

Miglioramento genetico per la produzione di ibridi di carciofo

Paola Crinò^{1*}, John Rusty Jordan, Mario Augusto Pagnotta³ e Francesco Saccardo⁴

¹ENEA C.R. Casaccia, Unità Sviluppo sostenibile ed innovazione del sistema agro-industriale, Via Anguillarese 301, 00123 Roma

²Big Heart Seed Company, Brawley, Ca, USA

³Università degli Studi della Tuscia, DAFNE, Via S.C. De Lellis snc, 01100 Viterbo

⁴Responsabile Scientifico del Progetto CYNASEME presso SEMIORTO Sementi s.r.l., Sarno (Salerno)

Breeding for the production of artichoke hybrids

Abstract. Artichoke is one of the most important vegetable crops in Italy, which is the leader producing country in the world. Propagation is still entrusted by the use of the traditional agamic technique with offshoots and ovoli that implies the typical problems of a multi-year crop with lack of contemporary production, heterogeneity of the genetic material and often uncertain phytosanitary conditions. The almost exclusive cultivation of traditional local landraces along with the agamic propagation represent obstacles to the development of the artichoke nursery and to the agronomic management of the crop. Many problems can be overcome, although at high costs and with specialized structures, by use of micropropagation to obtain virus free, early and homogeneous artichokes. At the same time, the interest to the use of seeded artichoke is emerging, as it ensures undoubted advantages compared to the traditional method of propagation. These advantages consist in (i) a lower cost of plants, (ii) the easiness to schedule the cropping period, (iii) the reduction of the crop cycle (from annual to multi-year) with the possibility of rotations, (iv) the improved health status of the plant, (v) the adaptation to the nursery development. The genetic improvement of seeded artichokes have so far been rather limited due to a lack of demand for such materials by farmers, not yet used to adopt artichoke seeds, and to the difficulties of operating on heterogeneous populations allogamous and with high *inbreeding* depression. The Tuscia University, in close collaboration with ENEA, has carried out research aimed at creating seed propagated materials developing artichoke hybrids and parents for which a molecular fingerprinting, to identify uniquely hybrids and hence protecting them from possible frauds, was outlined. These activities were carried out within the Carciofo and CAR-VARVI projects funded by Italian Ministry of Agriculture, an eight-year collaboration among Tuscia University, ENEA and BHSC (California) and the CYNASEME project fund-

ed by Italian Campania Region for the Measure 124 of the PSR 2007-2013. In order to produce seed propagated genetic materials, the development of F₁ hybrids was a major focus for the modernization of the artichoke crop. Over the last fifteen years, a breeding program aimed at obtaining new artichoke hybrids stable and attractive for Italian market has been played using malefertile and malesterile parental lines. Different hybrid combinations have been performed and among these, after genetic and agronomic evaluation in different environments, the most homogenous and interesting ones have been selected, these including the recently released F₁ hybrid Romolo. The complementarity of morphological and molecular analyses contributed to identify and classify plant genetic resources useful for the development of hybrids. An effective pollination technique, based on the use of insect pollinators (bees and bumblebees) and both malesterile and malefertile genotypes under tents, was also developed.

Key words: *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, parents, pollinations, selection, seed.

Introduzione

Il carciofo [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori; $2n=2x=34$] è un'angiosperma dicotiledone appartenente alla famiglia delle *Asteraceae* e al genere *Cynara*. Si tratta di una specie prevalentemente allogama, costituita da piante altamente eterozigoti e con una dimensione stimata del genoma di 1,078 Mbp (Marie e Brown, 1993; Giorgi *et al.*, 2013). L'infiorescenza del carciofo (capolino) è composta da numerosi piccoli fiori ermafroditi inseriti su un ricettacolo ingrossato. I fiori, di solito fertili, formano il disco centrale e presentano una maturazione scalare che progredisce dalla parte periferica verso quella centrale del capolino (centripeta); in ciascun fiore, il gamete maschile matura prima di quello femminile (proterandria). L'impollinazione in natura è assicurata da insetti pronubi, con diversa capacità impollinante; i

* paola.cрино@enea.it

più importanti sono l'ape (*Apis mellifera*) e il bombo (*Bombus chinensis*).

In Italia, il carciofo rappresenta la quarta ortiva coltivata con 451.461 tonnellate prodotte su una superficie totale investita pari a 46.440 ettari (dati ISTAT, 2014). Dopo la Sicilia, la Puglia e la Sardegna, le regioni Lazio e Campania contribuiscono rispettivamente con il 5 e 4% alla produzione nazionale della specie. Questa è tradizionalmente basata sulla coltivazione di tipi varietali a propagazione vegetativa, ancora scarsamente studiati e definiti da un punto di vista genetico; può addirittura verificarsi che uno stesso genotipo è noto con denominazioni differenti secondo la località di coltivazione. Si tratta per lo più di popolazioni, spesso eterogenee e strettamente legate alla memoria storica dei rispettivi luoghi di origine e diffusione; rappresentano, infatti, una riserva di diversità genetica per il miglioramento genetico dal momento che il centro di origine della specie dovrebbe essere localizzato proprio nell'Italia meridionale e in particolare in Sicilia (Gatto *et al.*, 2013). In base all'elenco dei prodotti agroalimentari tradizionali MiPAAF (G.U. n. 141, suppl. ord. n. 48 del 20 giugno 2014), esistono infatti più di 30 ecotipi tradizionali di carciofo di cui il gruppo più numeroso (27%) proviene dalla Regione Campania. Molti di questi ecotipi sono però sottoposti ad erosione genetica a causa della diffusione di altri materiali genetici considerati di *élite* (Mauromicale e Ierna, 2000) quali, ad es. per il carciofo Romanesco, il clone C3 proveniente da micropropagazione. È stato determinato il livello di variazione genetica (Sonnante *et al.*, 2002; Lanteri *et al.*, 2004; Ciancolini *et al.*, 2012; Mauro *et al.*, 2009; Pagnotta *et al.*, 2012; Pagnotta e Noorani, 2014; Reolon da Costa *et al.*, 2014), sia a livello morfologico che di DNA, in diverso germoplasma autoctono tradizionale di carciofo; i risultati indicano che, con la selezione clonale, è possibile identificare cloni in grado di preservare la variabilità genetica dell'ecotipo di origine e ridurre in tal modo il rischio di erosione genetica. In termini di panorama varietale, il miglioramento genetico può ancora fornire nuove prospettive di coltivazione mediante la costituzione di cultivar che meglio rispondono alle esigenze di produzione (uniformità, attitudine alla raccolta meccanica) e di mercato (precocità).

