



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PERUGIA**



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

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN
SCIENZE AGRARIE ED AMBIENTALI
Curriculum BIOTECNOLOGIE AGRARIE**

**"CARATTERIZZAZIONE GENETICA
DELL'AGLIONE (*A. ampeloprasum*) DELLA
VAL DI CHIANA"**

LAUREANDO

Niccolò Terzaroli

RELATORE

Emidio Albertini

MATRICOLA

265770

CO-RELATORE

Renzo Torricelli

Anno Accademico 2014-2015

Ringraziamenti

*Un ringraziamento
va ai miei genitori,
che mi fanno sempre sentire amato,
Al DSA3,
dove mi sento a casa,
Ai Prof,
con cui È nato un grande rapporto,
Alle nuove amicizie nate qui,
che possano durare per sempre.
Un ultimo ringraziamento,
ma non meno importante,
va all'occhio di Sauron
e ai piedini di Pazzo Pazzolfi,
fonte di ispirazione inesauribile.*

*Send me a sign, want to leave it all behind
I'll be leaving the hands of doom
Rearrange the master plan, take the future in my hands,
To be free and not trapped anymore*

*Ride the sky, Ride the sky
Give me wings to fly, Ride the sky*

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. Previous studies carried out on *Allium* spp. have been useful in identifying and assessing its evolutionary lineages. However, there are still many gaps in our knowledge of infrageneric taxonomy and evolution of *Allium*.

In the present study, we used a chloroplast DNA (cpDNA) fragment (*trnL-F*) and the nuclear ribosomal internal spacer (ITS) sequence data to examine intrageneric differentiation and phylogeny of *Allium*, in particular to see where is located Aglione, a kind of Great Headed Garlic (*A. ampeloprasum*), typical of the Val di Chiana, an area of the Middle Italy between the provinces of Siena, Arezzo and Perugia.

INDICE

1.INTRODUZIONE

1.1. Il Genere <i>Allium</i>: caratteristiche genetiche e botaniche	pag. 1
1.1.1. Risorse genetiche e possibile uso di specie selvatiche del genere <i>Allium</i>	pag. 6
1.1.2. Morfologia	pag. 9
1.1.2.1. Gruppo bulbose	pag. 10
1.1.2.2. Gruppo rizomatose	pag. 12
1.1.2.3. Specie edibili del genere <i>Allium</i>	pag. 12
1.1.3. Sviluppo della pianta	pag. 13
1.1.3.1. Germinazione del seme	pag. 13
1.1.3.2. Periodo giovanile e transizione allo stadio riproduttivo	pag. 14
1.1.3.3. Ciclo vegetativo	pag. 14
1.1.3.3.1. Specie bulbose	pag. 14
1.1.3.3.2. Specie rizomatose	pag. 15
1.1.3.3.3. Specie edibili coltivate di <i>Allium</i>	pag. 15
1.1.4. Propagazione	pag. 17
1.1.4.1. Per seme	pag. 17
1.1.4.2. Vegetativa	pag. 18
1.1.5. Composizione chimica	pag. 19
1.1.6. Caratteristiche nutrizionali	pag. 21
1.1.7. Storia	pag. 21
1.1.8. Importanza della coltura	pag. 23
1.2. <i>Allium ampeloprasum</i>	pag. 24
1.2.1. Pratiche colturali	pag. 26
1.2.1. Il territorio: la Val di Chiana	pag. 28
1.2.1. Mercato, usi e proprietà	pag. 32
1.3. Varietà da conservazione	pag. 33
1.3.1. Quantificazione dei fattori di rischio di erosione	pag. 33
1.3.2. Valutazione della dimensione delle popolazioni e della struttura genetica delle varietà locali mantenute <i>in situ</i>	pag. 36
1.4. Caratterizzazione genetica	pag. 36
1.4.1. Marcatori genetici	pag. 36
1.4.2. Marcatori morfologici	pag. 37
1.4.3. Marcatori molecolari	pag. 38
1.4.4. Vantaggi/svantaggi dei marcatori molecolari vs. descrittori morfologici	pag. 39
1.4.5. Sequenziamento comparativo del DNA	pag. 39
1.4.5.1 I Cloroplasti	pag. 40
1.4.5.2 ITS	pag. 44
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 45
3. MATERIALI E METODI	pag. 47

3.1. Materiale genetico di partenza	pag. 47
3.2. Estrazione del DNA genomico	pag. 49
3.3. Amplificazione delle sequenze	pag. 50
3.4. Purificazione dei prodotti di PCR per il sequenziamento	pag. 50
3.5. Quantificazione dei prodotti di PCR	pag. 51
3.6. Reazione di sequenza	pag. 52
3.7. Analisi bioinformatiche	pag. 52
3.8. Assemblaggio delle sequenze	pag. 52
3.9. Allineamento delle sequenze	pag. 52
3.10. Alberi filogenetici	pag. 53
3.11. Caratterizzazione morfologica	pag. 53
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 54
4.1. Caratterizzazione morfologica	pag. 54
4.2 Estrazione del DNA genomico	pag. 54
4.3. Amplificazione tramite PCR	pag. 55
4.4. Sequenziamento	pag. 56
4.5. Analisi bioinformatiche e discussione	pag. 56
5. BIBLIOGRAFIA	pag. 62
6. APPENDICE	pag. 76

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* (includendo *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 copre le latitudini a Nord durante l'Eocene¹ (Li *et al.*, 2010).

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 conteneti aperture nettarie da pori alla base dell'ovario, stigma intero o tripartito, capsula loculicida², 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 (Traub, 1968; Friesen, 1992; Huang *et al.*, 1995; 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

¹ Eocene: Seconda delle sette fasi del Terziario o Cenozoico, va 56 a 34 milioni di anni fa

² Capsula loculicida: La capsula è un frutto secco prodotto da un gineceo sincarpo deiscete. In una capsula loculicida il frutto deisce longitudinalmente attraverso i loculi

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*.
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 Gatersleben riconosce due piccoli subgenera *Bromatorriza* e *Anguinum*.

Studi molecolari più recenti (Havey, 1992; Bradeen *et al.*, 1994; 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 (Fig.1).

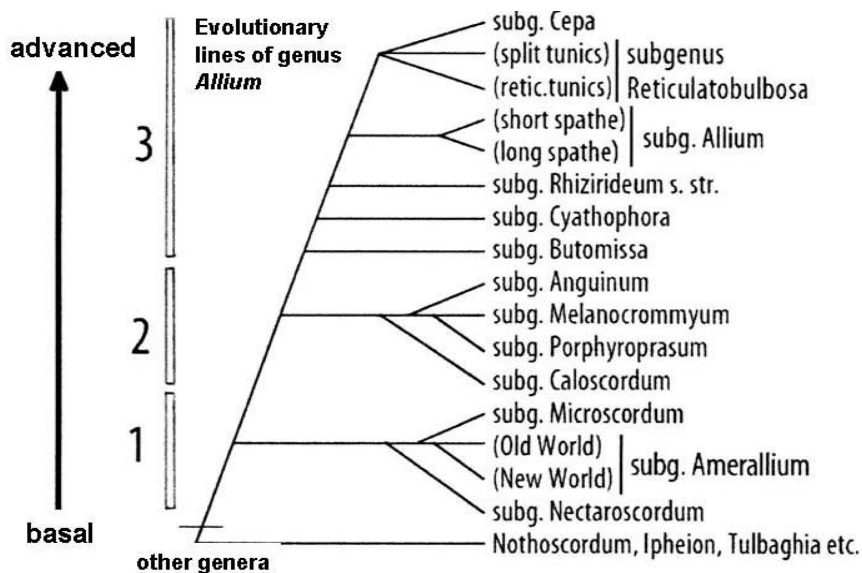


Fig. 1: classificazione filogenetica di *Allium* (da Fritsch, 2001)

