

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari
Dottorato di Ricerca in “Produttività delle piante coltivate” – XXIV Ciclo

SERGIO CURRÒ

Contributi per il miglioramento genetico del ficodindia
(*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.)

—————
DISSERTAZIONE FINALE
—————

Tutor: Prof.ssa Alessandra Gentile

Co-tutor: Prof. Stefano La Malfa

Coordinatore: Prof.ssa Daniela Romano

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 01
1. IL FICODINDIA	” 01
1.1. Inquadramento sistematico	” 01
1.2. Origine e diffusione	” 02
1.3. Descrizione botanica e fisiologia	” 03
1.4. Importanza economica nel mondo ed in Italia	” 05
1.5. Patrimonio varietale	” 07
1.6. Gli usi del ficodindia	” 09
1.7. Obiettivi del miglioramento genetico e delle biotecnologie applicate al ficodindia	” 10
2. COLTURE <i>IN VITRO</i>	” 14
2.1. Micropropagazione	” 14
2.1.1. <i>Fasi della tecnica di micropropagazione</i>	” 15
2.2. Applicazioni delle colture <i>in vitro</i> per il miglioramento genetico	” 17
2.3. Applicazione delle colture <i>in vitro</i> in <i>Opuntia</i>	” 23
3. MARCATORI MOLECOLARI	” 25
3.1. Classificazione dei marcatori molecolari	” 27
3.2. Principali tipologie di marcatori molecolari	” 29
3.2.1. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	” 29
3.2.2. <i>Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)</i>	” 29
3.2.3. <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	” 30
3.2.4. <i>Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)</i>	” 30
3.2.5. <i>Simple Sequence Repeats (SSR)</i>	” 31
3.2.6. <i>Inter-microsatelliti (I-SSR)</i>	” 33

3.2.7. <i>Single Nucleotide Polymorphism (SNP)</i>	Pag. 34
3.2.8. <i>Sequence-Specific Amplification Polymorphism (S-SAP)</i>	” 34
3.3. Impiego dei marcatori molecolari su ficodindia e specie affini	” 35
OBIETTIVI	” 37
MATERIALI E METODI	” 39
1. COSTITUZIONE DI IBRIDI INTRA- ED INTERSPECIFICI	” 39
1.1. Impollinazione incrociata	” 39
1.2. Analisi istologica	” 39
1.3. Estrazione e germinazione dei semi	” 41
1.4. Accrescimento, acclimatazione e messa a dimora delle piantine	” 43
2. REPERIMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI GERMOPLASMA DI <i>OPUNTIA</i>	” 45
2.1. Reperimento di germoplasma autoctono ed alloctono e costituzione di un campo collezione	” 45
2.2. Caratterizzazione con marcatori microsatelliti	” 49
2.2.1. <i>Materiale vegetale genotipizzato con marcatori microsatelliti</i>	” 49
2.2.2. <i>Estrazione del DNA</i>	” 49
2.2.3. <i>Analisi SSR</i>	” 49
2.2.4. <i>Analisi dei polimorfismi</i>	” 52
3. PROPAGAZIONE <i>IN VITRO</i> E VERIFICA DELLA <i>TRUE TO TYPE</i> NESS CON MARCATORI AFLP	” 55
3.1. Micropropagazione	” 55
3.2. Analisi con AFLP delle piante micropropagate	” 57
3.2.1. <i>Estrazione del DNA</i>	” 57
3.2.2. <i>Reazione di restrizione - ligazione</i>	” 58

3.2.3. <i>Amplificazione pre-selettiva</i>	Pag. 58
3.2.4. <i>Amplificazione selettiva</i>	” 59
3.2.5. <i>Visualizzazione del prodotto di amplificazione</i>	” 60
RISULTATI E DISCUSSIONE	” 61
1. COSTITUZIONE DI IBRIDI INTRA- ED INTERSPECIFICI	” 61
2. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI GERMOPLASMA DI <i>OPUNTIA</i> CON MARCATORI MICROSATELLITI	” 63
3. PROPAGAZIONE <i>IN VITRO</i> E VERIFICA DELLA <i>TRUE TO</i> <i>TYPENESS</i> CON MARCATORI AFLP	” 72
3.1. Micropropagazione	” 72
3.2. Analisi con AFLP	” 73
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	” 76
BIBLIOGRAFIA	” 79

INTRODUZIONE

1. IL FICODINDIA

1.1. Inquadramento sistematico

Il ficodindia (*Opuntia ficus indica* (L.) Miller, 1768) è un arbusto succulento originario del Messico ma presente in tutto il bacino del Mediterraneo e nelle zone temperate di America, Africa, Asia ed Oceania. Appartiene all'ordine *Opuntiales*, famiglia *Cactaceae*, sottofamiglia *Opuntioideae*, genere *Opuntia*. Il numero di specie incluse in tale genere non è noto (Chavez-Moreno *et al.*, 2009) e varia a seconda degli autori passando da 160 per Gibson e Nobel (1986), a 250 per Britton e Rose (1963) fino a 360 secondo Segura *et al.* (2007). La mancata definizione univoca del numero di specie è dovuta principalmente a problemi nella nomenclatura che si registrano non solo nel genere *Opuntia*, ma anche all'interno di altri generi della famiglia delle *Opuntioideae*. I motivi di tale confusione tassonomica principalmente sono dovuti al basso numero di caratteri morfologici, all'alto livello di plasticità fenotipica presente all'interno di molti taxa, alla frequente ibridazione intra- ed intergenerica (Wallace e Gibson, 2002), ai diversi livelli di ploidia (con specie da diploidi ad ottaploidi) (Felker, 2006) ed all'elevata incidenza della poliploidia che raggiunge valori del 64% sul totale delle specie (Pinkava, 1998).

Secondo alcuni autori, le specie di *Opuntia* sono divise in tre sottogeneri: *Cylindropuntia*, in cui troviamo specie arbustive con ramificazioni cilindriche (o articolazioni); *Platyopuntia*, le cui piante sono caratterizzate da ramificazioni appiattite chiamate cladodi (Gibson e Nobel, 1986); *Tephrocactus*, a cui appartengono specie di piccole dimensioni con articoli brevi e globulari. Altri autori, invece, sostengono che quest'ultimo sottogenere debba considerarsi come un genere a sé, distinto dal genere *Opuntia*. Il sottogenere *Platyopuntia* è senza dubbio il più importante perché comprende specie che assumono importanza economica essendo coltivate per la produzione di frutti, destinati all'alimentazione umana, e per la produzione dei cladodi impiegati sia per l'alimentazione del bestiame ma anche per quella umana oltre che per l'estrazione di particolari sostanze chimiche.

1.2. Origine e diffusione

Opuntia ficus indica è originaria dell'altopiano messicano come testimoniato dal ritrovamento di reperti fossili (semi) in insediamenti umani localizzati in quell'area e datati intorno al VII millennio a.C. (Kiesling, 1998; Griffith, 2004). Da qui si diffuse in tutto il Mesoamerica, Cuba, Hispaniola e nelle altre isole dei Caraibi (Figura 1), dove fu rinvenuta dai primi esploratori europei della spedizione di Cristoforo Colombo. E' verosimile inoltre che la pianta fosse stata introdotta anche in Sud America in epoca pre-colombiana da parte della civiltà peruviana dei Nazca (Sejuro, 1990). Secondo altri autori invece questa specie era sconosciuta nell'America del sud precolombiana (Towle, 1961; Baker, 2002).

Probabilmente la pianta venne introdotta nel vecchio continente già con il primo viaggio di ritorno di Colombo nel 1493 verso il Portogallo (Russell e Felker, 1987; Anderson, 2001). Il ficodindia però iniziò a diffondersi in Europa a partire dagli inizi del XVI secolo (Donkin, 1977; Casas e Barbera, 2002) grazie ai "conquistadores" spagnoli, i quali si accorsero per primi dei benefici di tale pianta nei confronti dello scorbuto, terribile malattia che colpiva principalmente i marinai e che era causata dalla carenza di vitamina C. La pianta fu così trasportata nelle navi durante i lunghi viaggi e questo ne permise una rapida diffusione in tutta l'area del Mediterraneo e nelle varie regioni aride e semiaride del mondo (Anderson, 2001; Casas e Barbera, 2002; Sàenz-Hernandez *et al.*, 2002).

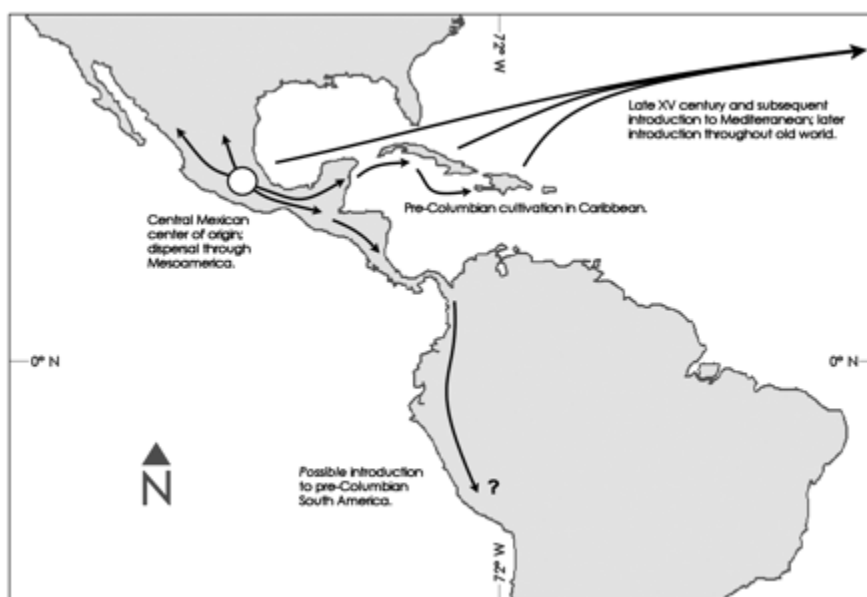


Figura 1. Centro di origine e diffusione primario del ficodindia

Giunto in Europa, il ficodindia, al pari di molte altre piante provenienti dal nuovo continente, venne utilizzato esclusivamente come pianta ornamentale; era infatti una specie molto strana per i botanici del tempo che vi riscontrarono caratteristiche morfologiche sconosciute all'epoca. Il ficodindia si diffuse rapidamente nei giardini delle ville e negli orti botanici perché era particolarmente apprezzato per il suo aspetto strano ed esotico, per il suo veloce accrescimento e per le sgargianti fioriture. La pianta si adattò ben presto all'ambiente mediterraneo diffondendosi velocemente e naturalizzandosi al punto da divenire uno degli elementi più comuni del paesaggio.

1.3. Descrizione botanica e fisiologia

Opuntia ficus indica è una pianta succulenta, perenne e spinosa, dal portamento che può essere prostrato, cespuglioso o anche arborescente, a crescita molto rapida, che può raggiungere un'altezza di 3-5 metri. Le ramificazioni sono composte da articoli sublegnosi, succulenti, ellittici, larghi e compressi, lunghi da pochi centimetri fino anche a 50, che prendono il nome di cladodi ma che comunemente vengono chiamati "pale". I cladodi inserendosi l'uno sull'altro danno vita alla caratteristica forma ad albero senza tronco e senza rami. Sulla superficie dei cladodi sono presenti numerose gemme protette da setole aghiformi; tali strutture prendono il nome di areole. Nelle areole si trovano due punti di vegetazione, uno che darà origine ad un fiore o un germoglio, l'altro che darà luogo alle spine. Inoltre sulle areole si formano i glochidi, spine sottilissime, di pochi millimetri, di colore giallo-bruno; per la loro caratteristica di essere spine non sclerificate alla base, sono caduche e si presentano come valida difesa contro molti animali, che attratti dalle pale ricche di acqua danneggerebbero la pianta.

I cladodi sono preposti contemporaneamente alla funzione di assimilazione (fotosintesi), di riserva e di sostegno. Su di essi le vere foglie si presentano di piccole dimensioni e sono visibili solo nel primo mese di età perché cadono precocemente.

La fioritura avviene a maggio-giugno e procede in modo scalare. I fiori si formano principalmente sugli orli apicali dei cladodi; sono sessili, solitari, ermafroditi, con ovario infero circondato da un ampio ricettacolo che a maturità costituirà l'epicarpo del frutto. Il calice dialisepalo protegge la corolla dialipetala di colore giallo intenso o giallo-arancio. Gli

stami sono numerosi, di dimensioni macroscopiche e ricchi di polline. L'impollinazione è autogama e cleistogama dovuta alla recettività dello stamma prima dell'antesi che rende tale specie dotata di scarsa variabilità genetica. I fiori si formano in gran parte sui cladodi di un anno di età; non è raro, però, poter osservare delle fioriture su cladodi di due anni o più, specialmente a condizioni climatiche favorevoli. Un cladodo fertile può produrre fino a 20 fiori per fioritura (Nerd e Mizrahi, 1994).

Ai fini di una produzione di maggiore pregio e con una maturazione tardiva, si è diffusa la tecnica colturale della "scozzolatura". Consiste nell'asportare i fiori ed i cladodi prodotti in primavera; effettuata nel periodo compreso tra la fine di maggio e la metà di giugno, induce nella pianta una seconda fioritura tardiva nel mese di agosto. Questa pratica se ben programmata, permette di differenziare l'epoca di raccolta in modo da realizzare delle raccolte scalari che vanno dalla fine di settembre fino ai primi di dicembre (Barbera e Inglese, 1993). I frutti ottenuti in estate che derivano dalla prima fioritura prendono il nome di "Agostani" o "Primo fiore", mentre quelli che maturano in autunno in seguito alla scozzolatura ed alla conseguente seconda fioritura, vengono chiamati "Scozzolati" o "Bastardoni". Normalmente gli agostani sono di qualità più scadente, infatti sono di piccole dimensioni e la loro polpa tende a sfarinare quando giungono a maturazione; al contrario i frutti autunnali, sono mediamente più grossi e la loro polpa è più turgida e croccante. Questa caratteristica rende i frutti tardivi più apprezzati dal mercato oltreché più idonei al trasporto ed alla conservazione.

Il frutto è una bacca uniloculare che ha forma ovoidale o piriforme, ombelicata all'apice, con polpa carnosa e commestibile. La buccia (epicarpo) a maturità assume un colore variabile dal giallo-arancione al rosso, a seconda della varietà. L'esterno dell'epicarpo è anch'esso ricco di glochidi, isolati o in ciuffi, pungenti e fastidiosi al momento della raccolta. Il mesocarpo e l'endocarpo costituiscono la polpa, molto dolce e succosa, di colore variabile dal bianco, al giallo-arancio, al rosso. La polpa avvolge i numerosi e piccoli semi legnosi.

Il fusto si forma dall'invecchiamento dei cladodi basali. Col passare degli anni essi assumono un colore scuro screziato e scaglioso di consistenza sub-legnosa. L'apparato radicale, quando la pianta proviene da seme, è costituito da una radice principale fittonante che penetra in profondità nel terreno e da radici secondarie che si sviluppano superficialmente ma che hanno la capacità di approfondirsi in caso di carenze idriche. Nel caso in cui la pianta sia originata da propagazione vegetativa l'apparato radicale si presenta superficiale e fascicolato con la capacità di approfondirsi fino ad 80 centimetri (Fernandez e Sayz, 1990).

La funzione di fotosintesi in questo tipo di piante è assunta dal tessuto parenchimatico dei cladodi in quanto le foglie, come già detto, sono lunghe appena pochi millimetri ed effimere in quanto cadono molto facilmente dopo circa 30 giorni.

Dal punto di vista fisiologico, una particolarità che contraddistingue il ficodindia, e tutta la famiglia delle cactaceae, è il fatto di avere un metabolismo CAM (Crassulacean Acid Metabolism); nelle piante CAM gli stomi si aprono di notte restando chiusi di giorno (il contrario di ciò che avviene nella maggior parte delle piante) riducendo quindi sensibilmente la perdita di liquidi per traspirazione. Questa particolarità non cambia anche se le piante dovessero vivere in condizioni ottimali di coltivazione, vale a dire di acqua e nutrimento. L'importanza del ciclo CAM si evidenzia nell'elevata efficienza d'uso dell'acqua, cioè nel ridotto "costo" in termini di acqua necessaria per fissare una molecola di carbonio. Questa caratteristica fa sì che la pianta sia capace di svilupparsi ottimamente anche in condizioni di carenza idrica e che quindi riesca a diffondersi in aree poco ospitali per le altre piante.

1.4. Importanza economica nel mondo ed in Italia

Il ficodindia rappresenta una specie minore nel panorama internazionale, per tale motivo manca di fonti statistiche precise e recenti relative alle superfici investite a livello mondiale e le rispettive produzioni ottenute. Secondo quanto riportato da Inglese *et al.* (2002), il principale Paese produttore a livello mondiale è il Messico, con una superficie coltivata di circa 70.000 ettari ed una produzione di 345.000 tonnellate; altri Paesi produttori nel mondo sono il Sudafrica con 1.000 ettari, che danno una produzione di circa 8.000 tonnellate, ed il Cile con 1.100 ettari e più di 8.000 tonnellate (Basile, 2001). Aree minori di coltivazione sono presenti in Argentina (800 ettari e 7.500 tonnellate), in Israele (300 ettari e 6.000 tonnellate) e negli Stati Uniti (200 ettari per una produzione di 3.600 tonnellate). Tra le altre nazioni in cui viene coltivato il ficodindia, anche se con superfici poco rilevanti, abbiamo: il Brasile, il Perù, la Colombia, l'Algeria, la Tunisia, il Marocco, la Turchia e l'Egitto. In Europa oltre all'Italia troviamo la Spagna, il Portogallo e la Grecia (Basile, 2001).

L'Italia rappresenta il maggior produttore europeo ed il secondo a livello mondiale. La pianta è coltivata quasi esclusivamente in Sicilia dove copre una superficie di 8.328 ettari, pari al 96 % della superficie nazionale (ISTAT, 2009). Per quanto riguarda l'offerta del prodotto siciliano, questa negli ultimi 3 decenni ha subito un notevole incremento; la

produzione totale, infatti, è passata da 35.000 tonnellate, nel quadriennio 1975-78, a 48.000 tonnellate, nel quadriennio 1987-90, fino a 63.000 tonnellate nel triennio 1997-98 (Inglese *et al.* 2002). Attualmente la produzione siciliana ammonta a circa 86.000 tonnellate (ISTAT, 2009), pari a circa il 97 % della produzione nazionale. Questa evoluzione positiva dell'offerta è stata accompagnata da diversi fattori come l'ampliamento del calendario di raccolta, l'adozione di superfici più vaste, tecniche di coltivazione eco-compatibili e un miglioramento della qualità del prodotto.

La coltivazione del ficodindia in Sicilia è essenzialmente concentrata in tre areali ben distinti (Figura 2):

- “Colline di San Cono”: comprende il territorio di tre province e ricade nei comuni di San Cono (Catania), San Michele di Ganzaria (Catania), Piazza Armerina (Enna) e Mazzarino (Caltanissetta);
- “Sud Ovest Etno”: rientra interamente nella provincia di Catania interessando principalmente i comuni di Belpasso, Biancavilla, Paternò, Adrano e Bronte;
- “Valle del Belice”: nonostante sul panorama siciliano non rivesta grande importanza, rappresenta l'areale di produzione più importante della Sicilia occidentale; la produzione del ficodindia interessa quasi esclusivamente il comune di Santa Margherita di Belice.

Un notevole passo in avanti nella valorizzazione del prodotto siciliano è stato fatto grazie al riconoscimento della DOP “Ficodindia dell'Etna” nel 2003 e alle attività del consorzio di tutela del ficodindia dell'Etna che è particolarmente attivo nella promozione di tale prodotto.



Figura 2. Principali aree di coltivazione in Sicilia: in rosso le “Colline di San Cono”, in verde il “Sud Ovest Etneo” ed in blu la “Valle del Belice”

1.5. Patrimonio varietale

In Messico circa il 90% dei frutti commercializzati sono prodotti da sei cultivar, vale a dire ‘Reyna’ (la cultivar più diffusa), ‘Cristalina’, ‘Chapeada’, ‘Naranjona’, ‘Montesa Amarilla’ e ‘Roja pelona’ (Pimienta-Barrios, 1994; Mondragon-Jacobo e Perez-Gonzalez, 1996). Tra le principali varietà coltivate negli altri Paesi troviamo: ‘Ofer’ in Israele; ‘Malta’, ‘Gymnocarpo’, ‘Direkteur’ e ‘Algerian’ in Sudafrica; ‘Amarilla sin espinas’ in Argentina; ‘Verde’ e ‘Blanca’ in Cile; ‘Andy Boy’ negli Stati Uniti (Inglese *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda l’Italia, la nostra produzione si basa esclusivamente su tre cultivar (Basile, 2001):

- la ‘Gialla’, detta anche ‘Surfina’, che gode di altissima rusticità e che rappresenta circa l’80% della produzione totale siciliana;
- la ‘Rossa’ o ‘Sanguigna’ che incide per circa il 15%;
- la ‘Bianca’ o ‘Muscaredda’ che occupa il restante 5% del totale.

I nomi delle cultivar sono esclusivamente basate sulle caratteristiche dei frutti (colore della buccia e della polpa) (Figura 3).

La cultivar ‘Gialla’ è ampiamente coltivata per la sua buona produttività, per l’alta capacità di resistenza alla manipolazione post-raccolta e per le qualità organolettiche superiori alle altre due varietà (Basile, 2001). A questa varietà fanno capo diverse varianti già descritte negli anni ’50 tra le quali la “Gialla a frutto pedunculato”, la “Gialla trunzara” e la “Gialla femminella”; quest’ultima si distingue per una minore rusticità (Damigella, 1958).

La cultivar ‘Rossa’, tipica per la sua colorazione rosso-violetto, presenta una produttività nettamente minore oltre ad una elevata sensibilità alla spaccatura; inoltre è stata dimostrata una tendenza all’alternanza produttiva (Alberghina, 1994; Barbera *et al.*, 1991). La cultivar dimostra comunque una buona resistenza alle manipolazioni ed al trasporto e produce dei frutti di dimensioni superiori rispetto alle altre (Basile, 2001). La polpa si presenta con una consistenza mucillaginosa più spiccata rispetto alle altre varietà. Anche per la ‘Rossa’ distinguiamo piante con frutti sessili e pedunculati oltre alla variante trunzara. Il suo colore la rende particolarmente gradita al consumatore.

La ‘Bianca’ è la meno diffusa; ha la polpa di colore giallo paglierino e gode di ottima produttività. La buccia si presenta più sottile rispetto a quella delle altre due cultivar (Barbera *et al.*, 1992) il che rende i frutti più sensibili alle manipolazioni post-raccolta e suscettibili alla mosca della frutta (*Ceratitis capitata*) (Inglese *et al.*, 1995). Anche in questo caso troviamo delle varianti a frutti pedunculati ed il clone trunzara.

I cloni “trunzari” si distinguono per la produzione di frutti con una polpa più croccante, caratteristica molto apprezzata dal consumatore (Barbera e Inglese, 1993).



Figura 3. Frutti sbucciati delle varietà ‘Bianca’, ‘Gialla’ e ‘Rossa’

1.6. Gli usi del ficodindia

Senza dubbio, dal punto di vista economico il principale l'utilizzo del ficodindia è rappresentato dal consumo alimentare dei frutti allo stato fresco. Uno dei limiti della diffusione di tale frutto nei mercati stranieri è rappresentato dalla difficoltà di consumo dovuta alla naturale presenza di spine. Accanto alle tecniche di despinatura che i magazzini di lavorazione realizzano, da alcuni anni sta crescendo l'offerta di un prodotto di IV gamma, vale a dire del frutto già sbucciato, confezionato e pronto all'uso. Sebbene la tecnologia sia abbastanza matura, la ricerca sta proseguendo la sua attività nel ritardare e ridurre i fenomeni ossidativi che si verificano sui frutti sbucciati anche attraverso lo studio dei più idonei film per il confezionamento. Il frutto però può subire anche numerose lavorazioni per ottenere prodotti quali canditi, succo, conserve, gelatine, liquori, alcool, ecc.

In Messico esistono diversi prodotti tradizionali ottenuti dalla trasformazione dei frutti:

- "Melcocha", sciroppo ottenuto dalla concentrazione del succo per ebollizione;
- "Queso de tuna", pasta dolce, compatta e molto nutriente ricavata a partire dalla Melcocha;
- "Miel de tuna", prodotto attraverso la concentrazione della polpa;
- "Colonche", bevanda alcolica ottenuta dalla fermentazione del succo.

Nella tradizione siciliana invece troviamo il "mostacciolo", ottenuto dal succo ristretto per ebollizione a cui si aggiungono farina di semola ed aromi, e la "mostarda", preparata in modo analogo ma addizionata di succo d'uva e che può essere conservata anche sotto forma di canditi.

Oltre ai frutti, anche i giovani cladodi sono commestibili, opportunamente ripuliti dalle spine. L'uso alimentare, però, sembra essere presente solo nella cultura messicana, dove i cladodi vengono impiegati con successo in vari piatti locali, o per la preparazione di conserve in salamoia o sott'aceto; non si ha notizia di un uso alimentare umano negli altri paesi del mondo, tranne qualche traccia storica nell'agrigentino.

Riguardo all'uso per l'alimentazione animale, anche in questo caso vengono utilizzati sia i frutti che i cladodi. Possono venire somministrati sia freschi che essiccati ma anche sotto forma di farine. Non indifferente è la quantità di acqua che gli animali possono assumere con un pasto a base di cladodi freschi; questo consente un considerevole risparmio di acqua per le abbeverate, particolare rilevante nelle zone aride (Barbera e Inglese, 2001).

Nella medicina popolare l'utilizzo del ficodindia assume grande importanza: per la cura di malattie come il diabete mellico, grazie alla sua azione ipoglicemizzante; per le infiammazioni delle vie urinarie e per favorire l'espulsione dei calcoli renali grazie alle proprietà diuretiche dei fiori essiccati e delle radici; per la ricchezza di fibre; per le proprietà anticongestionanti e cicatrizzanti sull'epidermide e sulle mucose intestinali.