Innovazione nel panorama varietale

L'attività di miglioramento genetico del carciofo è iniziata solo dopo i primi studi effettuati da Jannaccone (1967) sulla biologia fiorale e, a fronte dell'importanza economica della coltura, i programmi

specifici sinora svolti sono piuttosto scarsi. La storia genetica della specie è limitata a pochi studi sull'ereditarietà di alcuni caratteri (Pochard *et al.*, 1968; Scarascia Mugnozza *et al.*, 1976; Pécaut, 1993; Lòpez Anido *et al.*, 1998; Cravero *et al.*, 2004) che riguardano un determinismo poligenico per il controllo della dimensione, forma e peso del capolino, la lunghezza del peduncolo e la precocità, e uno monogenico recessivo per la presenza di spine (*sp*), la "foglia gialla" (*j*) e il "fiore bianco" (*b*). La base genetica per la colorazione antocianica del capolino, influenzata anche dalla temperatura, è resa piuttosto complessa dalla presenza di geni modificatori e di 1 o 2 geni *major* (Bazniski e Zohary, 1994). Due *loci* con effetto epistatico recessivo sono invece coinvolti nel determinismo genetico del colore del capolino, mentre altrettanti *loci* con semplice effetto epistatico dominante sono responsabili per la *tightness* del capolino (Cravero *et al.*, 2005). Riguardo alla maschiostertilità, inizialmente si pensava all'esistenza di un singolo gene recessivo (*ms1* secondo Principe, 1984) ma più recentemente è stato suggerito un determinismo oligogenico (Stamigna *et al.*, 2004), tra l'altro proposto anche da Basnizky e Zohary, (1994) con due geni, *ms2* e *ms3*, che causano la mancata produzione di gameti maschili o la produzione di gameti maschili non funzionali.

Negli ultimi 30 anni, mediante il miglioramento genetico sono stati realizzati degli ibridi propagati via seme e realizzati da Nunhems (ora Bayer CropScience Vegetable Seeds) o altre ditte che, nelle principali aree nazionali di produzione cinaricola (es. Puglia), stanno destando interesse quale alternativa ai materiali genetici sinora coltivati (Bonasia *et al.*, 2010; Saccardo *et al.*, 2013). Essendo propagati via seme, si tratta di materiali esenti dalle principali malattie endemiche per la coltura (es. virus e funghi quali *Verticillium dahliae*) con buone *performance* agronomiche e particolare idoneità sia al mercato fresco che alla trasformazione industriale. Le prime ricerche sulla propagazione via seme del carciofo sono state sviluppate, durante gli anni '90, in Francia, Israele e USA e poi estese più recentemente anche all'Italia (fig. 1) con progetti nazionali finanziati dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali ("CARCIOFO" e "CAR-VARVI") e dalla Regione Campania ("CYNASEME"), tutti svolti con il coordinamento scientifico del Prof. Saccardo, la stretta collaborazione tra l'Università degli Studi della Tuscia, l'ENEA e la ditta sementiera californiana Big Heart Seed Company (BHSC) e, per quelli nazionali, anche il coinvolgimento delle principali istituzioni italiane impegnate sul carciofo. Il progetto CYNASEME

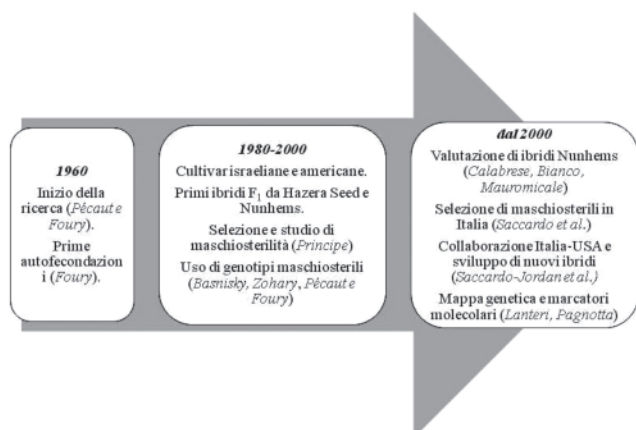


Fig. 1 - Fasi del miglioramento genetico del carciofo per la produzione di seme.

Fig. 1 - Phases of artichoke breeding for seed production.

(Misura 124 del PSR Campania 2007/2013) ha visto invece la partecipazione attiva della ditta sementiera campana La SEMIORTO Sementi (Sarno, Salerno) e di un'azienda agricola (IRIS Garden) impegnata nella coltura cinaricola; questo progetto rappresenta un esempio di trasferimento dei risultati dal mondo della ricerca a quello produttivo e industriale con un nuovo e innovativo modello di coltura che apre sbocchi verso lo sviluppo vivaistico e sementiero.