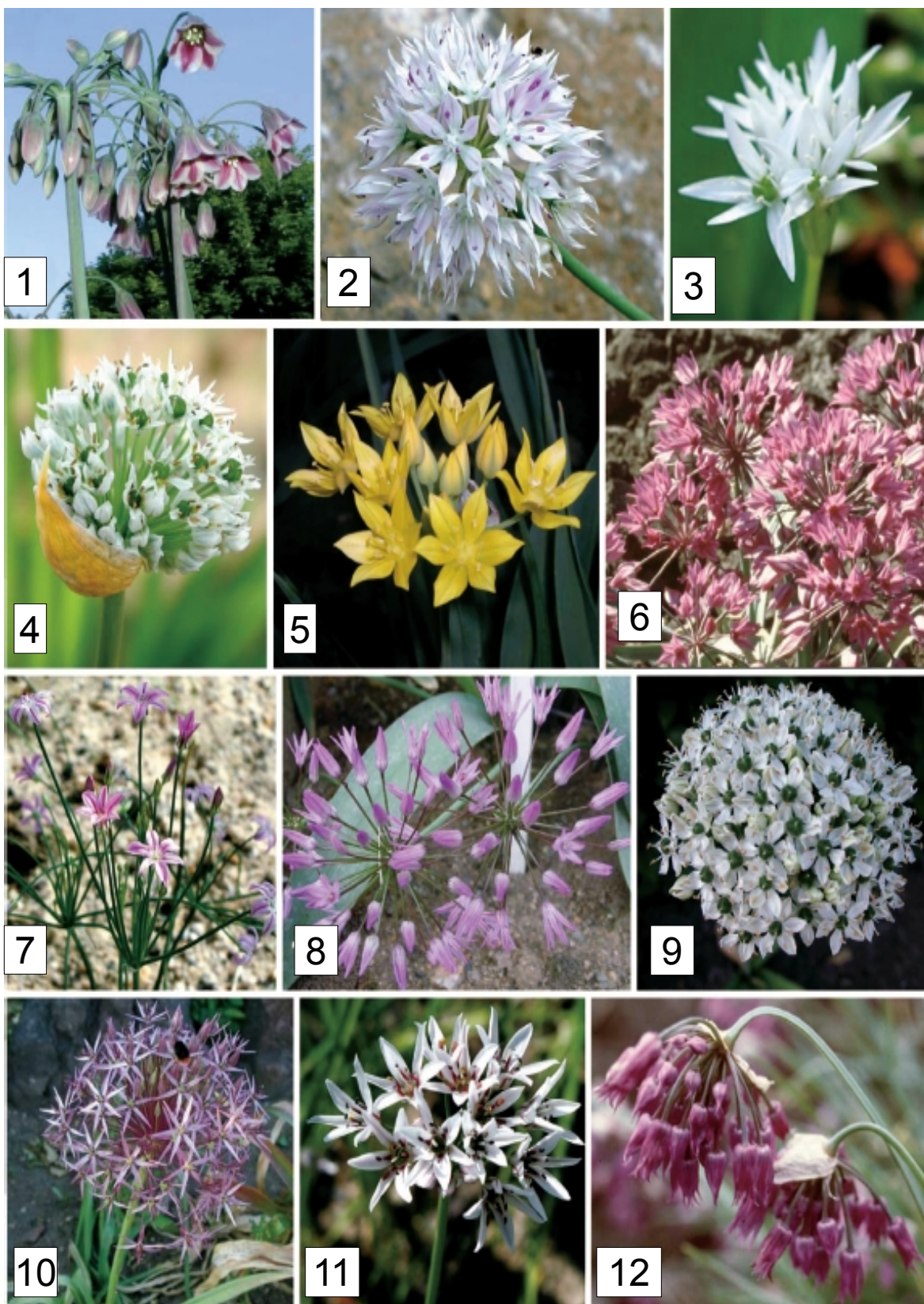


Fig. 2: fiori di *Allium*: 1. *A. siculum* (sect. *Nectaroscordum*) - 2. *A. amplexens* Torr. (sect. *Lophioprason*) - 3. *A. ursinum* (sect. *Arctoprason*) - 4. *A. hookeri* (sect. *Bromatorrhiza*) - 5. *A. moly* (sect. *Molium*) - 6. *A. oreophilum* (sect. *Porphyroprason*) - 7. *A. neriniflorum* (sect. *Caloscordum*) - 8. *A. cupuliferum* Regel (sect. *Regeloprasum*) - 9. *A. nigrum* (sect. *Melanocrommyum*) - 10. *A. cristophii* (sect. *Kaloprason*) - 11. *A. ramosum* (sect. *Butomissa*) - 12. *A. cyathophorum* (sect. *Cyathophora*). Da Friestch, Friesen e Blattner (2006).