Il ficodindia viene inoltre utilizzato, fin dai tempi degli Aztechi, per l'allevamento del *Dactylopius coccus*, comunemente detto "cocciniglia del carminio"; questo insetto, dell'ordine dei Rincoti, è un parassita che vive sulle cactaceae del genere *Opuntia*. Dalla cocciniglia viene estratto l'acido carminico, una sostanza dall'intenso colore rosso, che attraverso un processo industriale viene trasformato in un colorante che prende il nome di carminio e che corrisponde alla sigla E 120. Questo colorante è molto richiesto dall'industria cosmetica, farmaceutica, tessile ed alimentare.

1.7. Obiettivi del miglioramento genetico e delle biotecnologie applicate al ficodindia

Gli obiettivi del miglioramento genetico del ficodindia sono piuttosto ampi e, come per tutti gli altri fruttiferi, riguardano in primo luogo la conoscenza dei meccanismi molecolari sottesi all'espressione di caratteri interessanti e in secondo luogo all'utilizzo di tali conoscenze per lo sviluppo di varietà che meglio rispondano alle esigenze del frutticoltore, del trasformatore e del consumatore.

Poiché il ficodindia non ha una lunga storia di miglioramento genetico diversamente da ciò che si riscontra in altre colture (agrumi, vite, olivo, ecc), le priorità da sviluppare sono molteplici e sono funzione delle aree di coltivazione e degli utilizzi della coltura. Tra queste, certamente, accanto al miglioramento della qualità e dell'entità della produzione (ivi compresa la riduzione del numero di semi nel frutto e delle spine nella pianta e nel frutto), vanno annoverate l'ampliamento del calendario di maturazione, la resistenza alla mosca della frutta, l'attitudine all'utilizzo innovativo del prodotto (IV gamma, ad esempio).

La presenza dei semi nella polpa rappresenta un grosso limite per l'ampliamento dei mercati potenzialmente interessati al ficodindia; il numero di semi, infatti, in un singolo frutto può variare da 80 fino ad oltre 300 (pari a 3 - 8 grammi) in funzione della dimensione del frutto e della cultivar (Mondragon-Jacobo e Perez-Gonzalez, 1996). Inoltre a causa della poliploidia, insorta per la formazione di gameti non ridotti, frutti di ficodindia possono

presentare semi abortiti; è stato valutato che il rapporto tra semi abortiti e semi normali in cultivar italiane è 4 volte superiore (0.44) rispetto a quello delle cultivar messicane (0.11) (Pimienta-Barrios e Mauricio, 1987; Barbera *et al.*, 1994). Il numero di semi è correlato positivamente alla dimensione del frutto e il frutto ideale dovrebbe essere, pertanto, di grandi dimensioni ma con un elevato rapporto di semi abortiti rispetto ai semi normali.

La partenocarpia, cioè la produzione di frutti senza semi per la mancanza di impollinazione o fecondazione (ovvero di fecondazione seguita da aborto dell'embrione) è certamente il meccanismo biologico che assicura l'assenza di semi nei frutti. Anche per il ficodindia, è stata identificata in Israele una accessione a polpa gialla, denominata BS1, che non necessita di impollinazione per la formazione e ingrossamento del frutto; tuttavia i semi degenerati contengono ancora un rudimento interno piuttosto consistente e la qualità generale del frutto è piuttosto scadente (Weiss *et al.*, 1993; Nerd e Mizrahi, 1994). Altre strategie utilizzate hanno riguardato l'applicazione di gibberelline ma con limitati risultati (Arguilar, 1987; Ortiz, 1988).

Altro problema importante è rappresentato dalle spine la cui densità e dimensione nei cladodi varia molto tra le accessioni. Genotipi senza spine non sono presenti nelle forme selvatiche e pertanto tale carattere è stato acquisito durante il processo di domesticazione. Le varietà italiane a differenza di quelle messicane, hanno un numero e una dimensione delle spine piuttosto contenuto anche se lo sviluppo di cultivar senza spine è un obiettivo prioritario non solo per l'accettabilità del frutto da parte del consumatore ma anche per il miglioramento dell'efficienza delle operazioni colturali (potatura, raccolta).

Il miglioramento genetico del ficodindia è stato realizzato, al pari di quanto è avvenuto negli altri fruttiferi, utilizzando tutti i metodi tradizionali, quali la selezione, l'introduzione di germoplasma da altri Paesi, la selezione e la caratterizzazione del germoplasma autoctono, nonché l'ibridazione. Le cultivar presenti, in Italia ma anche in altri Paesi, tuttavia sono ancora principalmente il risultato di un lungo, informale processo di selezione eseguito dagli agricoltori sulla base di criteri specifici quali le dimensioni e la qualità dei frutti, la produttività e la tolleranza agli stress. Il panorama varietale, pertanto, nei diversi Paesi che producono ficodindia è strettamente correlato al germoplasma originario presente e, pertanto, la massima diversità genetica si riscontra in Messico, così come d'altronde è dimostrato dal numero di entità che sono raccolte nei centri di conservazione del germoplasma in questo Paese. Nel mondo risultano censiti 7 campi principali di raccolta del germoplasma ficodindico (Chapman *et al.*, 2002); tuttavia la conservazione *ex situ* delle risorse genetiche

di questa specie è complessa e onerosa sia nella fase del mantenimento, che nella gestione. Tali difficoltà sono dovute sia ad alcune caratteristiche genetiche della specie ma anche alle notevoli dimensioni che la pianta raggiunge nonché alle ridotte informazioni disponibili sulle accessioni in collezione e all'assenza di idonei descrittori sia morfologici che molecolari. Tale situazione determina la frequenza di accessioni duplicate e incertezza nella classificazione che rendono poi di fatto complicata la valutazione e l'utilizzazione delle risorse genetiche (Weniger, 1984).

Per poter realizzare un efficiente programma di miglioramento genetico del ficodindia è necessario disporre di biodiversità che, al tempo stesso, deve essere classificata secondo criteri certi. Nel tempo sono stati utilizzati diversi sistemi di classificazione della variabilità genetica esistente, tra i quali l'analisi delle principali componenti (PCA) sulla base di numerosi caratteri morfologici che ha consentito di trovare alcune correlazioni positive tra alcuni parametri (larghezza del cladodo e peso del frutto, ad es.) (Mondragon-Jacobo, 1999). La possibilità di disporre di marcatori molecolari in grado di discriminare l'ampio germoplasma disponibile anche per il ficodindia sarebbe di grande ausilio per la scelta di parentali per l'esecuzione di specifici programmi di incrocio.

L'incrocio quale metodo di miglioramento genetico nel ficodindia è reso complesso da alcuni aspetti della biologia florale della specie. I fiori di ficodindia sono generalmente ermafroditi, con numerosi stami, un singolo stilo e un perianzio molto vistoso. La specie è autocompatibile ed è caratterizzata da un meccanismo di proterandria che rende possibile l'autofecondazione prima che il fiore si apra (cleistogamia). Pertanto, i programmi di impollinazione incrociata devono prevedere diversi passaggi a carico del genitore maschile e del genitore femminile nonché diverse difficoltà per superare la dormienza fisiologica che i semi presentano.

La possibilità di disporre di un metodo di propagazione rapido ed efficiente per poter avere grandi quantitativi di nuovi genotipi ottenuti da specifici programmi di incrocio ovvero selezionati in campo rappresenta un'altra opportunità che le biotecnologie possono offrire per velocizzare i programmi di miglioramento genetico del ficodindia. La valutazione complessiva delle accessioni di nuova costituzione passa attraverso una verifica della performance bioagronomica in ambienti diversi e, sebbene la propagazione per parti di cladodo rappresenti un metodo efficace per la specie, l'utilizzo delle colture *in vitro* può, quando i materiali sono preziosi e scarsi in quantità, rappresentare un sistema di grande ausilio almeno in una fase precoce del processo di valutazione. Poiché la specie è

caratterizzata anche da apomissia (fino al 50% di semi poliembrionici), la verifica dei presunti semenzali ibridi rappresenta un passaggio fondamentale per evitare di portare in valutazione semenzali somatici. A tale proposito, l'utilizzo di specifici marcatori molecolari può rappresentare uno strumento importante per la selezione degli ibridi già in fase di germinazione dei semi.

2. COLTURE *IN VITRO*

Con il termine di “colture *in vitro*” si intendono diverse tecniche, sviluppate negli ultimi 50 anni, che consentono la crescita *in vitro*, su specifici terreni di coltura, di cellule, tessuti ed organi al fine di rigenerare nuove piante complete. Tali metodologie si basano sul concetto di totipotenza, cioè sulla capacità che hanno le cellule vegetali di originare un nuovo individuo. Le colture *in vitro* trovano svariate applicazioni nei programmi di miglioramento genetico e consentono di ottenere variabilità somaclonale, di realizzare la fecondazione *in vitro*, di produrre ibridi somatici mediante fusione di protoplasti, di recuperare embrioni di ibridi interspecifici o intergenerici, di ottenere linee aploidi via androgenesi e ginogenesi e di produrre piante transgeniche. Altri campi di applicazione delle colture *in vitro* riguardano il risanamento delle piante dai virus, la conservazione del germoplasma e la produzione di metaboliti secondari.

2.1. Micropropagazione

La micropropagazione è una tecnica di propagazione clonale che consiste nella produzione di piante attraverso la coltura di espianti (organi, tessuti o cellule) in specifici substrati artificiali in condizioni di sterilità e in ambiente controllato. Tale tecnica presenta alcuni vantaggi rispetto alle tecniche di propagazione tradizionali tra cui una notevole riduzione dei tempi e degli spazi richiesti, la possibilità di ottenere un gran numero di piante partendo da pochi espianti e la produzione di individui tutti identici fra di loro e alla pianta madre. Il presupposto allo sviluppo delle tecniche di micropropagazione è la caratteristica della totipotenza delle cellule vegetali, cioè la capacità, sotto l'influenza di specifici stimoli chimico-fisici, di dare origine ad un intero individuo.

La propagazione *in vitro* può avvenire secondo tre principali processi:

- *proliferazione ascellare*: i germogli si ottengono dalle gemme presenti nell'espianto messo in coltura; essa pur essendo più lenta, perché origina pochi germogli per singolo espianto ad ogni ciclo di subcoltura, fornisce maggiori garanzie di uniformità ed è comunque più rapida dei metodi tradizionali di propagazione;

- *organogenesi*: formazione di germogli (caulogenesi) o di radici (rizogenesi) da cellule somatiche dei tessuti messi in coltura (organogenesi diretta) o da cellule indifferenziate del callo (organogenesi indiretta) prodotto dagli espianti;
- *embriogenesi*: ottenimento di embrioni somatici, a partire da singole cellule, che accrescendosi daranno origine ad una piantina completa; può essere diretta, quando l'embrione si forma da una cellula differenziata dell'espianto, oppure indiretta, quando esso si origina da un cellula indifferenziata del callo.

Sebbene siano numerosi i vantaggi che la tecnica offre, esistono dei problemi che ne limitano l'utilizzo, tra questi ricordiamo la difficile applicazione su colture importanti (leguminose e cereali ad esempio), gli elevati costi iniziali per le attrezzature richieste, la necessità di personale specializzato e la possibilità che si generi variabilità non desiderata con conseguente perdita di uniformità del materiale propagato.

2.1.1. Fasi della tecnica di micropropagazione

Scelta del materiale di partenza. Una volta decisa la specie o la varietà da micropropagare, risulta necessario scegliere la pianta da cui prelevare l'espianto, la cosiddetta "pianta madre". Tale scelta è di fondamentale importanza perché la micropropagazione consente di ottenere, a partire da un singolo espianto, centinaia di piante, quindi un'errata valutazione iniziale delle caratteristiche genetiche e sanitarie della pianta madre si ripercuoterebbe in maniera disastrosa sull'intero materiale micropropagato.

Prelievo degli espianti e messa in coltura. La pianta madre anche se allevata in condizioni igieniche controllate ospita un'ampia gamma di microrganismi. Quindi si rende necessario, prima del prelievo dell'espianto, effettuare delle sterilizzazioni utilizzando prodotti chimici quali ipoclorito di sodio e cloruro di mercurio. Una volta sterilizzato il tessuto vegetale, gli espianti vengono prelevati e posti nei contenitori con i terreni di coltura opportunamente preparati.

Moltiplicazione. Il materiale ottenuto nella fase precedente viene trasferito i nuovi substrati di coltura per favorirne un rapido accrescimento e un'intensa attività di moltiplicazione. I nuovi germogli possono essere:

- inviati direttamente alla fase successiva di radicazione;
- sottoposti ad una fase di allungamento per ottenere una maggiore uniformità prima della fase di radicazione su substrati opportunamente modificati;

- nuovamente moltiplicati ponendoli su un substrato fresco della medesima composizione (subcoltura).

Il rapporto tra il numero di germogli ottenuti al termine di una subcoltura ed il numero di quelli posti a proliferare prende il nome di coefficiente di moltiplicazione.

Radicazione. Come precedentemente accennato, la fase di radicazione può essere preceduta da un periodo di 15-20 giorni, detto periodo di allungamento, in modo da ottenere germogli ben sviluppati. Nel processo rizogeno si possono distinguere tre fasi:

- induzione, durante la quale non si osservano variazioni istologiche;
- differenziazione, in cui le cellule parenchimatiche cominciano a modificarsi aumentando il proprio volume;
- attività meristemica.

Tale fase si conclude con lo sviluppo di un apparato radicale completo ed efficiente.

Acclimatazione. L'ultima fase della micropropagazione è l'acclimatazione delle piante ottenute, un processo di graduale adattamento alle condizioni *ex vitro*. L'acclimatazione è resa necessaria per le caratteristiche delle piante ottenute *in vitro*, cresciute in un ambiente caratterizzato da temperatura uniforme ed umidità elevata. Queste piante, infatti, presentano foglie sottili con scarsa formazione di mesofillo, poche cere epicutcolari e stomi con ridotta funzionalità (Al-Ahmad *et al.*, 1998) ed hanno inoltre un apparato radicale poco sviluppato e caratterizzato da una bassa conducibilità idrica (Fila *et al.*, 1998); tali caratteristiche, in seguito al trasferimento *ex vitro*, comportano un'eccessiva perdita di acqua per evapotraspirazione che non viene adeguatamente compensata dall'assorbimento radicale e che può portare alla morte delle piantine.

L'acclimatazione si distingue in due stadi:

- attecchimento delle piantine nel nuovo substrato di trapianto;
- ambientamento vero e proprio alle condizioni della serra.

Il primo stadio si favorisce mantenendo un'umidità relativa simile a quella propria delle condizioni *in vitro*. Quando gli apici vegetativi mostrano attività di crescita, inizia il secondo stadio durante il quale l'umidità viene portata in modo graduale alle condizioni naturali. Il livello di umidità del substrato di trapianto rappresenta un fattore importante sia per l'accrescimento delle radici che per un eventuale attacco di patogeni; devono essere impiegati substrati capaci di assicurare una sufficiente permeabilità ed areazione del mezzo e contemporaneamente trattenere una quantità sufficiente di acqua. I componenti del terriccio

più comunemente utilizzati sono torba, sabbia e perlite in rapporti diversi a seconda delle esigenze delle specie.

2.2. Applicazioni delle colture *in vitro* per il miglioramento genetico

Induzione di variabilità somaclonale. La coltura *in vitro* è anche uno strumento che può essere utilizzato nei programmi di miglioramento genetico col fine di indurre nuova variabilità. La comparsa, nelle piante propagate *in vitro*, di mutazioni genetiche solitamente irreversibili ed ereditabili o di variazioni epigenetiche, cioè reversibili e non ereditabili, viene definita variabilità somaclonale. Questo tipo di variabilità, benché in molte applicazioni delle colture *in vitro* rappresenti un aspetto negativo, come ad esempio nel caso della micropropagazione, può rivelarsi molto utile se sfruttata come fonte di nuova variabilità ai fini del miglioramento genetico vegetale. La maggior parte delle mutazioni non risultano vantaggiose, tuttavia alcune di loro possono manifestare caratteristiche favorevoli (Barcaccia e Falcinelli, 2006). La variabilità somaclonale può pertanto consentire l'isolamento di nuovi genotipi potenzialmente utili sia per la ricerca genetica di base che per il miglioramento genetico.

L'insorgenza della variabilità somaclonale può essere indotta da particolari condizioni di coltura: una prolungata fase allo stato di callo (maggiore è il numero delle subcolture e più elevata sarà l'insorgenza delle mutazioni), la concentrazione dei regolatori di crescita (2,4-D, NAA ed IBA ad alte concentrazioni sono agenti mutageni), la velocità di proliferazione cellulare (rapide divisioni cellulari favoriscono l'insorgere delle mutazioni). Anche il livello di ploidia della pianta madre ed il tipo di espianto influenzano la comparsa di variabilità somaclonale. Le mutazioni sono infatti più frequenti nelle specie poliploidi ed in quelle con elevato numero di cromosomi. Gli espianti di tessuti meristemati danno origine a bassa variabilità nelle piante rigenerate, questa aumenta nel caso in cui si utilizzano tessuti differenziati per la micropropagazione (Barcaccia e Falcinelli, 2006).

La modificazione più frequente che può manifestarsi è la poliploidizzazione; essa si verifica in seguito ad endoreduplicazione seguita da mitosi, a duplicazione cromosomica non seguita da divisione cellulare o a fusione di nuclei in cellule multinucleate. Un'altra modificazione consiste nella formazione di cellule aploidi a causa di eventi di meiosi

somatica. In seguito a segregazioni anormali durante la mitosi si possono avere fenomeni di aneuploidia.

Allo scopo di promuovere ulteriormente la comparsa di mutazioni si possono utilizzare anche sostanze mutagene che aggiunte al substrato di coltura stimolano fortemente la comparsa di nuova variabilità.

Per aumentare la possibilità di individuare mutazioni utili può essere realizzata una pressione selettiva durante la coltura introducendo specifici fattori di stress e favorendo così l'isolamento del mutante che presenta la variazione oggetto di interesse. La mutagenesi *in vitro* è divenuta così un sistema alternativo a completamento dell'attività di miglioramento genetico delle specie di interesse alimentare ed ornamentale.

Fecondazione in vitro. Nei programmi di miglioramento genetico, al fine di costituire nuovi genotipi, spesso è necessario ottenere ibridi derivanti da fecondazioni che in natura avvengono difficilmente o non avvengono affatto (incompatibilità). La coltura *in vitro* può quindi intervenire per superare gli ostacoli naturali delle ibridazioni interspecifiche.

Per effettuare una fecondazione *in vitro* è necessario mettere a contatto gametofiti maschili e femminili perfettamente funzionanti e definire le condizioni di coltura ottimali per assicurare la fusione dei gameti. Inoltre, bisogna mettere a punto il substrato di coltura che permetterà lo sviluppo del gametofito femminile dopo la fecondazione fino alla maturità dell'embrione o alla germinazione del seme (Devreux e Damiano, 1988).

Una tecnica di fecondazione *in vitro* prevede di coltivare l'intero gineceo che poi viene impollinato; in tal modo si consente lo sviluppo dei semi all'interno dell'ovario, dove essi, arrivati a maturità, germinano producendo piantine che emergono dall'ovario. Tuttavia, con tale tecnica di fecondazione le barriere naturali alle ibridazioni interspecifiche esistenti a livello di stigma e stilo non possono essere superate (Devreux e Damiano, 1988). Tale limite può essere superato ricorrendo all'impollinazione diretta degli ovuli *in vitro*; questa tecnica prevede la rimozione della parete dell'ovario in modo da mettere a nudo gli ovuli sui quali viene posto il polline.

Coltura di embrioni immaturi. L'embrione, com'è noto, rappresenta il primo stadio di sviluppo di un nuovo individuo diploide risultante dalla fusione del gamete femminile e di quello maschile.

La coltura *in vitro* di embrioni separati dal seme è stata intrapresa per diverse ragioni. La prima vera applicazione di questa tecnica per il miglioramento genetico è stata effettuata da Laibach il quale, nel 1925, riuscì a recuperare ibridi tra *Lilium perenne* e *L. austriacum*. Un'altra applicazione importante dell'embriocoltura è certamente il superamento della dormienza dei semi di alcune specie oppure la possibilità di ottenere lo sviluppo di embrioni che normalmente non riuscirebbero a raggiungerlo nel seme. Ma l'applicazione più significativa per il miglioramento genetico delle piante arboree da frutto è certamente legata alla possibilità di recuperare embrioni provenienti dal processo di incrocio tra cultivar assai precoci (es. pesco) ovvero tra varietà apirene come è il caso dell'uva da tavola. Per quest'ultima specie, infatti, molte delle varietà internazionali di nuova costituzione, ottenute tra parentali apireni, sono state prodotte mediante il processo dell'"embryo rescue" o salvataggio dell'embrione che prevede il recupero, dopo alcuni mesi dall'impollinazione, dell'embrione formato e il completamento del suo sviluppo su substrato agarizzato (Valdez J.G., 2005).

Ottenimento di piante aploidi. Al fine di ottenere piante con un corredo cromosomico aploide è possibile allevare *in vitro* cellule gametiche (polline ed ovuli); sono stati Guha e Maheshwari, nel 1964, a portare concretamente l'attenzione sulla possibilità di ottenere sperimentalmente piante aploidi con un lavoro sull' induzione *in vitro* di embrioni da antere di *Datura* (androgenesi). Da allora, le ricerche tendenti a mettere a punto metodi per la produzione di piante aploidi *in vitro* si sono moltiplicate, cosicchè oggi, soprattutto mediante coltura di antere, si ottengono piante aploidi in diverse specie sia erbacee (tabacco, asparago, peperone, patata, riso, grano, orzo, triticale) che arboree (pioppo, ippocastano, *Poncirus trifoliata*, vite, ecc.).

Per l'ottenimento di piante aploidi *in vitro* la tecnica utilizzata è relativamente semplice: le antere o il polline, previa sterilizzazione dei boccioli fiorali, vengono prelevate in ambiente sterile e coltivate su un apposito terreno di coltura, agarizzato o liquido e da questi, per embriogenesi ed organogenesi indiretta, si otterranno delle piantine aploidi. Le piante con corredo genetico aploide possono essere ottenute anche partendo dal gametofito femminile (ginogenesi) ma l'androgenesi, anche a causa del numero elevato di cellule aploidi con cui si opera, resta il metodo più efficiente.

Uno dei principali vantaggi delle piante aploidi consiste nel poter ottenere individui omozigoti a tutti i loci in modo relativamente semplice ed in tempi abbastanza brevi. La

condizione diploide viene ristabilita trattando gli individui aploidi con colchicina oppure può essere promossa dalla coltura *in vitro* stessa. Con l'uso di tecniche tradizionali, invece, ottenere piante omozigoti a tutti i loci comporterebbe l'effettuazione di vari cicli di autofecondazione che richiederebbero molti anni per le colture erbacee e che sarebbero difficilmente perseguibili per le piante arboree, caratterizzate da fasi giovanili molto lunghe.

Ibridazione somatica. Le cellule vegetali, a differenza di quelle animali, possiedono una parete cellulare all'interno della quale è contenuto il protoplasto. Nel 1960 Cocking dimostrò per la prima volta che si potevano isolare protoplasti da cellule vegetali, mediante la digestione enzimatica della parete cellulare. Da allora, la tecnica di isolamento dei protoplasti, la loro coltura *in vitro* e la successiva rigenerazione di piante, è stata messa a punto per diverse specie.

Due protoplasti, anche appartenenti a specie o generi diversi, possono essere fusi per dare origine ad un ibrido somatico, utilizzando metodi diversi. I più usati sono il trattamento con il PEG (glicole polietilenico) e l'elettrofusione. Questi trattamenti determinano un progressivo avvicinamento dei protoplasti le cui membrane cellulari vengono a contatto e si fondono. Per ottenere poi la rigenerazione della parete, i protoplasti vengono piastrati su substrato liquido o semisolido. I protoplasti originano così colonie cellulari in grado di formare callo dal quale, modificando la composizione del mezzo e le condizioni ambientali, si formeranno dei germogli.

La fusione somatica è stata applicata per ottenere ibridi somatici tra piante appartenenti a specie e/o generi incompatibili nelle quali l'ibridazione per via sessuata era estremamente difficile o impossibile.

Trasformazione genetica. Nel settore vegetale, per "trasformazione genetica" si intende l'integrazione stabile di un frammento di DNA "estraneo" nel genoma della cellula vegetale (Bains, 1993). Questa trasformazione può indurre nelle piante rigenerate, definite *transgeniche*, specifici cambiamenti fenotipici senza alterare ulteriori caratteri; il DNA introdotto viene detto *transgene*. La trasformazione richiede l'utilizzo di tecniche di ingegneria genetica, per l'isolamento dei geni di interesse, la loro clonazione in vettori di trasformazione (generalmente di origine plasmidica o virale) e l'utilizzo di tecniche di manipolazione *in vitro* che rendono possibile l'introduzione del gene isolato e la sua integrazione stabile nel genoma vegetale. L'obiettivo è ottenere un'intera pianta trasformata e

fertile che conservi i caratteri dell'individuo di partenza e presenti il carattere d'interesse espresso dal transgene.

Esistono diverse metodologie di trasformazione che possono essere raggruppate in due categorie principali:

- trasformazione indiretta: è mediata da un vettore il quale trasferisce il transgene nelle cellule vegetali; generalmente si usano due agrobatteri gram negativi responsabili delle malattie note come "tumore del colletto" e "sindrome delle radici aeree" e precisamente l' *Agrobacterium tumefaciens* e l' *A. rhizogenes*;
- trasformazione diretta: consiste nell'inserimento del transgene come DNA "nudo" nella cellula vegetale; le tecniche più usate sono il metodo biolistico (bombardamento delle cellule da trasformare con microproiettili ricoperti di DNA) e l'elettroporazione (formazione, attraverso impulsi elettrici, di aperture reversibili nella membrana cellulare per consentire l'ingresso del DNA).