Gli obiettivi degli attuali programmi di miglioramento genetico riguardano (a) lo sviluppo di linee parentali stabili maschiosterili (MS) e maschioferti (MF), (b) la costituzione di ibridi F₁ stabili e a basso costo e infine, con il progetto CYNASEME, (c) il trasferimento dei risultati dalla ricerca al settore agricolo/industriale (es. imprese agricole della Regione Campania e ditta sementiera La SEMIORTO Sementi di Sarno, Salerno). Per perseguire l'obiettivo di produrre ibridi, è stata seguita la strategia riportata in figura 2 che presenta le seguenti fasi: 1) selezione di germoplasma MS e MF, loro propagazione e conservazione

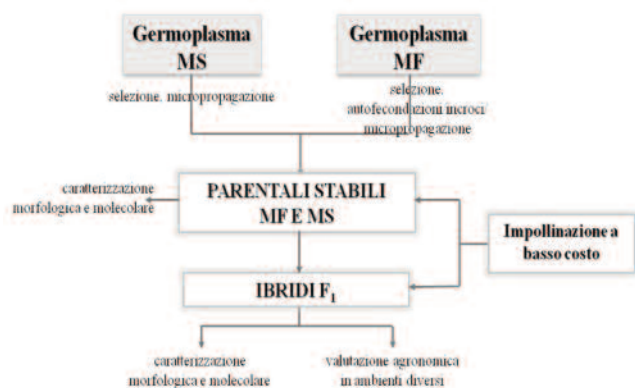


Fig. 2 - Strategia seguita per la realizzazione di ibridi stabili e a basso costo.

Fig. 2 - Strategy followed to develop stable and low cost artichoke hybrids.

mediante micropropagazione (genotipi MS e MF), autofecondazioni e interincroci (genotipi MF); 2) ottenimento di linee parentali stabili ben caratterizzate e classificate; 3) ottenimento di ibridi realizzati da incrocio tra cloni MS e linee MF stabili ben caratterizzate sia da un punto di vista morfologico che molecolare; 4) valutazione agronomica degli ibridi realizzati in ambienti pedoclimatici diversi. Nell'ambito di questa strategia, sono state messe a punto tecniche di impollinazione efficienti per aumentare la resa in seme ibrido e contemporaneamente ridurre i costi di produzione.

Gli obiettivi del miglioramento genetico, mirati essenzialmente a sviluppare germoplasma precoce (le infiorescenze prodotte precocemente spuntano prezzi più alti rispetto a quelli tardivi) e con buona qualità del capolino, sono stati sinora raggiunti operando per lo più sulla variabilità intra-clonale, sulla clonazione delle discendenze di ibridazioni intervarietali e sullo sviluppo di linee e ibridi da seme (Foury et al., 2005; Lanteri e Portis, 2008). La selezione è resa difficile dall'elevata depressione da *inbreeding*.

Sviluppo di linee parentali stabili

Per lo sviluppo di linee stabili, si può procedere mediante selezione e propagazione di singole piante, evitando di effettuare autofecondazioni ripetute e ricorrendo invece all'alternanza tra autofecondazioni e interincroci. A differenza del mais dove, per ottenere ibridi vigorosi, i parentali sono sottoposti a cicli di autofecondazione per ottenere linee *inbred* che, quando incrociate, sviluppano il massimo vigore nell'ibrido, in carciofo non si riesce ad ottenere linee *inbred* vere e proprie perché la loro vitalità decresce rapidamente all'aumentare dei cicli di autofecondazione, arrivando alla completa sterilità. Questa elevata depressione da *inbreeding* determina rapidamente effetti negativi sul vigore e resa produttiva della pianta, sulla qualità e quantità del polline prodotto (Foury et al., 2005; Saccardo et al., 2013). Gli effetti possono essere talmente severi da dover addirittura rinunciare alla produzione di linee *inbred*. A riguardo, l'induzione di aploidi via androgenesi o ginogenesi non ha portato sinora a risultati soddisfacenti (Chatelet et al., 2005a; Motzo e Deidda 1993; Stamigna et al., 2005).

Solo recentemente si è sviluppato interesse per la produzione del seme e questo per due motivi: (i) la moltiplicazione via seme riesce a risolvere molte delle problematiche presenti con la moltiplicazione vegetativa, (ii) si hanno a disposizione materiali vegetali e metodologie atte ad ottenere migliori risultati. Le attività di ricerca sul miglioramento genetico del carciofo

da seme intraprese in Italia (Stamigna *et al.*, 2004), dal 2006 sono proseguite anche in California nell'ambito di una co-operazione tra Università della Tuscia, ENEA, Big Heart Seed Company e La Semiorto Sementi (Lo Bianco *et al.*, 2011c; Saccardo *et al.*, 2013).

Dopo opportuna caratterizzazione morfologica e molecolare dei parentali MF e MS, effettuata per una loro accurata identificazione e classificazione (Crinò *et al.*, 2008; Mondini *et al.*, 2009; Lo Bianco *et al.*, 2011a; Boury *et al.*, 2012), si può invece ricorrere alle tecniche di micropropagazione, ovviamente da ottimizzare per il genotipo considerato.

I marcatori molecolari, principalmente microsatelliti (SSR) e ISSR, si sono dimostrati strumenti utili per determinare le distanze genetiche tra i parentali e fra questi e la progenie, facilitando la selezione dei genotipi più stabili e accelerando i cicli di selezione (Lo Bianco *et al.*, 2011a; Rey *et al.*, 2012). Considerando inoltre gli effetti dei caratteri dominanti delle linee parentali, chiaramente espresse nel fenotipo ibrido, la loro scelta risulta fondamentale. Il genotipo MS, per esempio, dovrebbe avere un *background* genetico tale da avere un effetto minimo sulla progenie. Oltre ai 3 cloni MS (1-001, 1-014 e 1-016) sviluppati in Italia, sono stati identificati e selezionati nuovi genotipi MS sia in Italia che in California. Il genotipo 1-001 si è rivelato essere un parentale in grado di trasferire buona stabilità all'ibrido (fig. 3). Secondo studi effettuati da Lo Bianco *et al.* (2011b), la maschiosterilità di questo genotipo sembra dovuta ad un blocco post-meiotico che si verifica durante la microgametogenesi, determinando produzione di polline non vitale, probabilmente associata ad una bassa attività nutrizionale delle cellule del tappeto nell'antera e ad una destrutturazione dell'esina.