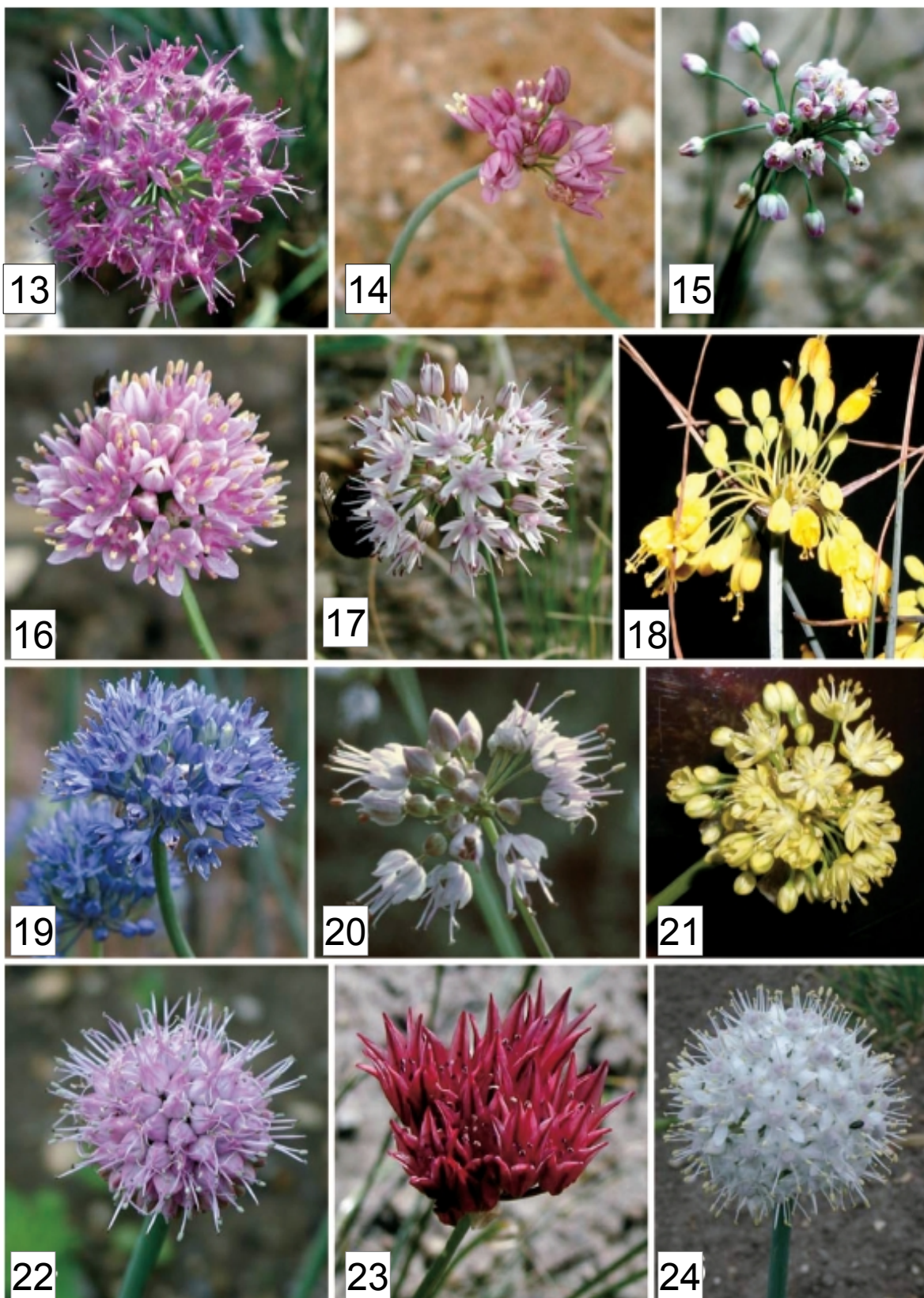


Fig. 3: fiori di *Allium*: 13. *A. przewalskianum* (sect. *Caespitosoprason*) - 14. *A. mongolicum* (sect. *Caespitosoprason*) - 15. *A. tenuissimum* (sect. *Tenuissima*) - 16. *A. incensiodorum* (sect. *Rhizidreum*) - 17. *A. eduardii* (sect. *Eduardia*) - 18. *A. flavum* (sect. *Codonoprasum*) - 19. *A. caeruleum* (sect. *Caerulea*) - 20. *A. ericetorum* (sect. *Daghestanica*) - 21. *A. scabriscapum* (sect. *Scabriscapa*) - 22. *A. carolinianum* (sect. *Falcatifolia*) - 23. *A. inconspicuum* Vved. (sect. *Campanulata*) - 24. *A. galanthum* (sect. *Cepa*). Da Friestch, Friesen e Blattner (2006).

1.1.1. Risorse genetiche e possibile uso di specie selvatiche del genere *Allium*

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 irriconscibili. 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).

La biologia moderna dispone di mezzi per l'introduzione di geni (Eady, 2002; Sher, 1980; Zheng *et al.*, 2004) da una specie all'altra. Così, i CWR sono di fondamentale importanza per il miglioramento e l'introduzione di nuove colture (Jones e Mann, 1963; Astley *et al.*, 1982; Astley, 1990; Currah *et al.*, 1984; De Ponti e Inggamer, 1997; Havey, 1999; Rouamba *et al.*, Kik, 2002; Garcia Lampasona, 2003) e devono essere collezionati, valutati e conservati.

La consapevolezza generale delle risorse genetiche è aumentata da quando N.I. Vavilov (1926) ha scoperto i centri geografici della diversità genetica, comunque, solo poche e irregolari missioni di raccolta e attività di conservazione di piante di *Allium* hanno avuto luogo prima degli anni '70. Dopo di esse, sono iniziate, ad opera di agenzie varie, banche del germoplasma, e ricercatori (Astley, 1982, 1990; Etoh e Simon, 2002; Maggioni, 2004), collezioni di seme e di organi di riserva, attività di conservazione di varietà locali e di CWR delle specie commestibili coltivate. Le più grandi collezioni di seme si trovano a Wellesbourne, UK; Wageningen, Paesi Bassi; Fort Collins, Colorado, USA; San Pietroburgo, Russia; Gatersbelen, Germania. La conservazione *in situ* avviene, invece, a Rehovot e Bet Dagan, Israele; Olomouc, Repubblica Ceca; Almaty, Kazakhstan; Skierniewice, Polonia; Gatersbelen, Germania; Pullman, Washington, USA.

Per specie di *Allium* selvatico non commestibili, comprese fonti per nuove ornamentali o per piante ricche di composti naturali con qualità terapeutiche, sono stati fatti sforzi molto minori nella collezione sistematica e nella preservazione. Inoltre, sforzi altrettanto piccoli hanno riguardato la valutazione del germoplasma conservato (Pooler and Simon, 1993; Baitulin *et al.*, 2000; Van Raamsdonk *et al.*, 2003; Kamenetsky *et al.*, 2004b, 2005), i cui benefici però sono subito diventati evidenti. Un buon esempio è il caso di *A. Roylei*, un

membro della sezione *Cepa*, originario dell'Himalaya: un unico esemplare era stato raccolto negli anni '50, conservato per molti anni e valutato solo negli anni '80 (Kofoet *et al.*, 1990; Kofoet e Zinkernagel, 1990). Si è poi trovato essere l'unica fonte per una completa resistenza alla peronospora (*Perenospora destructor*) e una buona fonte di resistenza per le malattie dovute a *Botrytis* (Kofoet *et al.*, 1990; Kofoet e Zinkernagel, 1990; Van der Meer e De Vries, 1990; De Vries *et al.*, 1992a, b, c). I due funghi infettano i bulbi di cipolla, causando perdite economiche severe, dovute alla riduzione di qualità e quantità (Maude, 1990). La progenie, nata dagli incroci tra questa singola pianta e la cipolla, è stata usata in un gran numero di programmi di miglioramento genetico in Olanda, USA, Israele.

In aggiunta alle collezioni *in situ* di *Allium* propagati vegetativamente, la conservazione *in vitro* offre una valida alternativa per la conservazione del germoplasma e può essere anche usata per rivitalizzare piccole collezioni e per mantenere il materiale sano. Sono stati pubblicati molti lavori sulla produzione *in vitro* di materiali di propagazione e conservazione di *Allium* (e.g. Novak, 1990; Nagakubo *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 1995; Keller e Lesemann, 1997; Pateña *et al.*, 1998; Senula *et al.*, 2000), ma queste tecniche sono, a tutt'oggi, poco diffuse.

E' stata sviluppata (Keller, 2002) anche la crioconservazione per il mantenimento a lungo termine di vari tessuti e organi, ma il costo di questa tecnica ne ha fortemente limitato la diffusione.

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.*, 1999; 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 (Tab.1). 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*. 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.

Tab. 1: dati etnobotanici su *Allium* selvatici usati dalle popolazioni locali in Asia Centrale (Kamenetsky et al., 2004b). Il nome delle specie è in accordo con Gregory et al. (1998).

Nome della specie	Destinazione d'uso	Parti della pianta usate
<i>A. jodanthum</i> Vved.	In alcol come antisettico	Foglie e steli
<i>A. motor</i> Kamelin e Levichev	Come cibo a Marzo-Aprile, come tonico in inverno	Foglie con succo d'arancio
<i>A. pskemense</i> B.Fedtsch	Nel cibo contro problemi intestinali	Bulbi, foglie e steli con succo lattiginoso
<i>A. flidens</i> Regel	Contro mal di denti e parotite	Foglie e bulbi
<i>A. severtztovioides</i> R.M. Fritsch	Nel cibo contro il mal di stomaco	Foglie (senza succo d'arancio)
<i>A. karataviense</i> Regel	Aggiunto al cibo come tonico	Foglie e bulbi
<i>A. suworowii</i> Regel	Aggiunto al cibo come tonico	Bulbi
<i>A. stipitatum</i> Regel	Usato marinato come tonico	Bulbi
<i>A. oschaninii</i> O.Fedtsch	Usato come la cipolla	Bulbi, foglie e steli
<i>A. longicuspis</i> Regel	Usato come il comune aglio	Bulbi, foglie e steli
<i>A. caesium</i> Schrenk	Usato come il comune aglio	Bulbi e foglie
<i>A. brevidentifforme</i> Vved.	Usato come il comune aglio	Bulbi e foglie
<i>A. komarowii</i> Lipsky	Usato nel cibo contro dolori cardiaci	Bulbi
<i>A. rosenorum</i> R.M. Fritsch	Aggiunto al cibo come tonico	Foglie
<i>A. crystallinum</i> Vved.	Usato come il comune aglio	Bulbi e foglie
<i>A. majus</i> Vved.	Aggiunto al cibo come tonico	Bulbi con succo d'arancio
<i>A. giganteum</i> Regel	Aggiunto al cibo come tonico	Bulbi con succo d'arancio
<i>A. praemixtum</i> Vved.	Usato come la cipolla	Bulbi, foglie e steli

1.1.2. Morfologia

Oltre alla tassonomia, una più grande categorizzazione dei "tipi biomorfologici" può essere usata per capire le correlazioni tra i programmi di sviluppo annuali di varie specie, con la loro distribuzione geografica, e l'ambiente (Pastor e Valdes, 1985; Hanelt *et al.*, 1992; Kamenetsky, 1992,1996; Kamenetsky e Fritsch, 2002; Kamenetsky e Rabinowitch, 2002). I tipi biomorfologici comprendono diversi taxa di *Allium*, servendo sia per la conoscenza teorica che per le implicazioni pratiche, come l'uso in orticoltura e per un'ulteriore

domesticazione e utilizzazione di preziose specie selvatiche di *Allium*. Parametri importanti per la tipizzazione biomorfologica delle diverse specie sono le condizioni ambientali prevalenti nelle nicchie ecologiche e geografiche e la natura degli habitat delle piante (Kamenetsky, 1996).