Dagli espianti utilizzati per la trasformazione si otterranno, attraverso processi di embriogenesi od organogenesi, delle piantine complete. Tra i nuovi individui, quelli originatisi dalle cellule nelle quali il transgene è stato effettivamente integrato nel DNA, saranno in grado di esprimere il nuovo carattere in maniera stabile.

Conservazione del germoplasma. In un'ottica di conservazione delle risorse genetiche vegetali è di rilevante importanza la messa a punto di tecniche che consentano la conservazione di specie a propagazione vegetativa e di specie che presentano semi recalcitranti (cioè non conservabili a seguito di disidratazione).

Le colture *in vitro* offrono delle alternative ai tradizionali metodi di conservazione del germoplasma quali i campi collezione; è infatti possibile conservare il materiale vegetale di specie per le quali si dispone di un efficace sistema di micropropagazione *in vitro* su terreni di coltura artificiali attraverso l'utilizzo di varie tecniche: uso di substrati contenenti sostanze che rallentano la crescita dei tessuti, frigoconservazione e crioconservazione. Nel primo caso, l'aggiunta nel terreno di coltura, di particolari sostanze, come ad esempio il mannitolo, determina un rallentamento dello sviluppo dei tessuti vegetali con un conseguente allungamento degli intervalli di trasferimento su terreni freschi dei materiali conservati *in vitro*. Nel secondo caso, il rallentamento dei ritmi di crescita si ottiene conservando le colture *in vitro* a temperature comprese tra 0 e 10 °C. Le condizioni ottimali di frigoconservazione devono considerare le naturali capacità di resistenza al freddo della specie oggetto della

conservazione. La crioconservazione, invece, si basa sull'arresto delle funzioni metaboliche del materiale vegetale, attraverso l'esposizione a bassissime temperature, e consente quindi di conservare il materiale vegetale per lunghi periodi; in questo caso si fa ricorso all'uso dell'azoto liquido per conservare meristemi, cellule e tessuti che, pretrattati con sostanze crioprotettrici (dimetilsolfossido, glicole polietilenico, sorbitolo, glicerolo, ecc.), una volta riportati a temperatura ambiente possono originare nuovamente plantule complete attraverso la coltura *in vitro* (Engelmann, 1997).

Risanamento di piante da virus. Le colture *in vitro* possono essere utilmente sfruttate per ottenere materiale virus-esente. La tecnica consiste nel prelevare dalle piante virosate gli apici meristemati con i primi due abbozzi fogliari; tali espunti vengono allevati su substrato artificiale oppure vengono microinnestati su semenzali ottenuti *in vitro* (Murashige *et al.*, 1972). Attraverso l'espunto degli apici, si effettua di fatto una selezione, nella pianta malata, dei tessuti non raggiunti dal virus che, grazie alla loro caratteristica di totipotenza, ne rigenerano un'altra sana. Il risanamento può essere facilitato dall'uso di alcune pratiche come ad esempio l'aggiunta nei terreni di coltura di inibitori della moltiplicazione dei virus (ad esempio gli *interferoni*) oppure l'allevamento degli espunti a temperature relativamente elevate che ostacolano la replicazione virale (termoterapia). Quando si procede al risanamento è sempre necessario effettuare poi la verifica della sanità acquisita attraverso accertamenti diagnostici sperimentali (saggi biologici e sierologici).

Tra le diverse specie per le quali è stato ottenuto risanamento mediante la coltura di apici meristemati sono certamente da ricordare gli agrumi. Per tali specie, infatti, esiste un consolidato sistema per ottenere piante risanate da tutti patogeni trasmissibili per innesto e al tempo stesso non in fase giovanile. Infatti, la coltura di apici meristemati, ovvero la coltura di embrioni nucellari, tipici degli agrumi, che consentono di risanare le varietà porterebbero ad avere piante in fase giovanile per la valutazione delle quali sarebbero necessari diversi anni. Nel 1975, Navarro *et al.* misero a punto una tecnica denominata "shoot-tip grafting" (STG) che ha consentito nei diversi paesi agrumicoli del mondo non solo di risanare il materiale autoctono e di ottenere produzioni di migliore qualità, ma anche di controllare e verificare il materiale genetico introdotto dall'estero.

2.3. Applicazione delle colture *in vitro* in *Opuntia*

I lavori effettuati con tecniche di colture *in vitro* sul genere *Opuntia*, e sulle Cactaceae più in generale, non sono particolarmente numerosi. Fra tutti spicca quello di King che nel 1957 applicò la coltura di tessuti a più di mille specie appartenenti alla famiglia delle Cactaceae. Nel 1962 Steinhart applicò la propagazione *in vitro* col fine di produrre alcaloidi. Ancora Minoicha e Menhra nel 1974, applicarono la coltura *in vitro* per i loro studi sulla fisiologia e la morfologia vegetale; in particolare approfondirono gli aspetti nutrizionali e morfogenetici sulle colture di callo. Mauseth nel 1976 studiò l'effetto delle citochinine e dell'acido giberellico sui meristemi apicali di una cactacea. Da non sottovalutare sono gli studi mirati alla propagazione ottenuta con questa tecnica effettuati da Corona e Yanez nel 1984; Havel e Kolar nel 1983 pubblicarono un articolo riguardante l'isolamento dei microespanti dalle cactaceae; Mauseth nel 1977 analizzò le potenzialità del metodo e nel 1975, insieme ad Halperin, approfondì gli aspetti del controllo ormonale dell'organogenesi nelle cactaceae; Vyscot e Jara nel 1984 fecero uno studio sull'utilizzo delle gemme ascellari ai fini della propagazione clonale; Ault e Blackmon nel 1987 pubblicarono sulla propagazione *in vitro* del ferocactus; nel 1992 Infante scrisse della propagazione da gemme ascellari e dell'embriogenesi somatica. Gli studi effettuati da Escobar e collaboratori nel 1986 consentirono di mettere a punto un protocollo di micropropagazione su *Opuntia amyclaea* che permetteva di ottenere 2500 piante in 100 giorni partendo da un giovane cladodo di 5 cm. Questo altissimo livello di moltiplicazione è stato ottenuto grazie alle diverse concentrazioni di Benzyl Adenina (BA) applicate agli espanti portanti germogli differenziati. La BA svolge un'azione inibitrice sull'accrescimento dei germogli a favore della formazione di nuovi germogli. Inoltre i loro studi portarono alla conclusione che l'aggiunta di acido Indolbutirrico (IBA) e la diminuzione della concentrazione di sali, portano alla formazione di radici in 10 giorni piuttosto che in 2 o 3 settimane.

La coltura del ficodindia e la sua propagazione si sono avvalse, fino a tempi recenti, delle tecniche tradizionali. La sua notevole attitudine alla propagazione vegetativa ha favorito la diffusione di questo sistema lasciando ai genetisti lo studio della propagazione da semi. Seppure altamente efficiente ed economica, la propagazione vegetativa non garantisce gli standard qualitativi che oggi il mercato richiede. Le piante ottenute da seme, per contro, richiedono una lunga fase improduttiva per l'accrescimento giovanile, oltre che problemi derivanti dai naturali processi di segregazione. Così, alla necessità di disporre di materiale di

propagazione certificato e a quella dell'ottenimento di materiale di propagazione, soprattutto quando raro e nuovo, in breve tempo, si può far fronte grazie all'impiego della micropropagazione *in vitro*. Certamente la possibilità di rigenerare piante *in vitro* rappresenta una condizione indispensabile per poter sviluppare programmi di miglioramento genetico basati sull'adozione delle biotecnologie.

3. MARCATORI MOLECOLARI

Un settore di notevole interesse e grandi potenzialità, nell'ambito delle biotecnologie, è quello dell'analisi del genoma basata sulla rilevazione di marcatori molecolari; un settore in continua e rapida crescita al quale contribuiscono, da un lato, la disponibilità di strumentazioni sempre più affidabili e, dall'altro, la sempre maggiore conoscenza della struttura, dell'organizzazione e delle funzioni degli acidi nucleici.

Un marcatore molecolare può essere definito come un locus genomico, rilevabile con sonde o inneschi specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' (Barcaccia e Falcinelli, 2006). Essi generalmente non si riferiscono all'attività di specifici geni, ma si basano sulla rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA; tali differenze sono dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc.

I marcatori molecolari consentono quindi di identificare specifiche sequenze nucleotidiche e di analizzare polimorfismi, ovvero mutazioni, di particolari geni o regioni cromosomiche. Gli individui appartenenti ad una determinata specie si diversificano tra di loro per un numero più o meno elevato di caratteri (alleli) e ciò mette in condizione di poter rilevare i polimorfismi nelle regioni di DNA omologhe (loci). Dal punto di vista molecolare si possono classificare i polimorfismi in tre categorie:

- a) polimorfismi di sequenza, dovuti a differenze nelle sequenze fra basi;
- b) polimorfismi d'inserzione e delezione, causati da mutazioni puntiformi (inserzioni o delezioni di basi);
- c) polimorfismi del numero d'unità di ripetizione, conseguenze nel numero di ripetizioni di sequenze del DNA.

Tra le varie applicazioni dei marcatori molecolari negli studi di genetica e miglioramento genetico, vi è lo sviluppo di dettagliate mappe di associazione (*linkage maps*), le quali permettono la comparazione tra genomi di gruppi tassonomici diversi e la rivelazione di correlazioni e omologie genetiche. Anche il *fingerprinting* del DNA, termine che in italiano potrebbe essere assimilato all'impronta digitale genomica, per l'identificazione varietale e la selezione assistita hanno trovato largo impiego nel miglioramento genetico; esso è usato per evidenziare le differenze presenti nella sequenza di DNA tra due o più campioni a confronto, al fine di determinarne l'identità o accertarne le correlazioni esistenti

Interesse notevole sta suscitando l'uso dei marcatori molecolari nella "selezione assistita" (MAS, *Marker Assisted Selection*), cioè nella selezione precoce per il carattere d'interesse non più a livello del fenotipo bensì a livello del genotipo. La selezione per marcatori strettamente associati al gene da selezionare, relativamente più semplici da rilevare, può facilitare l'individuazione di caratteri di interesse e consente di eseguire uno screening direttamente sul DNA di piantine in fase precoce di sviluppo, senza aspettare la fase fenologica specifica in cui tale carattere si esprime, accelerando quindi i tempi e riducendo gli spazi necessari al lavoro di selezione.

I marcatori molecolari presentano numerosi vantaggi rispetto agli altri marcatori genetici:

- non subiscono interferenze dall'ambiente, trattandosi di differenze a livello di DNA;
- coprono qualsiasi parte del genoma, sia quella codificante che quella non codificante (introni e regioni di regolazione);
- non presentano effetti pleiotropici ed epistatici e in molti casi hanno espressione codominante, che è un requisito essenziale per discriminare la condizione di omozigosi da quella di eterozigosi;
- nella maggior parte dei casi i polimorfismi molecolari sono neutri: una variazione allelica nel *locus* marcatore, cioè, non ha altri effetti a livello fenotipico se non quello di permettere di determinare il genotipo.

Il numero di marcatori molecolari attualmente disponibili è molto elevato e in costante aumento, grazie alla continua messa a punto di strumentazioni e tecniche d'analisi sempre più affidabili. Le caratteristiche di un marcatore molecolare ideale sono:

- alto livello di polimorfismo;
- stabilità;
- estesa distribuzione nel genoma;
- semplicità di analisi;
- ridotti costi di applicazione;
- ereditabilità mendeliana;
- codominanza;
- riproducibilità entro e tra laboratori.

È difficile trovare un marcatore che soddisfi tutte queste caratteristiche; la scelta del marcatore va fatta "caso per caso" sulla base delle esigenze del progetto di ricerca e della

disponibilità del marcatore conosciuto per le specie prese in esame; sviluppare “ex-novo” marcatori in specie poco studiate comporta infatti notevoli costi e investimenti.

3.1. Classificazione dei marcatori molecolari

Una prima distinzione tra i marcatori molecolari può essere fatta considerando le tecniche utilizzate per la loro analisi: sono infatti disponibili tecniche basate sulla digestione enzimatica ed ibridazione di acidi nucleici e quelle basate sulla PCR (Polymerase Chain Reaction).

I **marcatori molecolari basati su restrizione e ibridazione** sono stati i primi ad essere utilizzati nell'analisi dei genomi vegetali. Sfruttano l'attività di endonucleasi di restrizione che vengono abbinate con il processo di ibridazione (SBH, *Southern blot hybridization*) messo a punto da Southern nel 1975. Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica in grado di legarsi a particolari sequenze di basi (siti di taglio) e di tagliare la molecola producendo frammenti di dimensioni variabili. Il cambiamento in questi siti anche di una sola base (mutazione puntiforme) o mutazioni tra due siti successivi (per delezione, traslocazione, inserzione o inversione) portano a variazioni nella lunghezza dei frammenti di restrizione generati dopo la digestione enzimatica. Il saggio di ibridazione richiede invece una sonda specifica, marcata radioattivamente o con fluorofori, che sia in grado di legarsi a una molecola di DNA a singola elica. La reazione di complementazione si osserva tramite l'emissione di luce rilevabile da un'autoradiografia o tramite fotometria (nel caso di sonde marcate con fluorofori). Se la temperatura e le condizioni di astringenza sono ottimali, la reazione di ibridazione è da considerarsi altamente specifica (Sambrook e Russel, 2001). Le principali tecniche di questa prima categoria di marcatori sono: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*).

I **marcatori molecolari basati sulla PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) sono stati sviluppati in seguito alla messa a punto, da parte di Mullis *et al.* (1986), della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR). Tale tecnica è un sistema di analisi molecolare basato sull'amplificazione *in vitro* di DNA situato tra due sequenze nucleotidiche, utilizzando una DNA polimerasi, stabile alle alte temperature (anche 95°C), estratta dal batterio *Thermus aquaticus*. Questo enzima, noto come Taq polimerasi, utilizza DNA a singola elica come stampo per la sintesi dell'elica complementare (in direzione 5'-3'). Per iniziare

l'amplificazione è necessario un frammento di DNA a singola catena (primer) omologo all'estremità 3' della catena nucleotidica da duplicare e che funziona come innesco della reazione. Tale metodo prevede l'utilizzo di un ciclizzatore termico (Thermal Cycler) cioè di uno strumento in grado di realizzare ripetuti cicli termici e schematicamente la reazione procede attraverso le fasi seguenti:

- all'inizio di ogni ciclo il DNA è soggetto a denaturazione mediante riscaldamento a 93-95°C: questa temperatura determina la rottura dei legami idrogeno tra le basi azotate con conseguente separazione dei filamenti della doppia elica;
- il miscuglio di reazione è successivamente sottoposto a raffreddamento fino ad una temperatura variabile tra 37-65°C in funzione della lunghezza degli inneschi che permette l'ibridazione di questi nei siti di DNA stampo aventi sequenze complementari;
- alla fine di ogni ciclo l'enzima DNA polimerasi, in presenza di deossiribonucleosidi trifosfato e alla temperatura di 72°C, catalizza la sintesi di un nuovo filamento di DNA, complementare a quello stampo, a partire dagli inneschi.

Dato che i prodotti di un ciclo di amplificazione servono da stampo per quello successivo, alla fine di ogni serie di reazioni viene duplicato l'ammontare di DNA sintetizzato e quindi il numero di copie aumenta in maniera esponenziale. In generale si ottengono da milioni ad alcuni miliardi di copie del segmento di DNA prescelto, ognuna lunga da qualche decina a qualche migliaio di coppie di basi. Tra le principali tecniche che appartengono a questa categoria troviamo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), I-SSR (*Inter-microsatelliti*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), S-SAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*).

Un'altra distinzione, non meno importante, può essere fatta in base al numero di loci analizzati durante la prova e distingue da i marcatori multi-locus e dai marcatori singolo-locus. I marcatori **multi-locus** si basano sull'analisi simultanea di molti loci genomici e implicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali mediante l'impiego di primer oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria (ad esempio: RAPD, I-SSR e AFLP). Si possono definire marcatori dominanti perché ad ogni locus si può osservare la presenza o l'assenza della banda ma non si può distinguere la situazione eterozigote da quella omozigote. I marcatori **singolo-locus** prevedono l'ibridazione e l'amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l'utilizzo di sonde o primer specifici per determinati loci genomici

(ad esempio: RFLP e SSR). I marcatori appartenenti a questa tipologia sono di tipo codominante poiché permettono di distinguere i loci omozigoti da quelli eterozigoti rappresentati rispettivamente da una sola banda (o l'uno o l'altro allele) o da 2 bande (entrambi gli alleli).

3.2. Principali tipologie di marcatori molecolari

3.2.1. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

I primi marcatori molecolari impiegati sono stati i *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP, polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione). Botstein ed i suoi collaboratori nel 1980 suggerirono che le variazioni nelle sequenze nucleotidiche, in grado di modificare il sito di taglio specifico delle endonucleasi di restrizione, fossero sufficientemente presenti nel genoma, in misura tale da poter essere utilizzati come marcatori nel mappaggio cromosomico. Queste variazioni portano all'ottenimento, in seguito alla digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione, di frammenti di restrizione di diverso peso molecolare tra gli individui analizzati che possono essere visualizzati mediante ibridazione con sonde specifiche marcate con sostanze radioattive o fluorescenti. Questi marcatori sono codominanti e danno risultati affidabili e riproducibili; tuttavia, gli elevati costi, l'utilizzo di sonde radioattive, la non facile automazione e la necessità di disporre DNA in grosse quantità e di buona qualità, ne hanno limitato gli usi (Law *et al.*, 1998).

3.2.2. *Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)*

I marcatori VNTR, acronimo che sta per *Variable Number of Tandem Repeats* (numero variabile di sequenze ripetute), sono comunemente noti come Minisatelliti. Questa tecnica si basa sull'analisi del DNA per l'individuazione di ripetizioni a tandem di una corta sequenza di DNA comprese tra due siti riconosciuti da enzimi di restrizione; il polimorfismo è dovuto all'elevato numero di volte che l'elemento può essere ripetuto nel genoma (Soller e Beekmann, 1983). La lunghezza del singolo elemento ripetuto è variabile e generalmente si tratta di unità oligonucleotidiche lunghe da 10 a 60 pb. La procedura è analoga a quella descritta precedentemente per gli RFLP. I minisatelliti, dopo digestione del DNA con enzimi di restrizione (taglio al di fuori del minisatellite), sono riconosciuti tramite ibridazione con sonde costituite da sequenze di elementi ripetuti. La variazione delle sequenze dei minisatelliti

fornisce un'impronta genetica stabile del DNA e specifica per ogni individuo (Deumling, 1981). La tecnica è abbastanza al pari degli RFLP (Bartolini e Petruccioli, 1994).

3.2.3. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

La seconda tecnica sviluppata, in ordine di tempo, nel campo dei marcatori molecolari è stata quella dei RAPD *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD, DNA polimorfico amplificato a caso) (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). Prevede l'impiego di un solo primer, un oligonucleotide decamerico con sequenza casuale, avente generalmente un contenuto di G+C superiore al 60% in modo da massimizzare la specificità di appaiamento e in grado di trovare molti siti di appaiamento essendo così breve. I prodotti di amplificazione sono generalmente separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e colorati con bromuro di etidio; in alcuni casi, per una migliore risoluzione elettroforetica, si impiega il gel di poliacrilammide in combinazione con una colorazione a base di nitrato d'argento.

I marcatori RAPD, hanno avuto un notevole sviluppo grazie alla facilità d'uso, alla rapidità e alla capacità di evidenziare un numero elevato di loci (2-10) per esperimento; tuttavia, il fatto di essere dominanti e la loro scarsa riproducibilità rappresentano dei grossi limiti che ne limitano l'uso a favore di nuove metodiche.

3.2.4. *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*

Una tecnica molto usata per generare marcatori molecolari è quella degli *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP, polimorfismo della lunghezza dei frammenti amplificati) messa a punto nel 1995 da Vos e colleghi. Questa tecnica combina la possibilità di ottenere frammenti di restrizione del DNA e di amplificarli tramite la PCR. Rispetto ad altre, la tecnica AFLP si presenta più impegnativa, tuttavia l'utilizzo di kit disponibili per le varie fasi del protocollo l'ha resa più accessibile (Karp *et al.*, 1997). Le principali fasi sono cinque:

- a) taglio del DNA con due differenti enzimi di restrizione di cui uno riconosce una sequenza di 6 nucleotidi (*EcoRI*) e l'altro una di 4 (*MseI*);
- b) ligazione di adattatori ai frammenti di restrizione;
- c) pre-amplificazione mediante due primer, complementari alle sequenze dei siti di restrizione e degli adattatori, ed aventi una base selettiva;
- d) amplificazione selettiva con 2 primer complementari ai siti di restrizione e agli adattatori ma con 3 basi selettive;

e) visualizzazione delle bande (separazione su gel di acrilamide) o dei picchi (separazione tramite elettroforesi capillare) polimorfici.

Generalmente ad ogni esperimento si genera un numero di frammenti compreso tra 50 e 100. La ricerca della variabilità con questo tipo di marcatori viene condotta saggiando combinazioni diverse di enzimi di restrizione e di primer. La variabilità rilevabile dipende da diversi fattori: mutazioni a carico dei siti di taglio riconosciuti dagli enzimi di restrizione, mutazioni nei punti in cui agiscono le basi selettive e variazioni della lunghezza del frammento amplificato. Generalmente poche combinazioni di primer sono sufficienti per poter generare un numero adeguato di marcatori polimorfici e, al contrario dei RAPD per i quali vengono utilizzati molti primer che molto spesso non danno risultati riproducibili, gli AFLP offrono buone garanzie di riproduzione dei risultati (Jones *et al.*, 1997).

Sebbene gli AFLP posseggano una serie di caratteristiche di pregio come l'elevato polimorfismo, la riproducibilità, la possibilità di utilizzo senza la conoscenza a priori del genoma studiato, essi presentano anche una serie di limiti. In primo luogo sono dei marcatori dominanti, quindi meno informativi degli RLFP o degli SSR. Talvolta alcuni frammenti si possono considerare codominanti sulla base della loro intensità che viene correlata con il numero di copie alleliche ad un determinato *locus* (Meudt e Clarke, 2007) mediante l'impiego di specifici software. Un'altro problema è dato dalla possibile co-migrazione di frammenti non omologhi che porta ad una sottostima del grado di diversità esistente tra i genotipi analizzati. È stato dimostrato che questo fenomeno è inversamente correlato all'ampiezza dei frammenti amplificati (Vekemans *et al.*, 2002), per cui evitare l'analisi di piccoli frammenti riduce la possibilità di errore.

Una delle peculiarità degli AFLP è data dal fatto che è possibile analizzare contemporaneamente molte regioni differenti di DNA distribuite in modo casuale nel genoma. Per questo trovano diverse applicazioni in studi di identificazione varietale o per verificare il livello di similarità tra diversi individui e tra popolazioni, oltre che per studiare le linee evolutive o l'individuazione di marcatori legati al sesso (Tracey *et al.*, 2004).

3.2.5. *Simple Sequence Repeats (SSR)*

I marcatori *Simple Sequence Repeats* (SSR, sequenze ripetute semplici), detti anche microsatelliti, rappresentano una recente tipologia di marcatori molecolari. Questi si basano sulla presenza nel genoma di sequenze di lunghezza variabile costituite da ripetizioni in serie di mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ed esa-nucleotidi; il numero di queste ripetizioni è

estremamente variabile e ciò rende gli SSR dei marcatori altamente polimorfici. Il loro utilizzo prevede la conoscenza del genoma oggetto di studio, i primer vengono infatti disegnati nelle zone fiancheggianti il microsatellite; tali zone sono altamente conservate all'interno di una specie e tra specie affini, ciò significa che è possibile costruire dei primer comuni per tutti gli individui di una specie e capaci di amplificare le zone microsatelliti dei singoli individui. Il loro funzionamento prevede l'amplificazione delle regioni ripetute. Si otterranno così delle sequenze che non differiscono per il motivo di base ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto. In base ai diversi pesi molecolari dei microsatelliti, mediante elettroforesi, è possibile visualizzare le differenze tra i genotipi studiati (Powell *et al.*, 1996). Si distinguono microsatelliti genici e genomici, a seconda che le sequenze ripetute siano presenti in regioni codificanti o meno.

Gli SSR sono da due decenni i marcatori maggiormente utilizzati per studi di caratterizzazione varietale in molte specie frutticole (Wunsch e Hormaza, 2002), per la costruzione di mappe di *linkage*, per lo studio di caratteri quantitativi (Dondini *et al.*, 2004) e per studi di genetica delle popolazioni (Stoeckel *et al.*, 2006), grazie alla loro affidabilità e all'elevato livello di informazioni fornite. Inoltre, i microsatelliti, sono semplici da utilizzare e forniscono informazioni migliori e più specifiche rispetto a marcatori casuali come RAPD o AFLP, ma il loro sviluppo richiede un lavoro preliminare di identificazione dei microsatelliti e delle regioni fiancheggianti. L'identificazione dei microsatelliti genomici avviene tramite la costruzione di specifiche librerie genomiche ad inserti corti arricchite per sequenze specifiche di microsatelliti (Powell *et al.*, 1996), mentre quelli genici possono essere identificati con più facilità tramite ricerche in database di sequenze geniche EST (*Expressed Sequence Tags*) (Varshney *et al.*, 2005). Nel caso di specie vegetali importanti (riso, soia, vite, agrumi, ecc.), le migliaia di sequenze EST depositate permettono l'identificazione di microsatelliti ed il *primer design* a costi praticamente nulli. Nel caso di specie minori è invece necessario costruire librerie geniche e sequenziare i cloni della libreria per identificare i microsatelliti.

