



UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI PERUGIA



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE,
ALIMENTARI E AMBIENTALI**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOTECNOLOGIE AGRARIE ED AMBIENTALI**

**"SVILUPPO DI UN MARCATORE
MOLECOLARE PER LA TUTELA
DELL'AGLIONE (*A. ampeloprasum*) DELLA
VAL DI CHIANA"**

LAUREANDO
Niccolò Terzaroli

RELATORE
Prof. Emidio Albertini

MATRICOLA
281819

Anno Accademico 2017-2018

Ringraziamenti

CON QUESTO LAVORO VORREI RINGRAZIARE
I MIEI GENITORI E MIO FRATELLO CHE CHIEDONO POCO E DANNO TROPPO;
LA MIA COMPAGNA, DI ESAMI, DI AVVENTURE E DI QUALCOSA DI PIÙ GROSSO;
IL PROF ALBERTINI, CHE NONOSTANTE GLI IMPEGNI UN MINUTINO LO HA TROVATO,
I MIEI COINQUILINI CATO, ETTO, ALE, CAPO, CLAUDIO, CHE SONO DIVENTATI UNA FA-
MIGLIA,
I MIEI AMICI CHE SI MERITEREBBERO TANTO PIÙ TEMPO DA PARTE MIA
(DIA, GALO, MASTRO, BIO, ANGY "THE WILD MARIA" BRUNETTI, LISIUCCI,
TARSI, LEBO, GANJALF, LA VECCHIA DITTA E LA NUOVA DITTA,
BENNY BENASSI, CRI, ALE, LO ZIO D'AMERICA E TANTI TANTI ALTRI)
VORREI INVECE RICORDARE A GINO CHE FA TENERAMENTE SCHIFO.
RINGRAZIO POI I VINKINGS-CLANIS CON CUI HO DIVISO FATICHE E FANGO,
IL LUCEVAN E TUTTA LA SUA FAUNA BORISIANA.
GLI ULTIMI PLAUSI VANNO A SPIFE (E ALLA SUA SPLENDIDA FAMIGLIA),
CON CUI È INIZIATA UNA PICCOLA AVVENTURA,
E AL SIGNOR CARLO CITTERIO, MECENATE CHE HA CREDUTO IN ME FIN
DALL'INIZIO, E CHE SPERO CON TUTTO IL CUORE DI NON AVER DELUSO.

"N PAR DI SOLCHI DI PATATE HO GIÀ ZAPPATO, L'AGLIONE HO 'NFRASCATO,
UN PEZZETTO AL BAR CI VOLEVO ANDÀ"
LIBERAMENTE ISPIRATO A "IL PODERE MALANDATO" DI EMO ROSSI

ABSTRACT

The *Allium* genus comprises more than 800 species, placing it among the largest monocotyledonous genera. It is a variable group that is widely spread across the Holarctic region.

Aglione, (*A. ampeloprasum*), typical of the Val di Chiana, an area of the Middle Italy between the provinces of Siena, Arezzo and Perugia, is a crop very sustainable (economically, environmentally, socially) that boasts numerous attempts at imitation in Italy and not only, that for this needs protection.

The previous study carried out on *Allium* spp. have been useful in identifying and assessing its evolutionary lineages; in the present study, we used the nuclear ribosomal internal spacer (ITS) sequence data to examine the genetic difference between Aglione, and other kinds of Great Headed Garlic.

Furthermore we tried to develop a molecular marker, first a SCAR and then a CAPS, to discriminate between garlic (*Allium sativum*) and Aglione, to avoid scams and protect a new valiant product.

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Il genere <i>Allium</i>	1
1.1.1	L'aglio (<i>Allium sativum</i>)	5
1.1.2	Il Porro (<i>Allium ampeloprasum</i>)	7
1.1.3	L'Aglione (<i>A. Ampeloprasum</i> var. <i>Holmense</i>)	8
1.1.3.1	Pratiche colturali	11
1.1.3.2	Il territorio: la Val di Chiana	13
1.1.3.3	La storia	16
1.1.3.4	Mercato, usi e proprietà	18
1.1.3.5	Il rischio di erosione genetica: aggiornamenti	20
1.1.4	Varietà da conservazione	23
1.1.4.1	Varietà locali	24
1.1.5	Indicazioni geografiche UE	25
1.1.5.1	DOP	26
1.1.5.2	IGP	27
1.1.6	Marcatori molecolari	27
1.1.6.1	Vantaggi/svantaggi dei marcatori molecolari vs. descrittori morfo- siolog	28
1.1.6.2	Sequenziamento comparativo del DNA	29
1.1.6.3	SCAR	30
1.1.6.4	CAPS	31
2	SCOPO DELLA TESI	32
3	MATERIALI E METODI	34
3.1	Materiale genetico di partenza	34
3.2	Estrazione del DNA genomico	36
3.3	Amplificazione delle sequenze	36
3.4	Purificazione dei prodotti di PCR per il sequenziamento	36
3.5	Quantificazione dei prodotti di PCR	37
3.6	Reazione di sequenza	37
3.7	Assemblaggio delle sequenze	38
3.8	Alberi filogenetici	39

3.9 Progettazione dei primer	40
3.10 Validazione dei primer	41
3.11 Digestione enzimatica	41
4 RISULTATI	42
4.1 Analisi bioinformatiche	42
4.2 Efficacia primer	44
4.3 Efficacia marcatore CAPS	49
5 DISCUSSIONE	51
6 BIBLIOGRAFIA	52
7 SITOGRAFIA.....	57

1 INTRODUZIONE

1.1 Il genere *Allium*: caratteristiche genetiche e botaniche

Allium appartiene alla famiglia Amaryllidaceae J.St.-Hil., sottofamiglia Allioideae Herb., tribù Allieae Dumort. (Fay e Chase, 1996; APG III, 2009; Chase *et al.*, 2009). Ad oggi, *Allium* (incluso *Caloscordum* Herb., *Milula* Prain e *Nectaroscordum* Lindl.) è l'unico genere della tribù Allieae.

Il genere *Allium* L. comprende più di 800 specie (Fritsch *et al.*, 2010) ed è quindi uno dei più grandi generi tra le monocotiledoni; è un gruppo variabile ampiamente diffuso in tutto l'emisfero boreale, dalle secche regioni tropicali fino alle più alte latitudini. L'unica eccezione è l'*Allium dregeanum*, nativo del Sudafrica (De Wilde-Duyfjes, 1976). Questo genere ha il maggior centro di diversità che si estende dal bacino del Mediterraneo fino all'Asia Centrale e al Pakistan e un secondo centro, meno esteso, localizzato nell'ovest del Nord America. La vasta area e le nette differenze molecolari indicano che questo genere era probabilmente già differenziato agli inizi del Terziario (Hanelt *et al.*, 1992; Dubouzet and Shinoda, 1999). Janssen e Bremer (2004) riportano che la divergenza con il gruppo Amaryllidaceae è iniziata circa 87 Milioni di anni fa, fornendo ulteriori elementi di prova. *Allium* potrebbe essere uno di quei gruppi tassonomici che, secondo Tiffney (1985), formavano parte del piano della foresta boreotropicale che copriva le latitudini a Nord durante l'Eocene.

Allium consiste di specie erbacee perenni caratterizzate per la maggior parte da bulbi tunicati, foglie basali strette, infiorescenze a ombrella, fiori con sei tepali liberi o quasi (Figure 2 e 3), ovari superi con uno o alcuni ovuli per loculo, setti spesso contenenti aperture nettarie da pori alla base dell'ovario, stigma intero o tripartito, capsula loculicida, semi neri romboidali o sferoidali, un odore simile alla cipolla e un gusto dovuto alla presenza di sulfossidi della cisteina. Il genere è diversificato nella citologia: il numero più comune dei cromosomi di base è $x=8$, ma si verificano anche altri numeri ($x=7,9,10,11$) e la variazione della ploidia (Xu *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2007). *Allium* contiene molte specie importanti economicamente, tra cui aglio, porro, cipolla, scalogno, cipolla d'inverno (*A. fistulosum*), erba cipollina e aglio cinese (*A. tuberosum*), coltivate per l'alimentazione o come spezie, e specie usate per la medicina tradizionale o come piante ornamentali (Fritsch e Friesen, 2002).

Una ricerca a lungo termine sul genere *Allium* a Gatersleben (Germania) ha proposto una nuova classificazione tassonomica, chiamata "Gatersleben infrageneric classification" (Hanelt *et al.*, 1992),

in cui il genere è stato suddiviso in 6 subgenera e 57 sezioni e sottosezioni. Secondo questa classificazione i quattro subgenera maggiori sono:

1. *Allium*: il subgenus più vasto. E' formato da specie con bulbo ovoidale o subgloboso. I membri di questo subgenus si trovano comunemente nell'area mediterranea, in Asia minore e Centrale, e includono molte specie coltivate, come l'aglio e (*Allium sativum*) e *A. ampeloprasum*, "aglione", e ornamentali, per esempio *A. Atraviolaceum* e *A. Sphaerocephalon* (Fig. 1).



Figura 1: *Allium sphaerocephalon*. © Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste. Da http://dryades.units.it/euganei/index.php?procedure=taxon_page&id=6923&num=26770

2. *Rhizirideum*: contiene tutte le specie rizomatose. Queste crescono selvatiche in tutte le fasce altitudinali di Europa, Asia e Nord America, e includono molte piante economicamente importanti, e.g., *A. cepa*, *A. fistulosum*, *A. schenoprasum*.
3. *Melanocrommyum*: consiste di specie a bulbo con vera tunica. Le piante sono diffuse dalle Isole Canarie fino a Kazakhstan, Cina e Pakistan, con il centro di diversità nella parte orientale del bacino del Mediterraneo e in Asia centrale e Sud-occidentale. La maggior parte delle specie ornamentali fanno capo a questo subgenere, per esempio *A. aflatulense*, *A. giganteum*, *A. aschersonianum*.

4. *Amerallium*: i membri di questo subgenus sono diffusi in un vasto range di condizioni ecologiche, dai deserti caldi fino alle foreste fitte e umide del Nord America e del Mediterraneo. Le specie di questo taxon differiscono marcatamente nella morfologia: alcune producono principalmente rizomi e bulbi poco sviluppati (e.g. *A. Cernuum*), altri formano bulbi distinti e foglie larghe simili a quelle comuni nel subgenus *Melanocrommyum*, (e.g. *A. moly*), o foglie molto strette come nel subgenus *Allium* (e.g. *A. unifolium*).

In aggiunta, la classificazione di Gatersbelen riconosce due piccoli subgenera *Bromatorriza* e *Anguinum*.

Studi molecolari più recenti (Maass e Klaas, 1995; Mes *et al.*, 1997, 1999; Xingjin *et al.*, 2000; Van Raamsdonk *et al.*, 2003) hanno portato ad una nuova classificazione che include 14 subgenera (Fritsch, 2001; Fritsch e Friesen, 2002).

Contrariamente alle opinioni precedenti (Hanelt *et al.*, 1992; Cheremushkina, 1992; Kamenetsky, 1996), Fritsch e Friesen (2002) sostengono che le specie rizomatose di *Allium* non appartengano a un singolo gruppo monofiletico, e considerano la presenza di un rizoma allungato e di falsi bulbi uno stadio evoluzionistico avanzato, sviluppato indipendentemente da diverse linee. In concomitanza, i bulbi non sono considerati il prodotto più avanzato dell'evoluzione, ma una delle caratteristiche ancestrali nello sviluppo di *Allium*. Loro propongono, quindi, che l'evoluzione abbia proceduto secondo tre linee separate: la più antica, formata solo da piante bulbose dai subgenera *Amerallium*, *Nectaroscordum* e *Microscordum*, che raramente produce un rizoma degno di nota. Le altre due linee contengono sia taxa bulbosi che rizomatosi.

Secondo il sistema Raunkiaer (1934), le specie di *Allium* rientrano nei gruppi delle geofite ed emicriptofite, con un'alta variabilità nella metamorfosi dei fusti sotterranei. L'evoluzione e la diversificazione di queste sono state fortemente influenzate dalle condizioni ecologiche nei loro habitat naturali: terreni prevalentemente aperti, soleggiati e piuttosto asciutti.

La domesticazione di questi agli selvatici è iniziata millenni fa, seguita da un'ampia diffusione di condimenti aromatizzanti in tutta Europa e Asia (Hanelt, 1990; Engeland, 1991). Similmente a molte altre colture, il promuovere l'allontanamento dal centro di origine ha ridotto significativamente la possibilità di introgressioni geniche dalle crop wild relatives, cioè i progenitori selvatici. Inoltre, dalla domesticazione iniziale, molti degli immediati predecessori sono anch'essi andati perduti o sono irriconoscibili. Mutazioni genetiche e una pressione selettiva drastica e sbilanciata da parte di coltivatori e breeders ha comportato la perdita di molti tratti importanti per la moderna agricoltura, e quindi, geni

di caratteristiche potenzialmente utili sono andati persi o non sono prontamente disponibili per il miglioramento della coltura (Kamenetsky e Rabinowitch, 2006).

Nel mondo la diversità all'interno del genere *Allium*, come molte volte abbiamo detto, è molto alta, specialmente in Asia Centrale (Khassanov, 1997; Fritsch e Friesen, 2002): questo pool genico è fondamentale per l'introduzione di geni utili nelle specie attualmente coltivate, così come per la domesticazione, più o meno rapida, di nuove colture. La domesticazione di specie ornamentali dipende dalla conoscenza delle loro risposte fisiologiche all'inquinamento; nuove specie possono essere domesticate come spezie e condimenti vegetali, e molte specie e varietà locali possono servire come risorse per le loro qualità, come il contenuto in sostanza secca, l'aroma, il colore, la produttività, la resistenza a malattie e/o a stress ambientali, e per materia prima per l'industria farmaceutica e nutraceutica (Kamenetsky *et al.*, 2005; Kik *et al.*, 2001; Keusgen, 2002).

Attualmente, molte specie selvatiche con un odore e sapore simili all'aglio e alla cipolla sono usate come spezie o per il consumo fresco da molte comunità, in aggiunta alle colture conosciute. Ne sono un esempio l'aglio cinese o giapponese (*A. macrostemon*), l'aglio di Napoli (*A. neapolitanum*), l'aglio orsino (*A. ursinum*), l'aglio serpentino (*A. victorialis*), l'aglio del Canada (*A. canadense*), il porro selvatico (*A. tricoccum*), *A. altaicum*, *Allium polyanthum* (Fig. 2). Per esempio, in Nord Corea si coltiva commercialmente *A. komarovianum*, a Cuba *A. canadense* (Hanelt, 2001), in Canada e USA *A. tricoccum* (Davis e Greenfield, 2002), *A. ramosum* in Asia orientale e centrale (Fritsch e Friesen, 2002). Altri sono raccolti dalle popolazioni naturali per fini commerciali o semi-commerciali (e.g., *A. pskemense*, *A. obliquum*, *A. altaicum*, *A. nutans*). *Allium* selvatici sono usati dalla medicina popolare, come *A. ramosum*, consigliato per problemi cardiaci, per punture di insetti e morsi di cani e serpenti, oltre che per accelerare la coagulazione del sangue, *A. ursinum* e *A. victorialis* sono usati come antimicrobici per le infezioni allo stomaco (Sklyarevsky, 1975).

Durante la seconda guerra mondiale, alcune specie selvatiche di *Allium* sono state studiate in URSS al fine di identificare nuovi ortaggi e fonti vitaminiche (Baitulin *et al.*, 1986; Khassanov e Umarov, 1989). Nelle regioni rurali dell'Asia centrale, infatti, si consumano a questo scopo, in inverno, *A. motor*, *A. caesium*, e *A. pskemense*; fiori di *A. jodanthum* vengono posti in alcol e usati come antisettici.



Figura 2: Il porraccio (*Allium polyanthum* Schult & Schult), chiamato aglione in Campania. © Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste (http://dryades.units.it/euganei/index.php?procedure=taxon_page&id=6917&num=335)

1.1.1 L'aglio (*Allium sativum*)

L'aglio il cui nome deriva dal celtico "All" che significa piccante, è una pianta originaria dell'Asia centrale che ha trovato la massima diffusione nel Mediterraneo. Fin dai tempi più antichi veniva usato dagli Egiziani, Greci e Romani oltre che in cucina nella medicina popolare, per le sue proprietà terapeutiche. E' coltivato in molti Paesi del mondo raggiungendo una produzione complessiva di 2.700 milioni di tonnellate.

I Paesi maggiori produttori sono la Cina, la Corea del Sud, la Spagna e l'India. In Europa viene coltivato principalmente in Spagna, in Francia, in Grecia e in Italia dove raggiunge una superficie intorno ai 5.000 ha, con una produzione di circa 45 mila tonnellate. Le Regioni italiane maggiormente interessate alla coltura sono nell'ordine: Campania, Emilia Romagna, Veneto, Sicilia, Piemonte e Puglia con rese medie di 9,5 t/ha.

La coltura ancora oggi è scarsamente meccanizzata, sia per le operazioni di semina che di raccolta e quindi ha un alto costo di produzione. Gli elevati costi di manodopera e la sua scarsa disponibilità limitano l'espansione della coltura anche a livello nazionale e la rendono incapace di competere con le produzioni di altri Paesi dove la manodopera ha un minore costo. L'offerta mondiale di aglio è in forte crescita soprattutto per l'espansione produttiva della Cina ed esiste una forte concorrenza del prodotto estero reperibile sul mercato a prezzi nettamente inferiori.

