotta M.A. and Noorani A. (2014). Genetic Diversity Assessment in European *Cynara* Collections. In *Genomics of Plant Genetic Resources* (pp. 559-584). Springer Netherlands.
- Peakall R. and Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- Pècaut P. (1983). Amélioration des variétés à multiplication végétative, variétés à multiplication par semences, clones sans virus issus de multiplication in vitro. Procès-verbal de la Séance de 12 janvier. Académie d'agriculture de France : 69-78.
- Pècaut P. (1993). Globe artichoke *Cynara Scolymus* L. In G. Kallo and B. D. Berg (eds.) *Genetic Improvements of Vegetabl crops*. Pergamon, Oxford : 737-746.
- Pelser P. B., Kennedy A.H., Tepe E.J., Shidler J.B., Nordenstam B., Kadereit J.W. & Watson L.E. (2010). Patterns and causes of incongruence between plastid and nuclear Senecioneae (Asteraceae) phylogenies. *American Journal of Botany*, 97(5), 856-873.
- Perez-Garcia F., Adzet T., Canigual S. (2000). Activity of artichoke leaf extract on reactive oxigen species in human leukocytes, *Free. Radic. Res* 33:661-665.
- Pignone D. and Sonnante G. (2004). Wild artichokes of south Italy: did the story begin here? *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(6), 577-580.
- Pignone D. e Sonnante G. (2009). Botanica, Origine ed evoluzione 2-11, in *Il carciofo e il cardo*, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana *Coltura&Coltura* coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed.Script, Bologna.
- Pisanu A.B., Cadinu M., Repetto A., Testa M., Lanteri S., Portis E., Sanna D., Maxia M., Baghino L., Mallica G., Meloni S., Beneventi S., Pilia R., Pintore R., Tatti A., Camedda P., Meloni B., Pau G.F. e Muntoni M. (2013). Caratterizzazione di piante coltivate “Spinoso Sardo” micropropagate e attività di ricerca finalizzata all’avvio di una filiera vivaistica. *Atti del convegno di Viterbo Acta Italus Hortus* 8: 71-79.
- Pisanu A.B., Muntoni M., Ledda L. (2009). Paesaggio, Carciofo in Sardegna 124-135, in *Il carciofo e il cardo*, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana *Coltura&Coltura* coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed.Script, Bologna. *Resources and Crop Evolution*, 51(6), 577-580.

- Pittler M.H. and Ernst E. (1998). Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. *The American journal of gastroenterology*, 93(7), 1131-1135.
- Porceddu E., Dellacecca V., Bianco V.V. (1976). Classificazione numerica di cultivar di Carciofo. *Atti del Congresso Int. Di Studi sul Carciofo. Bari. Ed. Minerva Medica (Torino):1105-1119.*
- Portis E., Barchi L., Acquadro A., Macua J.I. and Lanteri S. (2005). Genetic diversity assessment in cultivated cardoon by AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellite markers. *Plant breeding*, 124(3), 299-304.
- Portis E., Mauromicale G., Acquadro A., Comino C., Mauro R. and Lanteri S. (2006). Molecular markers for agrobiodiversity analysis in artichoke and cardoon [*Cynara scolymus* L.; Sicily; Sardinia]. *Italus Hortus*, 13.
- Powell W., Morgante M., McDevitt R., Vendramin G.G. and Rafalski J.A. (1995). Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7759-7763.
- Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Pritchard J.K., Wen W. and Falush D. (2003). Documentation for STRUCTURE software: version 2.
- Pritchard JK and Rosenberg NA (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 65:220–228.
- Pritchard J.K., Stephens M., Rosenberg N.A. and Donnelly P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170-181.
- Provan J., Powell W. and Hollingsworth P.M. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(3), 142-147.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., Goldstein D.B., Powell W. (1999). A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153: 943-947.

- Provan J., Corbett G., Powell W. and McNicol, J.W. (1997). Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome*, 40(1), 104-110.
- Quagliotti L. (1996). Osservazioni sui rapporti tra caratteristiche morfologiche e terminabilità dei semi di cardo. *Ann. Fac. Agr. Torino*, IV: 225-235.
- Raccuia S.A., Melilli M.G. (2004). *Cynara cardunculus* L. a potential source of inulin in Mediterranean environment. *Field Crop Res* 101:187-197.
- Raubeson L.A., Jansen R.K. (2005). Chloroplast genomes of plants. In: Henry R (ed) *Diversity and evolution of plants-genotypic and phenotypic variation in higher plants*. CABI Publishing, Wallingford, pp 45–68.
- Robba L., Carine M., Russell S. and Raimondo F. (2005). The monophyly and evolution of *Cynara* L. (Asteraceae) sensu lato: evidence from the Internal Transcribed Spacer region of nrDNA. *Pl. Syst. Evol*, 253, 53-64.
- Rondanelli M., Opizzi A. and Monteferrario F. (2009). Fitoterapia e medicina 46-59, in *Il carciofo e il cardo*, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana *Coltura&Coltura* coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed.Script, Bologna.
- Rottenberg A. and Zohary D. (1996). The wild relatives and the wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resour Crop Ev* 43(1): 53-58.
- Rottenberg A. and Zohary D. (2005, October). Wild genetic resources of cultivated artichoke. In: *IV International Congress on Artichoke* 681 (pp. 307-314).
- Saba E. (2003). Applicazione di marcatori molecolari per l'analisi della variabilità genetica in *Cynara cardunculus*. Tesi Dottorato.
- Saccardo F. (2009). Ricerca, Miglioramento genetico 286-29, in *Il carciofo e il cardo*, coordinamento scientifico di N. Calabrese. Collana *Coltura&Coltura* coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed.Script, Bologna.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Saski C., Lee S.B., Daniell H., Wood T.C., Tomkins J., Kim H.G., Jansen R.K. (2005). Complete chloroplast genome sequence of *Glycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Mol Biol* 59:309–322.