Negli ultimi anni i microsatelliti genici, anche denominati EST-SSR, sono stati isolati da numerose specie frutticole e forestali (Rungis *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006) e utilizzati per la costruzione di mappe geniche (Chen *et al.*, 2008), per studi di diversità genetica (Bouck e Vision, 2007) e per il *fingerprinting* (Xie *et al.*, 2006). La presenza di microsatelliti in regioni espresse indica un loro possibile ruolo nella regolazione dell'espressione genica. È stato ipotizzato che la presenza di ripetizioni nelle regioni 3'UTR e 5'UTR (*UnTranslated Regions*) delle sequenze geniche possa causare errori nella

trascrizione e silenziamento, mentre SSR nelle regioni trascritte (ORF – *Open Reading Frame*) possono inattivare geni. Uno studio su larga scala dei microsatelliti genici in *Arabidopsis*, orzo e mais ha dimostrato una maggiore presenza di SSR nelle regioni UTR rispetto alle ORF (Morgante *et al.*, 2002).

I microsatelliti genici hanno delle caratteristiche peculiari rispetto a quelli genomici, generalmente sono più corti essendo le regioni codificanti più conservate rispetto a quelle non codificanti; gli EST-SSR inoltre presentano un maggior grado di trasferibilità e applicazione su diverse specie o generi affini (Varshney *et al.*, 2005). In numerosi studi i microsatelliti genici sono risultati però meno polimorfici rispetto a quelli genomici, visto che in generale le sequenze trascritte sono molto conservate. Tuttavia, uno studio su asparago, basato su un limitato numero di loci, ha permesso di discriminare 35 cultivar aventi un pool genetico molto ristretto (Caruso *et al.*, 2008).

3.2.6. *Inter-microsatelliti (I-SSR)*

I marcatori *Inter-Simple Sequence Repeat* (I-SSR), noti più semplicemente come Inter-microsatelliti, vengono rilevati utilizzando inneschi oligonucleotidici disegnati in modo tale che, unitamente alla ripetizione di monomeri molto semplici con due, tre o quattro nucleotidi come unità di base, presentino anche basi selettive all'estremità 3' oppure 5'. In questo modo, mediante PCR vengono amplificate le regioni comprese fra due microsatelliti adiacenti (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Tuttavia, è necessario specificare che soltanto con primer ancorati in 5' è possibile amplificare interamente anche i due microsatelliti che delimitano il marcatore. Nel caso di primer ancorati in 3' il tratto amplificato comprende soltanto la regione interna terminale dei due microsatelliti. I polimorfismi dipendono dalla lunghezza del tratto di DNA compreso tra due regioni microsatelliti aventi lo stesso motivo ripetuto, dal numero di ripetizioni presenti nei singoli microsatelliti e dalle sequenze delle regioni fiancheggianti i siti di attacco dei primer. Oltre al vantaggio di essere riproducibili, rapidi e poco costosi, l'elevata variabilità delle regioni di DNA inter-microsatellite rende tali marcatori particolarmente efficaci nella caratterizzazione genomica. Uno degli svantaggi più evidenti risiede nella natura dominante di tali marcatori che non consentono di distinguere la situazione allelica ad un dato locus.

3.2.7. *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*

La classe di marcatori *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP, polimorfismo di singoli nucleotidi) permette di identificare polimorfismi riconducibili a differenze di singoli nucleotidi dovute a sostituzioni, inserzioni o delezioni. La rilevazione di tali marcatori prevede la disponibilità di primer oligonucleotidici che fiancheggiano una particolare regione cromosomica, nella quale sussistono polimorfismi dovuti a singoli nucleotidi.

A differenza di tutte le altre tipologie di marcatori molecolari PCR-derivati, i polimorfismi SNP non sono visualizzati mediante separazione elettroforetica dei prodotti amplificati ma attraverso il loro sequenziamento. La tecnica quindi prevede l'amplificazione tramite PCR del DNA genomico, il sequenziamento dei prodotti di amplificazione ottenuti e l'allineamento delle sequenze in modo da mettere in evidenza le differenze.

La natura codominante rende i marcatori SNP particolarmente appropriati per la costruzione di mappe geniche e per il mappaggio di QLT (Quantitative Trait Locus). Al momento sono ancora in corso di valutazione le potenzialità applicative di questi marcatori per la tipizzazione di genotipi, ai fini del loro impiego nella selezione assistita e nell'identificazione di germoplasma (Barcaccia e Falcinelli, 2006)

3.2.8. *Sequence-Specific Amplification Polymorphism (S-SAP)*

La tecnica *Sequence-Specific Amplification Polymorphism* (S-SAP, polimorfismo di amplificazione di sequenze specifiche), sviluppata da Waugh ed i suoi collaboratori nel 1997, deriva dalla tecnica AFLP. È stata messa a punto per analizzare delle particolari sequenze di DNA mobili, i retrotrasposoni, e permette di analizzare la variabilità connessa alla loro posizione nel genoma e quella dovuta alle regioni fiancheggianti i siti di inserzione.

I retrotrasposoni rappresentano la classe più comune di elementi genetici mobili. Sono caratterizzati dalla capacità di muoversi nel genoma attraverso un intermedio di RNA che viene convertito in DNA prima della reinserzione. I retrotrasposoni presentano alle estremità due sequenze dirette ripetute, lunghe poche centinaia di basi, che costituiscono le *Long Terminal Repeats* (LTR, lunghe ripetizioni terminali).

I passaggi iniziali per la rilevazione dei polimorfismi a carico di queste regioni sono uguali a quelli utilizzati per gli AFLP. L'amplificazione selettiva è invece realizzata impiegando un primer AFLP (ad esempio *MseI*) in combinazione con un primer omologo ad un tratto della regione terminale LTR, altamente conservata, del retrotrasposone.

Una parte dei polimorfismi rilevabili con questa tecnica deriva da variazioni a carico dei siti di restrizione o delle sequenze ad essi fiancheggianti dove discriminano le basi selettive dei primer AFLP; altri polimorfismi possono essere dati da variazioni a carico della sequenza nella regione 5' in corrispondenza delle LTR o da modificazioni riconducibili a duplicazioni inserzionali a carico del retrotrasposone.

I vantaggi e gli svantaggi di questa tecnica sono analoghi a quelli degli AFLP. Questa classe di marcatori è molto utile in analisi filogenetiche al fine di ricavare informazioni sull'evoluzione del genoma di una specie.

3.3. Utilizzo di marcatori molecolari in ficodindia e nelle specie affini

Il concetto tassonomico del ficodindia è alquanto incerto. A volte viene descritto come tassonomicamente distinto da altre specie coltivate, come *O. megacantha*, *O. streptacantha* e *O. amyclaea* (Britton e Rose, 1963; Scheinvar, 1995; Reyes-Aguero *et al.*, 2005). In altri casi (Gibson e Nobel, 1986; Pimienta-Barrios, 1994; Felker *et al.*, 2005), questi genotipi spinoscenti coltivati sono stati classificati come *O. ficus indica*. In realtà, la presenza di spine nei cladodi è un elemento inadeguato per discriminare il ficodindia dalle altre specie affini (Chessa e Nieddu, 1997; Kiesling, 1998; Felker *et al.*, 2005). All'interno del genere, infatti, i principali caratteri morfologici come l'habitus vegetativo, la presenza di spine, il numero di spine per areola, e la quantità di areole, può variare notevolmente a seconda dell'ambiente pedoclimatico in cui le piante crescono (Rebman e Pinkava, 2001).

Oggi, le cultivar commerciali di ficodindia sono ottaploidi (Felker *et al.*, 2006) ma la loro ascendenza non è nota. Inoltre, diversi autori riportano che è difficile assegnare in modo corretto i genotipi coltivati ad un taxon definito (Kiesling, 1998; Felker *et al.*, 2006; Mondragon-Jacobo, 2001; Labra *et al.*, 2003). La continua variazione morfologica all'interno del genere, la mancanza di descrittori chiari per ogni specie, e la relativa facilità di ibridazione incrociata, con la presenza di individui con caratteristiche intermedie, hanno portato ad una erronea designazione della specie. A seguito di queste errate assegnazioni, le stesse varietà sono spesso classificate come appartenenti a specie diverse, e in altri casi sono considerate ibridi tra parentali sconosciuti. Per superare questi problemi, i marcatori molecolari, che sono riproducibili e stabili, possono essere strumenti utili per contribuire a svelare le incertezze nella classificazione che non possono essere risolte tramite la caratterizzazione morfologica.

Negli ultimi due decenni, pochi studi sono stati effettuati per caratterizzare le collezioni di germoplasma esistenti utilizzando marcatori molecolari casuali (Wang *et al.*, 1998; Mondragon-Jacobo, 2003; Zoghiami *et al.*, 2007; Luna-Paez *et al.*, 2007; García-Zambrano *et al.*, 2009; Souto Alves *et al.*, 2009). Due importanti studi (Labra *et al.*, 2003; Griffith, 2004) hanno sfruttato diversi strumenti molecolari per chiarire gli aspetti tassonomici del genere, in particolare l'origine di *O. ficus indica*. Labra e collaboratori nel 2003 hanno usato i marcatori AFLP per verificare la mancanza di differenziazione genetica tra il ficodindia ed alcune popolazioni di *O. megacantha* ed hanno suggerito che *O. ficus indica* dovrebbe essere considerata una forma addomesticata di *O. megacantha*. D'altra parte, Griffith (2004) considera il ficodindia come una specie costituita da un gruppo di diversi cloni selezionati per il loro basso numero di spine ed i loro frutti carnosì e che sono stati ottenuti da diversi parentali, molto probabilmente provenienti da varie specie di *Opuntia* originarie del Messico centrale e meridionale. La maggior parte di queste analisi basate sull'uso di marcatori molecolari hanno rivelato discrepanze tra la caratterizzazione molecolare e la classificazione tassonomica classica. Recentemente, altre ambiguità nella classificazione tassonomica delle specie di *Opuntia* sono emerse in un studio che ha utilizzato marcatori microsatelliti per cercare di discriminare due varietà botaniche di *Opuntia echios*, morfologicamente distinte (*echios* e *gigantea*), native delle isole Galapagos (Helsen *et al.*, 2009). Ancora una volta, gli autori hanno evidenziato che l'attuale distinzione tassonomica tra questi taxa non è supportata da dati molecolari. Sebbene questi studi abbiano chiarito alcuni aspetti tassonomici del genere e siano stati utili per il *fingerprinting* delle cultivar, c'è ancora una mancanza di conoscenza circa il livello di diversità genetica tra i genotipi coltivati più diffusi in tutto il mondo e la diversità tra cultivar, genotipi selvatici e specie affini di *O. ficus indica*.

OBIETTIVI

Negli ultimi decenni, la disponibilità di conoscenze approfondite nei settori delle colture *in vitro* e delle biotecnologie molecolari ha reso possibile la messa a punto e l'adozione di numerose tecniche innovative. Tali tecniche, insieme a metodi tradizionali, possono essere applicate con successo al miglioramento genetico delle piante coltivate. La propagazione *in vitro*, le tecniche innovative di miglioramento genetico e l'utilizzo di marcatori molecolari per la selezione assistita e per la caratterizzazione varietale, sono sempre più utilizzate per le specie arboree più importanti, ma è fuori di dubbio che anche le specie frutticole di importanza minore possano trarre vantaggio dalla loro applicazione. Tra le specie che potrebbero beneficiare in maniera consistente dell'applicazione di tali tecniche vi è certamente il ficodindia, una specie che nella nostra isola ha trovato ottime condizioni pedoclimatiche tanto da aver colonizzato numerosi ambienti e da divenirne uno dei principali simboli. Nonostante l'ampia diffusione il ficodindia in Sicilia è però caratterizzato da un patrimonio varietale molto ristretto, rappresentato quasi esclusivamente dalle cultivar 'Bianca', 'Gialla' e 'Rossa' e dalle loro varianti "trunzare", così definite per una maggiore croccantezza della polpa.

L'obiettivo che ci si è posti nel corso del triennio del Dottorato di Ricerca è stato quello di gettare le basi per l'ampliamento della ristretta base genetica del ficodindia servendosi di tecniche tradizionali di miglioramento genetico associate a metodologie quali la micropropagazione e l'utilizzo di marcatori molecolari. Il lavoro è stato articolato in tre differenti linee di ricerca.

Una prima linea ha previsto la realizzazione di impollinazioni incrociate tra le cultivar 'Bianca' e 'Rossa' di *Opuntia ficus indica* e tra 'Bianca' ed *Opuntia amyclaea*. L'obiettivo di tale ricerca è stato quello di ottenere ibridi con migliori caratteristiche tra le quali, auspicabilmente, una maggior presenza di semi abortiti, una migliore resistenza alle manipolazioni post-raccolta, per la varietà 'Bianca', e la diminuzione dell'alternanza produttiva che caratterizza la cultivar 'Rossa'.

Una seconda linea di ricerca è stata finalizzata al reperimento di germoplasma alloctono, proveniente da diverse aree del mondo, che è stato introdotto, insieme ad accessioni autoctone, in un apposito campo collezione realizzato presso l'Azienda Sperimentale dell'Università Catania. Onde procedere ad una univoca identificazione, tale materiale è stato caratterizzato con marcatori molecolari. Ciò ha permesso fra l'altro di comprendere il livello

di variabilità genetica esistente tra le principali cultivar coltivate nel mondo, le accessioni spontanee e le specie affini al ficodindia.

Infine, per far fronte alla necessità di dover moltiplicare in elevate quantità ed in modo rapido il germoplasma introdotto dall'estero ed i genotipi ottenuti in seguito ai programmi di incrocio, un'altra linea di ricerca è stata indirizzata alla definizione di un protocollo di propagazione *in vitro* che permettesse di ottenere cloni con patrimonio genetico identico alla pianta madre (*true to type*).

MATERIALI E METODI

1. COSTITUZIONE DI IBRIDI INTRA- ED INTERSPECIFICI

1.1. Impollinazione incrociata

Al fine di ottenere nuova variabilità e quindi di allargare il patrimonio varietale, nel mese di luglio del 2009, presso un'azienda commerciale sita nel territorio di Biancavilla (CT) sono stati realizzati degli incroci intraspecifici tra le varietà siciliane 'Bianca' e 'Rossa' ed incroci interspecifici tra la cultivar 'Bianca' e *Opuntia amyclaea* var. *leucosarca*. Per l'ottenimento di tali incroci è stato seguito il protocollo descritto da Mondragon-Jacobo *et al.* (1996). Nello specifico 25 fiori della varietà 'Bianca', utilizzata come genitore femminile, sono stati demasculati in fase di pre-antesi (Figura 4a); si è ricorso all'uso di piccole forbici per l'eliminazione dei sepalì e degli stami (Figura 4b), facendo attenzione a non danneggiare il pistillo. I fiori poi sono stati sciacquati con acqua per eliminare residui di antere e polline. Una volta demasculati, i fiori sono stati coperti con dei sacchetti di carta (Figura 4d) per qualche giorno affinché lo stigma potesse maturare senza che vi giungesse polline indesiderato. Contemporaneamente sono stati raccolti i fiori delle piante da utilizzare come parentale maschile (varietà 'Rossa' e *Opuntia amyclaea* var. *leucosarca*); gli stami ricavati sono stati conservati in un luogo fresco ed ombreggiato per favorire la maturazione del polline. Trascorsi 4 giorni dalla demascolazione, gli stigmi dei fiori demasculati sono stati impollinati, per mezzo di un pennellino, con il polline raccolto in precedenza (Figura 4e). 10 fiori sono stati impollinati con polline di 'Rossa' e 15 con polline di *O. amyclaea*; di questi ultimi, 5 sono stati utilizzati per le analisi istologiche. Subito dopo l'impollinazione, i fiori sono stati nuovamente coperti con sacchetti di carta per qualche giorno per impedire la deposizione sullo stigma di polline indesiderato prima che fosse avvenuta la fecondazione.

1.2. Analisi istologica

Con il fine di verificare l'effettiva compatibilità tra la varietà 'Bianca' ed *Opuntia amyclaea* var. *leucosarca*, dopo l'impollinazione controllata è stata effettuata un'analisi istologica del processo di fecondazione. Per realizzare tale analisi 48, ore dopo

l'impollinazione, tempo necessario affinché il polline possa germinare ed i tubetti pollinici possano raggiungere la base dello stilo (Reyes-Aguero *et al.*, 2006), sono stati prelevati i pistilli (Figura 5) da 5 fiori e sono stati conservati in FAA (90 ml etanolo 70%, 5 ml formalina, 5 ml acido acetico glaciale) a 4°C fino al momento delle osservazioni *in vivo*.

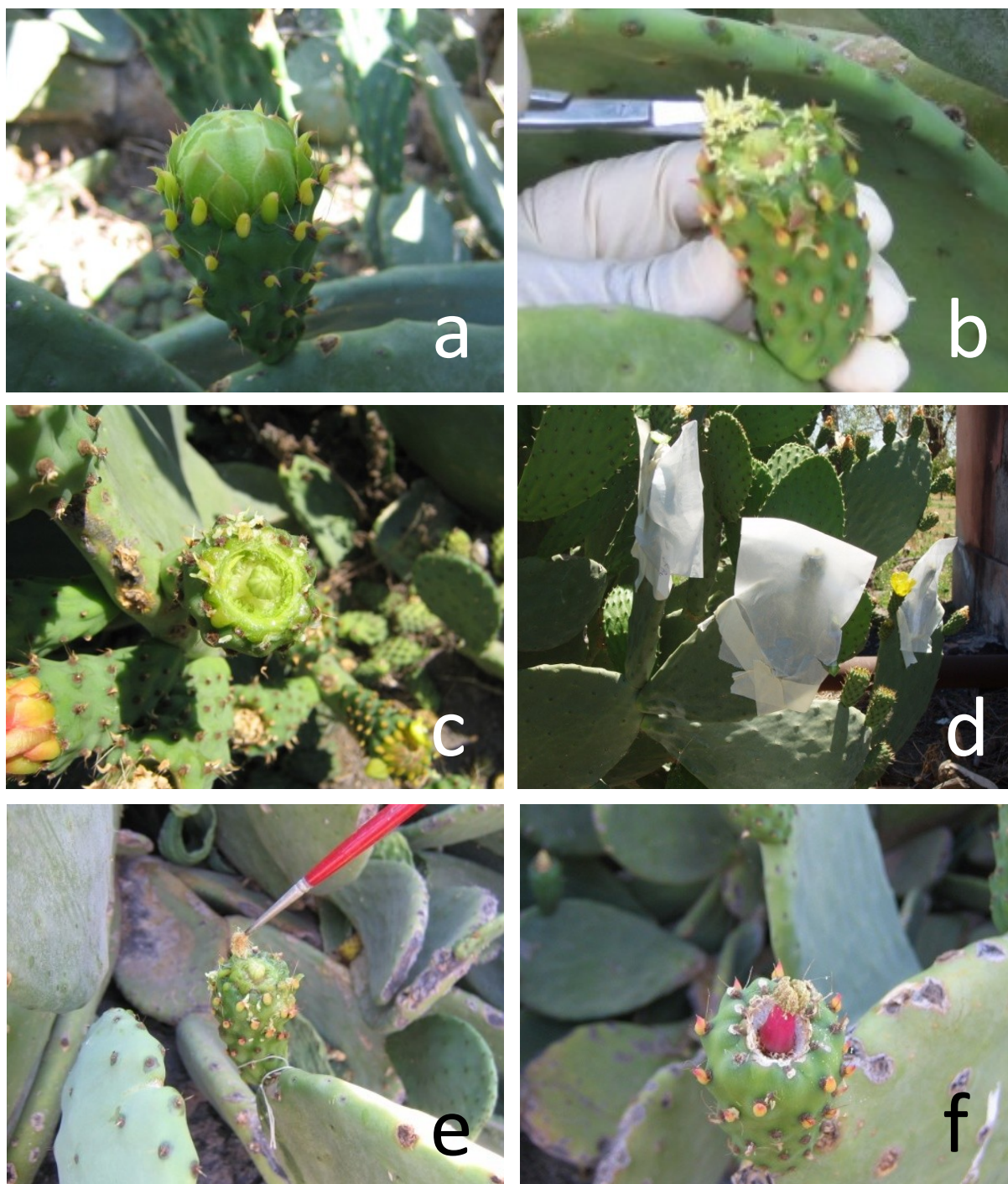


Figura 4. a) fiore in fase di pre-antesi; b) demascolazione con l'utilizzo di forbici; c) fiore demascolato; d) fiori demascolati coperti con sacchetti in attesa dell'impollinazione; e) impollinazione con l'utilizzo di un pennellino; f) fiore impollinato



Figura 5. Pistilli di ficodindia della varietà 'Bianca' destinati all'analisi istologica

Tali campioni sono stati sottoposti a tre lavaggi di un'ora con acqua distillata e quindi ammorbiditi per immersione in solfito di sodio (Na_2SO_3) che è stato portato ad ebollizione per pochi secondi. Successivamente i pistilli sono stati privati dell'ovario e la restante parte, ovvero stigma e stilo, è stata tagliata longitudinalmente ottenendo 3 o 4 sezioni (a seconda delle dimensioni del pistillo). Queste, poste su di un vetrino con alcune gocce di blu di anilina (0,1% in 0.1 N PO_4K_3), sono state pressate con il copri-vetrino in modo da schiacciarne i tessuti aumentando così la superficie visibile. Le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio a fluorescenza (Leica DM 2500, Leica Microsystems GmbH, Germania). È stata verificata l'attività di germinazione dei granuli pollinici e l'allungamento dei tubetti pollinici fino alla base dello stilo.

1.3. Estrazione e germinazione dei semi

Dei 20 fiori sottoposti ad impollinazione controllata, e destinati all'ottenimento dei frutti, 17 hanno completato regolarmente il ciclo di fruttificazione. I semi sono stati estratti da frutti sani e completamente maturi; questi sono stati sbucciati e posti in un frullatore che a bassa velocità e per pochi secondi ne ha permesso lo spappolamento senza provocare danni ai semi. I semi estratti (Figura 6) sono stati sciacquati più volte per eliminare ogni traccia di polpa e successivamente posti ad asciugare in forno per 2-3 ore ad una temperatura di 55-60 °C (Mondragon-Jacobo *et al.*, 1996) (Figura 7).

I semi di ficodindia presentano delle notevoli difficoltà di germinazione dovute al fatto che presentano tre tegumenti, il più interno dei quali avvolge completamente l'ovulo (Eames, 1961), mentre il più esterno è fortemente lignificato ed impedisce la fuoriuscita della radichetta (Werker, 1997). Per superare tali ostacoli vari studi, tra i quali quello di Altare *et al.* del 2006, hanno individuato e saggiato diversi metodi di scarificazione specifici per i semi di ficodindia.



Figura 6. Semi appena estratti dalla polpa

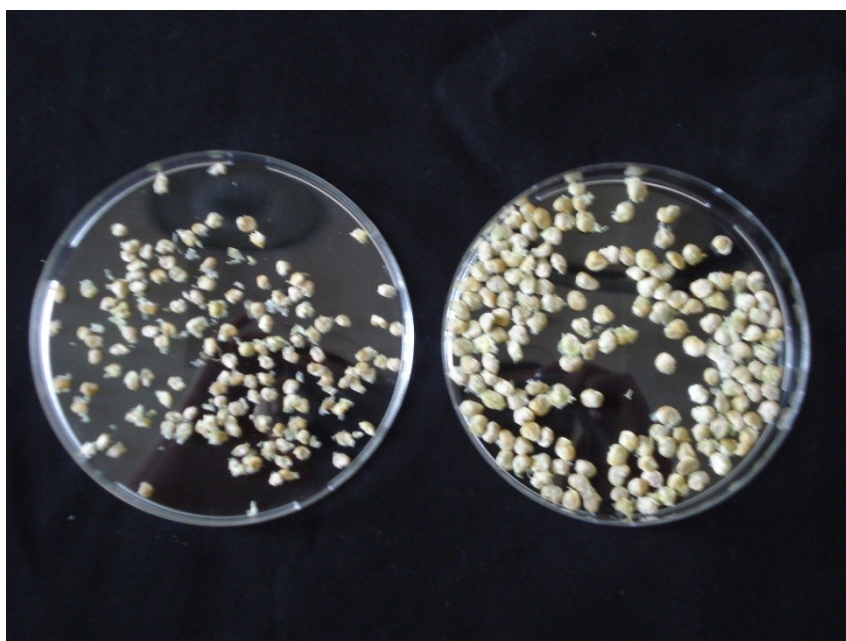


Figura 7. Semi lavati, asciugati e divisi in abortivi (a sinistra) e normali (a destra)

Per favorire la germinazione dei semi, dopo una serie di prove preliminari in cui è stato impiegato acido solforico (H_2SO_4) a diverse concentrazioni (5%, 15%, 30%) e che non sono andate a buon fine a causa della necrosi dei semi trattati, è stato utilizzato un protocollo basato sull'utilizzo di perossido di idrogeno (H_2O_2) descritto da Altare *et al.* (2006). I semi sono stati sterilizzati attraverso un'immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio ($NaClO$) al 7% e sciacquati 3 volte con acqua distillata sterile, successivamente sono stati posti in piastre Petri contenenti uno strato di cotone imbibito con perossido di idrogeno al 3.5% (Figura 8). Per ogni combinazione di incrocio sono stati utilizzati 200 semi suddivisi in 10 piastre Petri; queste sono state poste per 30 giorni in camera di crescita ad una temperatura di 25 °C ed un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

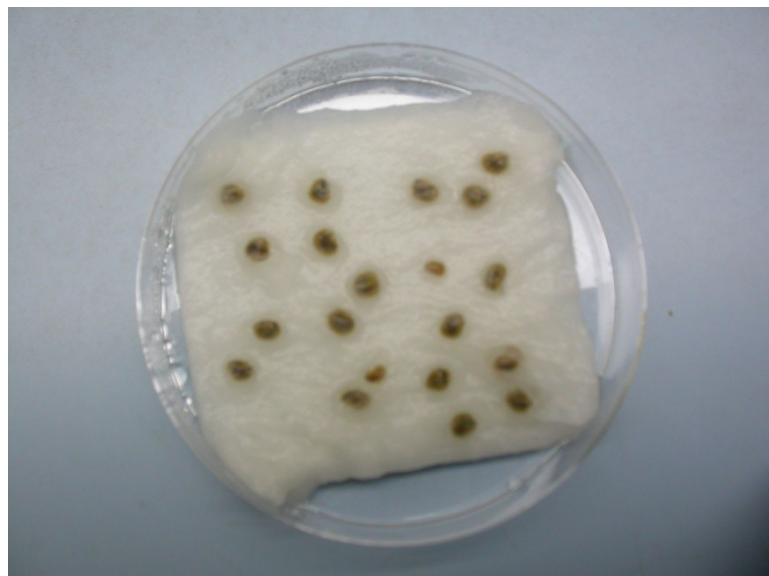


Figura 8. Semi di ficodindia posti su cotone imbibito con perossido di idrogeno

1.4. Accrescimento, acclimatazione e messa a dimora delle piantine

Subito dopo la germinazione, le piccole piantine ottenute sono state trasferite su panetti di torba (Figura 9), previamente sterilizzati in autoclave a 120°C per 20 minuti, e poste in camera climatica all'interno di contenitori chiusi al fine di mantenerle in condizioni di sterilità ed a livelli di umidità relativa prossimi alla saturazione. Appena le piantine hanno raggiunto una dimensione di circa 10 cm di altezza ed un apparato radicale abbastanza sviluppato è stato eseguito il trapianto, con il panetto di torba, in vasetti di 15 cm di diametro

contenenti terriccio, costituito da torba e terra in parti uguali. Le piante sono state quindi lasciate acclimatare per circa un mese in camera climatica. L'acclimatazione è stata eseguita coprendo la piante con dei sacchetti di plastica sui quali, via via, sono state realizzate delle aperture in modo da esporre gradualmente le piante a condizioni di umidità relativa decrescenti. Terminata la fase di acclimatazione (Figura 10), della durata di circa un mese, le piantine sono state trasferite in serra. Trascorsi circa 6 mesi, i semenzali sono stati trapiantati in vasi di maggiori dimensioni in attesa della messa a dimora in un apposito campo dell'Azienda Sperimentale di Agraria dell'Università di Catania che è stata eseguita nel mese di Aprile del 2011.