Riguardo al materiale coltivato, più che di varietà si tratta di ecotipi, più o meno omogenei, ad esclusione del "Rosso di Sulmona", che sembra essere l'unica varietà italiana in grado di produrre, ogni anno, gli scapi fiorali (Tab.1).

Il prodotto italiano veniva esportato in Francia e Germania, ma negli anni si è assistiti a un calo dell'esportazione a causa dei prezzi concorrenziali della Spagna, dei Paesi del Bacino del Mediterraneo e più recentemente da alcuni Paesi dell'Est Europeo e dell'America Latina. Gli agricoltori potranno fronteggiare tale situazione riducendo i costi di produzione, attraverso un aumento dell'attuale limitato grado di meccanizzazione e organizzando meglio la commercializzazione (Raineri, 2002).

CODICE	DENOMINAZIONE	TIPO IBRIDO	CODICE RESP.	EVENTUALI SINONIMI	DECRETO MIN. DI ISCRIZ.	DECRETO MIN. DI ULTIMA REISCR.
2605	Avorio		a1198		17/01/2004	17/02/2015
2975	Belriguardo		a518		26/11/2009	
2889	Bianco Delicato		a1198		22/07/2009	
37	Ottolini		173		06/01/1982	23/04/2014
3290	Pallavicino		b1342		03/07/2012	
1986	Rosso di Sulmona		a1404		26/11/2009	
2209	Serena		a173		21/02/1994	17/02/2015

Tabella 1: Varietà di aglio iscritte al registro nazionale (al 20/01/2017). <http://www.sementi.it/registri-varietà>

E' stato osservato che l'aglio ha un effetto diuretico, e oggi è stato appurato che, se usato in maniera corretta, l'aglio riduce la pressione sanguigna (Steiner *et al.*, 1996), fa diminuire l'aggregazione delle piastrine (Steiner e Lin, 1998) e protegge dai danni dell'LDL le cellule dell'endotelio dei vasi (Ide e Lau, 1997): tutti questi effetti sono un potenziale benefit per il cuore.

1.1.2 Il porro (*Allium ampeloprasum*)

Il porro coltivato, *A. ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J. Gay, è tetraploide, allogamo (McCollum, 1987; Ved Brat, 1965) con il 20% di autogamia (De Clercq *et al.*, 2003) e viene coltivato in tutto il mondo per la sua tolleranza alle basse temperature. Le irregolarità nella meiosi determinano errori di segregazione che interferiscono con la fertilità fiorale e la qualità del seme (Khazendari e Jones, 1997).

Pianta biennale coltivata a ciclo annuale, il porro non si trova allo stato spontaneo, presenta un bulbo poco sviluppato o assente, foglie allungate (con portamento eretto o ricadente, di colore da grigio-verde a verde-bluastro) con piccioli avvolgenti alla base, formando un falso fusto più o meno allungato (da 15 a 40 cm). Presenta un apparato radicale fascicolato, con molte radici che si possono spingere fino a 50 cm circa di profondità. Il fusto è accorciato a formare un disco appiattito, da cui si dipartono le foglie e le radici. Lo stelo fiorale viene emesso nel secondo anno, in aprile-maggio; è

pieno e termina con un'infiorescenza sferica (6-8 cm di diametro) protetta da una spata univalve e caduca; sono presenti 300-400 fiori pedunculati, con tepali di colore bianco, rosa o lilla. I semi sono neri, angolosi e grinzosi: 1000 semi pesano circa 2,5-3,3 g (Tesi R., 1994).

Una sua variante molto diffusa è il *Kurrat*, *A. ampeloprasum* var. *kurrat* Schweinf. ex Krause (Fig. 3) distribuito in estremo e medio oriente e largamente utilizzato in Egitto (Brewster, 1995).



1.1.3 L'Aglione (*A. Ampeloprasum* var. *Holmense*)

L'aglione (con molta probabilità *A. ampeloprasum* var. *holmense* (Mill.) Asch. et Graebn) è per Guenaoui *et al.* (2012), sinonimo di *great headed garlic* (GHG), *elephant garlic*, *big tex garlic* o *tahiti garlic*: ha grandi bulbilli e un bulbo molto più grosso (fino a 600g) rispetto all'aglio comune. Data la sua similarità, almeno a livello fenotipico, rispetto agli *Allium* sopracitati, trasleremo i discorsi fatti su questi all'aglione, dato che ancora pochi studi sono stati fatti sull'aglione stesso.

Figura 3: il kurrat

Questo ortaggio è considerato una cultigen, propagata vegetativamente, con ombrella fiorale di notevoli dimensioni solitamente sterile, e originatosi nel Bacino del Mediterraneo. L'aroma dei bulbilli è più delicato, ma molto simile a quello dell'aglio, di cui viene usato come sostituto. La notevole dimensione delle piante e del diametro dei bulbi è apparentemente associato alla poliploidia (4x, 6x o 8x) (Fritsch e Friesen, 2002; Hanelt, 1990; McCollum, 1987). La principale fonte di perdita di resa per il GHG è rappresentata dai bulbilli per la propagazione vegetativa. La mancanza di differenze genomiche nelle sequenze ripetute così come nelle disgiunzioni irregolari dei cromosomi durante la meiosi, associate alla sterilità fiorale, fa propendere verso l'autopoliploidia piuttosto che all'alloploidia (Guenaoui *et al.*, 2012). Ciò nonostante, dato che sia l'*Allium ampeloprasum* selvatico che le varietà locali di GHG si trovano contemporaneamente nella regione mediterranea, si suppone che la cultigen sia un ibrido delle due "specie" (Figliuolo e Mang, 2010). L'aglione ha una crescita e uno sviluppo del bulbo come l'aglio comune, ma a maturità forma lo scapo fiorale a differenza delle varietà di aglio "*softneck*", però, come indica il nome, l'aglione o elephant garlic, a maturità è molto più grande rispetto all'aglio: un singolo spicchio può essere più grande di un intero bulbo di aglio comune (Boyhan *et al.*, 2000).

Come entrambi i disciplinari di produzione affermano (www.aglione.it e www.aglionevaldichiana.net), l'Aglione della Val di Chiana è una pianta orticola con bulbi di colore bianco-avorio

senza striature di altri colori, di forma regolare e compatta, leggermente appiattita nel punto di inserimento dell'apparato radicale.

Il bulbo è di forma rotondeggiante - regolare con un leggero appiattimento della parte basale, di colore bianco-avorio. Il bulbo è costituito da un numero di spicchi (bulbilli) variabile tra due e sei che risultano tra loro uniti in maniera compatta e con caratteristica curvatura della parte esterna. Le tuniche che li avvolgono hanno colorazione giallognola sia nella parte concava che in quella convessa.

Le foglie sono alla base amplessicauli mentre distalmente sono lineari-nastriformi, acuminate, leggermente carenate, lunghe fino a 50 cm e larghe alla base anche 3 cm, di colore verde-grigiastro glaucescente con pagina inferiore più chiara; carnose, tenere, ricoperte di un materiale ceroso, con stomi in entrambe le pagine e portamento più o meno eretto. La prima foglia basale, quella più esterna, avvolge per circa 10 cm la seconda, che a sua volta avvolge la terza foglia interna per una ventina di centimetri; così procedendo si verifica che le foglie più interne sono avvolte per una lunghezza progressivamente crescente. A partire dalla settima foglia si forma un falso stelo cilindrico, abbastanza consistente e alto 25 – 30 cm (Fig. 4).



Figura 4: Una pianta di Aglione a maturità

Lo scapo florale è cilindrico, pieno, ricurvo in età giovanile, mentre in piena fioritura è eretto e può raggiungere un'altezza di 60 - 80 cm. Porta apicalmente un'infiorescenza ad ombrella avvolta da una brattea o spatula univalve appuntita, lungamente rostrata, che si fende da un lato rimanendo però attaccata allo scapo. L'ombrella porta 150 - 200 piccoli fiori ermafroditi, attinomorfi, proterandri, sostenuti da un esile pedicello e di colore variabile dal bianco, al rosa, al porporino. Il perigonio costituito da 2 verticilli, ciascuno formato da 3 tepali lanceolato – acuminati, saldati alla base e persistenti nel frutto; l'androceo presenta 6 stami, disposti su 2 verticilli, con antere dorsifisse incluse nel tubo del

perigonio; il gineceo è costituito da un ovario supero, triloculare, sincarpico con un solo stilo dritto, filiforme, terminante con uno stigma intero (Fig. 5).



Figure 5: L'infiorescenza dell'Aglione, molto gradita ai pronubi. Presso Gianfranco Pinzi, Chianciano Terme

All'atto dell'immissione in commercio l'Aglione della Val di Chiana deve presentare bulbi:

- Sani, consistenti, puliti, in particolare privi di terra e di residui visibili di fertilizzanti o di antiparassitari;
- Esenti da danni da gelo o da sole, da tracce di muffa e da germogli esternamente visibili;
- Privi di odori e sapori estranei e di umidità esterna anormale.

Rispetto all'aglio (*Allium sativum*) il GHG ha mostrato maggior contenuto in amminoacidi essenziali (EAA – Essential Amino Acids) e non essenziali (EAA), ad eccezione dell'acido aspartico nelle foglie e dell'arginina nel bulbo (Fig. 6) e anche una maggior concentrazione di sostanze antiossidanti come flavonoidi e polifenoli, mentre i tannini sono simili (Najda et al., 2016).

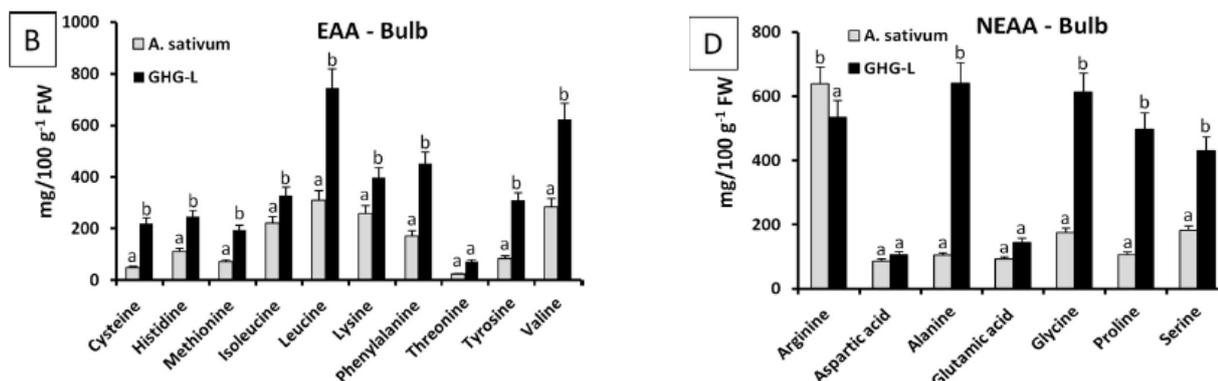


Figura 6: Il contenuto in amminoacidi essenziali (B) e non essenziali (D) in aglio e Great Headed Garlic. Da Najda et al., 2016

1.1.3.1 Pratiche colturali

Con la preparazione del terreno il suolo deve essere rovesciato, per interrare ogni residuo colturale: questa operazione va fatta due/quattro settimane prima della preparazione finale del terreno e della semina. Il pH consigliato per queste colture è tra 6.0 e 6.5; si consiglia anche un letto leggermente rialzato, una baulatura, come si fa per la cipolla. Dalle interviste con gli agricoltori è emerso che le distanze adottate sono molto variabili, da 20-25 cm sulla fila e 40-45 cm tra le file, passando a 25-30 x 70 cm o a 150x150 cm, sesto che permette la meccanizzazione della coltura e fa in modo che le foglie non si tocchino, così da non trasferire malattie, soprattutto la botrite. La profondità di semina è di 2-3 cm, e il bulbillo va posizionato rispettando la polarità, in maniera tale da velocizzare il germogliamento, anche se non sembra fondamentale: ciò ridurrebbe notevolmente i problemi di un trapianto meccanizzato. Tutti concordano sul piantare "spicchi" più grandi possibili, uno degli agricoltori dice: "Pianto solo i bulbi più grandi, intorno ai 70g, per produrre capi più grandi, riuscendo così a produrre 4 quintali, nelle annate favorevoli, in 1500 m quadri. Per questa superficie, la quantità di "seme" con sesto di 1,5x1,5 m è di 3000 spicchi, quindi circa 70 kg.

L'aglio, il porro e le altre specie del genere *Allium* sono grandi consumatori di nutrienti, per cui richiedono una notevole fertilizzazione dei suoli, data anche la durata del ciclo. Nei terreni normalmente poveri di Zolfo, non molto comuni in Italia, questo nutriente deve essere necessariamente apportato. Dei vari coltivatori pochi concimano e quasi tutti con letame, sconsigliato perché favorisce i marciumi, che sarebbe meglio apportare infatti alla coltura precedente. La coltura richiede invece discreti apporti di azoto, intorno ai 60-65 kg all'anno, da somministrare in modo localizzato in almeno due/tre interventi a partire da febbraio e fino a maggio, e dai 35 ai 60 kg di fosforo (P₂O₅) e potassio (K₂O), a seconda dei livelli residui nel terreno (Boyhan et al., 2000).

La semina va effettuata dagli inizi di Ottobre fino a Dicembre, entro gennaio al massimo, pena la produzione di capi piccoli: molto dipende dalla transitabilità dei campi. L'aglio e l'aglione producono bulbi suddivisi in sezioni ben definite che vengono chiamate "spicchi": è attraverso di essi che queste colture vengono riprodotte per via vegetativa. Per poter ottenere il "seme" è quindi necessario rimuovere la piastra basale e suddividere il bulbo, o capo, con quella che viene detta "sgranatura" che è molto onerosa in termini di manodopera. I bulbi che non sono riusciti a formare spicchi nella stagione precedente (volgarmente chiamati "cipolle") sono, a detta di tutti gli agricoltori, il miglior materiale per dare origine a bulbi di notevole dimensioni (oltre a non poter essere utilizzati in cucina perché il sapore è molto più pungente). Come abbiamo già affermato in precedenza, la maggior parte dei campi investiti con questo tipo di colture, infatti, può essere considerata come costituita da popolazioni clonali della stessa varietà, poiché l'aglio non produce semi vitali in quanto è auto-incompatibile. Questo rende tale coltura molto più vulnerabile alle malattie, sia biotiche che abiotiche. D'altra parte, però, i propaguli vegetativi sono molto facili da maneggiare e costituiscono una grossa fonte di riserve che facilita la ripresa della pianta che presenta un'emergenza estremamente alta.

Per queste colture è fondamentale il controllo delle infestanti, poiché le specie del genere *Allium* sono poco competitive: le lavorazioni vengono eseguite o manualmente, date le superfici ridotte, o attraverso motocoltivatori, almeno una volta al mese. Non si evidenziano, invece, particolari problemi dovuti ad insetti.

Una volta che sta emergendo lo scapo florale questo deve essere reciso affinché non peggiori la qualità e la dimensione del capo e addirittura non formi spicchi. Gli scapi recisi possono comunque essere utilizzati in cucina, specie se ancora teneri e possono costituire un importante sottoprodotto.

La raccolta avviene tra Giugno e Luglio, non appena le foglie cominciano a ingiallire, affinché il capo non si rompa o marcisca (Fig. 7). La durata del ciclo è quindi di 210-240 giorni. A questo punto l’Aglione deve essere fatto seccare per almeno un paio di settimane al riparo dai raggi solari (la perdita di umidità troppo repentina porta alla rottura delle tuniche esterne con conseguente deprezzamento) in luoghi freschi e asciutti, dove perde anche il 30% del peso.



Figure 7: Particolare della raccolta meccanizzata, tramite macchina sviluppata da Mauro Vegni, Montisi

1.1.3.2 Il territorio: la Val di Chiana

La valle ebbe origine nel periodo miocenico (era terziaria) come parte dell'arcipelago toscano. Nel periodo successivo detto pliocenico (ultimo dell'era quaternaria) le terre marginali emersero dal mare

e si alzarono in diversi rilievi divisi da profonde depressioni con formazioni di argille, conglomerati e sabbie gialle. Essa conservò a lungo questo aspetto di golfo tirrenico comprendente anche il Trasi-meno nel quale il Tevere sfociava sotto il colle di Città della Pieve. Una profonda mutazione oroge-netica si ebbe quando scaturirono dal fondo i vulcani Vulsinii con quattro grossi crateri, i quali con le loro colate basaltiche ed eruzioni tufacee costituirono una barriera trasversale. Allora le acque si raccolsero in una conca più stretta adducete a Nord al bacino del Valdarno superiore e a Sud alla depressione del Paglia. Un sollevamento del fondo prodotto dai detriti di fiumi e torrenti portò ad una provvisoria sistemazione della valle con tipica conformazione lacustre e vaste aree semi-paludose; queste restringendosi spontaneamente fino a prosciugarsi per intervento congiunto dell'uomo e della natura. Si è giunti, quindi, all'attuale assetto schematizzabile in tre zone altimetriche: fondovalle pia-neggiante per kmq 350, poggi e ripiani intermedi per kmq 500, alta collina e montagna kmq 210 (www.valdichiana.it).