Le linee parentali sviluppate (fig. 4) sono mantenute in collezione *in vitro* mediante tecniche di conservazione a breve termine.

Tecnica di impollinazione

Il fatto che i fiori del carciofo sono riuniti in un capolino rende particolarmente laboriose e ad alto rischio d'inquinamento le operazioni di ibridazione. È necessario pertanto ripetere manualmente le fecondazioni, isolando in precedenza i capolini prima dell'anestesi per evitare eventuali inquinamenti da polline esterno. A causa della proterandria che caratterizza la specie, è importante prelevare polline maturo, distribuendolo manualmente mediante spennellature su stigmi recettivi. In assenza di un genotipo MS, è necessario inoltre ricorrere al lavaggio dei capolini

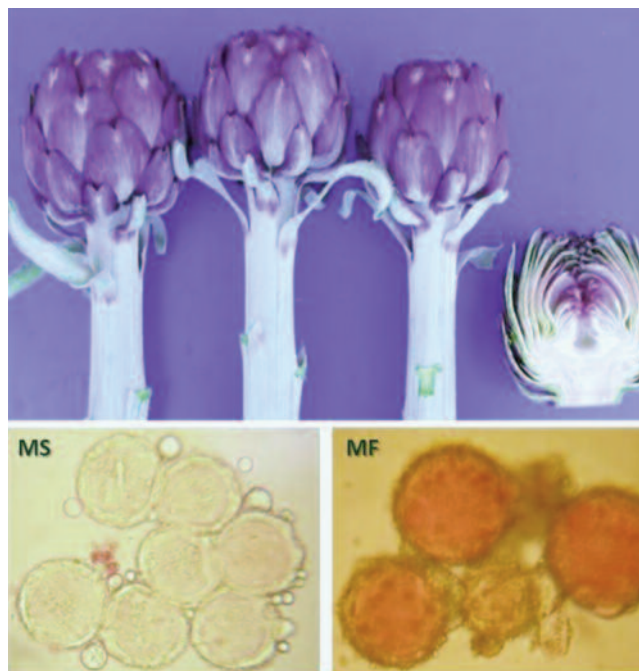


Fig. 3 - Aspetto del genotipo MS 1-001 di carciofo con differente aspetto del polline colorato con la tecnica del carminio acetico rispetto al genotipo MF.

Fig. 3 - Characteristics of the artichoke MS genotype 1-001 showing different aspect of pollen colored by the carmine acetic technique respect to a MF genotype.

della linea portaseme al fine di evitare il pericolo di autofecondazioni.

L'impiego della maschiosterilità consente di risolvere gran parte delle problematiche e rende possibile la costituzione di seme ibrido su scala commerciale. In alcuni casi, è utilizzata addirittura la depressione da *inbreeding*, con conseguente sterilità principalmente maschile e una ridotta produzione di seme.

Per lo sviluppo degli ibridi di carciofo, è necessario ottimizzare la tecnica di produzione del seme utilizzando sotto isolatore cloni MS come genitori femminili per minimizzare il costo delle operazioni manuali di demascolazione. Contemporaneamente, sono state confrontate, in condizioni di campo o sotto isolatore, diverse tecniche di impollinazione basate sullo strofinamento del capolino, l'uso del pennello o di insetti pronubi (soprattutto bombi e api). Gli insetti riescono ad impollinare efficacemente i fiori di cloni MS e, in particolare, l'impiego di bombi o api rappresentano i sistemi di impollinazione più efficaci nelle condizioni italiane.

L'efficienza di impollinazione è stata ulteriormente ottimizzata stabilendo il momento più adatto per l'impollinazione durante il giorno e scegliendo il genotipo MF più appropriato da utilizzare. Sono state trovate differenze significative tra la mattina (8-13 h) e il pomeriggio (14-19 h) per la produzione di seme ibri-



Fig. 4 - Esempi di linee parentali MF di carciofo ottenute.
 Fig. 4 - Examples of artichoke parental MF lines obtained.

do. Durante la mattina, l'efficienza di impollinazione era più o meno costante mentre si riduceva con l'avanzare del pomeriggio; è stata chiaramente evidenziata l'influenza del genotipo MF (Saccardo *et al.*, 2013). Nei campi sperimentali, è stata inoltre osservata, e riportata anche in letteratura, la scarsa attrazione delle api per i fiori MS, probabilmente a causa della mancanza di nettare che producono (Morison *et al.*, 2000).

Lo sviluppo di una tecnologia di impollinazione semplice, grazie all'impiego di linee parentali MS e di cloni MF stabili, ed efficiente in termini di quantità di polline prodotto, consentirà di poter ridurre i costi per la produzione di seme ibrido di carciofo.

Produzione di ibridi

Va soprattutto enfatizzato che quello comunemente denominato in cinaricoltura ibrido F_1 non è un vero ibrido di tipo mendeliano in quanto non deriva dall'incrocio tra due linee pure. Anche sottoponendo i parentali ad autofecondazione, la depressione da *inbreeding* rende pressoché impossibile realizzare delle linee pure per cui non è possibile raggiungere uniformità genetica come postulata da Mendel; questo complica l'ottenimento di linee ibride uniformi e costanti nel tempo. La depressione da *inbreeding* inibisce l'uso di *backcross*, di F_2 o di popolazioni ricombinanti.