Figura 9. Piantine ottenute dalla germinazione dei semi e trasferite in panetti di torba



Figura 10. Semenzali di 'Bianca' x 'Rossa' acclimatati

2. REPERIMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI GERMOPLASMA DI *OPUNTIA*

2.1. Reperimento di germoplasma autoctono ed alloctono e costituzione di un campo collezione

Sessantadue genotipi (Tabella 1) appartenenti a 16 specie di *Opuntia* (Tabella 2) sono stati reperiti in diverse aree geografiche ed introdotti in un campo collezione della Facoltà di Agraria di Catania. Le accessioni recuperate sono rappresentate da varietà coltivate in diverse Paesi (Italia, Messico, Argentina, Sudafrica, ecc.), genotipi selvatici, e specie affini.

Un primo gruppo di accessioni, comprendente le tre varietà coltivate siciliane e le rispettive varianti “trunzare”, è stato reperito in diverse aree della nostra regione. Un altro gruppo, fornito dal Dr. Mondragon-Jacobo (Università di Queretario, Messico), è costituito dalle varietà messicane più diffuse, classificate con diversi binomi o genericamente come *Opuntia* sp. (Pimienta-Barrios, 1994; Mondragon-Jacobo e Perez-Gonzalez, 1996; Fernandez-Montes *et al.*, 2000), e da piante di origine sconosciuta. Il terzo ed ultimo gruppo di genotipi, fornito dal Dr. Yaron Sitrit, è costituito da varietà di *Opuntia ficus indica* provenienti da diversi paesi (Kenya, Sud Africa, Stati Uniti e Messico), da ibridi artificiali e specie affini al ficodindia appartenenti ad una collezione di germoplasma dell’Hebrew University of Jerusalem (Rehovot, Israele).

Il materiale vegetale reperito, spesso costituito da un solo cladodo, è stato inizialmente posto a dimora in vasi contenenti un substrato costituito da torba e terra in parti uguali ed è stato mantenuto in serra. Una volta che le piante hanno raggiunto uno sviluppo adeguato, cioè prodotto almeno 3 o 4 cladodi completamente sviluppati, sono state trasferite nell’Azienda Sperimentale della Facoltà di Agraria. Il campo collezione è stato realizzato disponendo le piante con un sesto d’impianto 3x2 m.

Tabella 1. Lista delle accessioni di *Opuntia* reperite ed introdotte nel campo collezione

Genotipo	Classificazione tassonomica	Reperimento*	Spinescenza
1251	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Texas	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
<i>O. megacantha</i>	<i>O. megacantha</i>	Israele	Bassa
Niagra	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Castillo	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Gymno carpo	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Skinners court	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Hybrid	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Japie	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Kenya1	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
Kenya2	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
<i>O. streptacantha</i>	<i>O. streptacantha</i>	Israele	Assente
Jerico	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
<i>O. joconostle</i>	<i>O. joconostle</i>	Israele	Media
93-034	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Bassa
93-037	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
<i>O. vulgaris</i>	<i>O. vulgaris</i>	Israele	Assente
93-042	<i>O. ficus indica</i>	Israele	Assente
<i>O. subulata</i>	<i>O. subulata</i> (sin. <i>Austrocylindropuntia subulata</i>)	Israele	Assente
<i>O. spinulifera</i>	<i>O. spinulifera</i>	Israele	Assente
<i>O. oligacantha</i>	<i>O. oligacantha</i>	Israele	Elevata
<i>O. elizondoana</i> 29	<i>O. elizondoana</i>	Israele	Elevata
<i>O. leucotricha</i>	<i>O. leucotricha</i>	Israele	Media
<i>O. elizondoana</i> 31	<i>O. elizondoana</i>	Israele	Media
<i>O. cochenillifera</i>	<i>O. cochenillifera</i> (sin. <i>Nopalea cochenillifera</i>)	Israele	Bassa
<i>O. quimilo'</i>	<i>O. quimilo'</i>	Israele	Bassa
<i>O. amiclea</i> mexican	<i>O. amyclaea</i>	Israele	Bassa
Fusicaulis	<i>O. fusicaulis</i>	Israele	Assente
Reyna (sin. Alfajayucan)	<i>Opuntia</i> sp.; <i>O. albicarpa</i> ; <i>O. amyclaea</i>	Messico	Elevata
R6	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Media
Cristalina	<i>Opuntia</i> sp. ^a ; <i>O. albicarpa</i> ; <i>O. megacantha</i>	Messico	Media
Amarilla	<i>O. ficus indica</i> ; <i>O. streptacantha</i> ; <i>O. megacantha</i>	Messico	Media
2.03.01	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Media
Naranjona (sin. Pico chulo)	<i>O. megacantha</i>	Messico	Media
Rosalito (sin. Roja lisa, Roja pelona)	<i>O. ficus indica</i>	Messico	Assente
Burrona	<i>Opuntia</i> sp. ^a ; <i>O. albicarpa</i>	Messico	Elevata
Copadeoro	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Media
Apastillada	<i>O. streptacantha</i> ; <i>Opuntia</i> sp.	Messico	Bassa
AV	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Elevata
ARL	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Assente
Roja CNF	<i>O. ficus indica</i>	Messico	Assente

Tabella 1. Segue

Genotipo	Classificazione tassonomica	Reperimento*	Spinescenza
Centenario (sin. Amarilla montesa o Amarilla huesuda)	<i>O. megacantha</i>	Messico	Media
2.10.58	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Media
Liria	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Media
Fafajuco (sin. Blanca de san jose, Blanca de castilla)	<i>Opuntia</i> sp. ^a ; <i>O. megacantha</i>	Messico	Media
24	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Elevata
Amarilla grande	<i>Opuntia</i> sp.	Messico	Assente
Rossa trunzara1	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Bianca trunzara1	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
<i>O. amyclaea</i> 23	<i>O. amyclaea</i>	Italia	Media
Inerme	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Linosa	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Militello	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
<i>O. amyclaea</i> 27	<i>O. amyclaea</i>	Italia	Assente
Cuore	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Bianca sorba	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Bianca trunzara2	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Gialla trunzara	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Gialla	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Rossa	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
Rossa trunzara2	<i>O. ficus indica</i>	Italia	Assente
<i>O. robusta</i>	<i>O. robusta</i>	Italia	Assente

^a Considerata un ibrido tra *O. ficus indica* e *O. streptacantha* (Pimienta-Barrios, 1994)

* Il reperimento si riferisce al luogo in cui i genotipi sono stati reperiti e non al loro luogo di origine

Tabella 2. Elenco delle specie a cui appartengono i genotipi collezionati

Specie	Origine e distribuzione*	Livello di ploidia[#]
<i>O. ficus indica</i> (L.) Mill.	Mexico, USA, Mediterranean, Australia, South Africa, South America	8X ^{a, b}
<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck	Mexico	6X ^f / 8X ^{a, c}
<i>O. streptacantha</i> Lemaire	Mexico	2X ^f / 8X ^{d a}
<i>O. albicarpa</i> Scheinvar	Mexico	8X ^a
<i>O. joconostle</i> F.A.C. Weber ex Diguet	Mexico	8X ^a
<i>O. vulgaris</i> Mill.	-	2X ^b / 3X ^b / 6X ^f
<i>O. robusta</i> Wendland	Mexico	2X ^e / 4X ^a / 8X ^a
<i>O. spinulifera</i> Salm-Dyck	Mexico	4X ^a / 6X ^f
<i>O. oligacantha</i> Forster	Mexico	6X ^a
<i>O. elizondoana</i> E. Sánchez et Villaseñor	Mexico	4X ^a
<i>O. leucotricha</i> DC.	Mexico	4X ^b
<i>O. cochenillifera</i> Mill. (<i>sin. Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dick)	Mexico	2X ^b
<i>O. quimilo'</i> Schum.	Northern Argentina and Bolivia	2X ^f
<i>O. amyclaea</i> Tenore	Unclear, described as cultivated	8X ^c
<i>O. fusicaulis</i> Griff.	Unclear, described as cultivated	-
<i>O. subulata</i> (Muehl.) Engelm.	Peru, Argentina, Bolivia	6X ^b

* Le informazioni sull'origine e la distribuzione sono state tratte da Britton e Rose (1963) e Anderson (2001)

[#] Le informazioni relative al livello di ploidia sono state tratte da: ^a Segura *et al.* (2007); ^b Fedorov (1969); ^c Goldblatt e Johnson (1990); ^d Goldblatt e Johnson (2006); ^e Goldblatt (1981); ^f Moore (1977)

2.2. Caratterizzazione con marcatori microsatelliti

2.2.1. *Materiale vegetale*

I sessantadue genotipi introdotti nel campo collezione, sono stati utilizzati per un'analisi della diversità genetica attraverso marcatori microsatelliti. Inoltre, 20 semenzali ottenuti dall'incrocio tra 'Bianca' ed *O. amyclaea* (vedi Materiali e Metodi, capitolo 1) sono stati genotipizzati per favorire l'identificazione degli alleli.

2.2.2. *Estrazione del DNA*

Il DNA è stato isolato utilizzando il metodo di estrazione basato sull'impiego del tampone CTAB. Nello specifico il protocollo di estrazione prevede i seguenti passaggi:

- porre 0,1 g di tessuto vegetale in un tubo eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 350 µl di tampone CTAB, pestare il campione con un pestello di plastica fino a quando non si ottiene la completa disgregazione dei tessuti ed incubare a 65 °C per circa 1 ora;
- aggiungere 150 µl di Cloroformio, vortexare per 10 secondi e centrifugare a 5000 rpm per 10 minuti;
- trasferire il supernatante ottenuto in un nuovo tubo da 1,5 ml, aggiungere 500 µl di etanolo al 96%, mescolare leggermente per inversione e lasciare incubare per 10 minuti;
- centrifugare per 10 minuti a 10000 rpm ed eliminare l'etanolo facendo attenzione a non perdere il pellet presente nel fondo del tubo;
- aggiungere 1 ml di etanolo al 70%, mescolare per inversione e centrifugare come nel punto precedente;
- eliminare l'etanolo e sciogliere il pellet con H₂O.

La quantità e la qualità del DNA estratto è stata determinata tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific).

2.2.3. *Analisi SSR*

Per l'analisi molecolare sono stati utilizzati 19 microsatelliti specifici per *Opuntia* (Tabella 3), 16 dei quali isolati dalla specie *Opuntia echios* da Helsen *et al.* (2007); gli altri 3 sono stati ottenuti analizzando una serie di 122 Expressed Sequence Tags (accession number da EX720493 a EX720614) depositate nel database dbEST, utilizzando il software Msatfinder (Thurston e Field, 2005) per la ricerca di sequenze contenenti microsatelliti di 20 o più basi.

Tabella 3. Elenco dei 19 marcatori SSR testati

Marcatore	Ripetizione	Sequenza primer	Accessin number
Opuntia6	(TC) ₁₄ (CA) ₁₀ (CT) ₅	F: ATCTCATTGTATCATCTATTTTCCTG R: AGCACAAAGACACTTCATCG	DQ914853
Opuntia2	(AG) ₁₄ (CG) ₄	F: CACATACGCAAATACATGG R: GCTTCATTTTCCAGGTTACT	DQ914848
Opuntia4	(GA) ₁₂	F: GATGATTCCGCCATTCACC R: CGTCGATCTGACTCACACC	DQ914850
Opuntia14	(TA) ₁₇ (GA) ₁₃	F: TCAGGATTCAAGAAGATTTGC R: CGATTCAATTGATGATGGGC	DQ914860
Opuntia11	(CT) ₁₃ TT(CT) ₂	F: CCTACACCTGCTGCCAATC R: CGAGACAAACATCAGAGGAG	DQ914857
Opuntia13	(AG) ₁₂	F: CCAAATACCCAGCCCATAC R: CGAGAACCTAACTCCGATG	DQ914859
Opuntia15	(TC) ₁₀	F: GCGGTGGAAGCAGTTAGG R: TCAGTCGATCATACCCAAGG	DQ914861
Opuntia8	(CT) ₅ (TC) ₁₂ GC(TC) ₅	F: ACCGCCATCACCAGCTATC R: CTCACCCACAATTCCAAACC	DQ914854
Opuntia12	(TC) ₄ C(TC) ₁₂	F: TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC R: GGTATCTTGTTATTCTGTTTCG	DQ914858
Opuntia9	(AG) ₁₅	F: CTAGGCTTCATCCCACATTAGG R: TCCAAATTCACCTCCTCTGC	DQ914855
Opuntia16	(GA) ₈	F: GTCAATCCCGAGCAATTTAGG R: CTCATTAGTGAGGCCCAACG	DQ914862
Opuntia21	(TC) ₁₄	F: AAAGGGAAGACCTTGCTCTC R: TCTATTCTCAGCCCTCCTCTC	DQ914852
Opuntia10	(CT) ₉	F: ACCAACATCAAACCTTCAATACC R: CATGCTTCATCTTGTTCAATTGG	DQ914856
Opuntia3	(AG) ₁₉	F: GTGAGTGCCAGATGAAACT R: TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG	DQ914849
Opuntia1	(CT) ₁₃ (AC) ₃	F: CCATCTACTTCCCACCTTTCG R: CTCCTGTGTTTCTCTGTGCTC	DQ914847
Opuntia5	(TAC) ₅	F: TATGCACAAAGCACCATGC R: CCAACCATACCAACTGTACTGAC	DQ914851
Ops.24	(CT) ₂₄	F: TCCTTCCATTTCCACCACAC R: CAAGACCCCTCATTCCAAAG	EX720605
Ops.19	(TGA) ₉	F: AACTGCCTCACACGAGTTCC R: GCTACGAAATCTGCCGAGTC	EX720594
Ops.14	(GA) ₁₄	F: AGAGGCAGCAAGTGGTGAAC R: ACTCAAGGGCGTAGAAGCTG	EX720574

Tre sequenze contenenti SSR (Accession number: EX720574, EX720594 e EX720605) sono stati identificate. Le coppie di primer EST-SSR sono state progettate tramite l'uso del software Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Tutte i primer impiegati sono stati sintetizzati dalla Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germania); il primer forward di ogni coppia è stato marcato con l'aggiunta di una coda M13F (Oetting *et al.*, 1995). Le 19 coppie di primer SSR sono state testate su 6 genotipi appartenenti a diverse specie (*O. robusta*, *O. subulata*, *O. fusicaulis*, *O. streptacanta*, *O. quimilò* ed *O. ficus indica*) al fine di scartare quelle non idonee per l'analisi e di stabilire al contempo le migliori condizioni di PCR per quelle che invece sarebbero state impiegate. Nello specifico, per ogni coppia di primer, sono state effettuate delle amplificazioni di DNA a diverse temperature di annealing (53 o 55 °C) e con un diverso numero di cicli (35-40); ogni prova è stata condotta con due repliche al fine di verificare la riproducibilità del risultato. Per la caratterizzazione molecolare sono stati utilizzati soltanto i loci SSR che non hanno dato problemi di amplificazione e che hanno permesso di ottenere dei profili elettroforetici di chiara interpretazione. L'interpretazione dei polimorfismi di tali loci è stata favorita dall'analisi dei profili di segregazione di 20 semenzali ottenuti dall'incrocio tra 'Bianca' ed *O. amyclaea* (Figura 11).

Il DNA è stato amplificato su termociclatori GeneAmp 9700 e 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) utilizzando i seguenti parametri: denaturazione a 95 °C per 12 minuti, 35-40 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, annealing a 53-55 °C per 1 minuto, estensione a 72 °C per 1,5 minuti, ed un estensione finale di 30 minuti a 72 °C. La miscela di reazione per l'amplificazione comprendeva: i due primer specifici (0,3 mM), un primer marcato con M13F (0,13 mM), circa 50 ng di DNA, 0,2 mM dNTPs, 1X PCR buffer II, 2 mM di cloruro di magnesio, 1 unità di DNA polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) e 8,5 µl di H₂O per un volume totale di 15 µl.

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato con il sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). 0,5-2 µl di prodotto di PCR (a seconda delle prestazioni di amplificazione di ciascuna coppia di primer) sono stati miscelati con 13,5 µl di Formamide e 0,5 µl di LIZ-500 size standard (Applied Biosystems), denaturati a 95 °C per 5 minuti e subito dopo trasferiti in ghiaccio per un paio di minuti in modo da consentire un immediato raffreddamento della miscela. Successivamente i tubi contenenti il DNA amplificato sono stati posti all'interno del sequenziatore. Dopo l'elettroforesi capillare i dati in uscita dal sequenziatore sono stati convertiti dal software GENESCAN 3.1.2. in elettroferogrammi, permettendo così una comparazione tra i profili dei diversi campioni.

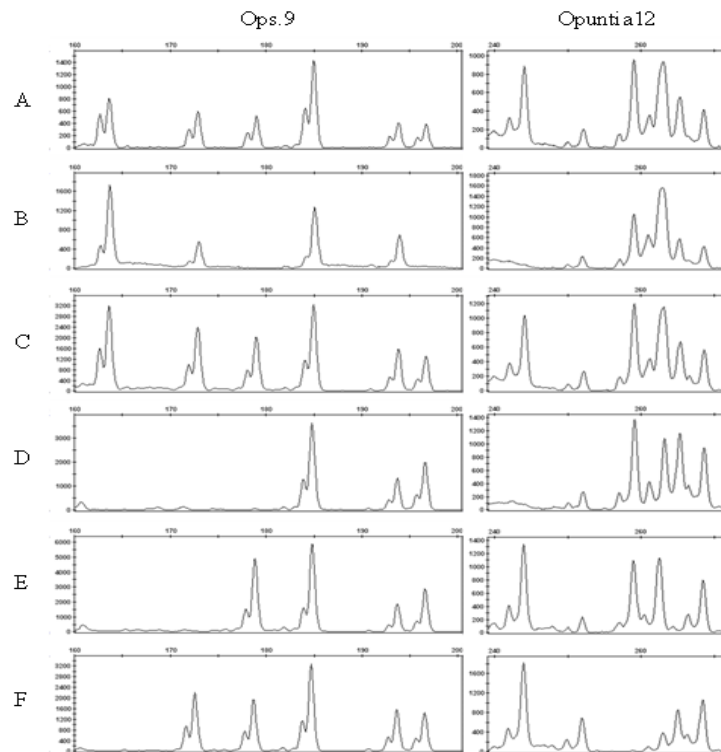


Figura 11. Segregazione di due loci SSR in alcuni ibridi di ‘Bianca’ x *O. amyclaea*. A) parentale femminile (‘Bianca’); B) parentale maschile (*O. amyclaea*); C) individuo apomittico, con un pattern allelico identico al genitore femminile; D, E, F) piante zigotiche

2.2.4. *Analisi dei polimorfismi*

Per l’analisi statistica, i picchi SSR visualizzati in seguito ad elettroforesi capillare su sequenziatore sono stati considerati come marcatori dominanti; questa strategia, pur riducendo l’informazione generata da ogni coppia di primer, rappresenta il miglior modo per poter elaborare i dati relativi a genotipi altamente poliploidi, con un livello di ploidia incerto ed appartenenti a specie diverse.

A partire dagli alleli individuati è stata costruita una matrice binaria basata sulla presenza o l’assenza di ogni singolo picco. Il software PowerMarker Versione 3.25 (Liu e Muse, 2005) è stato utilizzato per generare, a partire dalla matrice binaria, dapprima una matrice delle distanze, utilizzando il coefficiente *shared alleles*, e poi per costruire un albero filogenetico utilizzando l’algoritmo *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987); questa tipologia di analisi è stata già impiegata da altri autori per la valutazione genetica di collezioni di germoplasma (Dangl *et al.*, 2001; Barkley *et al.*, 2006). Per la costruzione dell’albero, è stata considerata come outgroup la specie *Opuntia subulata* (Figura 12), spesso definita *Austrocylindropuntia subulata* (Muehlenpfordt) Backeberg. Questa specie presenta delle

caratteristiche morfologiche molto particolari ed assai distinte dal ficodindia: possiede articolazioni cilindriche lunghe fino a 50-60 cm con rilievi longitudinali mammillari ai cui apice si trovano delle areole sprovviste di glochidi e dalle quali partono foglioline cilindriche carnose e 2-3 spine robuste.



Figura 12. *Opuntia subulata*, utilizzata come outgroup per l'analisi Neighbor-joining

Per verificare il grado di correttezza delle ramificazioni dell'albero filogenetico ottenuto, è stata eseguita un'analisi *bootstrap* con 1.000 repliche mediante il software PAUP versione 4.0b10 (Swofford, 1998). Il software ricampiona i dati di input mischiando l'ordine di alcune colonne ed effettuando delle duplicazioni/delezioni in modo da ottenere un gran numero di alberi che vengono confrontati con quello originale. Alla fine della procedura di *bootstrapping* si ottengono dei valori relativi ad ogni ramificazione che indicano in quale percentuale tale ramificazione è presente nelle repliche ottenute.

Il programma PowerMarker è stato utilizzato anche per la determinazione, per ogni coppia di primer, del *Polymorphism Information Content* (PIC), valore che indica il livello di polimorfismo di un dato marcatore e quindi il suo contenuto di informazione.

Per rendere ancora più chiara la rappresentazione grafica della diversità genetica presente all'interno della collezione, la matrice delle distanze è stata utilizzata per eseguire un'analisi con il metodo *NeighborNet* (Bryant e Moulton, 2004); nello specifico, il software SplitsTree versione 4.11.3 (Huson e Bryant, 2006) è stato impiegato per la costruzione di un

particolare albero filogenetico detto *network*. I *network* sono ricostruzioni filogenetiche che risultano particolarmente adatte per rappresentare processi evolutivi in cui i vari taxa non si siano sempre e solo separati gli uni dagli altri ma si siano anche mescolati tra loro; questo può succedere nel caso di ricombinazione genica o di flusso genico tra popolazioni. Queste interazioni vengono rappresentate negli alberi da reticoli più o meno complessi, riuscendo così ad esprimere una quantità maggiore d'informazione.

Per superare i limiti degli alberi filogenetici, dovuti alla presenza di ibridi intra- ed interspecifici, e per valutare la struttura genetica del germoplasma caratterizzato, è stata condotta un'analisi di inferenza Bayesiana utilizzando il software Structure versione 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Il programma è in grado di ripartire gli individui (X) di un campione in popolazioni (K), offrendo inoltre la possibilità di stimare il numero di popolazioni più probabile e la probabilità di ogni singolo individuo di appartenere a ciascuna di esse. Il numero di raggruppamenti (K) più probabile è stato dedotto dal calcolo della probabilità a posteriori di K [$\Pr(X | K)$] come suggerito da Pritchard *et al.* (2000). Poiché i genotipi analizzati sono probabilmente il risultato di una ibridazione naturale ed artificiale, è stata calcolata la probabilità a posteriori per valori di K compresi tra 1 e 14.

3. PROPAGAZIONE *IN VITRO* E VERIFICA DELLA *TRUE TO TYPE*NESS CON MARCATORI AFLP

3.1. Micropropagazione

La tecnica di micropropagazione è stata applicata per l'ottenimento di cloni a partire dalle 3 cultivar siciliane ('Bianca', 'Gialla' e 'Rossa') e da *Opuntia amyclaea*. Per tale lavoro è stato seguito il protocollo descritto da Estrada-Luna *et al.* (2008). Il materiale vegetale utilizzato, rappresentato da giovani cladodi, è stato trattato per 5 minuti con etanolo al 70% e successivamente immerso per 30 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio (NaOCl) al 6 % addizionata di Tween20 (0.1%); infine i cladodi sono stati sciacquati 3 volte con acqua distillata sterile per eliminare ogni traccia di ipoclorito di sodio. I cladodi sterilizzati sono stati tagliati in piccole porzioni di circa 1 cm di lato contenenti ciascuna una o due areole (Figura 13). Gli espianti sono stati posti su substrato di coltura MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato di saccarosio (50g/l), 6-benzilaminopurina (BAP) (2,5 mg/l) ed agar (7 g/l), e con pH corretto ad un valore di 5.7. La fase di induzione, della durata di 6 settimane, è stata eseguita mantenendo gli espianti in camera climatica ad una temperatura di 25 °C, un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio ed un'intensità luminosa di 3000 *lux*.