La Val di Chiana descritta in questo sito corrisponde grossomodo a quella dell'antico bacino Clanis Aretinum ricordato da Plinio il Vecchio (Hist. Nat. III, 52-54) ed il suo territorio è attualmente sud-diviso in 20 comuni di cui 8 in provincia di Siena: Cetona, Chianciano Terme, Chiusi, Montepulciano, San Casciano dei Bagni (in parte), Sarteano, Sinalunga e Torrita di Siena; 8 in quella di Arezzo: Cortona, Castiglion Fiorentino, Civitella in Val di Chiana, Foiano della Chiana, Lucignano, Marciano della Chiana, Monte San Savino e Arezzo (in parte); vanno, inoltre, considerati lembi di territorio umbro appartenenti ai comuni di: Castiglione del Lago, Città della Pieve e Tuoro (in parte) in provin-cia di Perugia ed infine Monteleone d'Orvieto e Fabro in provincia di Terni (Fig. 8).

Così circoscritta l'area ha una forma assai allungata in direzione Nord-Sud e occupa oltre 800 kmq. E' racchiusa tra le colline umbre e i monti cortonesi a Est ed il vario sistema collinare-montano che si eleva quasi parallelamente a Ovest del solco longitudinale della valle separandola dalla Val d'Orcia e dalla Val d'Asso. Questo sistema raggiunge le massime elevazioni con il monte Cetona (1148 m s.l.m.), il poggio di Pietraporciana 847 m s.l.m. e il colle della Maddalena 824 m s.l.m.; sull'altro versante emerge l'Alta di sant'Egidio 1056 m s.l.m., da cui discendono i monti Spino 952 m s.l.m., Cùculo 923 m s.l.m. e Ginezzo 828 m s.l.m., contrafforti della catena montuosa che divide la Val di Chiana dall'alta valle Tiberina.



Figure 8: La Val di Chiana (www.aglione.it)

Le variazioni altimetriche sono alquanto modeste, insignificanti, poi se riferite alla linea longitudinale più depressa della valle che si mantiene intorno ai 250 m s.l.m.. I limiti geografici quasi coincidono con il brusco cessare di tale caratteristica: infatti a Nord della Chiusa dei Monaci il piano comincia ad essere solcato da corsi d'acqua e a Sud della stretta di Olèvole il Chiani, attraverso una angusta e profonda incisione, scende rapidamente al Paglia a quota 111 m s.l.m.. L'argine di separazione costituisce una sorta di spartiacque artificiale: all'altezza della stazione ferroviaria di Chiusi separa la Val di Chiana toscana a Nord dalla Val di Chiana romana a Sud (limitata a lembi di territorio di Città della Pieve e di Fabro) che percorsa dal collettore Chianetta che si unisce al torrente Astrone (presso la stazione di Città della Pieve dove un tempo vi era un lago) dando luogo al già citato Chiani, subaffluente del Tevere, che raggiunta la stretta di Olèvole si congiunge col torrente Sorra e lascia la Valle.

Il torrente Astrone è l'unico della Valle che corre da Nord a Sud attraversando i comuni di Cetona, Montepulciano e Chianciano mentre il Tresa, che corre tutto in territorio umbro, e che anticamente scaricava le sue acque sul Trasimeno fu artificialmente deviato portandolo a sfociare nel lago di Chiusi e rendendolo quindi tributario dell'Arno.

La Valle prosegue a Nord comprendendo i "chiari" di Chiusi e di Montepulciano, quindi si allarga nel lungo fondovalle senese-aretino inframezzato da formazioni basso-collinari fino a raggiungere la massima estensione latitudinale (dalla Val d'Esse a Sinalunga), prosegue in territorio aretino tra Monte San Savino e Castiglion Fiorentino dove vi confluisce la valle di Chio, per poi terminare nella goletta di Chiani.

Nel corso del medioevo, le Città-Stato che maggiormente operarono nella valle furono Orvieto, Arezzo, Perugia, Siena e Firenze. Tutte dovettero fare, più o meno concretamente i conti con il grande problema di questo territorio: ovvero il dissesto idrologico che aveva provocato il progressivo impaludamento della zona.

Il fiume Chiana (o Clanis), che come attestano gli scrittori classici era al tempo degli etruschi e dei romani perfettamente navigabile, con una evoluzione quasi naturale, tendeva ad invertire il proprio corso dal Tevere all' Arno. A causa dei grandi interessi che via via si erano creati nella valle, le due città che si dovettero occupare maggiormente del problema furono quelle che per più tempo si divisero ed alternato il dominio sul territorio della Val di Chiana e cioè Siena e Firenze. La frammentarietà degli interventi, causata dalla precaria stabilità politica che caratterizzò il periodo medioevale e il primo Rinascimento, fu un ostacolo notevole alla necessaria opera di bonifica. Solo quando, con la caduta di Siena nel 1554, tutto il territorio passò sotto il dominio dei Medici, poté essere approntato un piano coordinato e completo di bonifica. Si occuparono dei lavori nella valle tutti i maggiori artisti e studiosi del '500, da Leonardo Da Vinci ad Antonio da Sangallo, a Baldassarre Peruzzi a Vignola etc., che realizzarono anche molte opere pubbliche e private. Nel 1737 l'opera di bonifica passò dalle mani dei Medici a quelle dei Lorena, che dettero un contributo concreto al raggiungimento dello scopo, inquadrando il discorso in un ampio panorama di politica territoriale. La bonifica integrale sarà portata a compimento nel ventennio fascista. Un progetto di colmata dei due laghi residui di Chiusi e Montepulciano approvato nel 1918, non fu fortunatamente attuato (www.valdichiana.it).

1.1.3.3 La storia

L'aglio è stata una delle prime piante utilizzate per curare le malattie e migliorare la salute, è stato infatti trovato nelle Piramidi egiziane come nei templi greci. Nel *Codice Ebers*, il trattato medico più autorevole del periodo (Bergner, 1996), già si indica l'aglio come possibile trattamento per le crescite anormali, quindi neoplasie e ascessi oltre che per malattie dell'apparato circolatorio, malaria e infestazioni da insetti e parassiti.

Ippocrate, universalmente riconosciuto come il padre della Medicina, aveva sempre l'aglio all'interno del suo armamentario terapeutico e lo utilizzava per disturbi polmonari, come un disinfettante o purgante e per rigonfiamenti addominali, specialmente uterini (Moyers, 1996).

Queste conoscenze passarono direttamente ai Romani: la massima autorità in campo medico era infatti Dioscoride (Bergner, 1996; Riddle, 1996), un greco che servì Nerone come capo medico dell'esercito. Egli era l'autore di un trattato in cinque volumi in cui raccomanda l'aglio per "pulire le arterie", anche se la circolazione sanguigna sarebbe stata scoperta molti secoli dopo, e per i disordini del tratto gastrointestinale, per i morsi di animali, per le malattie comuni e per le convulsioni. Non poteva poi mancare la testimonianza di Plinio il Vecchio con la sua *Historia naturalis*, in cui sono descritti 23 modi per utilizzare l'aglio contro i vari disturbi: tra questi c'è la credenza che l'aglio protegga dalle tossine e dalle infezioni, che ha trovato conferma attraverso gli studi sull'attività del P₄₅₀-2E1 e su altre malattie degenerative del fegato (Block, 1985; Pinto e Rivlin, 1999).

Anche in Oriente, maggior fonte di biodiversità per l'aglio, questo viene usato sin da tempi antichissimi, dal 2000 A.C. in Cina, dove faceva parte della dieta, nel senso che veniva usato giornalmente, in particolar modo se consumato insieme alla carne cruda (Kahn, 1996; Moyers, 1996), perché si riteneva che avesse un'attività conservante. Nella Medicina cinese l'aglio veniva prescritto per aiutare la respirazione e la digestione, fondamentale contro la diarrea e i vermi (Woodward, 1996): ci sono prove che questo venisse usato anche contro la spossatezza, l'emicrania, l'insonnia, la tristezza e la depressione, oltre che per ripristinare e aumentare la fertilità maschile (Kahn, 1996).

Durante il Medioevo veniva usato nelle bevande per combattere la stipsi, e si consigliava chi lavorava all'aperto di usare l'aglio per prevenire gli infarti (Kahn, 1996; Moyers, 1996). Al contrario le classi più elevate tendevano ad evitare l'aglio e a non ritenerlo utile per la propria salute.

Un'importante medico durante l'ultima parte del dodicesimo secolo, la badessa di Rupertsberg, Santa Ildegarda Von Bingen (Bergner, 1996; Khan, 1996), è curiosamente arrivata alla conclusione che l'aglio crudo aveva più effetto rispetto a quello cotto, forse per l'odore meno pungente di quest'ultimo.

Nel XVI secolo, quindi in pieno rinascimento, Pietro Mattioli, senese, divenne un medico affermato, i cui lavori vennero tradotti in molte lingue. Egli prescriveva l'aglio per i disordini intestinali dovuti ai vermi, per i problemi ai reni così come per le madri durante i parti difficili (Moyers, 1996).

Per quanto riguarda l'Aglione le tracce sono molto più recenti ed è spesso difficile distinguere se gli autori parlano di aglio comune, ma più grande, di sugo all'aglione o della pianta a cui ci riferiamo oggi.

In ordine cronologico il primo a parlarne è Cristoforo di Messisbugo, cuoco presso gli Estensi di Ferrara, nel libro postumo "Banchetti composizione di vivande e apparecchio in generale" (1549): «Aglione sopra pesci, rane, lumache e altro simile...».

Segue Tommaso Garzoni, scrittore enciclopedico, ne "La Piazza Universale di tutte le professioni del mondo", 1585: «...così i sapori vari e diversi come il Francese o Imperiale [...] l'agliata, l'aglione, l'agresto...».

Più recentemente Michele Tenore, nella "Flora medica universale e flora particolare della provincia di Napoli", tomo I, Napoli 1822: «Nascono ambedue le varietà lungo i margiuni de' campi, e più frequentemente la prima in Ischia; ove si conosce col nome di aglione...».

Ne "L'Etruria; Studj di Filologia di Letteratura di Pubblica Istruzione e di Belle Arti" del 1851 compare "L' Ajone. Favola narrativa burlesca di Michelangelo Buonarroti": «Che fanno ai fondi dell'Aglione il trogo: / Aglione è 'l montie ov'ha Figlin alberge / Ch'al castel di Gambassi sta sul tergo...».

Gentile Sermini, novelliere senese del XV secolo, le cui "Novelle" sono state pubblicate integralmente solo nel 1874, dice: «[...] e così vorrebbe il forte aglione con capponi o fagiani o starne, come col vieto lardo che usava il contado...».

Le notizie si perdono poi fino ai giorni nostri e l'Aglione ricompare in Val di Chiana a partire dagli anni '90 del secolo scorso, grazie ad alcuni agricoltori che lo hanno rimesso in coltura.

1.1.3.4 Mercato, Usi e Proprietà

La maggior parte degli agricoltori che coltivano l'Aglione vendono il prodotto sui mercati locali, tranne qualche caso, riuscendo a spuntare un prezzo al kg che parte da 15 e arriva fino a 25-30 euro, a seconda della qualità del bulbo e delle forme di confezionamento (treccie, mazze, scatole, bulbi singoli). Il prezzo è ritenuto comunque insoddisfacente dagli agricoltori dati i costi, principalmente dovuti al seme, alla scarsa meccanizzazione e alla durata della coltura (circa 8 mesi). Fino a pochi anni fa si riteneva che il mercato si sarebbe saturato a causa dell'incremento dell'autoproduzione da parte della popolazione locale, ma, ad oggi, il mercato è tutt'altro che saturo: nonostante le superfici siano aumentate esponenzialmente, l'Aglione si trova nei mercati al massimo per un paio di mesi

dopo la raccolta, dopo i quali diventa una rarità. Parallelamente il prezzo al Kg tende ad aumentare, anche visto il considerevole calo di peso a cui è soggetto. Si ritiene inoltre che, date le notevoli proprietà, l'Aglione possa facilmente diffondersi sul mercato nazionale ed internazionale, come alcune esperienze favorevoli hanno dimostrato (Fig. 9).

Dai racconti e dalla tradizione l'aglione sembrerebbe non generare allergia, non ha sapore forte e pungente, data probabilmente la diversità chimica rispetto all'aglio, ma se ingerito in notevoli quantità (200g), può avere come conseguenze notevoli cali di pressione, cosa che invece lo accomunerebbe all'aglio (studi in questo senso sono in corso all'Università della Tuscia). L'aglione è sostituito all'aglio in molte ricette della tradizione toscana, perché più dolce ed è fondamentale per i picci all'aglione, appunto, una pasta tipica del senese, stesa a mano e fatta solo con acqua e farina.

Anche lo scapo fiorale, comunemente detto germoglio o tallo, è risultato commestibile (Fig. 10) e dal sapore molto forte se consumato crudo o delicato se consumato dopo essere stato leggermente sbollentato, similmente ai germogli di aglio. Ciò potrebbe costituire un ulteriore prodotto vendibile della



Figure 9: semente di aglione in vendita online, di provenienza non certa. Da <http://www.ortomio.it>



Figura 10: Bocconcini di vitello con salsa all'aglione e chips di patate viola. Si ringrazia la 4B Enogastronomia e la Prof. Tiezzi dell'Istituto Alberghiero di Chianciano Terme

coltura che la renderebbe ancora più economicamente sostenibile, dato che gli scapi pesano molto e si conservano abbastanza a lungo.

1.1.3.5 Il rischio di erosione genetica: aggiornamenti

Attribuire in maniera oggettiva il grado di erosione genetica ad una risorsa sta diventando necessario per poter applicare politiche pubbliche ed elargire contributi economici con l'obiettivo della conservazione della biodiversità agricola. Ad esempio, nel caso della ormai vecchia Misura 214 del Piano di Sviluppo Rurale, oggi operazione 10.1.5 (www.regionetoscana.it), alle risorse a rischio possono essere dedicati opportuni contributi per la loro conservazione; o ancora per iscrivere una varietà o razza al Repertorio regionale, laddove esistente, o al Registro Nazionale come varietà da conservazione è necessario che questa risorsa sia a rischio di erosione. Ad oggi, in Italia, è stato fatto qualche tentativo pratico di definizione dei criteri di valutazione dell'erosione: in Toscana, la quantificazione del rischio spetta ad un'apposita Commissione, prevista dalla Legge Regionale, che stabilisce caso per caso. Il Piano nazionale sulla biodiversità di interesse agricolo propone l'utilizzo dei seguenti 9 fattori di rischio, ritenuti quelli di più facile determinazione:

1. Numero di coltivatori
2. Età dei coltivatori
3. Superfici coltivate in rapporto alla superficie regionale di settore
4. Distribuzione delle superfici coltivate
5. Tipologia di mercato del prodotto
6. Ruolo dell'innovazione varietale per quella specie
7. Trend di nuovi impianti o coltivazioni
8. Presenza nei Registri e/o Cataloghi nazionali
9. Presenza di iniziative di conservazione *ex situ*

Il livello di rischio per ogni fattore è suddiviso in tre classi: basso, medio, alto. Per ognuno dei fattori di rischio sono state individuate condizioni di corrispondenza ai tre livelli di rischio e sono stati assegnati dei valori (con una scala da 1 a 3). Ovviamente, disponendo di informazioni più dettagliate sui vari parametri è possibile articolare la scala di valori in modo diverso e sempre più preciso. Al fine di stabilire in sintesi il livello di rischio attribuibile a ciascuna risorsa genetica, i valori relativi ai

diversi parametri sono sommati per ottenere il livello complessivo di rischio (MIPAAF, 2013). Ne deriva la seguente scala, che deve essere assunta a titolo indicativo:

- rischio basso: valore complessivo inferiore/uguale a 9
- rischio medio: valore complessivo compreso tra 9 e 18
- rischio alto: valore complessivo superiore a 18

Per l'Aglione, nel 2015, anno della precedente tesi, il rischio era 22 (Terzaroli, 2015). Ad oggi il rischio stimato è 15 ed è in rapido calo. Ciò è dovuto alla presenza di nuovi impianti : il numero dei produttori è sicuramente superiore a 30 (12 sul sito www.aglione.it più altri 25 circa sul sito www.agliovaldichiana.net, più tanti piccoli produttori non censiti) che si collocano in media tra i 40 e i 70 anni; superfici (% su superficie regionale del settore) forse superiori all'1%, con piante non più isolate in orti familiari, ma ormai destinate alla produzione vera e propria con appezzamenti che arrivano ad un ettaro. Attraverso la commercializzazione e il marketing l'aglione è arrivato in tutta Italia dove sicuramente verrà riseminato (come è stato espressamente dichiarato dagli acquirenti), anche se in quantità limitate e da agricoltori "dilettanti". Come detto in precedenza, il mercato è in rapida crescita e verrà presto iscritto al Registro Nazionale delle Varietà da conservazione: a questo proposito la Regione Toscana dovrà sicuramente costituire una collezione, che sarà *in situ*, date le difficoltà nella conservazione dei bulbi e bulbilli. Non c'è stata innovazione varietale, per cui ancora non si hanno varietà competitive con quella locale (Tab. 2).