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.

Kamenetsky e Rabinowitch (2006) distinguono, in base al loro apparato radicale, presenza e sviluppo di organi di riserva, tipo di germinazione dei semi, sviluppo vegetativo, ramificazioni, ciclo vitale annuale, dormienza e florogenesi, tre tipi biomorfologici: specie bulbose, rizomatose e specie domestiche commestibili.

1.1.2.1. Gruppo bulbose

I membri di questo gruppo popolano principalmente le steppe e le aree desertiche e semi-desertiche (Kolmann, 1986; Kamenetsky, 1996; Hanelt *et al.*, 1992) (Fig.4). I bulbi consistono di foglie di stoccaggio (catafilli) concentriche che si dipartono da un disco compresso e appiattito (piastra basale) (De Mason, 1990; Brewster, 1994). Quando la formazione del bulbo è completa, la pianta solitamente entra in un periodo di dormienza che dura da poche settimane a diversi mesi, seguito dalla germinazione, che avviene o in autunno o in primavera (Brewster, 1990; Pistrick, 1992). I bulbi, parzialmente o completamente sotterranei, sono mezzi per sopravvivere al duro inverno e all'estate, condizioni ambientali prevalenti nel centro d'origine. A seconda della specie, la fase giovanile dura 1-5 anni: una volta adulte fioriscono in primavera (Kamenetsky, 1992, 1996).

All'interno di questo gruppo c'è un'ulteriore suddivisione in due sottogruppi:

1. Bulbi formati da una piastra basale condensata con diverse foglie, vere o false (guaine fogliari spesse) (Fig.5); l'apparato radicale annuale è diffuso o semi-diffuso e le ramificazioni si trovano solo al primo ordine. A questo sottogruppo appartengono *Allium ampeloprasum*, *A. caeruleum*, *A. delicatulum*, *A. dictyoprasum*, *A. phaneranthum*, e molti altri.



Fig. 4: schema della distribuzione geografica delle specie bulbose di *Allium*, da Kamenetsky e Rabinowitch, 2006

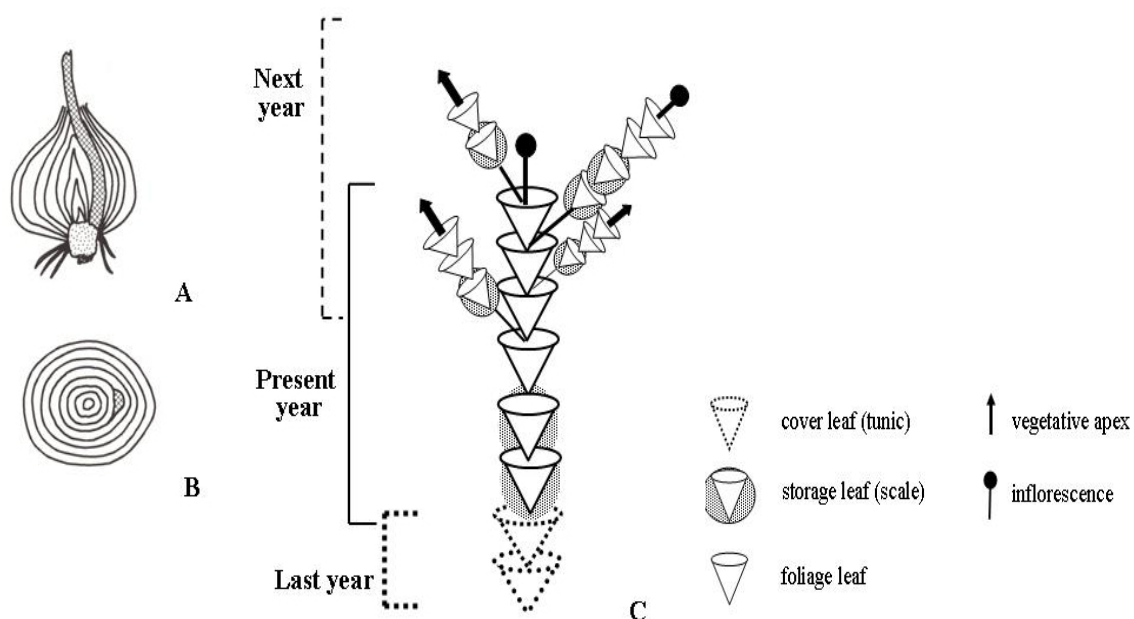


Fig. 5: struttura morfologica degli organi ipogei in *A. caesium* Schrenk, subgenus *Allium*. I germogli laterali possono sviluppare infiorescenze secondarie.

(A)- Sezione longitudinale di un bulbo adulto

(B)- Sezione trasversale di un bulbo adulto

(C)- rappresentazione schematica di una struttura morfologica

Da Kamenetsky e Rabinowitch, 2006

2. I bulbi sono formati solo da una piastra basale e foglie specializzate carnose e spesse. Alla fine della stagione vegetativa le guaine fogliari si seccano e formano le tuniche avvolgenti, che non contengono materiale di riserva. L'apparato di riserva è diffuso e consiste di numerose radici annuali che non si diramano. Le radici sono solitamente efemeroidali e permettono un assorbimento rapido ed efficiente dell'acqua durante la corta fase vegetativa comune nelle regioni desertiche (Baitulin *et al.*, 1986; Kamenetsky, 1996). La maggior parte delle specie di questo sottogruppo appartiene al sottogenere *Melanocrommyum*, che ha svolto il processo evolutivo nelle condizioni aride dell'Asia centrale e del Medio Oriente (Fritsch, 2001). Vi appartengono: *A. altissimum*, *A. karataviense*, *A. oreophillum*, *A. rothii*, *A. sergii*, *A. tel-avivense* e altri.

1.1.2.2. Gruppo rizomatose

Le specie con organi ipogei rizomatosi sono comunemente diffusi nelle zone temperate, soprattutto in habitat mesoxerofitici, come praterie, foreste e alte montagne della Siberia, Nord Europa e Canada e anche nelle zone aride alpine e sub-alpine (Hanelt *et al.*, 1992; Fritsch e Friesen, 2002). Le piante producono falsi bulbi fatti da guaine fogliari di differente spessore e rizomi sotterranei con la principale funzione di organi di riserva. Il rizoma carnoso consiste di successive concrescenze della piastra basale, che sviluppa in più stagioni e cresce in verticale, orizzontale o obliquo (Cheremushkina, 1985, 1992; Baitulin *et al.*, 1986; Kamenetsky, 1992, 1996).

Le specie appartenenti al gruppo delle rizomatose possono essere distinte in tre sottogruppi:

1. Emicriptofite con rizomi orizzontali e falsi bulbi, composti di guaine fogliari un po' addensate, come in *A. senescens*, *A. nutans*, *A. odorum* e *A. subtilissimum*.
2. Geofite con rizomi obliqui o obliquo-verticali, come *A. oreoprasum*, *A. rubens*, *A. strictum* e altri.
3. Il gruppo intermedio tra rizomatose e bulbose, con rizomi piccoli e verticali, che comprende *A. altaicum*, *A. galanthum*, *A. pskemense*.