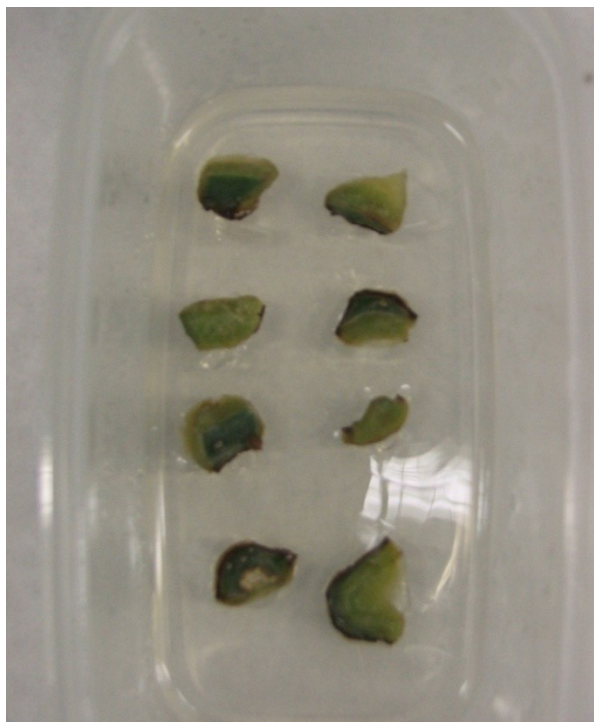


Figura 13. Porzioni di cladodo della varietà 'Gialla' poste su substrato di induzione

I germogli ottenuti dopo la fase di induzione (Figura 14) sono stati separati dall'espianto e posti su substrato di coltura fresco della medesima composizione per la fase di moltiplicazione della durata anch'essa di 6 settimane e condotta alle stesse condizioni di temperatura e fotoperiodo della fase precedente. Dopo la moltiplicazione (Figura 15) i germogli sono stati trasferiti singolarmente su un terreno di coltura MS addizionato di solo saccarosio (50 g/l) per la fase di radicazione. Dopo circa 4 settimane le piantine, complete di apparato radicale, sono state trapiantate in vasetti contenenti torba e terra dopo aver eliminato ogni traccia di terreno di coltura dalle radici. I vasi sono stati posti dapprima in camera climatica, per consentire una graduale acclimatazione delle piantine, e successivamente trasferiti in serra.



Figura 14. Germogli della varietà 'Rossa' ottenuti dopo la fase di induzione

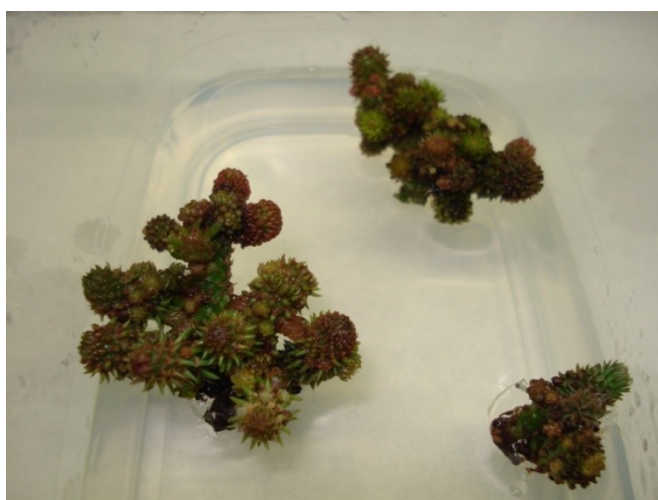


Figura 15. Germogli della varietà 'Rossa' in fase di moltiplicazione

3.2. Analisi con AFLP delle piante micropropagate

A causa della possibile insorgenza di nuova variabilità che può verificarsi in seguito a mutazioni indotte dalle colture *in vitro* (Larkin e Scowcroft, 1981), un'analisi con marcatori AFLP è stata condotta sulle piante ottenute attraverso la tecnica di micropropagazione.

L'obiettivo dell'analisi è stata quello di verificare la bontà del protocollo utilizzato per l'ottenimento di piante *true to type*, cioè identiche alla pianta madre.

3.2.1. Estrazione del DNA

Il DNA è stato isolato utilizzando il kit di estrazione ISOLATE Plant DNA Mini Kit (Bioline, Londra, UK). Tale metodo di estrazione si basa sulla proprietà che hanno gli acidi nucleici di legarsi ad una matrice silicea in presenza di sali caotropici, composti organici che possiedono la capacità di rompere i legami idrofobici o idrogeno di acidi nucleici e proteine e conseguentemente denaturarli. Dopo avere lavato la matrice silicea, gli acidi nucleici vengono eluiti in tamponi a basso contenuto di sali e sono pronti per le successive reazioni (clonaggio, digestione con enzimi di restrizione, blotting, sequenziamento manuale ed automatico, amplificazione, ecc.). Nello specifico il protocollo di estrazione prevede i seguenti passaggi:

- porre 0,1 g di tessuto vegetale in un tubo eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 400 µl di Lysis Buffer PD, pestare il campione con un pestello di plastica fino a quando non si ottiene la completa disgregazione dei tessuti ed incubare a 65 °C per circa 30 minuti;
- aggiungere 100 µl di Precipitation Buffer, vortexare per 5 secondi, incubare in ghiaccio per 5 minuti e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti;
- trasferire il supernatante ottenuto nella Spin Column PD1 posizionata all'interno di un tubo da 2 ml e centrifugare a 12000 rpm per 1 minuto;
- eliminare la Spin Column PD1, aggiungere al filtrato un quantitativo di Binding Buffer PD pari alla metà del volume del filtrato stesso, mescolare accuratamente pipettando più volte, porre il tutto nella Spin Column PD2 e centrifugare a 12000 rpm per 2 minuti;
- posizionare la Spin Column PD2 in un nuovo tubo, aggiungere 700 µl di Wash Buffer PD e centrifugare a 12000 rpm per 1 minuto;
- eliminare il filtrato, fare un altro lavaggio e centrifugare a 12 rpm per 2 minuti;

- porre la Spin Column PD2 in un nuovo tubo da 1,5 ml, versare 100 µl di elution buffer direttamente sulla membrana filtrante, lasciare incubare per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto ad 8000 rpm per eluire il DNA.

La quantità e la qualità del DNA estratto sono state determinate tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific).

3.2.2. *Reazione di restrizione - ligazione*

La restrizione del DNA e la ligazione degli adattatori ai frammenti sono state condotte in un'unica reazione e sono state precedute dalla preparazione della *enzyme master mix* e dell'*annealing* degli adattatori. L'*enzyme master mix* è stata preparata utilizzando per ciascun campione 0,06 µl di enzima *EcoRI*, 0,03 µl di enzima *MseI*, 0,05 µl di T4 DNA ligasi, 0,1 µl di T4 DNA ligasi buffer con ATP 10X, 0,1 µl di NaCl (0,5 M), 0,05 µl di BSA (Bovine Serum Albumin) e 0,6 µl di H₂O distillata sterile. Per l'*annealing* degli adattatori, due tubi eppendorf, contenenti un'aliquota sufficiente di *EcoRI* adaptor ed *MseI* adaptor, sono stati posti in un bagno termostatico alla temperatura di 95 °C per 5 minuti; successivamente sono stati trasferiti in un recipiente contenente acqua calda e mantenuti al suo interno fin quando l'acqua non ha raggiunto la temperatura ambiente. Le sequenze degli adattatori sono riportate di seguito:

- adattatore *EcoRI*: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
- adattatore *MseI*: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

La reazione di restrizione/ligazione è avvenuta incubando a 37 °C per 2 ore 500 ng di DNA genomico con i seguenti reagenti: 1 µl di T4 DNA ligasi buffer con ATP 10X, 1 µl di NaCl (0,5 M), 0,05 µl di BSA, 1 µl di adattatore *EcoRI*, 1 µl di adattatore *MseI* e 1 µl di *enzyme master mix*. Dopo l'incubazione la miscela è stata diluita con 189 µl di TE_{0,1} (Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.0).

3.2.3. *Amplificazione pre-selettiva*

Il DNA ligato e diluito (1:20), è stato pre-amplificato in una reazione con volume finale di 21 µl contenente 5 µl di DNA ligato e diluito 1:10, 2,1 µl di buffer PCR 10X, 0,2 µl di

DNA polimerasi BioTaq (Bioline), 2 µl di dNTPs (µM), 0,7 µl di MgCl₂, 1 µl di AFLP preamplification primer (10 µM) e 10 µl di H₂O. I primer di pre-amplificazione presentano una singola base selettiva all'estremità 3' e riconoscono le estremità generate nella precedente reazione di ligazione; è stata sempre usata come base la A per il primer EcoRI e la C per il primer MseI. I parametri utilizzati per l'amplificazione preselettiva sono stati i seguenti: uno step a 94 °C per 2 minuti, seguito da 20 cicli a 94 °C per 30 secondi, 56 °C per 30 secondi e 72 °C per 2 minuti, e da una estensione finale a 60°C per 30 minuti. Una parte del prodotto di amplificazione è stata fatta correre su gel di agarosio per verificarne l'effettiva amplificazione; la restante parte (10 µl) è stata diluita con 190 µl di TE_{0.1} e conservata a 4 °C.

3.2.4. Amplificazione selettiva

Per l'amplificazione selettiva, sono stati miscelati: 2.1 µl di buffer PCR 10X, 0,2 µl di DNA polimerasi BioTaq (Bioline), 2 µl di dNTPs (µM), 0,7 µl di MgCl₂, 10 µl di H₂O, 1 µl di primer *EcoRI* (marcato con marcatore fluorescente) a 3 basi selettive, 1 µl di primer *MseRI* anch'esso a 3 basi selettive e 5 µl di prodotto della pre-amplificazione diluito 1:10 per un volume totale di 22 µl. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando i parametri elencati di seguito:

- denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti;
- 10 cicli *touch down*: 94 °C per 20 secondi, 66-57 °C per 30 secondi (decremento di 1°C della temperatura di annealing ad ogni ciclo di amplificazione), 72 °C per 2 minuti;
- 20 cicli: 94 °C per 20 secondi, 56 °C per 30 secondi, 72 °C per 2 minuti;
- estensione finale a 60 °C per 30 minuti.

Per l'analisi dei somacloni sono state utilizzate 15 combinazioni di primer:

- 5 marcate con FAM: E-AGC/M-CAA, E-AGC/M-CAC, E-AGC/M-CAG, E-AGC/M-CCT, E-AGC/M-CTG;
- 5 marcate con NED: E-ACC/M-CAA, E-ACC/M-CAC, E-ACC/M-CAG, E-ACC/M-CCT, E-ACC/M-CTG;
- 5 marcate con PET: E-ACT/M-CAA, E-ACT/M-CAC, E-ACT/M-CAG, E-ACT/M-CCT, E-ACT/M-CTG.

La sequenze di base dei primer utilizzati sono state le seguenti:

- EcoRI: 5'-GACTGCGTACCAATTC-xxx- 3'
- MseI: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-xxx- 3'

3.2.5. Visualizzazione del prodotto di amplificazione

Il prodotto dell'amplificazione selettiva è stato analizzato per mezzo del sequenziatore *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). In ciascun tubo da caricare sul sequenziatore per l'elettroforesi capillare sono stati messi 23 μl di *loading buffer* (22,5 μl di formamide e 0,5 μl di GS500 LIZ size standard) e 3 μl di DNA amplificato (1 μl per ogni tipo di fluoroforo). Dopo una denaturazione a 95 °C per 5 minuti i tubi contenenti i campioni sono stati trasferiti in ghiaccio per 2 minuti e poi sono stati inseriti nel sequenziatore per l'analisi. Dopo l'elettroforesi capillare, il software GENESCAN 3.1.2. ha elaborato i dati in uscita dal sequenziatore convertendoli in elettroferogrammi, permettendo così una comparazione tra i profili dei cloni analizzati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. COSTITUZIONE DI IBRIDI INTRA- ED INTERSPECIFICI

L'analisi istologica condotta sui pistilli della varietà 'Bianca' impollinati con polline di *Opuntia amyclaea* var. leucosarca ha consentito di verificare l'effettiva compatibilità tra le due specie. Dalle osservazioni eseguite al microscopio a fluorescenza su sezioni longitudinali dei pistilli (Figura 16) è stato possibile osservare la germinazione del polline e lo sviluppo dei tubetti pollinici lungo lo stilo fino al raggiungimento della base di quest'ultimo senza che si sia manifestata alcuna reazione di incompatibilità.



Figura 16. a) Granuli di polline germinati sulla superficie dello stigma; b) sviluppo dei tubetti pollinici lungo lo stilo; c) arrivo dei tubetti pollinici alla base dello stilo

Per favorire la germinazione dei semi estratti da frutti sani e a completa maturazione, è stato utilizzato il protocollo basato sull'impiego di perossido di idrogeno, descritto da Altare e collaboratori (2006). Tale metodo ha permesso di ottenere, a distanza di un mese dall'inizio del trattamento, una percentuale di germinazione superiore al 20%. Nello specifico, per quanto riguarda l'incrocio tra 'Bianca' e 'Rossa' sono germinati 48 semi su 200, pari al 24%; nell'incrocio 'Bianca' x *O. amyclaea* su 200 semi trattati la germinazione ha riguardato il 21.5% di essi, cioè 43 semi. I risultati ottenuti con questa tecnica possono essere considerati soddisfacenti perché di poco inferiori a quelli ottenuti dagli stessi autori che hanno descritto il protocollo.

La fase di accrescimento dei giovani semenzali nei panetti di torba non ha riscontrato alcun problema; infatti tutte le giovani piantine ottenute dalla germinazione dei semi sono andate in contro ad un regolare sviluppo ed in un arco di tempo variabile da 2 a 3 mesi hanno raggiunto le dimensioni di circa 10 cm di altezza e prodotto un apparato radicale ben sviluppato.

Durante la fase di acclimatazione, a causa dell'insorgere di marciumi radicali, si è verificata la morte di quattro semenzali di 'Bianca' x 'Rossa' e due di 'Bianca' x *O. amyclaea*.

Gli 85 semenzali ottenuti dai due incroci dopo una prima fase di accrescimento in serra, sono stati messi a dimora in un campo collezione dell'azienda Sperimentale dell' Università di Catania e saranno valutati nel momento in cui entreranno nella fase produttiva.

2. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI GERMOPLASMA DI *OPUNTIA* CON MARCATORI MICROSATELLITI

19 coppie di primer SSR (Tabella 3) sono state saggiate su un campione di 6 genotipi appartenenti a differenti specie (*O. robusta*, *O. subulata*, *O. fuscicaulis*, *O. streptacantha*, *O. quimilò* ed *O. ficus indica*). Tale *screening* ha permesso di selezionare 8 loci microsatelliti (Tabella 4) che sono stati utilizzati per le successive analisi di diversità genetica. 11 loci sono stati scartati perché non hanno generato prodotti di amplificazione o perché hanno fornito degli elettroferogrammi di difficile interpretazione; tali problemi di interpretazione sono stati dovuti alla presenza di numerosi alleli in un range di poche paia di basi e ad un numero eccessivo di *stutter bands*, cioè frammenti di DNA di poche paia di basi più piccoli rispetto all'allele reale dovuti a "slittamento" della Taq polimerasi durante le reazioni amplificazione.

Tabella 4. Lista delle 8 coppie di primer SSR (6 SSR e 2 EST-SSR) utilizzate per l'analisi

Marcatore	Ripetizione	Primer forward e reverse*	N° alleli totali	PIC [#]	N° alleli unici
Opuntia9	(AG) ₁₅	F: CTAGGCTTCATCCCACATTAGG R: TCCAAATTCACCTCCTCTGC	22	0.23	2
Opuntia12	(TC) ₄ C(TC) ₁₂	F: TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC R: GGTATCTTGTTATTCGTTTCG	33	0.17	12
Opuntia5	(TA) ₅	F: TATGCACAAAGCACCATGC R: CCAACCATAACCACTGTACTGAC	11	0.11	6
Opuntia11	(CT) ₁₃ TT(CT) ₂	F: CCTACACCTGCTGCCAATC R: CGAGACAAACATCAGAGGAG	9	0.17	1
Opuntia13	(AG) ₁₂	F: CCAAATACCCAGCCCATAC R: CGAGAACCTAACTTCCGATG	16	0.21	5
Opuntia3	(AG) ₁₉	F: GTGAGTGCCAGATGAAACT R: TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG	7	0.17	2
Ops.9	(TGA) ₉	F: AACTGCCTCACACGAGTTCC R: GCTACGAAATCTGCCGAGTC	17	0.22	1
Ops.24	(CT) ₂₄	F: TCCTTCCATTTCACCACAC R: CAAGACCCCTCATTCCAAAG	18	0.25	2

* La sequenza M13F (CACGACGTTGTAACGAC) è stata aggiunta all'estremità 5' dei primer forward

[#] Polymorphic information content

Gli 8 loci SSR, di cui 6 isolati da *O. echios* (Helsen *et al.* 2007) e 2 ricavati da Expressed Sequence Tags (EST) di *O. streptacantha*, hanno permesso di ottenere elettroferogrammi chiari e riproducibili in entrambe le repliche (Figura 17) e sono stati

utilizzati per il *fingerprinting* dell'intera collezione di germoplasma costituita da 62 genotipi appartenenti a 16 diverse specie di *Opuntia*. L'analisi dei 20 semenzali di 'Bianca' x *O. amyclaea* è stata effettuata per facilitare la distinzione tra i profili allelici e le *stutter bands*.

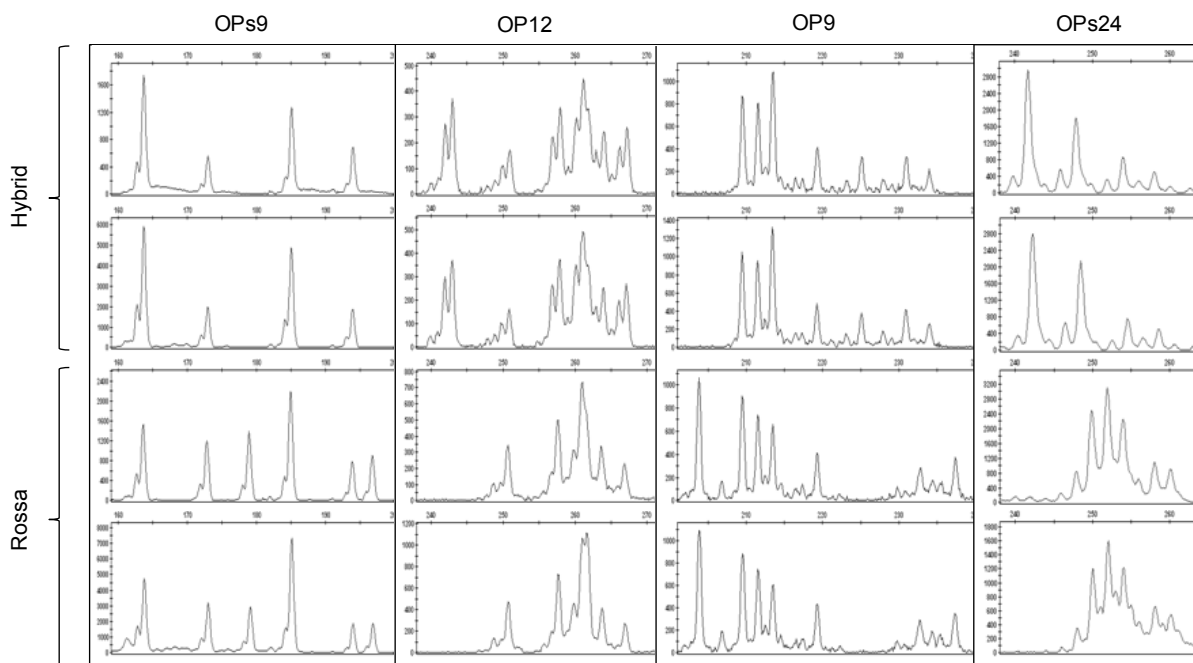


Figura 17. Amplificazioni ripetute di 4 loci in due genotipi ('Hybrid' e 'Rossa')

Degli 8 loci SSR, *Opuntia3* non è riuscito a generare prodotti di amplificazione in un piccolo gruppo costituito da 7 genotipi (*O. quimilò*, *O. cochenillifera*, *O. streptacantha*, '93-042', 'R6', '2.10.58', '24'). La mancata amplificazione potrebbe essere stata causata da mutazioni a livello del locus microsatellite o del sito di appaiamento dei primer. Le altre coppie di primer hanno generato ampliconi in tutti i genotipi analizzati.

Dall'osservazione degli elettroferogrammi ottenuti in seguito ad amplificazione ed elettroforesi capillare, è stato riscontrato un numero di alleli variabile da 1 a 8 e corrispondente al livello di ploidia dei singoli campioni (Tabella 5); il minor numero di alleli è stato mostrato dalle specie certamente diploidi (*O. cochenillifera* ed *O. quimilò*) ed il più alto è stato ottenuto dalle varietà coltivate, generalmente ottaploidi. Inoltre, 48 tra i 62 genotipi analizzati hanno mostrato una media di alleli per locus superiore a 4 (Tabella 5) confermando l'elevato livello di ploidia della gran parte degli individui analizzati.

Tabella 5. Numero di alleli ottenuti ed eterozigosi osservata per ogni genotipo analizzato

Genotipo	N° di alleli	N° medio di alleli	N° di alleli unici	H^*
1251	2-8	4,25	-	100,0
Texas	1-8	4,75	-	87,5
<i>O. megacantha</i>	1-7	4,25	-	87,5
Niagra	1-7	4,50	-	100,0
Castillo	2-7	4,50	-	100,0
Gymno carpo	2-8	4,88	-	100,0
Skidders court	1-6	4,00	1	87,5
Hybrid	1-8	4,75	-	87,5
Japie	2-8	4,88	-	100,0
Kenya-I	2-8	4,88	-	100,0
Kenya-II	2-7	4,75	-	100,0
<i>O. streptacanta</i>	2-8	4,86	-	100,0
Jerico	2-8	5,13	-	100,0
<i>O. joconostle</i>	1-7	4,13	2	87,5
93-034	1-8	3,88	-	75,0
93-037	2-7	3,75	-	100,0
<i>O. vulgaris</i>	1-6	2,75	2	75,0
93-042	0-7	4,43	-	100,0
<i>O. subulata</i>	1-4	2,50	5	62,5
<i>O. spinulifera</i>	1-6	3,25	7	87,5
<i>O. oligacantha</i>	1-6	3,38	-	87,5
<i>O. elizondoana</i> 29	1-5	2,50	-	50,0
<i>O. leucotricha</i>	2-7	4,38	5	100,0
<i>O. elizondoana</i> 31	1-3	1,88	1	62,5
<i>O. cochenillifera</i>	0-2	1,29	1	28,6
<i>O. quimilo'</i>	0-2	1,43	1	42,9
<i>O. amiclea</i> mexican	1-5	3,88	-	87,5
Fusicaulis	1-7	4,13	-	87,5
Reyna (sin. Alfajayucan)	1-5	3,88	-	75,0
R6	0-8	4,75	1	100,0
Cristalina	1-8	4,63	-	87,5
Amarilla	1-8	4,88	-	87,5
2.03.01	1-7	4,25	-	87,5
Naranjona (sin. Pico chulo)	1-7	4,25	-	75,0
Rosalito (sin. Roja lisa, Roja pelona)	2-5	3,63	-	100,0
Burrona	1-7	4,50	-	87,5
Copadeoro	1-8	4,63	-	75,0
Apastillada	3-6	4,75	-	100,0
AV	1-7	4,50	-	87,5
ARL	1-7	4,38	1	87,5
Roja CNF	1-6	4,00	-	87,5
Centenario (sin. Amarilla montesa o Amarilla huesuda)	1-7	4,63	-	87,5
2.10.58	0-8	5,14	-	100,0

Tabella 5. Segue

Genotipo	N° di alleli	N° medio di alleli	N° di alleli unici	H^*
Liria	1-6	4,13	-	75,0
Fafajuco (sin. Blanca de san jose, Blanca de castilla)	2-7	4,00	-	100,0
24	0-7	4,86	1	100,0
Amarilla grande	2-6	4,38	-	100,0
Rossa trunzara1	2-8	4,75	-	100,0
Bianca trunzara1	2-8	4,75	-	100,0
<i>O. amyclaea</i> 23	2-7	4,38	-	100,0
Inerme	1-8	4,13	-	87,5
Linosa	2-8	4,88	-	100,0
Militello	2-8	5,00	-	87,5
<i>O. amyclaea</i> 27	2-7	4,38	-	100,0
Cuore	2-8	4,88	-	100,0
Bianca sorba	2-7	4,75	-	100,0
Bianca trunzara2	2-8	4,75	-	100,0
Gialla trunzara	2-8	4,75	-	100,0
Gialla	2-8	4,88	-	100,0
Rossa	2-8	4,88	-	100,0
Rossa trunzara2	2-8	4,88	-	100,0
<i>O. robusta</i>	1-5	2,88	3	87,5

* eterozigosi osservata (percentuale di loci eterozigoti)

I loci SSR hanno manifestato un elevato livello di polimorfismo, con un numero medio di 16,9 alleli per ogni locus (Tabella 4). Prendendo in esame l'indice PIC (*Polymorphism Information Content*), che indica il livello di polimorfismo di un dato marcatore e quindi la sua capacità di discriminazione, risulta che i loci SSR più informativi siano stati Ops24 (0,25), Opuntia9 (0,23), Ops9 (0,22) e Opuntia13 (0,21) (Tabella 4). Sebbene i microsatelliti siano marcatori codominanti, l'analisi di diversità genetica si è basata sulla presenza/assenza degli alleli e non sul calcolo delle frequenze alleliche. Tale scelta, sebbene riduca il livello di informazioni ottenute dall'analisi di ciascun locus, si è resa necessaria a causa del diverso grado di ploidia delle specie di *Opuntia* e dell'elevata ploidia della maggioranza dei genotipi coltivati, che non ha consentito una stima accurata della frequenza allelica.