Tabella 2: Fattori di rischio di estinzione della risorsa e modalità di valutazione (MIPAAF, 2013). Le frecce rosse indicano la situazione al 2015, le blu quella attuale

Fattori di rischio	Descrizione	(grado di rischio)	Valore	
1. Numero coltivatori	Maggiore di 30	Basso	1	←
	Compreso fra 10 e 30	Medio	2	←
	Minore di 10	Alto	3	
2. Età media dei coltivatori	Minore di 40 anni	Basso	1	
	Compreso fra 40 e 70 anni	Medio	2	←
	Maggiore di 70 anni	Alto	3	←
3. Superfici (% su superficie regionale del settore)	Superiore al 1%	Basso	1	←
	Compresa fra 0,1 e l'1%	Medio	2	
	Inferiore a 0,1 % Piante isolate o coltivazioni in orti e giardini familiari	Alto	3	←
4. Distribuzione delle superfici coltivate e tipologie aziendali	Areali molto diversi, con diverse caratteristiche agro-climatiche	Basso	1	
	Areali limitati, con stesse caratteristiche agro-climatiche e medesime tecniche colturali	Medio	2	←
	Stessa azienda/stesso areale/unica tecnica di coltivazione	Alto	3	←
5. Tipologia di mercato del prodotto	Mercati e/o cooperative di produttori Varietà principali in Indicazioni Geografiche (IG)	Basso	1	
	Disponibile in piccole superfici a livello locale Varietà secondarie in IG	Medio	2	←
	Autoconsumo o a scopo di studio.	Alto	3	←
6. Ruolo dell'innovazione varietale	Assenza di varietà migliorate competitive con quella locale	Basso	1	←
	Persistenza della varietà locale solo per autoconsumo	Medio	2	←
	Rapida sostituzione varietà locale con varietà migliorate	Alto	3	
7. Trend nuovi impianti	Presenza nuovi impianti	Basso	1	←
	Assenza nuovi impianti	Alto	3	←
8. Presenza dei Registri/Cataloghi nazionali	Frutticole: varietà presenti nelle liste di varietà raccomandate delle diverse regioni e varietà iscritte al Registro Nazionale delle Varietà Vite: vitigni iscritti al Registro Nazionale delle Varietà di Vite (RNVV) e negli Elenchi regionali Orticole e piante agrarie: varietà iscritte al Registro Nazionale delle varietà da conservazione e/o prive di valore intrinseco	Basso	1	
	Vite: vitigni in corso di iscrizione al RNVV e negli Elenchi regionali Materiale disponibile presso pochi riproduttori e vivaisti	Medio	2	←
	Frutticole: varietà non inserite nelle liste varietà raccomandate e non iscritte al Registro Nazionale delle Varietà Vite: vitigni non iscritti al RNVV e negli Elenchi regionali Orticole e piante agrarie: non iscritte al Registro Nazionale delle Varietà da conservazione e/o prive di valore intrinseco Nessuna riproduzione per distribuzione extraziendale	Alto	3	←
9. Conservazione ex situ	Presenza di collezioni replicate almeno una volta	Basso	1	
	Presenza di una sola collezione	Medio	2	
	Assenza di collezioni	Alto	3	←

E' con piacere che si può affermare che l'Aglione della Val di Chiana ha un rischio medio di erosione genetica, e, a causa del sempre maggiore interesse nei suoi confronti, diminuirà ancora in maniera sensibile.

1.1.4 Varietà da conservazione

Con la “Conversione in legge, con modificazioni, del decreto legge 15 febbraio 2007, n. 10, recante disposizioni volte a dare attuazione ad obblighi comunitari ed internazionali”, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 84 dell'11 aprile 2007, fu precisato che per varietà da conservazione si intendono “le varietà, le popolazioni, gli ecotipi, i cloni e le cultivar di piante di interesse agricolo aventi le seguenti caratteristiche (almeno una):

- autoctone e non autoctone, mai iscritte in altri registri nazionali, purché integratesi da almeno cinquanta anni negli agroecosistemi locali;
- non più iscritte in alcun registro e minacciate da erosione genetica;
- non più coltivate sul territorio nazionale e conservate presso orti botanici, istituti sperimentali, banche del germoplasma pubbliche o private e centri di ricerca, per le quali sussiste un interesse economico, scientifico, culturale o paesaggistico a favorirne la reintroduzione

La direttiva e conseguentemente la disciplina nazionale, definiscono le deroghe applicabili alla registrazione delle varietà e alla commercializzazione delle sementi rispetto alle norme applicabili alle varietà convenzionali: la direttiva n. 145/2009 è stata recepita in Italia con il decreto legislativo n. 267 del 30 dicembre 2010, che disciplina tra l'altro l'iscrizione al registro nazionale delle varietà da conservazione (Santamaria e Ronchi, 2016).

Per quanto riguarda la registrazione, possono essere prese in considerazione prove non ufficiali e la descrizione può essere costituita da una lista di caratteri limitata, mentre l'omogeneità può essere inferiore a quella normalmente richiesta per l'iscrizione.

Nel caso delle varietà da conservazione viene inoltre previsto che sia identificata la regione di origine della varietà come la/e località dove essa è coltivata tradizionalmente e alle cui condizioni sia naturalmente adatta. Lì deve essere mantenuta e lì devono avvenire la produzione di sementi e la loro commercializzazione.

Le sementi sono soggette a controllo a posteriori e devono soddisfare i requisiti previsti per le sementi standard. Il quantitativo di sementi che si può commercializzare è limitato e per ciascuna specie o

gruppo di specie è previsto un quantitativo massimo che fa riferimento al fabbisogno necessario per seminare una determinata superficie (Tab. 3): questo potrebbe essere un problema in un futuro non troppo lontano, risolvibile iscrivendo l’Aglione non più come varietà da conservazione, ma come varietà orticola standard. Al momento l’Aglione non è ancora iscritto al Registro nazionale, ma sono in corso prove ufficiali per la registrazione come varietà da conservazione.

Nome botanico	Numero massimo di ettari per la produzione di ortaggi per varietà da conservazione
<i>Allium cepa</i> L. (varietà Cepa), <i>Brassica oleracea</i> L., <i>B. rapa</i> L., <i>Capsicum annum</i> L., <i>Cichorium intybus</i> L., <i>Cucumis melo</i> L., <i>Cucurbita maxima</i> Duchesne, <i>Cynara cardunculus</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., <i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Pisum sativum</i> L., <i>Vicia faba</i> L.	40
<i>A. cepa</i> L. (varietà Aggregatum), <i>A. porrum</i> L., <i>Allium sativum</i> L., <i>Beta vulgaris</i> L., <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. e Nakai, <i>Cucumis sativus</i> L., <i>Cucurbita pepo</i> L., <i>Foeniculum vulgare</i> Mill., <i>Solanum melongena</i> L., <i>Spinacia oleracea</i> L.	20
<i>A. fistulosum</i> L., <i>A. schoenoprasum</i> L., <i>Antriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm., <i>Apium graveolens</i> L., <i>Asparagus officinalis</i> L., <i>Cichorium endivia</i> L., <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex W. Hill, <i>Phaseolus coccineus</i> L., <i>Raphanus sativus</i> L., <i>Rheum rhabarbarum</i> L., <i>Scorzonera hispanica</i> L., <i>Valerianella locusta</i> (L.) Laterr., <i>Zea mays</i> L.	10

Tabella 3: Restrizioni quantitative alla commercializzazione di sementi di varietà da conservazione di cui all'art. 15 del D.L. 30/12/2010, n.267

1.1.4.1 Varietà locali

La salvaguardia della biodiversità riveste oggi un’elevata importanza su scala mondiale. Parte della biodiversità agraria è rappresentata dalle varietà locali (*landraces*). Una varietà locale può essere definita come “una popolazione variabile, comunque ben identificabile e che usualmente ha un nome locale. Non è stata oggetto di un programma organizzato di miglioramento genetico, è caratterizzata da un adattamento specifico alle condizioni ambientali e di coltivazione di una determinata area ed è strettamente associata con gli usi, le conoscenze, le abitudini, i dialetti e le ricorrenze della popolazione umana che l’ha sviluppata e/o continua la sua coltivazione” (Negri, 2005; PGR SECURE, 2012). In normativa, per le specie erbacee di interesse agrario, è stata introdotta per i Paesi della UE la Direttiva 98/95/CEE, che prevede la realizzazione della conservazione *on farm* e l’utilizzazione sostenibile delle risorse fitogenetiche, mediante la coltivazione e la commercializzazione di sementi coltivate in modo tradizionale e minacciate dall’erosione genetica. Tale normativa interessa tutte le risorse genetiche autoctone, definite dalle varie leggi regionali come specie, razze, varietà locali, cultivar, popolazioni, ecotipi e cloni originari del territorio regionale, oppure di origine esterna, purché introdotte da almeno 50 anni ed integrate tradizionalmente nella sua agricoltura; sono comprese anche le varietà locali attualmente scomparse dal territorio regionale, ma conservate presso orti botanici o centri di ricerca presenti in altre Regioni o Paesi.

Tutte le Regioni hanno operato sulla salvaguardia delle risorse genetiche autoctone partendo dalle specifiche emergenze del proprio territorio, anche attraverso apposite leggi regionali. La Regione Umbria ha varato la Legge Regionale 4 settembre 2001, n. 25 “Tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario”, che è entrata in vigore solo recentemente, mentre la Regione Toscana ha varato Legge Regionale n. 64 del 16 novembre 2004 per la Tutela e valorizzazione del patrimonio di razze e varietà locali di interesse agrario, zootecnico e forestale e sulla base della stessa ha indetto la “Rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche di specie vegetali ai sensi della L.R. 64/2004” secondo il Regolamento di attuazione LR 64/04, D.P.G.R. 1/03/2007, n° 12/R. Tutte le iniziative regionali hanno riguardato essenzialmente l’individuazione delle risorse, la loro caratterizzazione morfologica e genetica, la loro conservazione e la loro valorizzazione.

I registri regionali hanno un ruolo basilare nel sistema di tutela individuato dalle Regioni; in essi vengono iscritte le razze e le varietà locali, soprattutto quelle a rischio di estinzione. L’iscrizione ai registri avviene solo dopo la caratterizzazione della varietà locale sia dal punto di vista del legame con la cultura rurale locale e con la tradizione agraria del territorio, sia dal punto di vista morfologico e molecolare.

1.1.5 Indicazioni geografiche UE

A partire dal 1992, il Consiglio europeo ha adottato un quadro giuridico relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine dei prodotti agricoli e alimentari (regolamento CEE n. 2081/92) ed uno relativo alle specialità tradizionali garantite (regolamento CEE n. 2082/92). Tali prodotti beneficiano, dunque, di un sistema volontario di protezione che conferisce a produttori interessati la possibilità di proteggere determinate denominazioni attraverso la loro registrazione e l’ottenimento dei relativi diritti.

La volontà degli operatori di tutelare prodotti agricoli o alimentari identificabili in relazione all’origine geografica ha portato, fino ad oggi, alla registrazione di oltre 700 denominazioni di origine e indicazioni geografiche a livello comunitario a cui vanno aggiunte le indicazioni geografiche per il vino e le bevande spiritose (agraria.org).

L’Italia è il Paese europeo con il maggior numero di prodotti agroalimentari a denominazione di origine e a indicazione geografica riconosciuti dall’Unione europea (294 prodotti DOP,IGP,STG e 523 vini DOCG, DOC, IGT): ciò denota la grande qualità delle produ-

zioni nostrane, in virtù del forte legame che lega le eccellenze agroalimentari italiane al proprio territorio di origine.

Il sistema delle Indicazioni Geografiche dell'Ue, infatti, favorisce il sistema produttivo e l'economia del territorio; tutela l'ambiente, perché il legame indissolubile con il territorio di origine esige la salvaguardia degli ecosistemi e della biodiversità; sostiene la coesione sociale dell'intera comunità.

Allo stesso tempo, grazie alla certificazione comunitaria si danno maggiori garanzie ai consumatori con un livello di tracciabilità e di sicurezza alimentare più elevato rispetto ad altri prodotti.

1.1.5.1 DOP

La denominazione di origine protetta, meglio nota con l'acronimo DOP (Fig. 11), è un marchio di tutela giuridica della denominazione che viene attribuito dall'Unione europea agli alimenti le cui peculiari caratteristiche qualitative dipendono essenzialmente o esclusivamente dal territorio in cui sono stati prodotti.



Figura 11: il logo della DOP

L'ambiente geografico comprende sia fattori naturali (clima, caratteristiche ambientali), sia fattori umani (tecniche di produzione tramandate nel tempo, artigianalità, savoir-faire) che, combinati insieme, consentono di ottenere un prodotto inimitabile al di fuori di una determinata zona produttiva.

Affinché un prodotto sia DOP, le fasi di produzione, trasformazione ed elaborazione devono avvenire in un'area geografica delimitata. Chi fa prodotti DOP deve attenersi alle rigide regole produttive stabilite nel disciplinare di produzione. Il rispetto di tali regole è garantito da uno specifico organismo di controllo (regolamento CE n. 510/2006).

Per l'Aglione della Val di Chiana la DOP sarebbe la denominazione più appropriata, poiché questo vanta uno strettissimo legame con il territorio, alta qualità, unicità ed ogni fase del processo produttivo viene svolta all'interno della Val di Chiana stessa.

1.1.3.5.2 IGP

Il termine indicazione geografica protetta, meglio noto con l'acronimo IGP (Fig. 12), indica un marchio di origine che viene attribuito dall'Unione Europea a quei prodotti agricoli e alimentari per i quali una determinata qualità, la reputazione o un'altra caratteristica dipende dall'origine geografica, e la cui produzione, trasformazione e/o elaborazione avviene in un'area geografica determinata.



Figura 12: il logo dell'IGP

Per ottenere la IGP quindi, almeno una fase del processo produttivo deve avvenire in una particolare area. Chi produce IGP deve attenersi alle rigide regole produttive stabilite nel disciplinare di produzione, e il rispetto di tali regole è garantito da uno specifico organismo di controllo (regolamento CE n. 510/2006).

Si differenzia dalla più prestigiosa denominazione di origine protetta (DOP), quindi, per il suo essere generalmente un'etichetta maggiormente permissiva sulla sola provenienza delle materie prime (che se previsto dai singoli disciplinari possono essere sia di origine nazionale che di origine comunitaria o talvolta anche extra-comunitaria), in quanto tutela le ricette e alcuni processi produttivi caratterizzanti tipici del luogo ma non per forza l'origine del prodotto nel suo intero complesso, se non quello della produzione finale. Ciò viene a volte concesso principalmente perché una produzione di materie prime a livello locale o nazionale destinata a tale scopo potrebbe non essere sufficiente per soddisfare la richiesta del prodotto a livello globale, o perché alcuni ingredienti di origine estera vengono considerati più idonei per loro specifiche caratteristiche organolettiche che hanno un ruolo determinante nella riuscita finale del prodotto.

1.1.6 Marcatori molecolari

Un marcatore molecolare può essere definito come quel *locus* genomico, rilevabile con sonde (*probes*) o inneschi (*primer*) 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'. Questi marcatori, ereditati solitamente secondo schemi mendeliani, rilevano la diversità dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse. In particolare i polimorfismi genetici intraspecifici sono variazioni nelle sequenze di DNA presenti in una popolazione con una frequenza maggiore dell'1%. Quando la frequenza è inferiore a tale valore arbitrario, si preferisce parlare di varianti genetiche rare, che in molti *loci* sono presenti in aggiunta ai polimorfismi.

Sono ad oggi fondamentali e universalmente riconosciuti come affidabili nella tracciabilità dei prodotti alimentari: sono ritenuti più economici rispetto ad altre tecniche e possono essere utilizzati in qualsiasi momento della vita di un prodotto, anche con DNA degradato dalle varie trasformazioni a cui sono solitamente soggetti i prodotti agroalimentari (Rao e Leone, 2014).

1.1.6.1 Vantaggi/svantaggi dei marcatori molecolari vs. descrittori morfo-fisiologici

I marcatori molecolari si basano, come sopra indicato, sulla rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA che costituisce il patrimonio ereditario di ciascun individuo. Pertanto presentano diversi aspetti positivi:

- ✓ non subiscono l'interferenza dell'ambiente di coltura;
- ✓ possono interessare qualsiasi regione del genoma - trascritta o meno - e alcuni di essi consentono di rilevare differenze anche tra individui geneticamente molto simili, non distinguibili fenotipicamente;
- ✓ non presentano effetti epistatici o pleiotropici;
- ✓ sfuggono all'inevitabile soggettività dell'operatore nel compiere i rilievi morfologici;
- ✓ possono essere condotti in qualunque momento della vita della pianta (anche giovanissima e ben prima della sua entrata nella fase produttiva, che per le arboree può essere lunga) e in qualunque momento del ciclo vegetativo (anche durante il riposo invernale);
- ✓ permettono di confrontare RGV conservate in luoghi e/o in tempi diversi, intervenendo dunque proficuamente, soprattutto nelle specie arboree, nell'accertamento di sinonimie/ omonimie e nella definizione della corretta denominazione (*true to type*);
- ✓ possono essere utilmente impiegati in caso di contestazioni anche di tipo legale, per l'indubbia oggettività e affidabilità;
- ✓ le analisi sono automatizzabili.

D'altra parte ad essi sono associate, però, delle problematiche di tre tipi: mentre alcuni sono codominanti, altri sono dominanti e non consentono la distinzione tra eterozigote ed omozigote, necessitano spesso di conoscenze preliminari delle sequenze di DNA ed hanno un costo elevato (Rao e Leone, 2014).