1.1.2.3. Specie edibili del genere *Allium*

La domesticazione di queste specie è iniziata circa 10 millenni fa: da questo momento, agricoltori e breeders hanno selezionato per caratteri importanti economicamente, modificando profondamente la morfologia e la fisiologia di queste specie. Per esempio, la cipolla e lo scalogno sono parenti stretti delle specie rizomatose *A. vavilovii* e *A. oschaninii*

del subgenus *Cepa* (Hanelt, 1990; Havey, 1992b; Fritsch *et al.*, 2001; Van Raamsdonk *et al.*, 2003). Comunque, la morfologia di *A. cepa* assomiglia a quella di una vera bulbosa: il bulbo è avvolto da alcune tuniche, e consiste di una piastra basale condensata con diverse scaglie, sia vere che false (Kamenetsky e Rabinowitch, 2006). La selezione da parte dei breeders su porro e kurrat dalla bulbosa *A. ampeloprasum* ha comportato lo sviluppo di organi di riserva fatti di una concrescenza successiva delle guaine fogliari, che formano lunghi e carnosi falsi steli (Van der Meer e Hanelt, 1990; De Clercq e Van Bockstaele, 2002).

Originariamente una specie bulbosa, i bulbi di aglio consistono di numerosi germogli laterali trasformati in organi di riserva (bulbilli o spicchi). Il bulbo intero, avvolto da strati di foglie basali secche e spesse, è formato da una o più spire di spicchi, ognuno dei quali formato da un germoglio vegetativo incorporato dentro a una spessa foglia di riserva, avvolta all'esterno da una guaina fogliare protettiva, secca e cilindrica (Mann, 1952; De Mason, 1990).

1.1.3. Sviluppo della pianta

1.1.3.1. Germinazione del seme

Durante la maturazione, i semi della maggior parte delle specie di *Allium* diventano dormienti, e la loro germinazione dipende dalle condizioni ambientali, prime tra tutti la temperatura e l'umidità (Dalezkaya e Nikofova, 1984; Specht e Keller, 1997; Kamenetsky e Gutterman, 2000). Per esempio, le condizioni ottimali per la germinazione del seme di *A. rothii* (subgenus *Melanocrommyum*; pianta nativa del deserto del Negev, Israele, dove l'inverno è mite), sono 14-28 giorni con umidità a saturazione e 15°C (Gutterman *et al.*, 1995). In confronto, *A. rosenbachianum* (*A. rosenorum*), che cresce selvatico nei climi continentali dell'Asia Centrale, necessita di temperature tra 5 e 25°C, ma l'elongazione del cotiledone è più veloce a 20-25°C che a 5°C (Aoba, 1968).

Lo sviluppo epigeo è comune nelle specie di *Allium*, cioè l'emergenza del cotiledone è seguita dalla crescita della radichetta embrionale, ed entrambe le estremità della parte superiore e curva del cotiledone (cappio; ginocchio) si allungano simultaneamente, dando così inizio alla crescita verso l'alto. Quando esposto alla luce, il cotiledone diventa verde, e la parte distale si raddrizza (Jones e Mann, 1963; De Mason, 1990). Qualche specie, comunque, mostra una germinazione ipogea, in particolare quelle adattate a condizioni umide (e.g., *A. ursinum* e *A. victorialis*) (Druselmann, 1992).

1.1.3.2. Periodo giovanile e transizione allo stadio riproduttivo

Quando propagate da seme, tutte le piante di *Allium* subiscono un'obbligatoria fase giovanile prima di poter rispondere agli stimoli ambientali e fiorire. Questo periodo varia da alcuni mesi (cipolla, porro, scalogno) fino a 5-6 anni (e.g., *A. giganteum*, *A. karataviense*: De Hertogh e Zimmer, 1993), e finisce quando la pianta raggiunge una certa età fisiologica e/o biomassa (vedi Tab. 2). Negli *Allium* commestibili, la transizione del meristema alla fase riproduttiva avviene al primo o secondo anno di sviluppo del seme. Il numero di foglie serve come misura affidabile e indipendente dal tempo dello stato fisiologico della pianta e della prontezza a fiorire:

Tab. 2: requisiti per la fioritura da Kamenetksy e Rabinowitch (2002)

<i>Allium</i> spp.	Coltura	Numero minimo di foglie	Fonte
<i>A. cepa</i>	Cipolla	10-14 (3-4 in casi estremi)	Rabinowitch, 1985;1990
<i>A. cepa</i> gruppo Aggregatum	Scalogno	'6-7	Krontal <i>et al.</i> , 1998
<i>A. sativum</i>	Aglione	6-30 (genotipo dipendente)	E.Shemesh, 2003
<i>A. ampeloprasum</i>	Porro	'6-7	Van der Meer e Hanelt, 1990; De Clercq e Van Bockstaele, 2002

1.1.3.3. Ciclo vegetativo

Le specie di *Allium* variano significativamente il loro ciclo annuale e i processi morfogenetici, come negli esempi seguenti.

1.1.3.3.1. Specie bulbose

Quelle di origine Mediterranea, che appartengono principalmente ai sottogeneri *Amerallium* e *Nectaroscordum* e in parte al sottogenere *Allium*, si sono evolute con estati secche e calde, ma con inverni miti e favorevoli alla crescita e allo sviluppo delle piante (McNeal e Ownbey, 1973; Hanelt, 1990). Quindi, il germogliamento inizia in autunno, lo sviluppo delle foglie continua in inverno e primavera, l'elongazione dello scapo florale

avviene in primavera ed è comune la dormienza estiva (Kamenetsky, 1994a; Kamenetsky *et al.*, 2000; Kamenetsky e Rabinowitch, 2002). Il fotoperiodo lungo è essenziale per l'induzione alla fioritura in *A. sphaerocephalon* (Berghoef e Zevenbergen, 1992) e accelera lo sviluppo florale in *A. ampeloprasum* (De Hertogh e Zimmer, 1993).

1.1.3.3.2. Specie rizomatose

La maggior parte di esse rimane attiva, produce nuove foglie e rinnova i bulbi durante tutto l'anno (Cheremushkina, 1992; Pistrick, 1992; Kamenetsky, 1996). L'inverno rallenta la crescita, mentre la primavera velocizza lo sviluppo a causa delle condizioni ambientali favorevoli. Il meristema apicale caulinare (SAM = shoot apical meristem) rimane vegetativo quasi tutto l'anno, e diventa riproduttivo in primavera in risposta al fotoperiodo lungo. La differenziazione florale e l'elungazione dello scapo sono veloci, la fioritura si realizza in estate.

1.1.3.3.3. Specie edibili coltivate di *Allium*

In questo caso, la coltivazione e la selezione da lunghissimo tempo, con la pressione che ne consegue, hanno determinato un adattamento alle varie condizioni ambientali e migliorato i caratteri d'interesse di queste colture, che hanno profondamente modificato i processi di sviluppo. Questi includono: la difficoltà di andare a seme in tutti gli *Allium* edibili, fusti più lunghi nel porro, crescita veloce delle foglie nell'erba cipollina, cuore singolo nella cipolla o al massimo doppio nello scalogno. Nella cipolla si è andati anche verso la selezione di bulbi più grandi, verso una grande variabilità per quanto riguarda il colore e la forma, per il gusto più o meno intenso, per l'alto o basso contenuto di sostanza secca, rispettivamente per l'industria di trasformazione e per il mercato fresco.

Con l'eccezione dell'aglio, dell'aglione e di tutti i cloni tradizionali di scalogno, gli *Allium* edibili sono colture annuali o biennali, propagate per seme. Le condizioni climatiche, i terreni, le tecnologie di pre e post-raccolta influenzano la crescita e lo sviluppo, oltre alla morfologia e alla composizione chimica della pianta (Rabinowitch, 1979), la dolcezza (Randle *et al.*, 1995; Randle e Lancaster, 2002), durata della dormienza e resistenza allo stoccaggio (Komochi, 1990; Gubb e MacTavish, 2002).

In generale, l'induzione florale per questo gruppo è favorita dalle basse temperature e dal fotoperiodo lungo (Kamenetsky *et al.*, 2004a), mentre alte temperature di stoccaggio ne danneggiano il germogliamento.