Tuttavia, nell'ambito di una collaborazione Italia-USA, in corso ormai da circa 8 anni, sono state otte-

nute circa 200 combinazioni di incrocio. I migliori ibridi selezionati in California sono stati caratterizzati da un punto di vista morfologico e agronomico, utilizzando i descrittori morfologici riportati da Ciancolini *et al.* (2012), e selezionati anche Tarquinia (Viterbo) e Sarno (Salerno) per caratteri agronomici e stabilità genetica. Limitatamente a quelli selezionati come migliori, la caratterizzazione con marcatori molecolari ha completato quella morfologica rivelandosi uno strumento prezioso in grado di (i) fornire un profilo *fingerprinting* degli ibridi e delle linee parentali, e (ii) scegliere i parentali migliori per dare progenie omogenee con caratteristiche di qualità superiore. In tal modo è stato ottenuto l'ibrido Romolo, iscritto recentemente al Registro Varietale Italiano e commercializzato dalla ditta TOP SEED (Sarno, Salerno) che ha la licenza esclusiva. Si tratta di un ibrido appartenente alla tipologia Romanesco e originato dalla combinazione MS6 x 9BDG (fig. 3); in Italia, confrontato con altri ibridi commerciali ha mostrato la sua superiorità a livello produttivo e di precocità, rispondendo bene alle esigenze del consumatore italiano e quindi della grande distribuzione. Da più anni sono in corso prove di coltivazione in diverse regioni del centro-Sud vocate alla coltivazione del carciofo (Lazio, Campania, Puglia), dove ha mostrato un'ottima produzione ed una omogeneità accettabile del prodotto. Pur appartenendo alla tipologia primaverile, in quanto Romanesco, produce già a gennaio e talvolta addirittura

tura anche a dicembre, se trattato con acido gibberellico (Calabrese, comunicaz. pers.). Da analisi condotte presso il CNR di Bari (Calabrese, comunicaz. pers.), Romolo è risultato idoneo alla frigoconservazione e all'utilizzo per la quarta gamma. Anche un altro ibrido, denominato 9, sempre costituito nell'ambito della collaborazione Italia-California, ha dato buoni risultati produttivi e, assieme ad altri di recente selezione, è quindi proponibile per l'iscrizione varietale. Nell'ambito del progetto CYNASEME, inoltre, sono stati realizzati altri due nuovi ibridi di carciofo da seme, denominati CS11-054 e CS 11-114 (fig. 5), proposti per l'iscrizione al Registro varietale. Recentemente è stato iscritto al Registro Varietale Nazionale dalla ditta TOP SEED (Sarno, Salerno) anche l'ibrido del tipo rifiorante denominato Istar, particolarmente adatto per la produzione autunno-vernina. Si tratta di un genotipo precoce, se seminato in tarda primavera, con capolini tondeggianti dalla sfumatura violacea sul calice.

Supporto biotecnologico

Il genoma di *C. cardunculus* è ancora molto da studiare, sebbene siano ormai disponibili alcune informazioni sulla sua organizzazione (Scaglione *et al.*, 2012a). Lo sviluppo dei marcatori molecolari ha fornito lo strumento per valutare il germoplasma, considerando unicamente le varianti genetiche e non quelle ambientali che rendono il carciofo particolarmente plastico. La conoscenza della quantità e della distribuzione della variabilità genetica è essenziale per sviluppare strategie razionali per una corretta conservazione del germoplasma e per ottimizzarne la sua utilizzazione ai fini del miglioramento genetico assistito. Quest'ultima utilizzazione in carciofo è ancora ai primi stadi di



Fig. 5 - Ibrido Romolo iscritto al Registro Nazionale delle Varietà Ortive.

Fig. 5 - Artichoke hybrid Romolo inscribed to the National Register of Vegetable Varieties.

applicazione, sebbene alcuni studi abbiano rilevato l'esistenza di associazioni interessanti fra marcatori e caratteri morfo-fisiologici d'interesse (es.: epoca di comparsa e dimensione del capolino). È stato infatti mappato un certo numero di QTL associati ai principali caratteri del capolino (Portis *et al.*, 2012; 2014) che sono di interesse pratico per il miglioramento genetico assistito da marcatori molecolari.

I marcatori molecolari hanno numerosi vantaggi rispetto agli altri tipi in quanto non sono influenzati dall'ambiente e dallo stadio fenologico della pianta, analizzano l'intero genoma, sono virtualmente infiniti, non hanno effetti pleiotropici o epistatici, possono essere co-dominanti, possono evidenziare anche polimorfismi che non producono varianti fenotipiche. In questo contesto, l'analisi al livello del DNA fornisce uno strumento complementare all'uso dei tradizionali descrittori morfologici UPOV anche se, nel caso specifico del carciofo, sono ancora pochi e, per molti di questi, non se ne conosce la localizzazione sul genoma. Al momento sono stati sviluppati e utilizzati marcatori molecolari per quantizzare la variabilità genetica presente nel materiale in coltivazione (Lanteri *et al.*, 2001; Cravero *et al.*, 2007; Sonnante *et al.*, 2002; 2008; Mauro *et al.*, 2009), caratterizzare collezioni di germoplasma appartenente alle tipologie tardive compreso il Romanesco (Crinò *et al.*, 2008; Ciancolini *et al.*, 2012), Spinoso Sardo, Violetto di Sicilia, Catanese, Spinoso di Palermo (Lanteri *et al.*, 2004; Mauro *et al.*, 2012; 2015;), riconoscere e proteggere prodotti tipici con marchi di denominazione controllata, sviluppare mappe genetico-molecolari della specie.

Le mappe genetiche forniscono un potente strumento di analisi per lo studio di caratteri agronomici, molti dei quali sono sotto un determinismo poligenico o oligogenico. Stabilire *linkages* tra i *loci* e i marcatori molecolari associati consente di identificare quali regioni cromosomiche portano geni rilevanti per il miglioramento genetico assistito con marcatori molecolari. Purtroppo, bisogna considerare che la maggior parte dei genotipi usati per tali studi non è del tutto appropriata in quanto, come detto, il carciofo è una specie altamente eterozigote che, tra l'altro, non risponde bene alle autoimpollinazioni.