Com'è possibile osservare dal dendrogramma Neighbor joining (Figura 18), costruito a partire da una matrice di similarità basata sul coefficiente "shared alleles", l'analisi svolta ha permesso di generare un numero di marcatori polimorfici tali da permettere la discriminazione della maggior parte dei genotipi analizzati. Alcune eccezioni sono rappresentate da un gruppo costituito da 5 genotipi siciliani ('Rossa', 'Rossa trunzara2', 'Gialla', 'Cuore', 'Linosa') e 3

provenienti dalla collezione israeliana ('Gymnocarpo', 'Japie' e 'Kenia1'). Inoltre, non è stato possibile distinguere i due cloni di 'Bianca trunzara' da 'Gialla trunzara', l'accessione siciliana 'Bianca sorba' dall'accessione 'Kenia2' ed i due cloni di *Opuntia amyclaea* ('*O. amyclaea* 23' ed '*O. amyclaea* 27').

L'analisi *bootstrap* eseguita con il software PAUP versione 4.0b10 per stimare il grado di correttezza delle ramificazioni, ha evidenziato i limiti del dendrogramma Neighbor joining ottenuto. Solo una parte delle ramificazioni è stata supportata dall'analisi ottenendo dei valori di *bootstrap* superiori al 50% (Figura 18); questo probabilmente è dovuto alla presenza di diversi ibridi che potrebbero far parte di cluster differenti.

Per superare i limiti del dendrogramma e per rendere ancora più chiara la rappresentazione grafica della diversità genetica presente all'interno della nostra collezione, è stata eseguita un'analisi con il metodo NeighborNet (Bryant e Moulton, 2004). Il *network* filogenetico (Figura 19), basato sul coefficiente di Dice, conferma che la maggior parte delle specie affini ad *O. ficus indica* (*O. robusta*, *O. elizondoana*, *O. spinulifera*, *O. vulgaris*, *O. quimilò*, *O. oligacantha*, *O. joconostle*, *O. cochenillifera*, *O. leucotrica* ed *O. subulata*) sono nettamente separate dalle varietà coltivate. Nel caso dei genotipi coltivati, è evidente la presenza di linee perpendicolari alle ramificazioni che vanno a formare delle reti, che, rispetto all'albero filogenetico, indicano con migliore risoluzione le relazioni esistenti tra la varietà. In entrambi i casi, le accessioni classificate come *O. ficus indica*, *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. streptacantha* ed *O. fusicaulis*, formano un *cluster* principale diviso in sottogruppi che non coincidono con l'attuale classificazione tassonomica. Inoltre, i raggruppamenti non suddividono i genotipi in base alla spinescenza, che è stata considerata come una caratteristica distintiva ai fini della classificazione tassonomica (Britton e Rose, 1963; Scheinvar, 1995; Reyes-Aguero *et al.*, 2005). Le varietà messicane mostrano un elevato livello di diversificazione e si vanno a collocare in diversi *cluster*. Per quanto riguarda le varietà senza spine siciliane, esse manifestano una base genetica molto ristretta e sono strettamente correlate ad altre accessioni senza spine come 'Jerico', 'Kenia1', 'Kenia2', 'Gymnocarpo' e 'Texas' ed ai due cloni di *O. amyclaea*; ciò risulta particolarmente evidente nell'analisi NeighborNet. Altri genotipi senza spine, tra cui 'Inerme', 'Skinners court', 'Castillo' e 'Rosalito', divergono dal principale gruppo di cultivar inermi; questo conferma l'ipotesi di Griffith (2004) secondo la quale le varietà senza spine potrebbero derivare da pool genetici differenti.

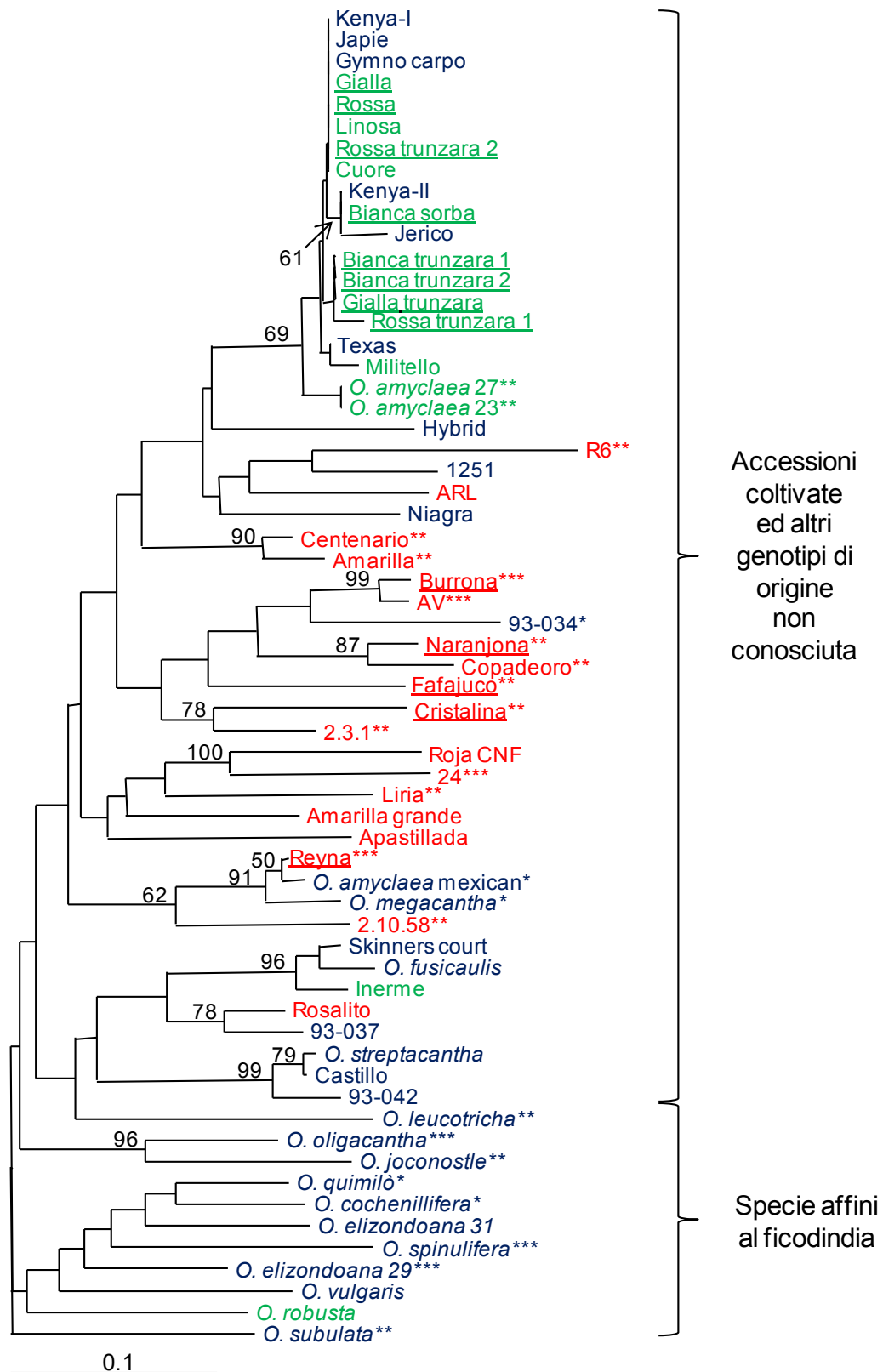


Figura 18. Dendrogramma Neighbor joining. I numeri in corrispondenza delle ramificazioni rappresentano valori di *bootstrap* superiori al 50%. I colori indicano le differenti aree di campionamento (verde = Italia, rosso = Messico, blu = Israele). I nomi sottolineati rappresentano le varietà coltivate. La presenza delle spine è indicata dagli asterischi (* = bassa; ** = media, *** = alta)

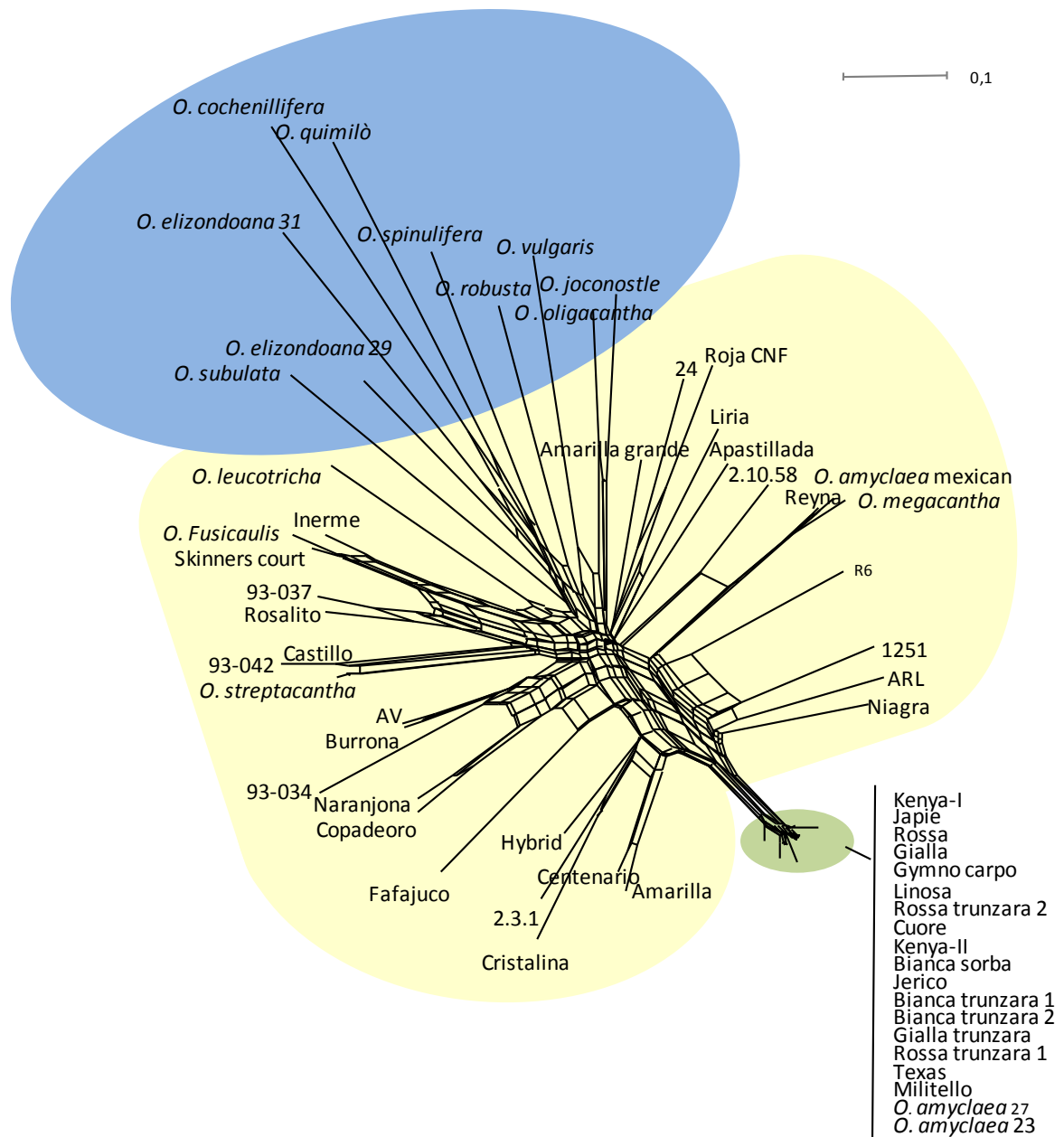


Figura 19. Albero ottenuto con l'analisi NeighborNet

A causa di eventi di ibridazione, sia di origine naturale che artificiale, all'interno del genere *Opuntia*, come riportato da vari autori (Wang *et al.*, 1996; Griffith, 2004; Reyes-Aguero *et al.*, 2006), la costruzione del dendrogramma e del network, entrambi basati su indici di similarità genetica, non è bastata per rivelare pienamente le relazioni tra i genotipi presi in esame. È stata condotta quindi un'analisi di inferenza Bayesiana attraverso il software Structure, per assegnare probabilisticamente le accessioni analizzate a diverse popolazioni e per mettere in evidenza eventuali fenomeni di ibridazione intra- ed inter-specifica. Anche se non è possibile conoscere il numero di popolazioni (K) a cui attribuire le diverse accessioni, Pritchard *et al.* (2000) hanno suggerito di calcolare la probabilità a posteriori di K [$\Pr(X | K)$] come guida per scegliere il più appropriato valore di K, cioè quello che assume il valore della probabilità a posteriori più alto. Nella nostra stima della probabilità a posteriori per valori di K compresi tra 1 e 14, il valore maggiore (0.768525) è stato ottenuto per K = 8 (Tabella 6). Quindi, un numero di popolazioni pari ad 8 è stato considerato come il più appropriato per costruire un modello di struttura delle popolazioni del germoplasma preso in esame.

Tabella 6. Valori della probabilità a posteriori [$\Pr(X | K)$] per K da 1 a 14

K	Pr (X K)
1	~0.0
2	1,1E-210
3	3E-162
4	2,1E-111
5	1E-158
6	1E-158
7	2,52E-68
8	0,768525
9	0,231475
10	2,8E-199
11	1,1E-145
12	~0.0
13	~0.0
14	~0.0

Nel *bar plot* (Figura 20) ottenuto mediante Structure, è possibile notare che le specie affini al ficodindia ricadono in 3 popolazioni chiaramente separate dalle accessioni coltivate. Nello specifico, la popolazione numero 6 include 7 specie affini (*O. quimilò*, *O. cochenillifera*, *O. elizondoana*, *O. robusta*, *O. subulata*, *O. spinulifera* e *O. vulgaris*), il raggruppamento numero 7 include solo *O. leucotricha* ed il numero 8 comprende *O.*

joconostle ed *O. oligacantha*. Queste specie hanno mostrato un diverso grado di commistione, che può essere dovuto al basso numero di genotipi inclusi nell'analisi (uno o due genotipi per ogni specie). Tuttavia, va notato che la maggior parte di questi genotipi ha generato degli alleli unici che li hanno distinti nettamente dalle accessioni coltivate (Tabella 5). Le restanti 5 popolazioni includono le accessioni di ficodindia e le specie *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. streptacantha* e *O. fusicaulis* (Figura 20). Come nel caso delle analisi basate sulle distanze genetiche, l'analisi Bayesiana non distingue nettamente le accessioni di *O. ficus indica* da quelle delle altre specie coltivate, confermando ancora una volta l'inconsistenza di alcune classificazioni tassonomiche che distinguono le accessioni coltivate in specie distinte. Inoltre, l'analisi con il software Structure ha evidenziato con maggiore efficacia la possibile presenza di eventi di ibridazione sia naturale che artificiale; è chiaro l'esempio delle accessioni 'Hybrid' e '2.10.58', provenienti rispettivamente dal campo collezione israeliano e messicano, probabilmente derivanti da programmi di breeding.

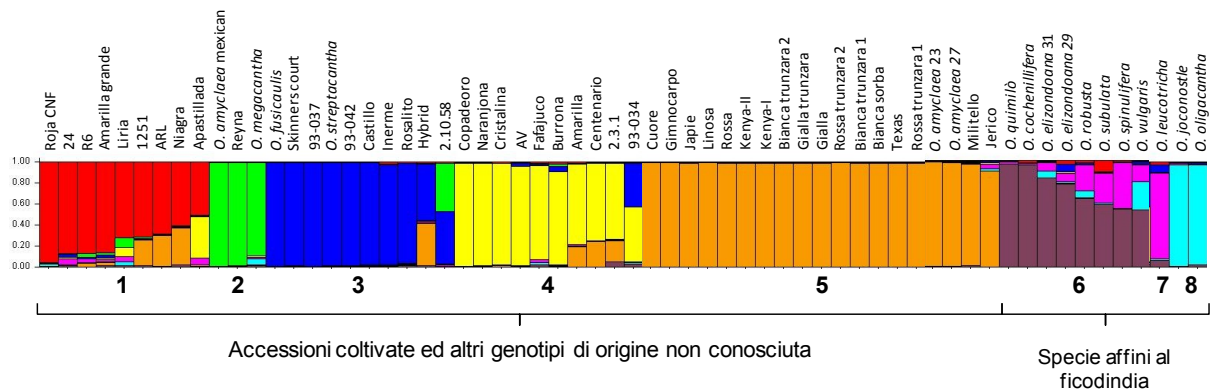


Figura 20. Bar plot che assegna i 62 genotipi ad 8 differenti popolazioni

3. PROPAGAZIONE *IN VITRO* E VERIFICA DELLA *TRUE TO TYPE*NESS CON MARCATORI AFLP

3.1. Micropropagazione

Il protocollo utilizzato per la sterilizzazione dei cladodi si è dimostrato adeguato, infatti sono il 5% circa degli espianti messi in coltura è andato perso a causa di inquinamento del mezzo di coltura.

Dopo circa 3 settimane dalla messa in coltura degli espianti, sono apparsi i primi germogli emessi dalle areole. Al termine delle 6 settimane della fase di induzione, circa il 90% degli espianti messi in coltura hanno prodotto uno o più germogli. Per ciascuna delle 4 piante madri (varietà 'Bianca', 'Gialla', 'Rossa' ed *Opuntia amyclaea*) sono stati selezionati 50 germogli; essi una volta separati dall'espianto di partenza, sono stati posti su terreno di coltura fresco delle medesime condizioni. Tali espianti hanno manifestato una buona attitudine alla morfogenesi ed alla moltiplicazione originando nuovi germogli. Sono state riscontrate differenze sia per il numero di germogli che hanno accettato che per il numero di nuovi germogli ottenuti (Tabella 7). In particolare, la varietà 'Rossa' è stata quella che ha ottenuto il più alto indice di accettazione con l'82% dei germogli accettati, seguita dalla 'Gialla' con il 78%, *O. amyclaea* con il 70% e 'Bianca' con il 68%. Per quanto concerne il numero di nuovi germogli ottenuti per singolo espianto, la cultivar 'Gialla' si è dimostrata la più prolificata con una media di 3,54 germogli, seguita da *O. amyclaea* (3,15), 'Rossa' (2,9) e 'Bianca' (2,75).

Tabella 7. Risposta delle varietà 'Bianca', 'Gialla' e 'Rossa' e di *O. amyclaea* alla fase di moltiplicazione

	Bianca	Gialla	Rossa	<i>O. amyclaea</i>
Numero di germogli subcolturati	50	50	50	50
Numero germogli accettati	34	39	41	35
Percentuale germogli accettati	68	78	82	70
Numero medio di germogli per ogni accettazione	2,74	3,54	2,9	3.23
Totale nuovi germogli ottenuti	93	138	119	113

Tutti i germogli ottenuti nella fase di propagazione sono stati trasferiti su substrato di radicazione dove in 4 settimane hanno originato un soddisfacente apparato radicale (Figura

21). Nell'arco di 4 mesi si è quindi giunti all'ottenimento di un elevato numero di piantine complete di apparato radicale e pronte per essere trasferite in vaso e sottoposte alla fase di acclimatazione. Quest'ultima, che si è svolta in camera coprendo la pianta con un apposito sacchetto di plastica che è stato aperto in modo graduale al fine di abituare la pianta alle condizioni di umidità relativa esterne, non ha presentato particolari difficoltà permettendo di acclimatare il 90% delle piante provenienti dalla fase di radicazione.



Figura 21. Piantine con un buon apparato radicale pronte per essere trasferite in vaso

3.2. Analisi con AFLP

L'analisi molecolare, rivolta all'accertamento della *true to typeness*, condotta con la tecnica AFLP, ha riguardato i cloni ottenuti attraverso propagazione *in vitro* da piante madri di 'Bianca', 'Gialla', 'Rossa' ed *Opuntia amyclaea*; l'obiettivo è stato quello di verificare la presenza o meno di eventuale variabilità genetica insorta in seguito a fenomeni di mutazione che possono essere indotti dalla coltura *in vitro*. I marcatori AFLP, soprattutto negli ultimi 10 anni, sono stati ampiamente utilizzati per la verifica della *true to typeness* in varie specie coltivate (Hornero *et al.*, 2001; Chuang *et al.*, 2009; Gagliardi *et al.*, 2007); in *Opuntia* l'unico lavoro per valutare la stabilità genetica di piantine propagate *in vitro* è stato eseguito con marcatori RAPD (Zoghلامي *et al.*, 2011).

Le 15 combinazioni di primer utilizzate (Tabella 8) hanno generato prodotti di amplificazione in tutti i campioni analizzati ed inoltre hanno fornito elettroferogrammi di facile interpretazione. È stata presa in considerazione la presenza/assenza dei picchi chiaramente distinguibili presenti in un range compreso tra 50 e 500 paia di basi. La tecnica AFLP ha permesso di generare un numero totale di 952 marcatori (Tabella 8) con una media di 63,5 marcatori per ogni combinazione di primer.

Tra i 952 alleli identificati, nessuno è risultato polimorfico nella comparazione tra i cloni e le piante madri. L'elevato numero di marcatori generati, dovrebbe escludere con buona probabilità l'eventuale comparsa di variabilità somaclonale indotta dal protocollo di micropropagazione.

Sulla base dei risultati ottenuti, si ritiene quindi che il protocollo utilizzato per la micropropagazione *in vitro* possa essere impiegato per l'ottenimento di piante *true to type*. Ad ogni modo non è possibile affermare con assoluta certezza che le piante clonate posseggano lo stesso patrimonio genetico delle piante madri, visto che l'analisi AFLP non ha analizzato il genoma completo ma solo una porzione di esso, e che tale analisi non permette di identificare variazioni epigenetiche che sono solite manifestarsi nelle colture *in vitro* (Miguel e Marum, 2011).

Tabella 8. Elenco delle 15 combinazioni di primer utilizzate e numero di marcatori generati

Combinazioni di primer	Numero di marcatori
E-AGC/M-CAA	89
E-AGC/M-CAC	73
E-AGC/M-CAG	65
E-AGC/M-CCT	72
E-AGC/M-CTG	71
E-ACC/M-CAA	54
E-ACC/M-CAC	61
E-ACC/M-CAG	46
E-ACC/M-CCT	63
E-ACC/M-CTG	52
E-ACT/M-CAA	59
E-ACT/M-CAC	56
E-ACT/M-CAG	68
E-ACT/M-CCT	60
E-ACT/M-CTG	63
Totale	952
Media	63,5

Facendo un confronto tra i cloni ottenuti dalle piante madri di ‘Bianca’, ‘Gialla’ e ‘Rossa’ non è stato possibile riscontrare polimorfismi il che conferma la ristretta base genetica esistente tra le 3 cultivar siciliane già evidenziata dalla caratterizzazione molecolare effettuata con marcatori SSR. Differenze sono state individuate invece tra le piantine clonali delle varietà siciliane e quelle ottenute da *O. amyclaea*; queste ultime, sono distinguibili per l’assenza di 7 marcatori (Tabella 9) (Figura 22).

Tabella 9. Marcatori polimorfici presenti nelle tre cultivar siciliane ed assenti in *Opuntia amyclaea*

Combinazioni di primer	Marcatori polimorfici (bp)
E-AGC/M-CAG	248
E-AGC/M-CAG	488
E-AGC/M-CTG	317
E-ACT/M-CCT	277
E-ACT/M-CCT	279
E-ACT/M-CTG	92

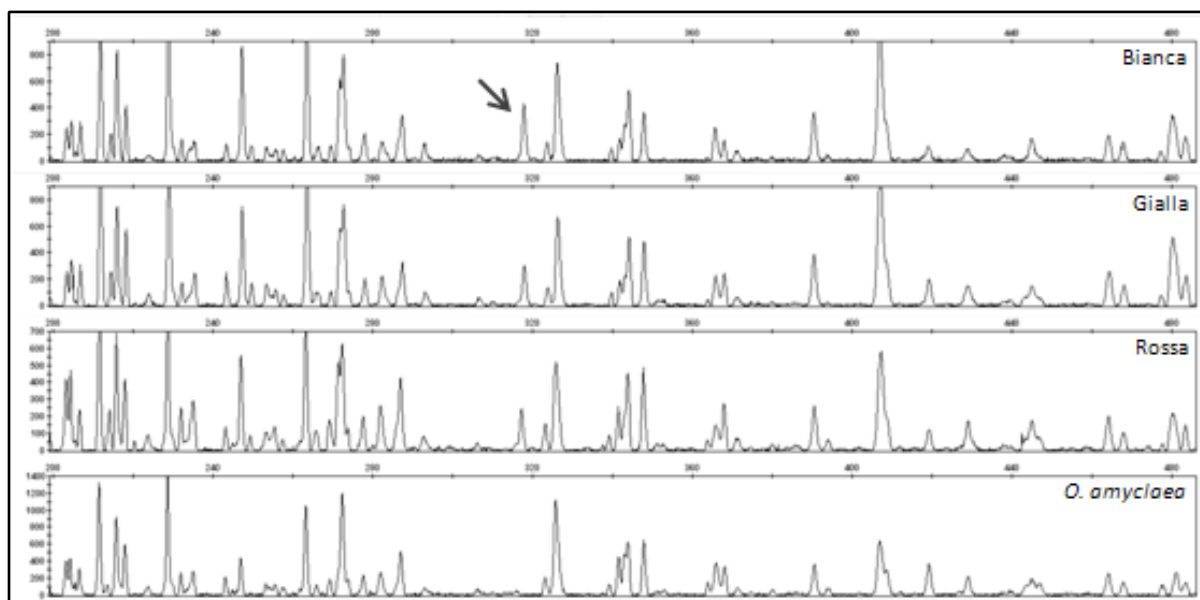


Figura 22. Porzioni di elettroferogrammi di ‘Bianca’, ‘Gialla’, ‘Rossa’ ed *O. amyclaea* a confronto. La freccia indica il marcatore polimorfico E-AGC/M-CTG 317 presente nelle 3 cultivar siciliane ed assente in *O. amyclaea*

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Durante i tre anni di dottorato di ricerca sono state intraprese varie linee di ricerca, in parte basate sull'utilizzo di biotecnologie innovative, per lo studio del ficodindia (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.), una specie considerata minore ma che per la nostra regione possiede un elevato valore non solo dal punto di vista economico ma anche sotto l'aspetto paesaggistico e culturale.