L'erba cipollina (*A. schenoprasum*) (Poulsen, 1990) e il porro (*A. ampeloprasum*) (van der

Meer e Hanelt, 1990; De Clercq e Van Bockstaele, 2002) sono biennali. La vernalizzazione favorisce la fioritura in entrambi. Nel porro, la fioritura, per avere inizio, necessita di temperature costanti di almeno 21°C, sempre con fotoperiodo lungo.

Tutti i cloni dei moderni agli commerciali (*A. sativum*) sono completamente sterili e quindi sono propagati solo vegetativamente (Simon e Jenderek, 2004). In assenza di riproduzione sessuale, l'incremento di variabilità genetica è limitato a mutazioni casuali o indotte (Burba, 1993), variazioni somaclonali (Novak, 1990) o trasformazioni genetiche (Kondo *et al.*, 2000; Sawahel, 2002; Zheng *et al.*, 2004a,b). La recente scoperta di cloni fertili in Asia Centrale (Etoh *et al.*, 1988; Kamenetsky *et al.*, 2004), combinata con l'applicazione di mezzi fisiologici per la ristorazione della fertilità, potrebbe facilitare lo sfruttamento della grande diversità genetica, rendendola accessibile a studi genetici e a miglioramenti delle colture.

Nell'aglio, l'infiorescenza e il bulbo competono per risorse limitate. La pressione di selezione esercitata dall'uomo per millenni per la precocità e la dimensione dei bulbi, ha modificato il bilancio ormonale a favore degli organi di riserva. Di conseguenza, molti cloni di aglio non fioriscono, oppure fioriscono e producono scapi senza infiorescenza (Takagi, 1990).

Durante la fase vegetativa sia nelle giovani piantine che dagli spicchi che germogliano, il SAM dell'aglio produce solo primordi fogliari. Poi, quando la pianta raggiunge una massa critica e a seguito di effetti ambientali (Kamenetsky e Rabinowitch, 2001; Kamenetsky *et al.*, 2004a), il meristema apicale cambia verso una di queste tre possibili vie: (1) degenerazione dell'apice e arresto della crescita; (2) formazione di uno spicchio al centro del bulbo; (3) iniziatazione di una spata, seguita dalla formazione del meristema riproduttivo, dall'elongazione dello scapo e dalla differenziazione di un'infiorescenza. (Takagi, 1990). La capacità di andare a seme è stata usata per classificare l'aglio (Takagi, 1990) come segue: (1) *Nonbolting* - le piante normalmente non formano lo scapo, ma producono solo degli spicchi all'interno di uno scapo incompleto; (2) *Incomplete bolting* - le piante producono uno scapo corto e sottile, che sostiene solo pochi grandi bulbilli fiorali e solitamente non forma fiori; (3) *Complete bolting* - le piante producono uno scapo lungo e spesso, con molti fiori e bulbilli.

Studi sull'induzione fiorale degli appartenenti a quest'ultimo gruppo hanno rivelato quattro fasi di sviluppo, che includono: (1) transizione del meristema apicale; (2) allungamento dello scapo; (3) differenziazione dell'infiorescenza; e (4) completamento dello sviluppo fiorale. La transizione del meristema è autonoma e avviene in piante in attiva crescita in

una molteplicità di condizioni sia di stoccaggio che di crescita, ma il fotoperiodo lungo è essenziale per l'allungamento iniziale dello scapo (Kamenetsky e Rabinowitch, 2001; Kamenetsky *et al.*, 2001). Con un continuo fotoperiodo favorevole, la differenziazione dei boccioli florali nell'infiorescenza in via di sviluppo è seguita dalla formazione di bulbilli, che fanno degenerare i fiori veri e propri. Un fotoperiodo corto blocca lo sviluppo di questi bulbilli florali, perciò, una corta interruzione del fotoperiodo lungo è sufficiente a indurre l'allungamento dello scapo, ma non basta per lo sviluppo dei bulbilli, così da avere una fioritura con fiori fertili (Kamenetsky *et al.*, 2004a).

Gli effetti della temperatura e del fotoperiodo sono quantitativi sia sullo sviluppo dell'aglio che sulla sua induzione: con un fotoperiodo lungo, le basse temperature favoriscono l'allungamento dello scapo, mentre le temperature miti agevolano la traslocazione delle riserve agli spicchi e ai bulbilli florali, con la conseguente degenerazione dei fiori. Il fotoperiodo corto promuove la crescita delle foglie e il germogliamento degli spicchi ausiliari (Kamenetsky e Rabinowitch, 2006).

1.1.4 Propagazione

1.1.4.1. Propagazione per seme

La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Allium* produce semi vitali (Rabinowitch, 1990b) (Fig. 6). La temperatura sembra essere il fattore dominante nella germinazione dei semi, con risposta specie-specifica. Nella maggior parte delle specie edibili, la selezione da parte dell'uomo ha eliminato la dormienza del seme, e quando c'è abbastanza umidità, la germinazione avviene in un ampio range di temperature. Per la cipolla si va da 5° a 35°C, con un optimum tra 25° e 30°C (Rabinowitch, 1990b).

Nelle specie coltivate la perdita di vigore del seme inizia subito dopo la maturazione, e, con le normali condizioni ambientali, la vitalità viene persa molto rapidamente. Lo stoccaggio a bassa temperatura e umidità permette la conservazione a lungo termine con una riduzione minima del vigore (Roberts, 1972).

Fiori fertili e semi vitali di aglio sono stati prodotti a Kagoshima, Giappone, dalle piante collezionate in Asia Centrale e Kazakistan (Etoh *et al.*, 1988; Etoh e Simon, 2002).

La massiccia propagazione dei semi di aglio sembra essere un'opzione fattibile (Etoh e Simon, 2002), e in futuro la riproduzione sessuale potrà essere sfruttata per il miglioramento genetico per la produzione e la qualità, per la tolleranza a stress biotici e abiotici e per l'adattamento a precise nicchie ecologiche. Inoltre, la produzione di seme da

parte di cultivar affermate potrebbe essere usata per la produzione di propaguli virus esenti, riducendone il costo rispetto ad altre tecniche (Kamenetsky e Rabinowitch, 2006).



Fig. 6 : semi di *Allium textile* (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Allium_textile_seeds.jpg)

1.1.4.2. Propagazione vegetativa

Alcune specie di *Allium*, come l'aglio, lo scalogno e la maggior parte delle ornamentali, sono propagate vegetativamente attraverso gli spicchi, i bulbilli, la divisione dei rizomi e i bulbilli fiorali (Kamenetsky, 1994b). Il tasso di propagazione vegetativa naturale comunque, è generalmente basso, per cui sono state studiate e impiegate delle tecniche per incrementarne l'efficienza.

Nelle bulbose, la ramificazione intrabulbo varia tra uno e due set (e.g., *A. aflatulense*, *A. macleanii*, *A. flavum*) fino a una decina di bulbi ascellari figli (e.g., *A. moly*, *A. ampeloprasum*, *A. scorodoprasum*). Il processo può comunque essere facilitato dalle condizioni di crescita, tra cui un'ottima fertilizzazione e irrigazione, crescita a temperature tra 20-30°C e una difesa rigorosa delle piante.

I bulbilli dell'infiorescenza sono usati nella propagazione vegetativa delle specie edibili, come l'aglio, il rocamboles (*A. scorodoprasum*) (Brewster e Rabinowitch, 1990). Il primo anno, l'aglio cresciuto da questi propaguli produce solo bulbi piccoli, per cui il ritorno economico sarà ottenuto solo dopo la seconda stagione vegetativa. Come per gli spicchi, anche i bulbilli "fiorali" possono essere attaccati da virus e da altri patogeni, con perdite di produzione per quantità e qualità fino al 70% (Nagakubo *et al.*, 1993; Davis, 1995). Piante

di aglio libere dai patogeni vengono ottenute attraverso la coltura di apici meristematici combinata con termoterapia, seguite da una moltiplicazione in vitro (Salomon, 2002). I protocolli per la propagazione attraverso colture di tessuti sono disponibili per l'aglio e lo scalogno (Walkey *et al.*, 1987; Novak, 1990; Robledo-Paz *et al.*, 2000; Salomon, 2002; Zheng *et al.*, 2003); *A. aflatulense*, *A. ampeloprasum* e *A. aschersonianum* (Evenor *et al.*, 1997; Ziv *et al.*, 1983). La propagazione di queste specie può avvenire anche da callo (Barandiaran *et al.*, 1999a;b;c), dal meristema dell'infiorescenza (Xu *et al.*, 2001), e mediante embriogenesi (Haque *et al.*, 1998; Fereol *et al.*, 2002; Fereol *et al.*, 2005).