La prima mappa molecolare del carciofo, basata sulla strategia del *two-way pseudo-test cross*, è stata pubblicata da Lanteri *et al.* (2006) usando una progenie ottenuta dall'incrocio tra il clone Romanesco C3 e lo Spinoso di Palermo; questa copre 1330 cM su un totale di circa 3000 cM. Allo scopo di ampliare il numero limitato di marcatori co-dominanti disponibili, è stato sviluppato e mappato un set di nuovi mar-

catori SSR per il carciofo, strumenti validi per l'analisi genetica della specie (Acquadro *et al.*, 2009). I nuovi SSRs si sono distribuiti in maniera uniforme nelle mappe già sviluppate di carciofo, migliorando in tal modo la loro copertura e contribuendo all'allineamento delle nuove mappe. Nuove mappe, basate su incroci carciofo x cardo coltivato e carciofo x cardo selvatico, sono state successivamente allineate con quelle precedenti allo scopo di sviluppare una *reference map* della specie (Portis *et al.*, 2009; Sonnante *et al.*, 2011). È in fase di realizzazione la saturazione della mappa anche con marcatori SNP (Scaglione *et al.* 2012a; 2012b), utilizzabili sia in programmi di miglioramento genetico che per il *fin-gerprinting* molecolare. Inoltre il mappaggio dei geni coinvolti nella via biosintetica degli acidi caffeolchinici (CQA) può contribuire a comprendere meglio la base genetica della sintesi di questi composti di valore nutraceutico e farmacologico (Menin *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2013). Si sta infine procedendo al sequenziamento di porzioni del genoma di carciofo grazie alle nuove tecnologie di Next Generation Sequency (Acquadro *et al.*, 2014).

Conclusioni

Per affermarsi il comparto cinaricolo necessita di essere organizzato secondo una filiera moderna in grado di rispondere efficacemente alle esigenze di un mercato che apprezza la qualità e l'uniformità del prodotto. L'impiego di ibridi riproducibili via seme garantisce molti vantaggi tecnici e ambientali con benefici per le imprese in termini di (a) riduzione dei costi e possibilità di inserire avvicendamenti colturali, (b) aumento dei ricavi grazie ad una meccanizzazione delle operazioni colturali e ad un minore uso di fitofarmaci, (c) maggiore competitività per impiego di germoplasma innovativo, caratterizzato da produttività e vigoria della pianta oltre che da garanzie dal punto di vista fitosanitario. Affinché questo tipo di attività possa decollare nella pratica agricola corrente, occorre tuttavia considerare aspetti importanti quali l'adattamento del ciclo colturale ad uno sviluppo di piante da seme e la produzione regolare ed economica di seme ibrido. Nel primo caso, il materiale genetico disponibile consente una coltura con produzione per lo più primaverile che il trattamento con gibberelline riesce ad anticipare al periodo invernale. Nel secondo caso, è necessario applicare dei sistemi di impollinazione su larga scala e a basso costo, come quelli proposti nel presente lavoro con genotipi MS e insetti pronubi, ma è opportuno ottimizzare la tecnica stabilendo la giusta proporzione MS/MF e studiando l'im-

portanza dell'attrattività delle linee MS verso gli insetti. Secondo Morison *et al.* (2000), le differenze di attrattività sarebbero di origine genetica; il nettare sembrerebbe costituire la sola risorsa di attrazione e le differenze tra i genotipi potrebbero riflettere differenze di produzione nettariifera, di accessibilità al nettare nella corolla o della composizione del nettare. A riguardo, non sono state trovate differenze morfologiche chiare tra i fiori MS e MF; queste consisterebbero soltanto nella quantità secreta di nettare e nella sua composizione glucidica variabile secondo il genotipo (Foury *et al.*, 2005). La caratterizzazione quanti-qualitativa della produzione nettariifera nelle linee parentali, assieme all'impiego di insetti pronubi meno discriminanti verso la composizione glucidica del nettare, potrebbero contribuire a ottimizzare la produzione di seme ibrido in condizioni economicamente soddisfacenti.

Fino a questo momento la produzione del carciofo in Italia è avvenuta soprattutto con carducci, ovoli e/o piante micropropagate e con problematiche connesse a tali tecniche colturali (coltura poliennale, eterogeneità del materiale genetico, condizioni fitosanitarie spesso incerte) che hanno ostacolato lo sviluppo vivaistico del carciofo e la gestione agronomica della coltura. Lo sviluppo e l'impiego di linee parentali stabili è indispensabile per la realizzazione di ibridi altrettanto stabili. Pur essendo tecnicamente fattibile, la riproduzione da seme è ostacolata dall'elevato grado di eterozigosi del carciofo; la scelta di parentali stabili è fondamentale per assicurare l'omogeneità dello standard varietale nell'ibrido.

Riassunto

Nell'ambito di due progetti finanziati dal MiPAAF, di una collaborazione Italia-USA e di un progetto finanziato dalla Regione Campania, è stata svolta attività di ricerca finalizzata a sviluppare ibridi di carciofo e parentali maschiofertili e maschiosterili. Sono state effettuate diverse combinazioni ibride e selezionate quelle in grado di dare progenie più omogenee, tra cui quella che ha dato origine all'ibrido Romolo di recente iscrizione al Registro Varietale italiano. La complementarità delle analisi morfologiche e molecolari ha contribuito a identificare e classificare i materiali genetici. È stata inoltre sviluppata una tecnica d'impollinazione basata sull'impiego di insetti pronubi e di genotipi maschiosterili e maschiofertili sotto isolatori.

Parole chiave: *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, parentali, impollinazioni, selezione, seme.