La prima linea di ricerca ha permesso di ottenere ibridi tra le varietà siciliane 'Bianca' e 'Rossa' e tra 'Bianca' ed *O. amyclaea*. I protocolli utilizzati per le operazioni di impollinazione incrociata e germinazione dei semi, rispettivamente descritti da Mondragon-Jacobo *et al.* (1996) e Altare *et al.* (2006), hanno dato soddisfacenti risultati permettendo di ottenere 85 ibridi che, dopo una fase di acclimatazione e crescita iniziale in serra, sono stati messi a dimora in un apposito campo dell'Azienda Sperimentale dell'Università di Catania. Tali semenzali saranno in seguito valutati per le caratteristiche qualitative dei loro frutti.

Un'altra linea di ricerca ha avuto come obiettivo la costituzione di un campo collezione tramite il reperimento e l'introduzione di germoplasma autoctono ed alloctono rappresentato da varietà coltivate, accessioni selvatiche e specie affini al ficodindia. Il campo, realizzato presso l'azienda sperimentale dell'Università di Catania, risulta costituito da 62 accessioni appartenenti a 16 specie differenti. Per indagare e comprendere il livello di diversità genetica esistente all'interno del germoplasma reperito, che può rivelarsi utile al fine di impostare futuri programmi di incrocio, è stata eseguita un'analisi con marcatori microsatelliti SSR ed EST-SSR. Le differenze tra i profili SSR ottenuti sono state analizzate con due metodi basati su indici di similarità, Neighbor joining e NeighborNet, che hanno fornito una panoramica delle variazioni genetiche, esistenti tra i genotipi analizzati e con un'analisi Bayesiana che ha rivelato ulteriori informazioni per quanto riguarda la diversificazione e il grado di commistione tra diversi pool genici. I raggruppamenti ottenuti dalle tre analisi si discostano chiaramente dall'attuale classificazione tassonomica che suddivide le diverse specie di *Opuntia* sulla base di parametri morfologici. In particolare, la spinescenza è stata considerata una caratteristica distintiva per l'assegnazione dei genotipi a delle determinate specie sia nelle prime classificazioni tassonomiche (Britton e Rose, 1963) che in quelle più recenti (Scheinvar, 1995; Reyes-Aguero *et al.*, 2005). In realtà, alcuni caratteri fenotipici, tra cui proprio la presenza/assenza delle spine, mostrano una grande variabilità nelle progenie e possono essere diversi da quelli delle piante madri (Nieddu *et al.*, 2006). In accordo con

Chessa e Nieddu (1997), la variabilità di alcuni caratteri morfologici potrebbe essere dovuta a differenti livelli di espressione dei geni codificanti per tali caratteri, così come a fattori epigenetici ed ambientali (Labra *et al.*, 2003). Sebbene la maggior parte delle specie selvatiche di *Opuntia* (*O. robusta*, *O. elizondoana*, *O. spinulifera*, *O. vulgaris*, *O. quimilò*, *O. oligacantha*, *O. joconostle*, *O. cochenillifera*, *O. leucotrica* ed *O. subulata*) siano raggruppate in *cluster* nettamente distinti da *Opuntia ficus indica*, i genotipi classificati come *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. fusicaulis*, *O. albicarpa* ed *O. streptacantha*, risultano strettamente correlati con le varietà di ficodindia coltivate. L'analisi condotta, in accordo con i risultati di lavori precedenti basati su marcatori molecolari (Wang *et al.*, 1998; Labra *et al.*, 2003; Griffith *et al.*, 2004), dimostra chiaramente che l'attuale classificazione tassonomica sia in parte inesatta. Un'esempio emblematico dell'erronea classificazione tassonomica è rappresentato dalle accessioni di *O. amyclaea*. Sulla base delle analisi effettuate, sembra chiaro che tali genotipi non siano altro che semenzali di varietà coltivate. Di conseguenza, le tecniche molecolari sono sicuramente gli strumenti più appropriati per valutare il reale livello di diversità genetica esistente in collezioni di germoplasma di *Opuntia* e per superare i limiti delle classificazioni tassonomiche basate unicamente su caratteri fenotipici. Tali analisi dovrebbero rappresentare un prerequisito per la pianificazione di programmi di incrocio al fine di sfruttare nel miglior modo possibile la variabilità esistente.

La maggior parte dei genotipi senza spine inclusi in questa analisi hanno mostrato una ristretta base genetica ed alcuni di loro non sono stati discriminati. Nonostante essi producano frutti che presentano una colorazione differente, i profili SSR di questi genotipi sono simili non solo in termini di presenza/assenza di picchi, ma anche in termini di dosaggio allelico osservato ad ogni picco, che dovrebbe variare in caso di avvenuta ricombinazione. Si può quindi ipotizzare che tali differenze fenotipiche siano il risultato di mutazioni somatiche verificatesi in diverse regioni di coltivazione. Altre accessioni inermi sembrano essere chiaramente separate dal gruppo precedente, indicando che il carattere della spinescenza si sia probabilmente manifestato più volte durante l'evoluzione del genere e che potrebbe essere stato selezionato da diverse popolazioni. Di fatto, l'ipotesi di Griffith (2004), che considera la specie *O. ficus indica* come un gruppo di cloni indipendenti ottenuti da diversi ancestrali e selezionati sulla base di caratteristiche agronomiche favorevoli, sembra essere supportata dall'analisi condotta con SSR.

Oltre alla stima della variabilità genetica, il *genotyping* attraverso SSR si presta come uno strumento rapido ed efficace per la distinzione tra genotipi apomittici, che presentano

profili allelici identici alla pianta madre in termini di peso molecolare e dosaggio allelico, e genotipi zigotici, che presentano profili segreganti; gli SSR potranno quindi essere utili in futuri programmi di incrocio al fine di selezionare gli individui ibridi e scartare quelli apomittici.

La terza linea di ricerca ha avuto come obiettivo la propagazione *in vitro* di piante a partire dalle tre principali varietà siciliane, ‘Bianca’, ‘Rossa’ e ‘Gialla’, e da *Opuntia amyclaea*. Il protocollo impiegato, messo a punto da Estrada-Luna *et al.* (2008), si è rivelato idoneo a tale scopo permettendo in breve tempo di ottenere un buon numero di cloni dalle piante madri. Tali cloni sono stati poi valutati con la tecnica AFLP per verificarne la *true to typeness*. Le 15 combinazioni di primer, pur generando un elevato numero di marcatori, non hanno evidenziato differenze tra il materiale micropropagato e le piante madri; il materiale micropropagato dimostrerebbe quindi un discreto livello di stabilità genetica. Tuttavia, non si può affermare con certezza che i cloni ottenuti siano geneticamente identici alle piante madri poiché è stata indagata solo una porzione dell’intero genoma. Inoltre, è noto che le colture *in vitro* inducano variabilità a livello dell’epigenoma, dovuta soprattutto ad eventi di metilazione del DNA (Miguel e Marum, 2011). Tali modificazioni non possono essere individuate attraverso la tecnica AFLP. Sarà opportuno, quindi, eseguire ulteriori analisi con tipologie diverse di marcatori, quali gli MSAP (*Methylation Sensitive Amplified Polymorphism*) (Xiong *et al.*, 1999), capaci di identificare polimorfismi dovuti a metilazione a livello della citosina, al fine di stabilire con certezza la *true to typeness* delle piante micropropagazione. Il protocollo di micropropagazione utilizzato, associato all’impiego di tecniche molecolari innovative per l’individuazione di eventuali mutazioni, potrà essere impiegato per la moltiplicazione rapida di germoplasma reperito in varie aree del mondo e di piante ottenute in seguito a programmi di miglioramento genetico.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Ahmad M., Hughes H. e Safadi F. (1998). Studies on stomatal function, epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene glycoltreated and non treated *in vitro* grape plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol.* 34: 1-7
- Alberghina O. (1994). La configurazione tecnico colturale della fichindicoltura siciliana. *Informatore agrario*32: 37-44
- Altare M., Trione S., Guevara J.C., e Cony M. (2006). Stimulation and Promotion of Germination in *Opuntia ficus-indica* Seeds. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 8: 91-100
- Anderson E.F. (2001). The cactus family. Timber, Portland, Oregon, USA
- Arguilar B.A. (1987). Efecto de la aplicacion de acido giberelico (GA₃) y urea en el fruto del nopal (*Opuntia amychlaea* Tenore). Master's Thesis, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Messico
- Ault J.R. e Blackmon W.J. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (cactaceae). *Horticultural Science* 22: 126-127
- Baker M.A. (2002). Chromosome numbers and their significance in some *Opuntioideae* and *Cactoideae* (*Cactaceae*) of mainland Ecuador and Peru. *Haseltonia* 9: 69-77
- Barbera G., Carimi F. e Inglese P., (1991). The reflowering of prickly pear *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller: influence of removal time and cladode load on yield and fruit ripening. *Advances in Horticultural Science* 2:77-80
- Barbera G. e Inglese P. (1993). La Coltura del Ficodindia. Calderini, Bologna: Edagricole, pp. 219
- Barbera G. e Inglese P. (2001). Ficodindia, Parma, L'Epos, 2001, pp. 220
- Barbera G., Inglese P. e La Mantia T. (1994). Influence of seed content on some characteristics of the fruit of cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill.). *Scientia Horticulturae* 58: 161-165
- Barcaccia G. e Falcinelli M., (2006). Genetica e genomica – Vol. III Genetica e Genomica, Liguori Editore, Napoli

- Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R. e Federici C.T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 112:1519-1531
- Basile F. (2001). Economic Aspects of Italian Cactus Pear Production and Market. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 4: 31-46
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. e Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331
- Bouck A. e Vision T. (2007). The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Molecular Ecology* 16: 907-924
- Britton N.L. e Rose J.N. (1963). *The Cactaceae*. Vol. 1. Dover Publications Inc., New York
- Bryant D. e Moulton V. (2004). Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* 21: 255-265
- Caruso M., Federici C.T. e Roose M.L. (2008). EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. *Molecular Breeding* 21: 195-204
- Casas A. e Barbera G. (2002). Mesoamerican domestication and diffusion. In: *Cacti: biology and uses* (Nobel P.S., ed), University of California Press, Berkeley, pp.143-162
- Chapman B., Mondragon-Jacobo C., Bunch R.A. e Paterson A.H. (2002). Breeding and Biotechnology. In: *Cacti, Biology and use* (Nobel P.S, ed), University of California Press, Berkeley, pp. 255-272
- Chavez-Moreno C.K., Tecante E.A. e Casas E.A. (2009). The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera:Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation* 18: 3337-3355
- Chen C., Zhou P., Choi Y.A., Huang S. e Gmitter F.G. (2006). Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1248-1257
- Chen C., Bowman K.D, Choi Y.A., Dang P.M., Rao M.N., Huang S., Soneji J.R., McCollum T.G. e Gmitter F.G. (2008). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 4: 1-10
- Chessa I. e Nieddu G. (1997). Descriptors for cactus pear (*Opuntia* spp). *CACTUSNET – FAO Newsletter Special Issue*, pp. 39

- Chuang S.J., Chen C.L., Chen J.J., Chou W.Y. e Sung J.M. (2009). Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. *Scientia Horticulturae* 120: 121-126
- Cocking E.C. (1960). A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles nature 187: 962-963
- Damigella P. (1957). Il ficodindia e le cultivar della sicilia orientale. *Tecnica agricola*, Anno X, 3: 474-502
- Dangl G.S., Mendum M.L., Prins B.H., Walker M.A., Meredith C.P. e Simon C.J. (2001). Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: a tool for managing a grape germplasm collection. *Genome* 44: 432-438
- Deumling, (1981). Sequence arrangement of a highly methylated satellite DNA of a plant *Scilla*: a tandemly repeated inverted repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 78: 338-342
- Devreux M. e Damiano C., (1998). Fecondazione in vitro e coltura di embrioni immaturi. *Agricoltura e Ricerca* 151: 69-76
- Dondini L., Pierantoni L., Gaiotti F., Chiodini R., Tartarini S., Bazzi C. e Sansavini S. (2004). Identifying QTLs for fireblight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. *Molecular Breeding* 14: 407-418
- Donkin R. (1977). Spanish red: an ethnogeographical study of cochineal and the *Opuntia* cactus. *Transactions of the American Philosophical Society* 67: 1-77
- Eames A.J. (1961). *Morphology of the Angiosperm*. McGraw-Hill, New York
- Engelmann F. (1997). In vitro conservation methods. In: *Biotechnology and plant genetic resources* (Callow J.A., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J., eds). CAB International, Oxford, pp. 119-161
- Escobar H.A., Villalobos V.M. e Villegas A. (1986). *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7: 269-277
- Estrada-Luna A.A., Martinez-Hernandez J., Torres-Torres M.E. e Chablé-Moreno F. (2008). *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae* 117: 378-385

- Fedorov A. (1969). Chromosome numbers of flowering plants. Komarov Botanical Institute, Leningrad
- Felker P., Rodriguez S.C., Casoliba R.M., Filippini R., Medina D. e Zapata R. (2005). Comparison of *Opuntia ficus indica* varieties of Mexican and Argentine origin for fruit yield and quality in Argentina. *Journal of Arid Environments* 60: 405-422
- Felker P., Paterson A. e Jenderek M.M. (2006). Forage potential of *Opuntia* clones maintained by the USDA National Plant Germplasm System (NPGS) collection. *Crop Science* 46: 2161-2168
- Fernandes J. e Saiz M.M. (1990). La chumbera como cultivo de zonas aridas. *Hojas Divulgadoras*: N° 1/90, MAPA, Madrid, p. 24
- Fernandez-Montes M.R., Mondragon-Jacobo C., Luna-Vazquez J., Gutierrez-Acosta F., Saenz-Quintero L.A., Zegbe-Dominguez J.A., Mendez-Gallegos S.D.J.e Martinez-Gonzalez J.C. (2000). Principales Cultivares Mexicanos de Nopal Tunero. INIFAP. CIRCE. Campo Experimental Norte de Guanajuato. Publicación Técnica Núm. 1. Guanajuato, Messico
- Fila G., Ghashghaie J., Hoarau J. e Cornic G. (1998). Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. *Physiologia Plantarum* 102: 411-418
- Gagliardi R.F., Hanai L.R., Pacheco G., Oliveira C.A., Carneiro L.A., Montenegro Valls J.F., Mansur E. e Carneiro Vieira M.L. (2007). Assessment of Genetic Stability Among *In Vitro* Plants of *Arachis retusa* Using RAPD and AFLP Markers for Germplasm Preservation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 307-312
- García-Zambrano E.A., Zavala-García F., Gutiérrez-Diez A., Ojeda-Zacarias M.C. e Cerda-Hurtado I. (2009). Estimation of the genetic diversity of *Opuntia* spp. using molecular markers AFLP. *Phyton* 78: 117-120
- Gibson A.C. e Nobel P.S. (1986). *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Goldblatt P. (1981). Index to plant chromosome numbers 1975-1978. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 5: 1-553
- Goldblatt P., Johnson D.E. (1990). Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 30: 1-243

- Goldblatt P., Johnson D.E. (2006). Index to plant chromosome numbers. 2001-2003. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 106: 106-107
- Griffith M.P. (2004). The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): New molecular evidence. American Journal of Botany 91:1915-1921
- Guha S. e Maheshwari S.C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497
- Havel L. e Kolar Z. (1983). Microexplant isolation from Cactaceae. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2: 349-353
- Helsen P., Verdyck P., Tye A., Desender K., Van Houtte N. e Van Dongen S. (2007). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos prickly pear (*Opuntia*) cactus species. Molecular Ecology Notes 7:454-456
- Helsen P., Verdyck P., Tye A. e Van Dongen S. (2009). Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galápagos). Plant Systematics and Evolution 279: 1-10
- Hornero J., Martinez I., Celestino C., Gallego F.J., Torres V. e Toribio M. (2001). Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. International Journal of Plant Sciences 162:827-833
- Huson D.H. e Bryant D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Molecular Biology and Evolution 23: 254-267
- Infante R. (1992). *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 155-159
- Inglese P., Barbera G., La Mantia T. e Portolano S. (1995). Crop production, growth, and ultimate size of cactus pear fruits following fruit thinning. HORTSCIENCE 30: 227-230
- Inglese P., Basile F. e Schirra M. (2002). Cactus pear fruit production. In: Cacti: biology and uses (Nobel P.S., ed.), University of California Press, Berkeley, pp. 163-183
- ISTAT (2009). Tav. C23 - Superficie (ettari) e produzione (quintali): fichi d'india, nespolo comune, sorbe.

- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., Van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M. e Daly A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390
- Kiesling R. (1998). Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 50-59
- Labra M., Grassi F., Bardini M., Imazio S., Guiggi A., Citterio S., Banfi E. e Sgorbati S. (2003). Relationships in *Opuntia* Mill. genus (Cactaceae) detected by molecular marker. *Plant Science* 165: 1129-1136
- Larkin P.J. e Scowcroft W.R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214
- Law J.R., Donini P., Koebner R.M.D., Reeves J.C. e Cooke R.J. (1998). DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102: 335-342
- Liu K. e Muse S.V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128-2129
- Luna-Paez A., Valadez-Moctezuma E., Barrientos-Priego A.F. e Gallegos-Vázquez C. (2007). Characterization of *Opuntia* spp. by means of seed with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 9: 43-59
- Meudt H.M. e Clarke A.C. (2007). Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106-117
- Mauseth J. D. (1976). A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus Succulent Journal* 51: 186-187
- Mauseth J.D. (1977). Cactus tissue culture: a potencial method of propagation. *Cactus Succulent Journal* 49: 80-81
- Miguel C. e Marum L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3713-3725
- Mondragon-Jacobo C. e Bordelon B.B. (1996). Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) Breeding for Fruit Production. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 1: 19-35

- Mondragon-Jacobo C. e Perez-Gonzales S. (1996). Native cultivars of cactus pear in Mexico. In: Progress in New Crops (Janick J. e Simon E., eds.). AHSS Press, Alexandria, Virginia, pp. 446-450
- Mondragon-Jacobo C. (1999). Preliminary genetic studies on cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) germplasm from Central Mexico. Ph.D Thesis, Purdue University, West Lafayette, Indiana
- Mondragon-Jacobo C. (2001). Cactus pear breeding and domestication. Plant Breeding Reviews 20: 135-166
- Mondragon-Jacobo C. (2003). Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal de (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. Revista Chapingo 9: 97-114
- Moore R.J. (1977). Index to plant chromosome number 1967-1971. Regnum Vegetable 96: 1-157
- Morgante M., Hanafey M. e Powell W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nature Genetics 30: 194-200
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki K., Horn G.T. e Herlich H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51: 263-273
- Murashige T., Bitters W.P., Rangan T.S., Nauer E.M., Roistachek C.N. e Holliday P.B. (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. Hortscience 7: 118-19
- Murashige T. e Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant 15: 473-497
- Navarro L., Roistacher C.N., e Murashige T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Journal of the American society for Horticultural Science 100: 471-479
- Nerd A. e Mizrahi Y. (1994). Toward seedless prickly pear. In: Proceeding of the Fifth Annual Texas Prickly Pear Council (Felker P. e Moss J.R., eds). Kingsville, Texas, pp. 5-6
- Nieddu G., Chessa I. e Barberis A. (2006). Characterization of Seedlings Obtained from Open Pollinated 'Gialla' Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*). Acta Horticulturae 728: 105-110

- Oetting W.S., Lee H.K., Flanders D.J. e Wiesner G.L. (1995). Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30: 450-458
- Ortiz H.Y. (1988). Efecto del acido giberelico y auxina en el fruto del nopal tunero (*Opuntia amychlaea* T). Master's Thesis, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Messico
- Pimienta-Barrios E. e Mauricio L. (1987). Variacion en los componentes del fruto maduro entre formas de nopal (*Opuntia* spp) tunero. *Revista de Fitotecnica Mexicana* 12: 183-196
- Pimienta-Barrios E. (1994). Prickly pear (*Opuntia* spp) a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments* 28: 1-12
- Pinkava D.J., Rebman J. e Baker M. (1998). Chromosome numbers in some cacti of western North America-VII. *Haseltonia* 6: 32-41
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. e Rafalski A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238
- Pritchard J.K., Stephens M. e Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Rebman J.P. e Pinkava D.J. (2001). *Opuntia* cacti of North America - an overview. *Fla Entomol* 84: 474-483
- Reyes-Aguero J.A., Aguirre J.R. e Hernandez H.M. (2005). Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 395-408
- Reyes-Aguero J.A., Aguirre R.J.R. e Valiente-Banuet A. (2006). Reproductive biology of *Opuntia*: a review. *Journal of Arid Environments* 64: 549-585
- Rozen S. e Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365-386
- Rungis D., Berube Y., Zhang J., Ralph S., Ritland C.E. e Ellis B.E. (2004). Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics* 09: 1283-1294.
- Russell C.E. e Felker P. (1987). The prickly pears (*Opuntia* spp., Cactaceae): a source of human and animal food in semiarid regions. *Economic Botany* 41: 433-445

- Saenz-Hernandez C., Corrales-Garcia J. e Aquino-Perez G. (2002). Nopalitos, mucilage, fiber, and cochineal. In: *Cacti: biology and uses* (Nobel P.S., ed.), University of California Press, Berkeley, pp. 211-234
- Saitou N. e Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425
- Scheinvar L. (1995). Taxonomy of utilized *Opuntias*. In: *Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear* (Barbera G., Inglese P., Pimienta-Barrios E., eds). FAO Plant Production and Protection, Paper 132, Roma, pp. 20-27
- Segura S., Scheinvar L., Olalde G., Leblanc O., Filardo S., Muratalla A., Gallegos C. e Flores C. (2007). Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. Series *Streptacanthae Britton et Rose, Leucotrichae DC., Heliabravoanae Scheinvar and Robustae Britton et Rose*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1033-1041
- Sejuro, N.O. (1990). *Plantas Medicinales Utilizadas por los Curanderos de Nasca*. 2nd ed. Boletín de Investigación en Tecnologías Nativas 5
- Silfverberg-Dilworth E., Matasci C.L., Van de Weg W.E., Van Kaauwen M.P.W., Walser M., Kodde L.P., Soglio V., Gianfranceschi L., Durel C.E., Costa F., Yamamoto T., Koller B., Gessler C. e Patocchi A. (2006). Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* 2: 202-224
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 509-517
- Souto-Alves T., Vanusa Da Silva M., Alves De Almeida C.M., Oliveira Jordão Do Amaral D., Cordeiro Dos Santos D., Farias I., Tenório Sabino Donato V.M. e Da Costa A.F. (2009). Genetic diversity in cactus clones using ISSR markers. *Acta Horticulturae* 811: 55-58
- Steinhart, C. E. (1962). Tissue culture of a cactus. *Science* 137: 545-546
- Stoeckel S., Grange J., Fernández-Manjarres J.F., Bilger I., Frascaria-Lacoste N. e Mariette S. (2006). Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species -*Prunus avium* L.. *Molecular Ecology* 15: 2109-2118
- Swofford D.L. (1998). *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
- Thurston M.I. e Field D. (2005). *Msatfinder: Detection and Characterisation of Microsatellites*. CEH Oxford, Oxford, UK

- Towle M.A. (1961). The ethnobotany of pre-Columbian Peru. Aldine, Chicago, Illinois, USA
- Valdez J.G. (2005). Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L) after an extended period of seed trace culture. *Vitis* 44: 17-23
- Varshney R.K, Graner A. e Sorrells M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55
- Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M. e Roldán-Ruiz I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139-151
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Adrie Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M. e Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4415
- Wallace R.S. e Gibson A.C. (2002). Evolution and systematics. In: Nobel PS (ed) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, Berkeley, pp. 1-22
- Wang X., Felker P., Paterson A.H., Mizrahi Y., Nerd A. e Mondragon-Jacobo C. (1996). Cross hybridization and seed germination in *Opuntia* species. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 1: 49-60
- Wang X., Felker P., Burrow M.D. e Paterson A.H. (1998). Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 3-14
- Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.T. e Powell W. (1997). Genetic distribution of BARE-1 retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics* 253: 687-694
- Weiss J., Nerd A. e Mizrahi Y. (1993). Vegetative parthenocarpy in the cactus pear *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Annals of Botany* 72: 521-526
- Welsh J. e McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218
- Weniger D. (1984). *Cacti of Texas and Neighboring States: A Field Guide*. University of Texas, Austin

- Werker E. (1997). Seed anatomy. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart, pp. 424
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. e Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535
- Wunsch A. e Hormaza J.I. (2002). Cultivar identification and genetic fingerprint of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 59-67
- Xie H., Sui Y., Chang F.Q., Xu Y. e Ma R.C. (2006). SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 2366-372
- Xiong L.Z., Xu C.G., Saghai Maroof M.A. e Zhang Q. (1999). patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics* 261: 439-446
- Zietkiewicz E., Rafalski A. e Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183
- Zoghalmi N., Chrita I, Bouamama B, Gargouri M, Zemni H, Ghorbel A, Mliki A (2007) Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) in Tunisia. *Scientia Horticulturae* 113: 134-141
- Zoghalmi N., Bouamama B., Khammassi M. e Ghorbel A. (2011). Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. *Industrial Crops and Products* 36: 59-64