1.1.5. Composizione chimica

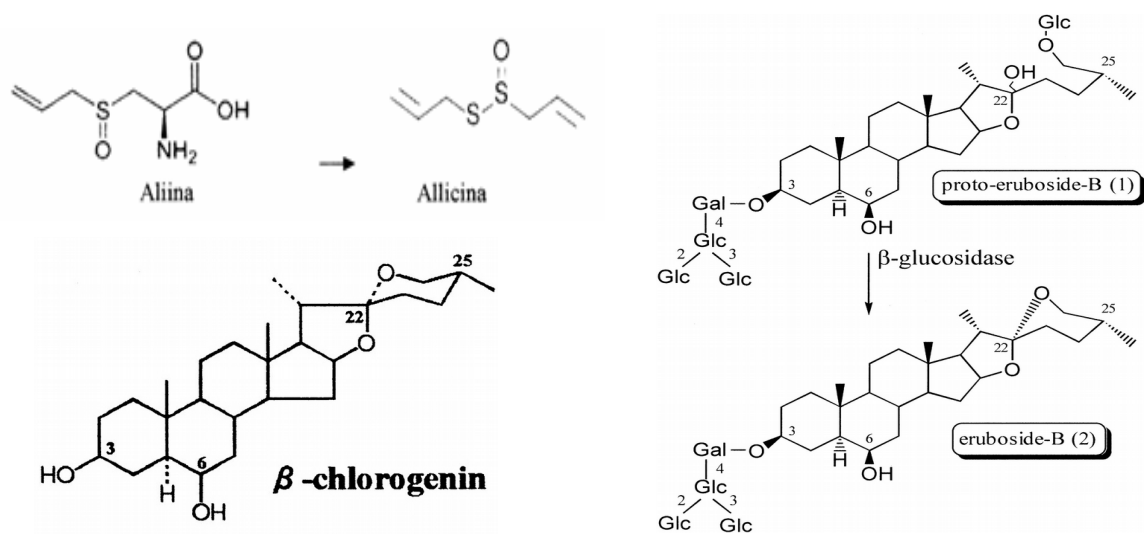
I carboidrati sono la classe più abbondante di composti chimici nelle specie di *Allium* e includono glucosio, fruttosio e saccarosio, insieme a una serie di oligosaccaridi, i fruttani³ (Darbyshire e Steer, 1990). Altri composti presenti sono proteine, pectine, minerali e poliammine (Fenwick e Hanley, 1990; Parolo *et al.*, 1997). Un carattere distintivo di tutte queste specie è la catena metabolica dei composti solforati (Block *et al.*, 1986; 2001; Randle e Lancaster, 2002), che comprendono tiosolfinati, monosolfuri, bisolfuri, trisolfuri e derivati del tiofene (Coley-Smith e King, 1969; King e Coley-Smith, 1969). La maggior parte di questi sono in forma di amminoacidi non proteici, alcuni dei quali servono da precursori degli odori volatili e dei composti nutraceutici (Augusti, 1990; 1996; Dorsch, 1996; Koch e Lawson, 1996; Craig, 1999; Griffiths *et al.*, 2001; Kik *et al.*, 2001; Keusgen, 2002; Jones *et al.*, 2004). Questi precursori amminoacidici sono privi di odore, stabili, non volatili dal nome generale di S-Alch(en)il sulfossidi della cisteina (ACSOs). Quattro differenti ACSOs sono stati riconosciuti in tutto il genere *Allium*: metil (MCSO), 2-propenil (2-PeCSO), 1-propenil (1-PeCSO) e propil (PCSO). L' 1-PeCSO è predominante nelle foglie, nei bulbi e nelle radici di cipolla. Il 2-PeCSO, o alliina, è stato trovato in grandi quantità in aglio e, in piccole tracce, in foglie e radici di cipolla: attraverso l'alliinasi (o alliina liasi) si trasforma in allicina, anche solo per schiacciamento degli spicchi (Freeman e Whenham, 1975; Haskimoto *et al.*, 1984). Con la cromatografia a gas l'unica specie di *Allium* su 26, oltre all'aglio comune, ad aver mostrato picchi per le vinilditiine, derivanti dalla degradazione dell'allicina, è proprio *A. ampeloprasum*. Con questa analisi, infatti, i cromatogrammi di aglio e elephant garlic sono differenti solo per la quantità di ogni costituente. Anche la TLC (cromatografia su strato sottile), ha dato risultati molto

3 Fruttani: carboidrati formati dalla ripetizione di unità di fruttosio. Svolgono una importante funzione di immagazzinamento dell'energia conferendo anche un certo grado di tolleranza al congelamento

simili tra queste due specie per la presenza di alliina e con il porro, di saponine, glicosidi steroidei o triterpenici. La β -clorogenina è la sapogenina tipica dell'aglio schiacciato, derivante dall'idrolisi dell'eruboside B, una saponina: eccetto per l'elephant garlic, che ne contiene una dose minima, le altre specie del genere non ne contengono affatto (Itakura *et al.*, 2001).

Tra le tre specie più comuni di *Allium*, la concentrazione totale di ACSO è più alta in aglio, intermedia nella cipolla e bassa in porro (Block, 1982; Coley-Smith, 1986), e influenza la resistenza al marciume bianco, veicolato da *Sclerotium cepivorum* Berk. (Hovius *et al.*, 2005).

La differenza in odore e sapore tra specie e cultivar dipende probabilmente dalla variabilità nell'assorbimento di zolfo e del suo metabolismo attraverso il pathway biosintetico. Alcune specie di *Allium* mostrano un modello caratteristico di sulfossidi della cisteina notevolmente differenti da quelli di aglio e cipolla, e la loro quantità totale può andare oltre l'1% del peso fresco del bulbo (Fritsch, 2001). Per esempio, le specie siberiane di *A. obliquum* contengono alti livelli di alliina, isoalliina e MCSO. Un alto livello di alliina e isoalliina è stato trovato anche in *A. Ampeloprasum*; l'MCSO in moltissime specie dell'Asia centrale, tra cui *A. stipitatum* e *A. jastianum*. La chemiotassonomia di più di 40 specie di *Allium* provenienti da diversi subgenera, ha rivelato almeno sette differenti chemiotipi dei profili dell'aroma, e ha mostrato specifici insiemi di composti solforati volatili nelle specie rizomatose (Schulz *et al.*, 2000; Storsberg *et al.*, 2003). Questa classificazione può contribuire ad una migliore selezione di specie selvatiche in esperimenti di breeding, puntando ad un miglioramento mirato del sapore, dell'odore e anche delle proprietà farmacologiche di ibridi interspecifici. Va sottolineato che, comunque, la classificazione in chemiotipi non rispecchia la divisione tassonomica e biomorfologica all'interno del genere.



1.1.6. CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI

In tabella 3 si riportano i valori per 100 g di porzioni eduli (bulbilli senza tunica) (USDA, 2014).