Il costo dell'uso dei marcatori molecolari - in particolare in relazione al rapporto costi/benefici - è di difficile quantificazione, perché estremamente variabile in relazione agli obiettivi dell'analisi, al tipo

e al numero di marcatori necessari, alla specie, alla dimensione del campione, al dettaglio desiderato. Tuttavia non sempre una descrizione morfologica è da considerarsi meno costosa, soprattutto quando deve essere condotta in osservazioni ripetute e su un elevato numero di campioni (MIPAAF, 2013).

I descrittori morfologici non sono infatti validi per distinguere all'interno della specie *Allium ampeloprasum*, mentre lo sono tra GHG e *Allium sativum* L., poiché la forte interazione genotipo-ambiente porta ad una convergenza morfologica: è molto più facile discriminare i genotipi analizzando le naturali variazioni del DNA nelle sequenze ripetute del genoma nucleare (Guenauoui *et al.*, 2012). Figliuolo e Di Stefano (2007) hanno mostrato come i RAPDs e specialmente le variazioni dell'ITS funzionino bene a livello intra-specifico: una sorgente fondamentale di informazioni sul genoma nucleare delle piante è proprio questa regione, che include il gene per il 5.8S rRNA e due spaziatori interni ITS-1 e ITS-2. I polimorfismi di un singolo nucleotide nelle sequenze ITS solitamente funzionano a livello intra-generico (Alvarez e Wendel, 2003; Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995), ma in *A. ampeloprasum* sono stati trovati SNPs anche all'interno della specie (Figliuolo e Di Stefano, 2007).

Anche i marcatori biochimici, basati sulle differenze nella concentrazione di Selenio e polifenoli (Biagiotti *et al.*, 2016) sembrano di difficile attuabilità e meno economicamente vantaggiosi rispetto a marcatori molecolari nella determinazione di specie o sub-specie mentre potrebbero chiarire meglio la provenienza geografica del prodotto.

1.1.6.2 Sequenziamento comparativo del DNA

Potenzialmente la tecnica più completa ma più laboriosa è il sequenziamento comparativo del DNA di loci specifici, anche se è stata grandemente aiutata dall'uso delle varie tecniche di PCR. Questa tecnica è stata usata per molti studi sull'evoluzione molecolare dell'aglio. Il confronto tra marcatori del DNA nucleare e quelli del cloroplasto in particolare, consente approfondimenti circa l'evoluzione reticolata e la speciazione ibridogenica comune nel genere *Allium*. Il terzo genoma (mitochondrial DNA – mtDNA) non è stato usato come marcatore per l'evoluzione molecolare: nelle piante, infatti, la sostituzione nucleotidica è più lenta che negli animali, dove l'mtDNA, al contrario, è stato spesso usato per questo genere di studi. Nelle piante l'mtDNA è incline a riarrangiamenti frequenti, che rendono difficile l'interpretazione dei dati (Klaas e Friesen, 2002).

1.1.6.3 SCAR

Su uno SNP, cioè un polimorfismo di un singolo nucleotide, si possono disegnare dei primer specifici ed ottenere così un marcatore SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*: regione amplificata e caratterizzata mediante sequenza), che è un marcatore locus-specifico. L'identificazione del marcatore SCAR in campioni di DNA estratto da piante diverse (ad esempio piante di una popolazione segregante, o da specie/subspecie diverse, come nel nostro caso) viene effettuato utilizzando due (o più) primer di almeno 18 paia di basi (bp), disegnati sulla sequenza ottenuta del precedente sequenziamento (Fig. 13) e con il -3' sul polimorfismo. Ciò che si ottiene è solitamente un amplicone specifico a seconda dei primer utilizzati (presenza/assenza e quindi dominante) o a più ampliconi contemporaneamente (codominante).

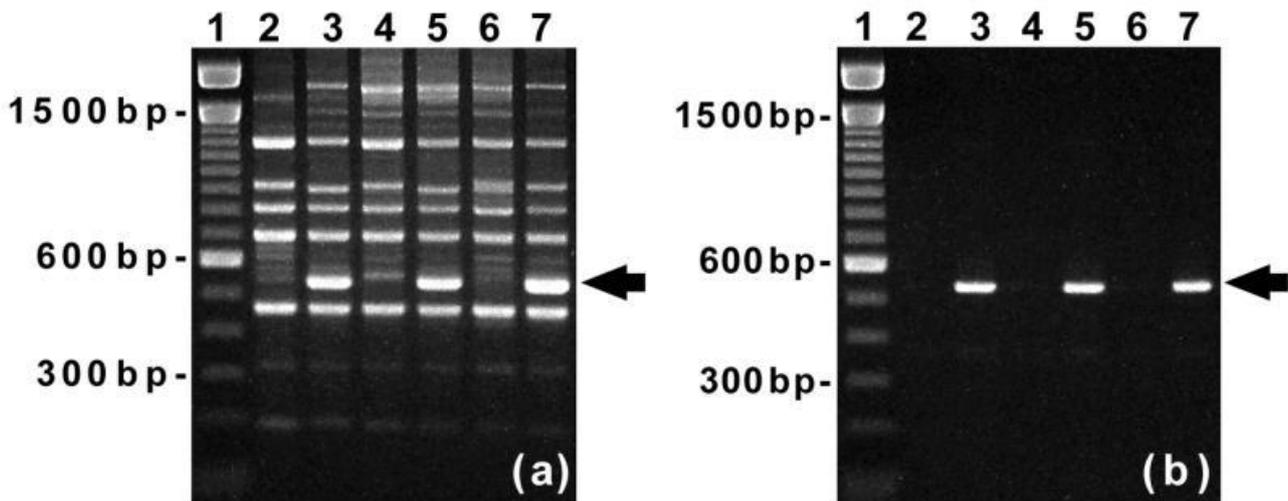


Figure 13: In (a) un marcatore RAPD da cui è stato ricavato il marcatore SCAR (b). Da Park et al. 2007

Essendo una tecnica basata sulla PCR, è molto solida, ripetibile, poco soggetta all'ambiente esterno, automatizzabile, di facile interpretazione e piuttosto economica, soprattutto se si evita di estrarre il DNA (PCR diretta) (Rao e Leone, 2014).

1.1.6.4 CAPS

I CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) o PCR-RFLP prevedono la digestione di un amplicone che contiene al suo interno uno SNP (Fig. 14). L'uso di un enzima di restrizione che riconosce la sequenza in cui è situato lo SNP permetterà di distinguere le due varianti alleliche (in un caso l'enzima taglia l'amplicone mentre nell'altro no). Questo tipo di rilevazione di uno SNP è possibile il polimorfismo di sequenza è incluso in un sito di restrizione di un enzima (Lorenzetti et al., 2018).

CAPS assay



1. PCR amplify
2. Cut with *EcoRI*
3. Resolve in gel

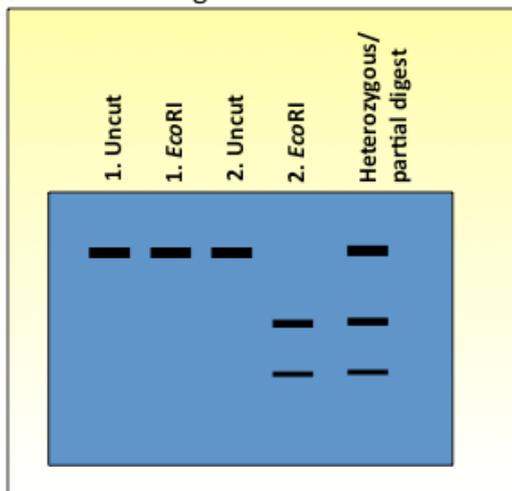


Figura 14: Sviluppo e funzionamento di un marcatore CAPS. Da <https://warwick.ac.uk/>

2 SCOPO DELLA TESI

Se nella precedente tesi era fondamentale riscoprire questo prodotto ed evitare che si perdesse, oggi è di vitale importanza tutelare l'Aglione della Val di Chiana. Questa coltura, conservata grazie all'intelligenza e alla cura di alcuni agricoltori, sembra essere una panacea per il territorio poiché è sostenibile al 100%, da vari punti di vista:

- Sociale; è una coltura legata al territorio e alla tradizione
- Ambientale; è una risorsa a rischio di erosione genetica, impatta poco sull'ambiente ed è una coltura da rinnovo, che si integra perfettamente nella rotazione e sostituisce colture più impattanti come i cereali a paglia
- Economica; è una coltura remunerativa a tutti i livelli, anche con scarsa meccanizzazione

Oltre a ciò è un prodotto che offre notevoli benefici alla salute. Per tutte queste ragioni, per il marketing che è stato fatto dai singoli agricoltori e dalle associazioni di produttori e dalla ricerca svolta presso le Università, è arrivato a godere di una certa fama ormai in tutta Italia e anche in qualche altra parte del mondo (Olanda, Francia, Germania, USA, Cina, Giappone).

È noto che dove c'è redditività ci sia la volontà di frodare: tanti producono o produrranno nei prossimi anni l'Aglione della Val di Chiana fuori zona o addirittura altri tipi di aglio spacciandoli per Aglione della Val di Chiana sia come prodotto fresco che come sughi e prodotti trasformati. È utile ricordare che i costi di produzione dell'aglio comune sono 4-6 volte inferiori rispetto all'Aglione (www.aglione.it). A ciò va aggiunto che il materiale utilizzato in cucina è proprio l'organo di riproduzione, che quindi non si può tenere lontano dal mercato: ognuno può piantare i bulbilli e riprodurlo.

In tal senso questa Tesi vuole cercare di fermare sul nascere i tentativi di frode, che andrebbero ad impoverire, sia in senso economico diretto che come immagine, il territorio e gli agricoltori della Val di Chiana. La metodologia più idonea, come affermato nell'introduzione, sono senza dubbio i marcatori molecolari, che permetteranno la rintracciabilità della filiera anche sui prodotti trasformati che sarebbero difficilmente sondabili in altri modi, soprattutto a parità di costi.

Gli strumenti sviluppati in questa tesi dovranno necessariamente essere affiancati da controlli della filiera, svolti a più livelli da un Consorzio di produttori o da un'associazione di produttori e regolati da idonei disciplinari di produzione (già presenti peraltro, ma ancora non applicati). La speranza ultima è che ciò porti ad un riconoscimento ufficiale della denominazione di origine da parte dell'Unione Europea.

L'altro scopo di questa tesi, propedeuticamente al precedente, è di valutare anche dal punto di vista genetico la variabilità con altri “aglioni” provenienti dal resto del mondo, per capire se e quanto effettivamente l'aglione sia un prodotto unico (è infatti dato per certo che non esistano varietà simili né in Italia né in Europa). Oltre ad una caratterizzazione morfologica, mancata per motivi pratici che andremo a descrivere in seguito, la caratterizzazione genetica sembra lo strumento migliore per raggiungere questo obiettivo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale genetico di partenza

Il materiale vegetale proviene da diverse fonti: dalla precedente tesi, con le varie accessioni raccolte personalmente in Val di Chiana (Terzaroli, 2015), dalla banca del germoplasma IPK di Gatersbelen e da alcuni agricoltori della zona, che hanno reperito per proprio conto il materiale accompagnandolo con la documentazione (Tab. 3). Alcune delle sequenze presenti nell'allineamento sono state ottenute attraverso la funzione *blast* dal sito ncbi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

I campioni elencati in tabella 3, eccetto gli ultimi sei, sono stati seminati in vasi di plastica nella serra del DSA3. L'emergenza è stata praticamente assente: ciò ha impedito di valutare morfologicamente il materiale e di estrarre il DNA dalle foglie.

Tabella 3: Lista dei campioni presenti nella presente tesi

Campione	Presunta Specie	Provenienza	Fornitore
ALL 1354 "Himalayan Red"	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – GHG group	USA	IPK
ALL 1355 "Elephant"	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – GHG group	USA	IPK
ALL 1639	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – GHG group	Spagna	IPK
ALL 1755 "Carentan"	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – Leek group	Germania	IPK
ALL 1810 "Ajo Castellano"	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – GHG group	Spagna	IPK
ALL 1898 "Ajo poro"	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – GHG group	Messico	IPK
ALL 1905	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>Ampeloprasum</i> – Leek group	Albania	IPK
01.012481	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>babingtonii</i>	UK	UK Vegetable SeedBank (Warwick)
AGLIONE	<i>Allium ampeloprasum</i> sub. <i>holmense</i>	Sinalunga (IT)	Sig. Citterio Carlo
Amorosa	<i>Allium spp.</i>	Sinalunga (IT)	Sig. Citterio Carlo
18.10.1 A/B	<i>Allium spp.</i>	Scrofiano (IT)	Sig. Citterio Carlo
18.10.2 A/B	<i>Allium spp.</i>	Sinalunga (IT)	Sig. Citterio Carlo
18.10.3 A/B	<i>Allium spp.</i>	Spagna	Sig. Citterio Carlo
AGLIONE	<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>holmense</i>	Chianciano Terme (IT)	Sig. Pinzi Giancarlo
AGLIO bianco di Voghiera DOP	<i>Allium sativum</i>	Voghiera (IT)	Soc.Agr.Mazzoni
Sugo all'aglione	<i>Allium spp.</i>	Cortona (IT)	Az. Agr. Checconi Massimo

3.2 Estrazione del DNA genomico

I tessuti vegetali, cioè i bulbilli, sono stati grindati, in presenza di azoto liquido usando pestello e mortaio in ceramica. Il materiale finemente polverizzato è stato successivamente trasferito in un tubo da microcentrifuga e posto in azoto liquido. Su tutti i campioni utilizzati il DNA genomico totale è stato estratto mediante l'impiego del GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma) secondo le specifiche del fornitore. Il DNA estratto è stato quantificato mediante spettrofotometro (Nano-Drop® - Thermo Scientific) e sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio per verificarne la qualità e l'integrità. Le sospensioni di DNA purificato sono state quindi mantenute in congelatore a -20 °C sino a nuovo utilizzo. Per la prova dei primer l'estrazione è stata evitata grazie al Kit Phire (Thermo) per la PCR diretta da tessuto.

3.3 Amplificazione delle sequenze

Inizialmente il DNA di tutti i genotipi è stato amplificato tramite i primer universali ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 25 µl così composto: 2,5 µl di buffer, 1 µl di dNTPs, 1 µl di primer forward, 1 µl di primer reverse, 1,6 µl di MgCl₂, 0,2 µl di *Taq* polimerasi e 16,7 µl di H₂O più 1 µl di DNA. Per le amplificazioni è stato utilizzato il termociclature SimpliAmp Thermal cycler (Applied Biosystems), impostato in modo da avere il seguente profilo termico: denaturazione a 95°C per 1' seguita da 35 cicli composti da 95°C per 30'', 58°C per 30'', 72°C per 1' e terminante con un ciclo di 72°C per 10' e poi a 4°C. Dieci µl della miscela di reazione insieme a 2 µl di colorante Loading Dye sono stati separati su gel di agarosio (concentrazione 1,5%) e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio.

3.4 Purificazione dei prodotti di PCR per il sequenziamento

La purificazione dei prodotti di PCR è stata effettuata allo scopo di eliminare primer in eccesso, dNTPs non incorporati, buffer ed eventuali prodotti secondari rimasti in soluzione. Tutti questi prodotti, in particolar modo primer e dNTPs, quando si trovano in eccesso disturbano la reazione di sequenziamento, effettuata successivamente, dando pessimi risultati. Pertanto è stata necessaria una purificazione effettuata il kit ExoSAP-IT (GE Healthcare).

Il protocollo ExoSAP-IT prevede una reazione enzimatica che utilizza in particolar modo due enzimi:

- Esonucleasi I (Exo)
- Fosfatasi alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP)

Questi degradano rispettivamente i primer e i dNTP, ma non rimuovono sali o altri prodotti secondari della PCR.

Di seguito è riportato il protocollo ExoSAP-IT di purificazione dei pPCR:

- Aggiungere 0,3 µl della mix Exo-SAP al campione contenente i pPCR riamplicati;
- Vortexare accuratamente le miscele di reazione;
- Inserire le provette in un termociclatore ed eseguire il ciclo descritto: 1 ciclo a 37,0°C per 30' e 1 ciclo a 80,0°C per 15';
- I campioni così trattati sono pronti ad essere sottoposti a reazione di sequenza.

3.5 Quantificazione dei prodotti di PCR

Per utilizzare la giusta quantità di DNA per la successiva reazione di sequenza, il prodotto di PCR purificato è stato quantificato grazie all'uso del marker GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). È stato necessario confrontare l'intensità della banda di DNA relativa al prodotto di PCR purificato, con l'intensità delle bande a PM e quantità (ng) note del marker. La concentrazione del DNA viene espressa in ng/µl. Per poter calcolare la concentrazione iniziale del campione è stata necessaria l'applicazione della formula seguente:

$$\left[\frac{ng}{\mu l} \right] = \frac{\text{quantità totale di DNA}}{5 \mu l}$$

dove al denominatore si hanno i µl di pPCR purificati caricati per l'elettroforesi, dopo la purificazione. Sapendo che per il sequenziamento sono necessari 1-2 ng di DNA ogni 100 bp, e conoscendo la lunghezza delle regioni amplificate, tutto ciò ha permesso di calcolare la quantità di campione necessaria (in µl) da aggiungere alla reazione di sequenza.

3.6 Reazione di sequenza

Per la reazione di sequenziamento è stato usato il kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). La mix per la reazione è riportata in tabella 3.