- Saski C., Lee S.B., Fjellheim S., Guda C., Jansen R.K., Luo H. and Clarke J.L. (2007). Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theoretical and applied genetics*, 115(4), 571-590.
- Scaglione D., Acquadro A., Portis E., Taylor C., Lanteri, S. and Knapp S. (2009). Ontology and diversity of transcript-associated microsatellites mined from a globe artichoke EST database. *BMC genomics*, 10(1), 454.
- Scarascia Mugnozza G.T. (1969). Primi risultati di studi di genetica e radiogenetica del carciofo. Atti del 1° Congresso internazionale del carciofo. Edizione Minerva Medica, Torino 145-155.
- Scarascia Mugnozza G.T., Pacucci G. (1976). Tipi di potenziale valore pratico isolati nell'ambito di un programma per il miglioramento genetico del carciofo. Atti II Cong. Int. Studi sul Carciofo. Ed Minerva Medica (Torino): 117-143.
- Scarcelli G., Kling S., Quijano E., Pineda R., Marcos S. and Yun S.H. (2013). Brillouin microscopy of collagen crosslinking: noncontact depth-dependent analysis of corneal elastic modulus. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(2), 1418-1425.
- Schlötterer C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
- Schneider S., Roessli D. and Excoffier L. (2000). Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver., 2, 2496-2497.
- Sevcikova P., Glaz Z., Slanina J. (2002). Analysis of artichoke (*Cynara cardunculus*) extract by means of micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis* 23:249-252.
- Sias V. (2006). Variabilità genetica molecolare (SSR) in una collezione di carciofo selvatico (*Cynara cardunculus* var. *sylvestris*). Tesi di Laurea.
- Slanina J., Taborska E. and Musil P. (1993). Determination of Cynarine in the Decoctions of the Artichoke/*Cynara cardunculus* L./by the HPLC Method. *CESKOSLOVENSKA FARMACIE*, 42, 275-275.

- Sonnante G., Carluccio A., De Paolis A., Pignone D. (2008). Identification of artichoke SSR markers: molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies. *Genet Resour Crop Evol.* 55:1029–1046.
- Sonnante G., Carluccio A.V., Vilatersana R. and Pignone D. (2007a). On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(3), 483-495.
- Sonnante G., De Paolis A. and Pignone D. (2004). Relationships among artichoke cultivars and some related wild taxa based on AFLP markers. *Plant Genet Resour.- Characteriz Utiliz* (in-press).
- Sonnante G., De Paolis A., Lattanzio V., Perrino P. (2002). Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 49: 247-252.
- Sonnante G., Pignone D., Hammer K. (2007b). The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to genomics age. *Ann Bot* 100:1095–1100.
- Soressi G.P. (2003). Variabilità disponibile e utilizzabile nel miglioramento genetico del carciofo. *Informatore agrario*, 59(22), 47-52.
- Sukno S.A., Taylor A.M, and Farman M. (2002). Development of contamination-free restriction fragment length polymorphism probes for the obligate biotroph *Peronospora tabacina*, an oomycete causing blue mold of tobacco. *Phytopathology*, 92(11), 1227-1235.
- Tanksley S.D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(1), 3-8.
- Thuillet A.C, Bataillon T., Poirier S., Santoni S., David J.L. (2005) Estimation of long-term effective population sizes through the history of durum wheat using microsatellite data. *Genetics* 169:1589–1599.
- Turpeinen T., Tenhola T., Manninen O., Nevo E. and Nissilä E. (2001). Microsatellite diversity associated with ecological factors in *Hordeum spontaneum* populations in Israel. *Molecular Ecology*, 10(6), 1577-1591.
- Uptmoor R., Wenzel W., Friedt W., Donaldson G., Ayisi K. & Ordon F. (2003). Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern

- Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(7), 1316-1325.
- Vendramin G.G., Lelli L., Rossi P. and Morgante M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5(4), 595-598.
- Viani P. (1929). *Trattato di orticoltura, coltivazione industriale a familiare delle piante ortive*.
- Vigouroux Y., McMullen M., Hittinger C.T., Houchins K., Schulz L., Kresovich S. and Doebley J. (2002). Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9650-9655.
- Wagenbreth D. (1996). Evaluation of artichoke cultivars for growing and pharmaceutical use. *Beitr Zuchtungsforsch.* 2:400-403.
- Wang M.F., Simon J.E., Aviles I.F., He K., Zheng Q.Y., Tadmor Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric Food Chem.* 51:601-608.
- Weising K. and Gardner R.C. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42(1), 9-19.
- Whitham T.G. and Slobodchikoff C.N. (1981). Evolution by individuals, plant-herbivore interactions, and mosaics of genetic variability: the adaptive significance of somatic mutations in plants. *Oecologia*, 49(3), 287-292.
- Wiklund A. (1992). The genus *Cynara* L. (Asteraceae- Carduae). *Bot. J. Linnean Soc.* 109: 75-123.
- Winter P. and Kahl G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 438-448.
- Wright S. (1951). The genetical structure of population. *Ann. Eugenics*, 15: 323-354.
- Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K. and Akira S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology*, 169(12), 6668-6672.

- Yeh F.C., Yang R.C. and Boyle T. (1999). PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research: 11-23.
- Zhivotovsky, L.A. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, 8(6), 907-913.
- Zohary D. and Basnizky J. (1975). The cultivated artichoke *Cynara scolymus*. Its probable wild ancestors. *Econ Bot.* 29:233-235.