Bibliografia

- 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.
- ACQUADRO A., SCAGLIONE D., PORTIS E., TIRONE M., MAURO R., LO MONACO A., MAUROMICALE G., FROENICKE L., REYES CHIN WO S., MICHELMORE R., LANTERI S., 2014. *The globe artichoke genome sequence*. Atti 58th Conv. SIGA, Alghero (Italia) 15-18 September 2014.
- BASNIZKY J., ZOHARY D., 1994. *Breeding of seed planted artichoke*. Plant Breed. Rev. 12: 253-269.
- BLANCO E., NEGRO D., DE PAOLA D., PIGNONE D., SONNANTE G., 2013. *Polyphenolic compounds in artichoke cultivars and regulation of their synthesis in artichoke*. Acta Horticulturae 983: 75-80.
- BONASIA A., CONVERSA G., LAZZIZERA C., GAMBACORTA G., ELIA A., 2010. *Morphological and qualitative characterisation of globe artichoke head from new seed-propagated cultivars*. Journal of the Science of Food and Agriculture 90 (15): 2689-2693.
- BOURY S., JACOB A.-M.E., EGEEA-GILABERT C., FERNÁNDEZ J.A., SONNANTE G., PIGNONE D., REY N.A., PAGNOTTA M.A., 2012. *Assessment of genetic variation in an artichoke European collection by means of molecular markers*. Acta Hort. ISHS) 942: 81-87.
- CHATELET P., STAMIGNA C., THOMAS G., 2005. *Early development from isolated microspores of Cynara cardunculus var. scolymus (L.) Fiori*. Acta Hort. 681: 375-380.
- CIANCOLINI A., REY N.A., PAGNOTTA M.A., CRINÒ P., 2012. *Characterization of Italian spring globe artichoke germplasm: morphological and molecular profiles*. Euphytica 186 (2): pp. 433-443.
- CRAVERO V.P., LOPEZ ANIDO F.S., ASPRELLI P.D., COINTRY E.L., 2004. *Diallel analysis for traits of economic importance in globe artichoke (Cynara scolymus)*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 32 (2): 159-165.
- CRAVERO V.P., PICARDI L.A., COINTRY E.L., 2005. *An approach for understanding the heredity of two quality traits (head color and tightness) in globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Genetics and Molecular Biology 28 (3): 431-434.
- CRAVERO V.P., MARTIN E., COINTRY E., 2007. *Genetic diversity in Cynara cardunculus determined by sequence-related amplified polymorphism markers*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132 (2): 208–212.
- CRINÒ P., TAVAZZA R., REY MUÑOZ N.A., TRIONFETTI NISINI P., SACCARDO F., ANCORA G., PAGNOTTA M.A., 2008. *Recovery, morphological and molecular characterization of globe artichoke 'Romanesco' landraces*. Genetic Resources and Crop Evolution 55 (6): 823-833.
- FOURY C., MARTIN F., PÉCAUT P., VAISSIÈRE B., MORISON N., CORRE J., 2005. *Avantages et difficultés de la création d'hybrides F1 d'artichaut à semer*. Acta Horticulturae 681: 315-322.
- GATTO A., DE PAOLA D., BAGNOLI F., VENDRAMIN G.G., 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.
- GIORGI D., PANDOZY G., FARINA A., GROSSO V., LUCRETI S., CRINÒ P., SACCARDO F., 2013. *Karyotype of globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus): Preliminary studies to define its chromosome morphology*. Acta Horticulturae 983, pp. 133-138.
- JANNACCONE A. 1967. *Avvicendamenti, metodi di propagazione e durata della carciofofaia*. Atti I Cong. Int. Carciofo, Bari: 9-16, Ed. Minerva Medica. Torino.
- 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 Breed 120: 243–247.
- LANTERI S., SABA E., CADINU M., MALLICA G.M., BAGHINO L., PORTIS E., 2004. *Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke*. Theor. Appl. Genet. 108:1534–1544.
- 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, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers*. Theor. Appl. Genet. 112: 1532–1542.
- LANTERI S., PORTIS E., 2008. *Globe artichoke and cardoon*. In: Prohens J & Nuez F. eds, Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae and Cucurbitaceae, Springer, New York, USA: 49-74.
- LO BIANCO C., FERNÁNDEZ J.A., MIGLIARO D., CRINÒ P., EGEEA-GILABERT C., 2011a. *Identification of F1 hybrids of artichoke by ISSR markers and morphological analysis*. Molecular Breeding 27 (2) , pp. 157-170.
- LO BIANCO C., SACCARDO F., OLIMPIERI I., MAZZUCATO A., CRINÒ P., 2011b. *Floral biology in male sterile clones of globe artichoke [Cynara cardunculus subsp. scolymus (L.) hegi]*. Acta Horticulturae 942: pp. 159-164.
- LO BIANCO C., MICOZZI F., JORDAN J.R., JORDAN A., CRINÒ P., TEMPERINI A., PAGNOTTA M.A., SACCARDO F., 2011c. *F1 hybrids of globe artichoke of 'Romanesco' type*. Acta Horticulturae 942 , pp. 133-138.
- LÓPEZ ANIDO F.S., FIRPO I.T., GARCÍA S.M., COINTRY E.L., 1998. *Estimation of genetic parameters for yield traits in globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Euphytica 103: 61–66.
- MARIE D., BROWN S., 1993 *A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C-values for 70 species*. Biol Cell 78:41–51.
- MAURO R., PORTIS E., ACQUADRO A., LOMBARDO S., MAUROMICALE G., LANTERI S., 2009. *Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implications for evolution and domestication of the species*. Conserv Genet 10: 431–440.
- MAURO R.P., PORTIS E., LANTERI S., MAUROMICALE G., 2012. *Genotypic and bio-agronomical characterization of an early Sicilian landrace of globe artichoke*. Euphytica 186:357–366.
- MAURO R.P., PORTIS E., LANTERI S., LO MONACO A., MAUROMICALE G., 2015. *Clonal selection in a globe artichoke landrace: characterization of superior germplasm to improve cultivation in Mediterranean environments*. Journal of Agricultural Science 153 (1): 102-113.
- MAUROMICALE G., IERNA A., 2000. *Characteristics of heads of seed-grown globe artichoke [Cynara cardunculus L. var. scolymus (L.) Fiori] as affected by harvest period, sowing date and gibberellic acid*. Agronomie 20 (2): 197-204.
- MENIN B., COMINO C., MOGLIA A., DOLZHENKO Y., PORTIS E., LANTERI S., 2010. *Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in Cynara cardunculus L.* Plant Science 179: 338–347.
- MONDINI L. AND NOORANI A., PAGNOTTA M.A., 2009. *Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools*. Diversity 1: 19-35.
- MORISON N., VAISSIÈRE B., MARTIN F., PÉCAUT P., CAMBON G., 2000. *Pollinisation de l'artichaut (Cynara scolymus L.) par l'abeille domestique (Apis mellifera L.) en production de semences hybrides sous abris grillagés*. Apidologie 31: 115-128.
- MOTZO R., DEIDDA M., 1993. *Anther and ovule culture in globe artichoke*. J. Genet. Breed. 47: 263-266.
- PAGNOTTA M.A., SACCARDO F., TEMPERINI O., REY N.A., NOORANI A., LO BIANCO C., CRINÒ P., TAVAZZA R., CUOZZO L., PAPANICHIOLI V., SONNANTE G., PIGNONE D., MORGESSE A., SARLI G., DE LISI A., RACCUA S., DI VENERE D., JACOB A.-