Tabella 4: Mix per la reazione di sequenza

Reagenti	Concentrazione	μl
Buffer	2 x	2.0
Big Dye	-	0.5
Primer	3.2 μM	0.5
H ₂ O	-	1.0
Volume finale	-	4.0

Al volume della mix di 4 μl sono stati aggiunti 6 μl di pPCR da sequenziare. Il ciclo della reazione è descritto nella tabella 4.

Tabella 5: Ciclo della reazione di sequenza

Nome del ciclo	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo	Numero di cicli
PCR	96.0	10''	30
	50.0	5''	
	60.0	4'	

I prodotti della reazione di sequenza devono essere purificati prima di essere caricati nel sequenziatore, al fine di evitare errori di lettura dei nucleotidi per la presenza di BigDye non inclusi e primer, che potrebbero interferire con l'elettroforesi. Pertanto è stata necessaria la purificazione dei prodotti di sequenza utilizzando il BigDye XterminatorTM Purification Kit (Applied Biosystems).

Sono stati prelevati 6 μl dei 10 μl totali di prodotto di sequenza per ogni campione, ai quali sono stati aggiunti 10 μl di BigDye XterminatorTM solution e 45 μl di SAMTM solution, per un volume totale di 55 μl .

Una volta preparata la mix per la purificazione è stato necessario attendere 30 minuti, vortexando ogni 5 minuti, per risospendere il BigDye Xterminator, che essendo molto denso tende a precipitare. A questo punto i campioni sono stati inseriti nel sequenziatore capillare ed è stata così avviata la corsa elettroforetica.

3.7 Assemblaggio delle sequenze

Tutte le sequenze sono state verificate, controllate tramite il programma Chromas e successivamente assemblate, allineate ed analizzate da un punto di vista filogenetico con il programma Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0.21 (MEGA7).

Per ogni campione abbiamo infatti assemblato le due sequenze nucleotidiche (forward e reverse), derivanti dagli elettroferogrammi, per la formazione di un'unica sequenza contigua, detta "contig", la quale è stata salvata in un file testo (in direzione 5'-3'), per poi essere inserita nell'allineamento, effettuato successivamente.

Tutte le sequenze nucleotidiche di ITS corrispondenti alle specie di *Allium* sono state scaricate dalla banca dati GenBank, nel sito NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Successivamente, il programma MEGA7 ha permesso l'allineamento multiplo sia delle sequenze scaricate dal web sia delle sequenze relative ai campioni prelevati nelle aziende, precedentemente controllate e assemblate.

3.8 Alberi filogenetici

Una volta ottenuto l'allineamento multiplo (contenente le sequenze delle specie di *Allium* più le sequenze dei campioni), grazie ancora al software MEGA7, è stato possibile ricavare, direttamente dall'allineamento, un albero filogenetico, impostando i parametri che consentono di calcolare la relazione genetica migliore (opzione "Find Best DNA/Protein Models). Nel nostro caso tali parametri erano Tamura-Nei + G (Gamma distribution) + I (Invariant sites = un certo numero di siti è evolutivamente invariabile) con il metodo statistico di Maximum Likelihood (Tab. 6).

Tabella 6: Tabella Best Method (MEGA 7). NOTA: I modelli con il punteggio per il BIC (Bayesian Information Criterion) più bassi sono stati ritenuti i migliori per descrivere il pattern di sostituzione. Per ogni modello sono presentati il valore AICc (Akaike Information Criterion, corretto), il valore di Maximum Likelihood (lnL), e il numero di parametri (inclusa la lunghezza dei bracci). I tassi evolutivisti e di non-uniformità tra i siti possono essere modellati usando una distribuzione Gamma discreta (+G) con 5 categorie e assumendo che una certa frazione di siti sono evolutivamente invariabili (+I). I valori, stimati o assunti, di transizione (trasversione (R) sono mostrati per ogni modello. Essi sono seguiti dalle frequenze nucleotidiche (f) e dai tassi di sostituzione delle basi (r) per ogni coppia nucleotidica.

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models																							
Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
TN93+G+I	56	3684.418	3259.813	-1573.687	0.00	0.34	2.56	0.220	0.306	0.189	0.281	0.042	0.026	0.180	0.030	0.155	0.039	0.030	0.250	0.039	0.141	0.042	0.026
K2+G	51	3702.769	3316.039	-1606.837	n/a	0.27	2.12	0.250	0.250	0.250	0.250	0.040	0.040	0.170	0.040	0.170	0.040	0.040	0.170	0.040	0.170	0.040	0.040
T92+G	52	3707.373	3313.067	-1604.345	n/a	0.27	2.12	0.265	0.265	0.235	0.235	0.042	0.038	0.160	0.042	0.160	0.038	0.042	0.180	0.038	0.180	0.042	0.038
K2+G+I	52	3711.187	3316.881	-1606.251	0.38	0.63	2.14	0.250	0.250	0.250	0.250	0.040	0.040	0.170	0.040	0.170	0.040	0.040	0.170	0.040	0.170	0.040	0.040
T92+G+I	53	3715.826	3313.944	-1603.776	0.38	0.63	2.14	0.265	0.265	0.235	0.235	0.042	0.037	0.160	0.042	0.160	0.037	0.042	0.181	0.037	0.181	0.042	0.037
K2+I	51	3723.954	3337.224	-1617.430	0.40	n/a	1.91	0.250	0.250	0.250	0.250	0.043	0.043	0.164	0.043	0.164	0.043	0.043	0.164	0.043	0.164	0.043	0.043
T92+I	52	3728.480	3334.174	-1614.898	0.40	n/a	1.91	0.265	0.265	0.235	0.235	0.045	0.040	0.155	0.045	0.155	0.040	0.045	0.174	0.040	0.174	0.045	0.040
HKY+I	54	3739.701	3330.244	-1610.918	0.40	n/a	2.18	0.220	0.306	0.189	0.281	0.047	0.029	0.196	0.034	0.132	0.043	0.034	0.213	0.043	0.153	0.047	0.029
K2	50	3743.468	3364.314	-1631.982	n/a	n/a	1.81	0.250	0.250	0.250	0.250	0.044	0.044	0.161	0.044	0.161	0.044	0.044	0.161	0.044	0.161	0.044	0.044
GTR+G	58	3748.047	3308.293	-1595.911	n/a	0.30	2.07	0.220	0.306	0.189	0.281	0.058	0.057	0.162	0.042	0.148	0.032	0.066	0.239	0.022	0.126	0.034	0.015
T92	51	3748.057	3361.327	-1629.482	n/a	n/a	1.81	0.265	0.265	0.235	0.235	0.047	0.042	0.152	0.047	0.152	0.042	0.047	0.171	0.042	0.171	0.047	0.042
JC+G	50	3752.316	3373.163	-1636.406	n/a	0.27	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR+G+I	59	3756.705	3309.377	-1595.445	0.34	0.64	2.09	0.220	0.306	0.189	0.281	0.058	0.057	0.161	0.041	0.149	0.031	0.066	0.241	0.022	0.126	0.034	0.015
JC+G+I	51	3760.467	3373.737	-1635.687	0.39	0.65	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR+I	58	3769.181	3329.427	-1606.478	0.40	n/a	1.69	0.220	0.306	0.189	0.281	0.063	0.058	0.162	0.045	0.130	0.034	0.067	0.210	0.040	0.127	0.037	0.027
JC+I	50	3773.427	3394.274	-1646.962	0.40	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR	57	3788.048	3355.868	-1620.707	n/a	n/a	1.62	0.220	0.306	0.189	0.281	0.067	0.057	0.161	0.048	0.127	0.036	0.067	0.206	0.040	0.125	0.039	0.027
JC	49	3792.355	3420.778	-1661.221	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
HKY+G	54	26446.879	26037.422	-12964.507	n/a	0.32	2.55	0.220	0.306	0.189	0.281	0.042	0.026	0.205	0.030	0.138	0.039	0.030	0.223	0.039	0.160	0.042	0.026
TN93+G	55	26455.545	26038.513	-12964.045	n/a	0.32	2.55	0.220	0.306	0.189	0.281	0.042	0.026	0.183	0.030	0.153	0.039	0.030	0.247	0.039	0.143	0.042	0.026
HKY+G+I	55	26456.469	26039.437	-12964.507	0.00	0.32	2.55	0.220	0.306	0.189	0.281	0.042	0.026	0.205	0.030	0.138	0.039	0.030	0.223	0.039	0.160	0.042	0.026
TN93+I	55	26499.270	26082.239	-12985.908	0.40	n/a	2.19	0.220	0.306	0.189	0.281	0.047	0.029	0.170	0.034	0.150	0.043	0.034	0.242	0.043	0.132	0.047	0.029
TN93	54	72020.763	71611.307	-35751.450	n/a	n/a	2.06	0.220	0.306	0.189	0.281	0.049	0.030	0.169	0.035	0.146	0.045	0.035	0.236	0.045	0.132	0.049	0.030
HKY	53	72056.027	71654.146	-35773.877	n/a	n/a	2.14	0.220	0.306	0.189	0.281	0.048	0.030	0.195	0.034	0.131	0.044	0.034	0.211	0.044	0.152	0.048	0.030

3.9 Progettazione dei primer

La progettazione dei primer è stata fatta sull'allineamento ottenuto grazie a MEGA 7, andando a disegnare manualmente i primer con il 3' sugli SNPs capaci di discriminare l'Aglio (e altri *Allium ampeloprasum* sub. *Ampeloprasum* e *holmense*) dall'aglio comune *Allium sativum*. I primer così disegnati sono stati inseriti nell'apposita query sull'interfaccia web di Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) al fine di controllare una serie di parametri (Fig. 15) relativi a:

- complementarietà tra forward e reverse,
- contenuto in GC,
- temperatura di melting,
- probabilità di formare loop

in modo da evitare problemi durante la PCR e garantire una corretta amplificazione.

Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Left primer is unacceptable: High 3' stability; Right primer is unacceptable: High 3' stability

```
OLIGO      start  len  tm  gc%  any  3' seq
LEFT PRIMER  254   22  61.50  50.00  5.00  2.00  ctttgtgctattctagcgagcg
RIGHT PRIMER  483   19  62.81  57.89  4.00  2.00  caaaacggactcgtcgac
SEQUENCE SIZE: 733
INCLUDED REGION SIZE: 733
```

PRODUCT SIZE: 230, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

Figura 15: L'output di una delle coppie di primers in esame. Da Primer3

3.10 Validazione dei primer

La validazione dei primer è avvenuta tramite PCR a cui è seguita elettroforesi su gel d'agarosio. La reazione è avvenuta con il Kit Phire (Thermo) in un volume totale di 25 µl, con 12,5 µl di buffer, 1 µl di primer FOR, 1 µl di primer REV, 0,5 µl di PhireTaq e 10 µl di acqua ultrapura in cui è stato inserito tramite puntali sterili il materiale vegetale dai bulbi. Per l'amplificazione è stato utilizzato il SimpliAmp Thermal cycler (Applied Biosystems), impostato in modo da ottimizzare l'appaiamento dei primer, come al capitolo 4.2.

3.11 Digestione enzimatica

Dopo l'amplificazione con la coppia di primer universali ITS4/ITS5 si è proceduto alla digestione enzimatica con lo stesso enzima (MspI) di due ditte differenti:

- New England Biolabs, la cui mix per ogni campione è stata 0,5 µl di enzima, 2,5 µl di CutSmart® Buffer, 12 µl di pPCR e 10 µl di acqua ultrapura;
- Thermo Fisher Scientific, la cui mix per ogni campione è stata 1,0 µl di enzima, 2,5 µl di Anza™ 10x Red Buffer, 12 µl di pPCR e µl di acqua ultrapura.

Per entrambi, la digestione è avvenuta nel SimpliAmp Thermal cycler (Applied Biosystems) a 37 °C per 15 minuti e poi a 4 °C.

I risultati sono stati poi visualizzati con elettroforesi su gel d'agarosio.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi bioinformatiche

Come precedentemente descritto, a partire dall'allineamento delle sequenze si è proceduto calcolando il Best Method che nel nostro caso è risultato essere Tamura-Nei + G (Gamma distribution) + I con il metodo statistico di Maximum Likelihood (Tamura e Nei, 1993), con cui abbiamo potuto costruire l'albero in Figura 16.

Il bootstrap utilizzato per produrre l'albero è stato 1000 e rappresenta la storia evolutiva dei taxa analizzati (Felsenstein, 1985). Le branche corrispondenti a partizioni riprodotte dal bootstrap meno di 500 volte (50%) sono collassate. La percentuale di alberi replicati in cui i taxa associati hanno clusterizzato insieme nel test bootstrap si può vedere vicino al nodo. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente applicando gli algoritmi Neighbor-Join e BioNJ a una matrice di distanze di coppia stimata usando il metodo della Maximum Composite Likelihood (MCL), e selezionando poi la topologia con il valore del log likelihood più alto. La Gamma distribution discreta è stata utilizzata per modellare le differenze nel tasso di evoluzione tra siti (5 categorie (+G, parameter = 0.3326)). La variazione del tasso ha permesso ad alcuni siti di rimanere evolutivamente invariabili ([+I], 39.6194% dei siti). L'analisi ha coinvolto 26 sequenze nucleotidiche, lunghe 578 nucleotidi nel dataset finale. Le analisi evolutive sono state condotte con MEGA7 (Kumar et al., 2016).

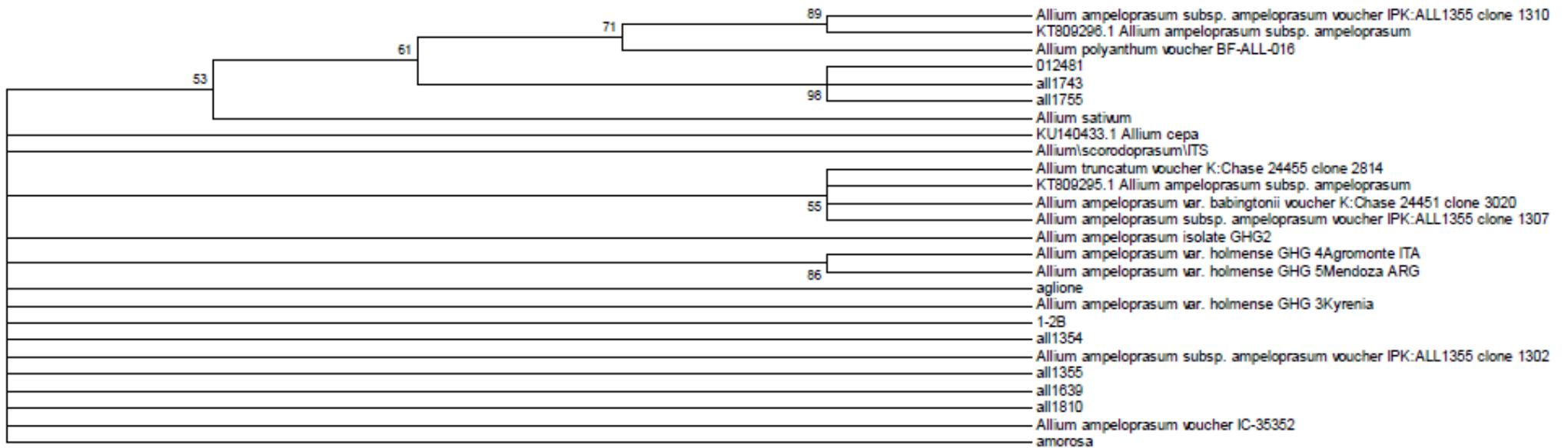


Figura 16: Albero filogenetico prodotto con il metodo Maximum Likelihood (MEGA 7)

L'albero non è radicato, cioè non si conosce l'ancestrale tra i taxa in esame. E' interessante notare che cloni diversi, 1302, 1307, 1310, appartenenti alla stessa accessione (IPK ALL 1355) finiscano in branche diverse. Lo stesso discorso sembra valido per la varietà *babingtonii* che non è nella stessa branca del campione 012481, che ricordiamo essere un'accessione di *Allium ampeloprasum* subsp. *babingtonii* proveniente dalla banca del germoplasma di Warwick (UK). L'Aglione della Val di Chiana (1-2B, Aglione, Amorosa) invece non ha clusterizzato, in maniera simile ai Great Headed Gralic (GHG).

Tale analisi risulta insufficiente a discriminare le accessioni dal punto di vista genetico. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che non esistono reali differenze a livello di ITS, che è ripetuto in troppe copie nel genoma.

4.2 Efficacia primer

Per la discriminazione della specie si è inizialmente provato con i primer AGLIO_FOR (5'- GCT-CATACCCGACGAGTACTAC – 3'), AGLIO_REV (5' – CGACAATCACTTAAACCTACCA – 3'), AGLIONE_FOR (5' – CGAGTACTATGTGTTTGTGCTG – 3') e AGLIONE_REV (5' – CGACAATCACTTAAACCTACCG – 3'), disegnati dal sottoscritto grazie al software Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>).

Si sono dimostrati entrambi inefficaci poiché la coppia AGLIONE FOR/REV non amplificava, mentre AGLIO FOR/REV amplificava sia aglio che aglione (Fig. 17). La temperatura di annealing utilizzata per la prima prova è stata di 57 °C per entrambi, quando la temperatura di melting dichiarata da Sigma-Aldrich era di alcuni gradi superiore (Fig. 18).

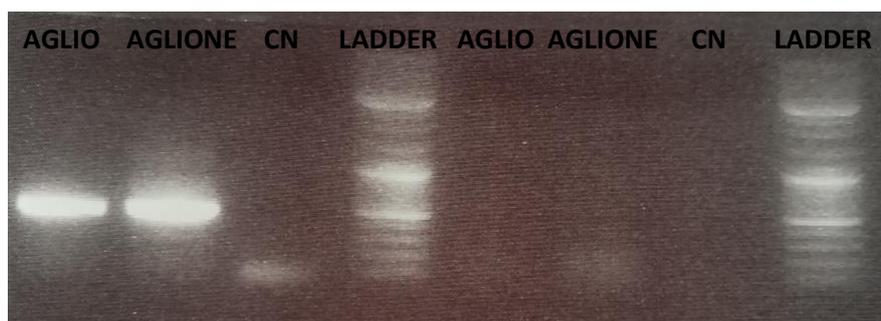


Figura 17: Prova delle prime due coppie di primer. Nelle corsie da sx a dx: aglio, aglione, controllo negativo, ladder (con primer AGLIO), dopo si ripete ma con primer AGLIONE

Aglione_FOR	8810687299-000470	22	DST	0.05	6664	61.5
Aglione_REV	8810687299-000480	22	DST	0.05	6616	60.5
Aglio_FOR	8810687299-000490	22	DST	0.05	6787	59.9
Aglio_REV	8810687299-000500	22	DST	0.05	6632	62.2

Figura 18: Temperatura di melting della prime due coppie di primer, dal technical datasheet di Sigma-Aldrich

La prova è stata ripetuta con diversa temperatura di annealing:

- Per AGLIO FOR/REV a 59 °C per cercare di discriminare maggiormente, evitando appaiamenti aspecifici
- Per AGLIONE FOR/REV a 50 °C per cercare di ottenere amplificazione (Fig.19)

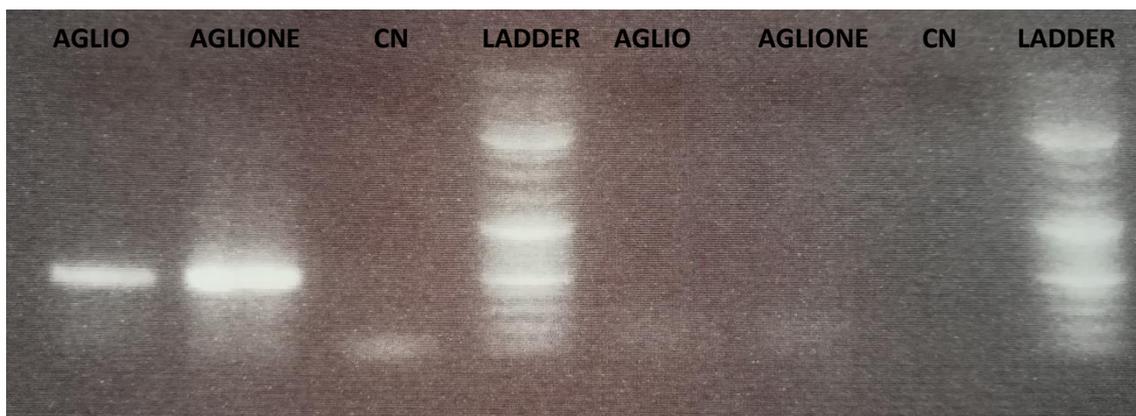


Figura 19: a sx i primer AGLIO (59°C), a dx i primer AGLIONE (50°C)

Scartate queste due prime coppie di primer, sono state disegnate sull'allineamento di MEGA 7 altre 3 coppie di primer, di cui AGLIO1 FOR/REV specifici per l'aglio, AGLIONE1 FOR/REV specifici per l'aglione, ALLIUM FOR/REV universali per tutti gli *Allium*, da combinare anche con un FOR/REV delle altre due coppie (Tab. 7). La specificità è stata ottenuta mettendo il polimorfismo all'estremità -3' del primer (Fig. 20)

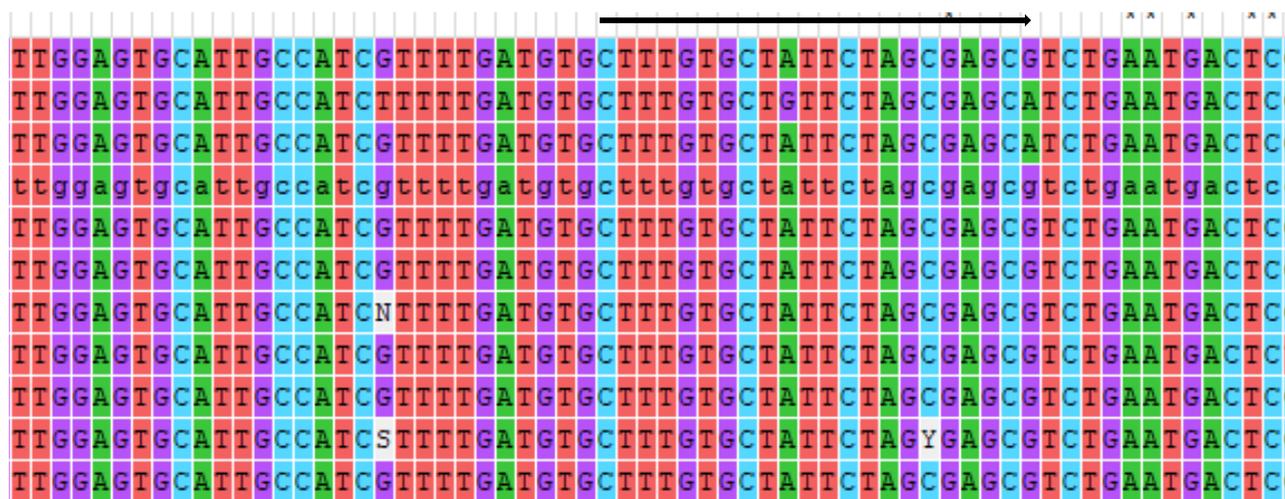


Figura 20: Particolare dell'allineamento della sequenza ITS per diverse specie di aglio (MEGA 7): la freccia nera indica il primer FOR che termina con il 3' su uno SNP che permette di distinguere tra aglio e aglione

Tabella 7: Caratteristiche dei primer utilizzati

Primer	Sequenza 5'-3'	T° Melting	GC %
AGLIO1 FOR	CTTTGTGCTATTCTAGCGAGCA	63,3	45,4
AGLIO1 REV	CAAAATGCACTCGTCS CAT	58,8	42,1
AGLIONE1 FOR	CTTTGTGCTATTCTAGCGAGCG	64,9	50
AGLIONE1 REV	CAAAACGGACTCGTCS CAC	62,2	52,6

La prima prova è stata eseguita con il seguente profilo termico per tutte le 4 coppie: 95 °C x 5 minuti, 35 cicli con 95°C x 30 secondi, 58 °C x 30 secondi, 72°C x 1 minuto, infine 72°C x 7 minuti e a 4°C. La coppia AGLIONE1 FOR/REV sembrava dare risultati molto interessanti, mentre le altre coppie amplificavano tutto (Fig. 22 e 23). Si può notare che il peso molecolare delle bande è corretto per tutte le coppie e che il primer AGLIONE REV crea sempre degli aspecifici di maggior peso molecolare ne campioni 18.10.1A e 18.10.2A, gli agli selvatici di origine spagnola.

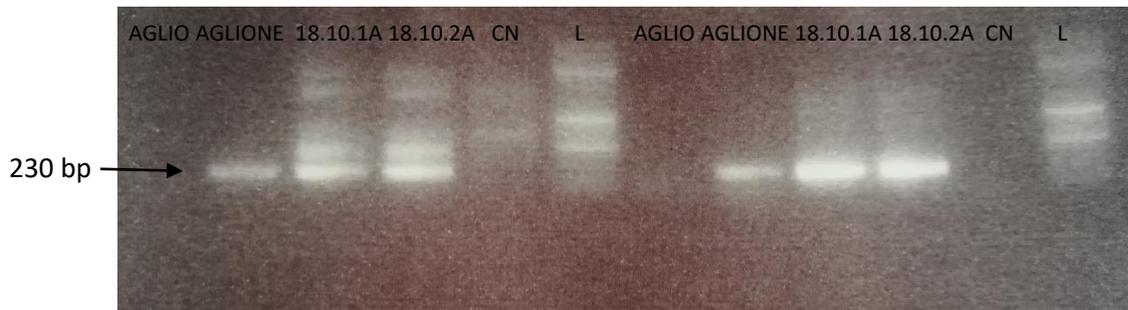


Figura 23: A Sx la coppia AGLIONE1 FOR/REV, a Dx la coppia AGLIO1 FOR/REV: molto probabilmente il campione AGLIO non è stato amplificato per l'eccesso di materiale vegetale durante la PCR diretta

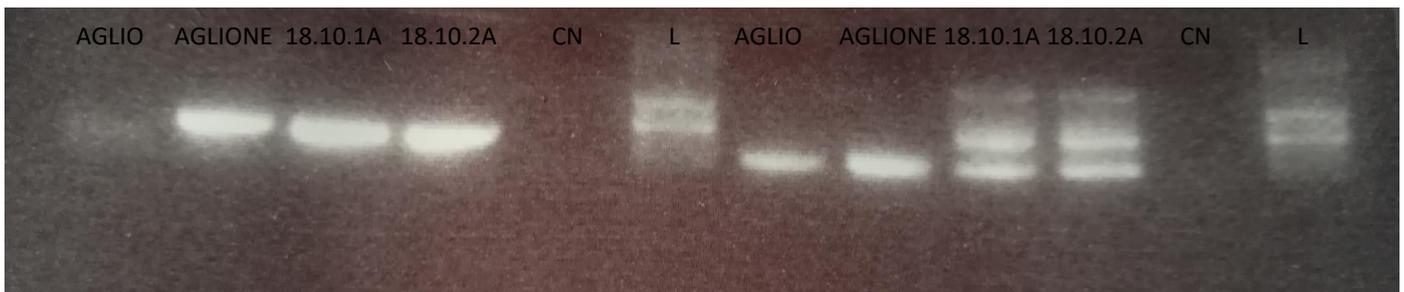


Figura 22: A Sx la coppia AGLIONE FOR/ALLIUM REV, a Dx la coppia ALLIUM FOR/AGLIONE REV

Per aumentare la specificità delle 3 coppie che avrebbero dovuto amplificare solo l'aglio si è provato ad aumentare la temperatura di annealing a 61°C, senza ottenere alcun miglioramento, mentre per la coppia AGLIO1 FOR/REV si è ripetuta la PCR a 58°C (Fig. 24).

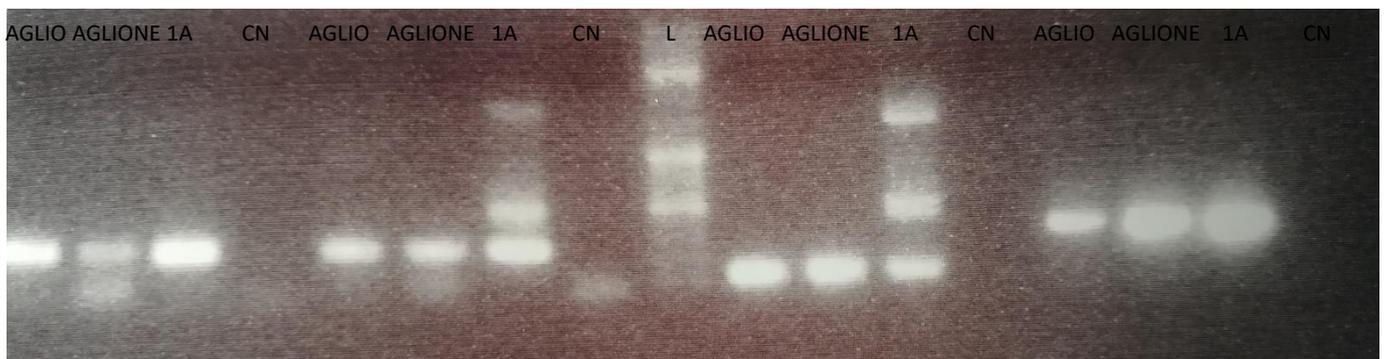


Figure 24: Da Sx a Dx le coppie AGLIO1 F/R, AGLIONE1 F/R, ALLIUM F/AGLIONE1R, AGLIONE1 F/ALLIUM R

Le coppie AGLIO1 FOR/REV e AGLIONE 1 FOR/REV sono state testate a temperature di annealing ancora più alte (66° e 69 °C), senza ottenere più amplificazione per la coppia AGLIO1 FOR/REV (Fig. 25).



Figura 255: A Sx T annealing = 66°C, a destra T annealing =69°C

A questo punto si è deciso di riprovare solamente la coppia AGLIONE1 FOR/REV a diverse temperature di *annealing*, per capire se effettivamente fosse capace di amplificare solamente l'aglione e non l'aglio: prima a 64 e 66° C (Fig. 26) e poi a 66, 67 e 68°C (Fig. 27).

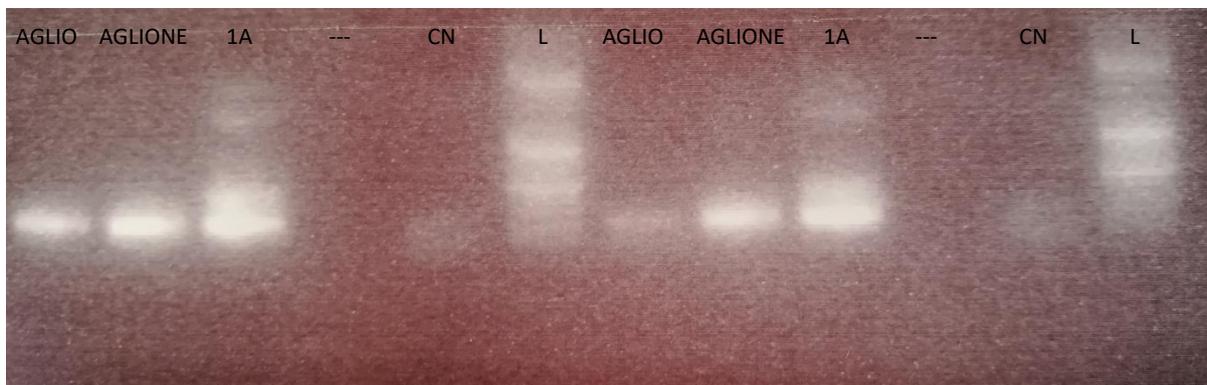


Figura 26: La coppia AGLIONE1 FOR/REV, a Sx con T annealing = 64°C, a Dx con T annealing = 66°C

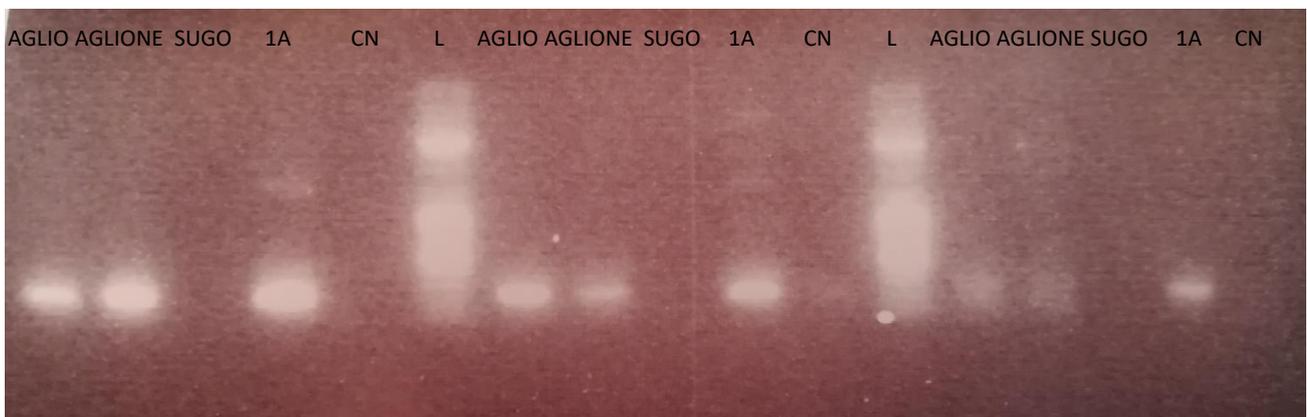


Figura 27: La coppia AGLIONE1 FOR/REV, a Sx con T annealing = 66°C, al centro con T annealing = 67°C, a Dx con T annealing = 68 °C

4.3 Efficacia marcatore CAPS

Vista la difficoltà di riuscire a discriminare tra le due specie vegetali tramite marcatore di tipo SCAR, cioè grazie a primer specie-specifici disegnati con l'estremità -3' su di un polimorfismo, si è provato a ricorrere ad enzimi di restrizione che tagliassero sul sito polimorfico (Fig. 28). Il polimorfismo in questione si trova in posizione 493-497 dell'allineamento completo.



Figura 28: La sequenza riconosciuta dai MspI in giallo e in nero il taglio, che lascia estremità sticky. Nella riga in alto la sequenza è di aglio (*Allium sativum*), in basso di Aglione

Dopo amplificazione con i primer universali ITS4 e ITS5 (Fig. 29), l'amplicone è stato digerito per 15 minuti a 37°C con l'enzima MspI (Fig. 30) di due aziende differenti (New England Biolabs e Thermo Fisher Scientific), con le seguenti mix per ciascun campione (Tabelle 8 e 9).