- M., BAZINET C., BOURY S., ARTES F., EGEA-GILABERT C., FERNÁNDEZ J.-A., MACUA J.-I., LAHOZ I., JOUY C., ALERCIA A., 2012. *Characterization of the Cynara European genetic resources*. Acta Horticulturae 942, pp. 89-94.
- PAGNOTTA M. A., NOORANI A., 2014. *Genetic diversity assessment in European Cynara collections*. In: Tuberosa R. et al. eds, Genomics of Plant Genetic Resources. Springer Science+Business Media Dordrecht: 559-584.
- PÉCAUT P., 1993. *Globe artichoke Cynara scolymus L. Genetic improvements of vegetable crops*. Pergamon Oxford. Pp. 737-746.
- POCHARD E., FOURY C., CHAMBONNET D., 1968. *Il miglioramento genetico del carciofo*, Atti 1° Conv. Int. sul Carciofo, Bari (Italia) 20–24 November 1967: 117–143. Ed. Minerva Medica, Torino.
- PORTIS E., MAUROMICALE G., MAURO R., ACQUADRO A., SCAGLIONE D., LANTERI S., 2009. *Construction of a reference molecular linkage map of globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus)*. Theor Appl Genet 120:59–70.
- PORTIS E., SCAGLIONE D., ACQUADRO A., MAUROMICALE G., MAURO R., KNAPP S.J., LANTERI S., 2012. *Genetic mapping and identification of QTL for earliness in the globe artichoke/cultivated cardoon complex*. BMC Research Notes 5: 252-267.
- PORTIS E., MAURO R., BARCHI L., ACQUADRO A., MAUROMICALE G., LANTERI S., 2014. *Mapping yield-associated QTL in globe artichoke*. Mol. Breeding 34:615–630.
- PRINCIPE J.A., 1984. *Male-sterility in artichoke*. Hort Science, 19 (6): 864.
- REOLON DA COSTA A., SCHEFFER BASSO S.M., FERRARI GRANDO M., CRAVERO V.P. 2014. *Phenotypic variability in a population of globe artichoke*. Ciência Rural, Santa Maria 44 (11): 2003-2009.
- REY N.A., SACCARDO F., PAGNOTTA M.A., 2012. *Assessment of the genetic stability in globe artichoke hybrids and evaluation of their parents by means of SSR molecular markers*. Atti 56th Convegno SIGA, Perugia (Italia) 17-20 Settembre 2012. ISBN 978-88-904570-1-2.
- SACCARDO F., JORDAN, J.R., JORDAN, A., CRINÒ, P., MICOZZI, F., LO BIANCO, C., TEMPERINI, A., REY N.A., PAGNOTTA, M.A., 2013. *Innovative strategy to obtain F1 hybrids of globe artichoke*. Acta Horticulturae 983, pp. 159-172.
- SCARASCIA MUGNOZZA G.T., PACUCCI G., 1976. *Tipi de potenziale valore pratico isolati nell'ambito di un programma per il miglioramento genetico del carciofo*. In: Atti 2° Congr. Int. di Studi sul Carciofo, Bari. Ediz. Minerva Medica, Torino: 721–732.
- SCAGLIONE D., ACQUADRO A., PORTIS E., TIRONE M., KNAPP S.J., LANTERI S., 2012a. *RAD tag sequencing as a source of SNP markers in Cynara cardunculus L*. BMC Genomics 13: 3-11.
- SCAGLIONE D., LANTERI S., ACQUADRO A., LAI Z., KNAPP S.J., RIESEBERG L., PORTIS E., 2012b. *Large scale transcriptome characterization and mass discovery of SNPs in globe artichoke and its related taxa*. Plant Biotechnology Journal 10 (8): 956-969.
- 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., CARLUCCIO A.V., 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., GATTO A., MORGESSE A., MONTEMURRO F., SARLI G., BLANCO E., PIGNONE D., 2011. *Genetic map of artichoke x wild cardoon: toward a consensus map for Cynara cardunculus*. Theoretical and Applied Genetics 123 (7): 1215–1229.
- STAMIGNA C., MICOZZI F., PANDOZY G., CRINÒ P., SACCARDO F., 2004. *Produzione di ibridi F1 di carciofo mediante impiego di cloni maschiosterili*. Italus Hortus 11 (5): 29-33.
- STAMIGNA C., CRINÒ P., CHATELET P., SACCARDO F. 2005. *Induction of embryogenesis in isolated microspores of artichoke (Cynara scolymus L.)*. Acta Hort. 660: 139-143. ISHS.