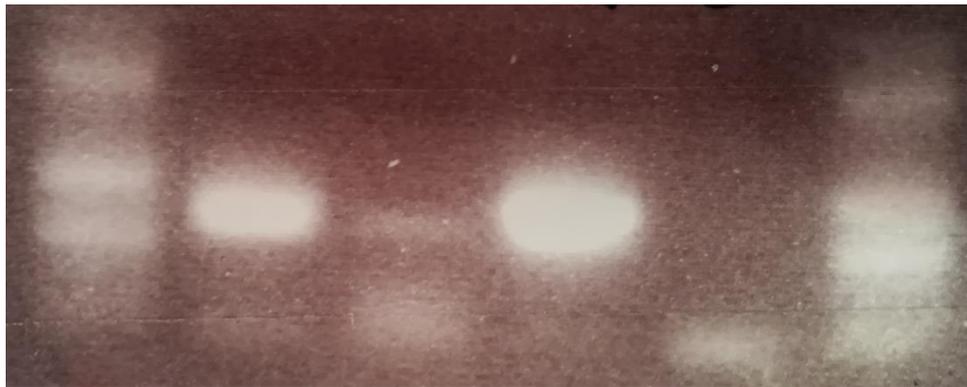


Figura 29: PCR con primer ITS 4 e 5. Da sx a dx: Ladder, Aglio, Aglione, 18.10.1°, controllo negativo, Ladder

Tabella 8 e 9: Mix per la digestione enzimatica

New England Biolabs	Quantità in µl
MspI	0,5
Buffer	2,5
pPCR	12
H2O UP	10
Totale	25

Thermo Fisher Scientific	Quantità in µl
MspI	1,0
Red Buffer	2,5
pPCR	12
H2O UP	9,5
Totale	25

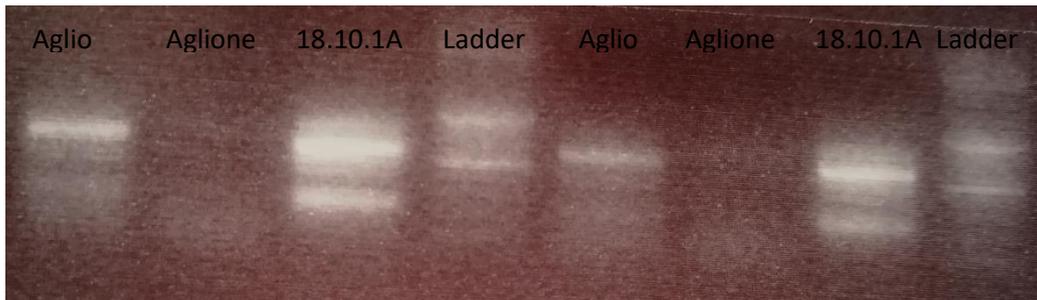


Figura 30: Digestione con *MspI* prodotto a sx da Thermo Fisher Scientific, a dx da New England Biolabs26

Come si vede dalla Figura 28, l'enzima avrebbe dovuto tagliare solamente l'aglione, lasciando intatto l'amplicone dell'aglio: qui si ottengono diversi tagli non previsti sia su aglio che sul campione 18.10.1A (aglio selvatico), che non dovrebbero esserci, mentre su aglione il risultato della PCR non è stato abbastanza da risultare visibile dopo la digestione enzimatica.

5 DISCUSSIONE

Come si è visto nei paragrafi precedenti, né l'enzima di restrizione né i primer si sono dimostrati capaci di discriminare tra aglio e Aglione della Val di Chiana, mentre un parziale risultato c'è stato tra Aglione e aglio selvatico spagnolo (campioni 18.10.1A e 18.10.2A) che hanno dato un diverso profilo di amplificazione con la coppia di primer AGLIONE1 FOR/REV.

Questa incapacità di discriminare può dipendere dalla bontà del sequenziamento, che però risulta perfettamente identico alle sequenze già online (www.ncbi.com): la sequenza saggiata non è quindi abbastanza lunga e informativa per poter discriminare specie così vicine (l'albero filogenetico ha due sole branche e entrambe poco significative), o per discriminare tra aglio e Aglione, tantomeno da substrati complessi come sughi o prodotti trasformati, in cui il DNA è solitamente danneggiato.

Si ritiene che marcatori singolo locus high-throughput basati su NGS potrebbero individuare differenze su cui costruire un albero filogenetico più preciso e su cui costituire poi una metodologia facile da ripetere, a basso costo e pertanto adatta ad analisi di routine, sperando che nel frattempo l'Aglione riscuota sempre il medesimo successo.

Al momento attuale è possibile discriminare tra le diverse specie (e raramente sottospecie) solamente attraverso amplificazione con i primer universali ITS4 e ITS5 e sequenziamento Sanger dell'amplificazione ottenuto.

6 BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, I., Wendel, J.F.. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molec Phylogenet Evol* 29:417:434
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121
- Baitulin, I.O., Rakhimbaev, I.R., Kamenetsky, R. 1986. Introdukcija i morfogenez dikorastushchikh lukov Kazakhstana (Introduction and morphogenesis of wild *Allium* species in Kazakhstan) (In Russian). Nauka, Alma-Ata, Kazakhstan
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3–16
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Wojciechowski, J.M., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247–277
- Bergner, P. 1996. The healing power of garlic, pp 3-26. Prima Publishing, Rocklin, CA
- Biagiotti S., Sordi F., Ripoli R., 2016. Rintracciabilità geografica dell’Aglione della Valdichiana. *Ricerche di qualità e sviluppo rurale*, n°3
- Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* 252:114-119
- Boyhan, G.E., Kelley, W. T., Granberry, D.M., *Extensions Horticulturists*, 2000. Production and management of garlic, elephant garlic and leek. University of Georgia, College of agricultural and environmental sciences
- Brewster, J.L.. 1995. Onions and other vegetable Alliums. In: Fordham R (ed) *Scientia Horticulturae* 62 (1-2):145-146. Wallingford, U.K.
- Chase M.W., Reveal, J.L., Fay, M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132–136
- Cheremushkina, V.A. 1992. Evolution of life form of species in the subgenus *Rhizirideum* (Koch) Wendelbo, genus *Allium* L. p. 27-34. In: P. Hanelt, K. Hammer, and H. Knupffer (eds.), *The genus Allium - taxonomic problems and genetic resources*. Proc. Int. Symp. June 11-13, Gatersleben, Germany
- Davis, J.M., Greenfield, J. 2002. Cultivating Ramps: wild leeks of Appalachia. P.449-452. In : J.Janick and A. Whipkey (eds.). *Trends in new crops and new uses*. ASHS press, Alexandria, VA
- De Clercq, H., Peusens, D., Roldàn-Ruiz, I., van Bockstaele, E.. 2003. Causal relationships between inbreeding, seed characteristics and plant performance in leek (*Allium porrum* L.). *Euphytica* 134:103-115.

- De Wilde-Duyfjes B.E.E. 1976. A revision of the genus *Allium* L. (Liliaceae) in Africa. *Belmontia* 7: 75–78
- Dubouzet J.G., Shinoda, K. 1999. Relationships among Old and New World Alliums according to ITS DNA sequence analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 422–433
- Engeland, R.I. 1991. Growing great garlic. Filaree Prod., Okanogan, WA
- Etruria; Studj di Filologia di Letteratura di Pubblica Istruzione e di Belle Arti, 1851
- Fay, M.F., Chase, M.W. 1996. Resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45: 441–451
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- Figliuolo, G., Di Stefano, D.. 2007. Is single bulb garlic *Allium sativum* or *Allium ampeloprasum*? *Sci Hortic* 114:243-249
- Figliuolo, G., Mang, S.. 2010. Characterization and discrimination of mediterranean bulb-producing garlic. In: Pacurar M, Krejci G (eds) *Garlic Consumption and Health*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp 181-197
- Fritsch, R.M., Friesen, N. 2002. Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch HD, Currah L. eds. *Allium crop science: recent advances*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 5–30
- Fritsch, R.M., Blattner, F.R., Gurushidze, M. 2010. New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. *Phyton* 49: 145–220
- Garzoni Tommaso, 1585. *La Piazza Universale di tutte le professioni del mondo*
- Guenauoui, C., Mang, S., Figliuolo, G., Neffati, M.. 2012. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. *Genet Resour Crop Evol* (2013) 60:97-114
- Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution and history. p. 1-26. In: H. D. Rabinowitch and Brewster, J. L. (eds.) *Onions and allied crops*, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL
- Hanelt, P., Schulze-Motel, J., Fritsch, R.M., et al. 1992. Infrageneric grouping of *Allium*— the Gatersleben approach. In: Hanelt P, Hammer K, Knu´ppfer H. eds. *The genus Allium: taxonomic problems and genetic resources*. Proceedings of an international symposium held at Gatersleben, Germany, 11–13 June 1991. Institut fu¨r Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany, 107–123
- Hanelt, P. 2001. *Alliaceae*. p.2250-2269. In: P. Hanelt (ed.). *Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops*. Vol. 4, 3rd ed., Springer-Verlag, Vienna
- Ide, N., Lau, B.H. 1997. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J. Pharm. Pharmacol.* 49:908-911

- Janssen, T., Bremer, K. 2004. The age of major monocot groups inferred from 800 +rbcL sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146:385–398
- Kahn, G. 1996. History of garlic. In: *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species* (Koch, H.P. & Lawson, L.D., eds.), pp. 25-36. Williams and Wilkins, New York, NY
- Kamenetsky, R. 1996. Life cycle and morphological features of *Allium L.* species in connection with geographical distribution. *Bocconeia* 5:251-257
- Kamenetsky, R., London Shafir, I., Khassanov, F., Kik, C., van Heusden, A.W., Vrielingvan Ginkel, M., Burger-Meijer, K., Auger, J., Arnault, I., Rabinowitch, H.D. 2005. Diversity in fertility potential and organo-sulphur compounds among garlics from Central Asia. *Biodiversity and Conservation*
- Kamenetsky, R., Rabinowitch H.D. 2006. The genus *Allium*: A developmental and Horticultural Analysis
- Keusgen, M. 2002. Health and *Alliums*. p. 357-378. In: H. D Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium crops science: recent advances*. CAB Int. Wallingford, UK
- Khassanov, F.O. 1997. Conspectus of the wild growing *Allium* species of Middle Asia. p.141-159 In: M. Öztürk, Ö. Seçmen and G. Görk (eds.), *Plant life in Southwest and Central Asia*. Ege Univ. Press, Izmir, Turkey
- Khassanov, F.O., Umarov, T. 1989. Dikorastushie pishevye vidy roda *Allium L.* Zapadnogo Tyan-shanya. (Wild edible species of the genus *Allium L.* form West Tian Shan) (in Russian). *Uzbeksky biologichesky zhurnal*, 6:24-25
- Khazendari, K.A., Jones, G.H. 1997. The causes and consequences of meiotic irregularity in the leek (*Allium ampeloprasum* spp. *porrum*); implications for fertility, quality and uniformity. *Euphytica* 93:313-319.
- Kik, C., Kahane, R., Gebhardt, R. 2001. Garlic and health. Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases 11(4):57-65 (Suppl.)
- Klaas, M., Friesen, N. 2002. Molecular markers in *Allium*
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33: 1870-1874
- Lorenzetti F., Albertini E., Frusciante L., Rosellini D., Russi L., Tuberosa R., Veronesi F., 2018. Miglioramento genetico delle piante agrarie. Edagricole
- Maaß, H.I., Klaas, M. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum L.*) by isozyme and RAPD markers. *Theor.Appl.Gen.* 91:89-97
- McCollum, G.D.. 1987. Onion and allies. In: Simmonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*. Longman, England, pp 186-190.

- Mes, T.H.M., Friesen, N., Fritsch, R.M., Klaas, M., Bachmann, K. 1997. Criteria for sampling in *Allium* based on chloroplast DNA PCR-RFLPs. *Syst. Bot.* 22:701-712
- Mes, T.H.M., Fritsch, R.M., Pollner, S., Bachmann, K. 1999. Evolution of the chloroplast genome and polymorphic ITS regions in *Allium* subg. *Melanocrommyum*. *Genome* 42:37-247
- Di Messisbugo Cristoforo, 1549. Banchetti composizione di vivande e apparecchio in generale
- Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. 2013. Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse per l'agricoltura. Piano Nazionale sulla Biodiversità di Interesse Agricolo, Inea, Roma
- Moyers, S. 1996. Garlic in health, History and world cousine, pp. 1-36. Suncoast Press, St. Petersburg, FL
- Najda A., Blaszczyk L., Winiarczyk K., Dyduch J., Tchòrzewska D., 2016. Comparative studies of nutritional and health-enhancing properties in the “garlic-like” plant *Allium ampeloprasum* var. *ampeloprasum* (GHG-L) and *A.sativum*. *Scientia Horticulturae* 201, 247-255
- Negri, V. 2005. Agro-Biodiversity Conservation In Europe: Ethical Issues. *J. of Agricultural and Environmental Ethics*, 18, 1: 3-25
- Park S.O., Steadman J.R., Coyne D.P., Crosby K.N., 2007. Development of a Coupling-Phase SCAR Marker Linked to the *Ur-7* Rust Resistance Gene and Its Occurrence in Diverse Common Bean Lines. *Crop Science*, Vol. 48 No. 1, p. 357-363.
- Pinto, J.T., Rivlin, R.S. 1999. Garlic and other allium vegetables in cancer prevention. In: Nutritional oncology (Heber, D., Blacburn, G., and Go, U.L.M, eds.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 393-403
- Raineri, R.R. 2002. L'aglio nel territorio della S.O.A.T. Paceco
- Rao R., Leone A., 2014. Biotecnologie e genomica delle piante. Casa editrice Idelson-Gnocchi, Napoli
- Riddle, J.M. 1996. The medicines of Greco-Roman antiquity as a source of medicines for today. In: Prospecting for drugs in ancient and medieval european texts: a scientific approach (Holland, B.K. ed.), pp. 7-17. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands
- Santamaria P., Ronchi L., 2016. Varietà da conservazione in Italia: lo stato dell'arte per le specie orticole. *Italus hortus* 23(2), 29-44
- Sermini Gentile da Siena, 1874. Le novelle
- Sklyarevsky, L.Y. 1975. The medical proprieties of food plants. (in Russian). Nauka, Moscow

- Steiner, M., Khan, A.H., Holbert, D., Lin, R.I. 1996. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:866-870
- Steiner, M., Lin, R.S. 1998. Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31:904-908
- Tamura K., Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzee. *Molecular biology and evolution* 10: 512-526
- Tenore Michele, 1822. *Flora medica universale e flora particolare della provincia di Napoli, tomo I*, Napoli
- Terzaroli Niccolò, 2015. *Caratterizzazione genetica dell'Aglione (A. ampeloprasum) della Val di Chiana*. Tesi di laurea triennale, DSA, Perugia
- Tesi R., 1994. *Principi di orticoltura e ortaggi di Italia*. Edagricole
- Tiffney, B.H. 1985. The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in tertiary and modern phytogeography of the Northern Hemisphere. *Journal of the Arnold Arboretum* 66: 243–273
- Van Raamsdonk, L.W.D, Ensink, W., van Heusden, A.W.M, Vrielink-van Ginkel, M., Kik, C. 2003 Biodiversity assessment based on cpDNA and crossability analysis in selected species of *Allium* subgenus *Rhizirideum*. *Theor. Appl. Genet.* 107:1048-1058
- Ved Brat, S.. 1965. Genetic system in *Allium* species I. Chromosome variation. *Chromosoma* 16:486-499
- Woodward, P.W. 1996. *Garlic and friends: the history, growth and use of edible alliums*, pp. 2-22. Hyland House, Melbourne, Australia
- Xingjin, H., Song, G.E., Jiemei, X.U., Deyuan, H. 2000. Phylogeny of Chinese *Allium* (*Liliaceae*) using PCR-RFLP analysis. *Science in China (Series C)*. 43:454-463
- Xu, J.M., Yang, L., He, X.J. 1998. A study on karyotype differentiation of *Allium fasciculatum* (*Liliaceae*). *Acta Phytotaxonomica Sinica* 36: 346–352
- Zhou, S.D., He, X.J., Yu, Y., Xu, J.M. 2007. Karyotype studies on twenty-one populations of eight species in *Allium* section *Rhiziridium*. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 45: 207–216

7 SITOGRAFIA

http://dryades.units.it/euganei/index.php?procedure=taxon_page&id=6917&num=335

<http://primer3.ut.ee/>

https://warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/research/vegin/background/genetic_markers/

<http://www.aglione.it/index.html>

<https://www.aglionevaldichiana.net/Disciplinari>

<http://www.agraria.org/prodottitipici/glossariodop.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

http://www.ortomio.it/le_piante_da_orto_varieta.php?IDVar=657&IDSpe=15

<http://www.regione.toscana.it/-/psr-feasr-2014-2020-operazione-10-1-5-coltivazione-delle-variete-locali-adattate-alle-condizioni-locali-a-rischio-di-estinzione>

<http://www.sementi.it/registri-variete>

<http://www.valdichiana.it/lavalle.php>

<http://www.valdichiana.it/bonifica/index.php>