Tab. 3 : valori nutrizionali di *Allium sativum* (USDA, 2014)

Nutriente	Unità di misura	Valore per 100g	Nutriente	Unità di misura	Valore per 100g
Acqua	g	58,58	Riboflavina	mg	0,11
Energia	kcal	149,00	Niacina	mg	0,70
Proteine	g	6,36	Vitamina B-6	mg	1.235,00
Lipidi totali	g	0,50	Folato, DFE	µg	3,00
Carboidrati	g	33,06	Vitamina B-12	µg	0,00
Fibre	g	2,10	Vitamina A, RAE	µg	0,00
Zuccheri	g	1,00	Vitamina A, IU	IU	9,00
Calcio	mg	181,00	Vitamina E	mg	0,08
Ferro	mg	1,70	Vitamina D	IU	0
Magnesio	mg	25,00	Vitamina K	µg	1,70
Fosforo	mg	153,00	Acidi grassi saturi		
Potassio	mg	401,00		g	0,089
Sodio	mg	17,00	monoinsaturi	g	0,011
Zinco	mg	1,16	polinsaturi	g	0,249
Vitamina C	mg	31,20	Colesterolo	mg	0,00
Tiamina	mg	0,20	Caffeina	mg	0,00

1.1.7. 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. Addirittura ne sono stati trovati dei bulbi intatti dentro alla tomba di Tutankhamen, datata intorno al 1500 A.C., e scavata nel 1922 (Green e Polydoris, 1993; Kahn, 1996), ma il motivo della loro presenza è ancora ignoto. 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.

Nell'antichità l'aglio era prerogativa delle classi lavoratrici, presumibilmente perché si

credeva che questo ne aumentasse la forza e quindi le rendesse capaci di lavorare più duramente ed essere più produttive (Rivlin, 2001).

Per questi motivi anche gli schiavi ebrei in Egitto, infatti, venivano nutriti con aglio, tanto da aver probabilmente sviluppato una predilezione per questo vegetale, poiché quando lasciano l'Egitto con Mosè è scritto nei Numeri (11:5) che a loro mancavano "il pesce, i cocomeri, e i meloni, e i porri, le cipolle e l'aglio". Nel Talmud, un testo religioso ebraico del secondo secolo D.C., l'aglio è consigliato per migliorare la relazione tra marito e moglie, forse come un aiuto per la procreazione (Moyers, 1996).

L'aglio è stato ritrovato nel Palazzo di Cnosso, a Creta, risalente al 1400-1800 A.C., e ci sono prove che venisse usato dagli atleti durante i primi Giochi Olimpici, come una sorta di agente dopante (Green e Polydoris, 1993; Lawson, 1998). 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 P₄₅₀-2E1⁴ 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). Essendo considerato una spezia, il consumo

4 Il Citocromo P₄₅₀ 2E1, o CYP2E1, è un enzima coinvolto nel metabolismo delle sostanze xenobiotiche, come molti anestetizzanti, con l'etanolo, il paracetamolo o tossiche come le aniline e il benzene. Inoltre interviene nella conversione dell' Acetil-CoA a glucosio e dell'acetone in propilene glicol, precursore di piruvato, acetato e lattato.

regolare di aglio era raccomandato, ma in piccole quantità. 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).

Per gli stessi sintomi anche i *Charaka-Samhita*, il principale testo indiano di 2000 anni fa, raccomanda l'aglio, in più anche per le malattie cardiache e per l'artrite.

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). Ci sono prove che, durante questo periodo, molte delle classi reggenti nell'Europa continentale hanno iniziato ad utilizzare l'aglio, il cui consumo prima era ristretto solo alle classi più basse. Si dice che Re Enrico IV di Francia, tra il sedicesimo e il diciassettesimo secolo, sia stato battezzato con acqua contenente aglio per proteggerlo dagli spiriti maligni e dalle malattie (Rivlin, 2001).

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, 1999) 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.

1.1.8. Importanza della coltura

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.

Il prodotto italiano veniva esportato in Francia e Germania, ma negli anni si è assistito 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).

1.2. Allium ampeloprasum

Allium ampeloprasum L. è una specie composta da differenti citotipi distribuiti nei Paesi intorno al Mar Mediterraneo e si espande dal Nord Africa, Sud ovest asiatico fino al Sud dell'Inghilterra (Bothmer, 1970; Guern *et al.*, 1991; Hanelt, 1990; Hanelt *et al.*, 1992; Mathew, 1996; McCollum, 1987). E' comunemente accettato che questa specie è formata da quattro gene-pools: porro selvatico, cultivar europee di porro, *kurrat* egiziano e *great headed garlic*.

La prima e più selvatica *gene-pool* è piuttosto variabile per la dimensione del bulbo, il colore dei fiori, il numero di unità riproduttive (bulbilli, bulbi fiorali o semi) e per l'adattamento ai terreni (Figliuolo e Di Stefano, 2007). La classificazione dell'*A. ampeloprasum* selvatico si è sempre basata principalmente sulla morfologia e sulla distribuzione geografica, soltanto di recente, per discriminare meglio all'interno della stessa specie o tra specie diverse, sono state sfruttate le differenze a livello di DNA (Figliuolo e Di Stefano, 2007): in base al livello di ploidia e all'isolamento delle popolazioni grazie alla distanza geografica, è stata trovata una certa scala di fertilità. In Tunisia l'*A. ampeloprasum* selvatico è apprezzato come pianta officinale o per preparare i piatti locali ed è diffuso

ovunque in tutto il Paese (Guenauoui *et al.*, 2013).

Il *Kurrat*, *A. ampeloprasum* var. *kurrat* Schweinf. ex Krause, distribuito in estremo e medio oriente e largamente utilizzato in Egitto (Brewster, 1995), è il terzo ortaggio importante domesticato a partire dal *gene-pool* primario.

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).

Il *Great headed garlic* (GHG) *A. ampeloprasum* var. *holmense* (Mill.) Asch. et Graebn. È per Guenaoui *et al.* (2012), sinonimo di aglione, *elephant garlic*, *big tex garlic* o *tahiti garlic*: ha grandi bulbilli e un bulbo molto più grosso (fino a 600g) rispetto all'aglio comune. Questo ortaggio è considerato una cultigen, propagata vegetativamente in tutto il mondo, 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) (Figliuolo *et al.*, 2001; 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 (Guenauoui *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 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).

I descrittori morfologici non sono validi per distinguere all'interno della specie *Allium ampeloprasum*, mentre lo sono tra GHG e *Allium sativum* L., poichè 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).

1.2.1 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 favorire la germinazione. 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. La coltura richiede invece discreti apporti di azoto, intorno ai 60-65 kg all'anno, e dai 35 ai 60 kg di fosforo (P_2O_5) e potassio (K_2O), a seconda dei livelli residui nel terreno (Boyhan *et al.*, 2000).

La semina va effettuata dagli inizi di Ottobre fino a Dicembre, ma sarebbe meglio in gennaio quando però è difficile per la 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. 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, però i propaguli vegetativi sono molto facili da maneggiare e costituiscono una grossa fonte di riserve che facilita la ripresa della pianta che presenta una germinabilità estremamente alta.

Le varietà di aglio registrate nel registro varietale sono molto poche, 7, (Tab.4), mentre non ne esistono di aglione.

Tab. 4: varietà registrate di aglio (*Allium sativum* L.) (MIPAAF: Catalogo delle varietà delle specie di ortaggi - 2012)

CODICE	DENOMINAZIONE	TIPO IBRIDO	CODICE RESP.	EVENTUALI SINONIMI	DECRETO MIN. DI ISCRIZ.	DECRETO MIN. DI ULTIMA REISCR.
2605	Avorio		a1198		17/01/2004	
2975	Belriguardo		a518		26/11/2009	
2889	Bianco Delicato		a1198		22/07/2009	
37	Ottolini		a173		06/01/1982	09/04/2004
3290	Pallavicino		b1342		03/07/2012	
1986	Rosso di Sulmona		a1404		26/11/2009	
2209	Serena		a173		21/02/1994	14/03/2005

Per questo motivo non esiste alcun prodotto registrato su aglione, quindi la maggior parte dei coltivatori, che vende anche a ristoranti non può fare trattamenti. Le malattie che attaccano la coltura sono principalmente marciumi e botrite, che si diffondono facilmente in suoli tendenzialmente pesanti e quindi particolarmente sottoposti a problemi di ristagno idrico.

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.

La raccolta avviene tra Giugno e Luglio, non appena le foglie cominciano a ingiallire, affinché il capo non si rompa o marisca. La durata del ciclo è quindi di 210-240 giorni (Fig.7).

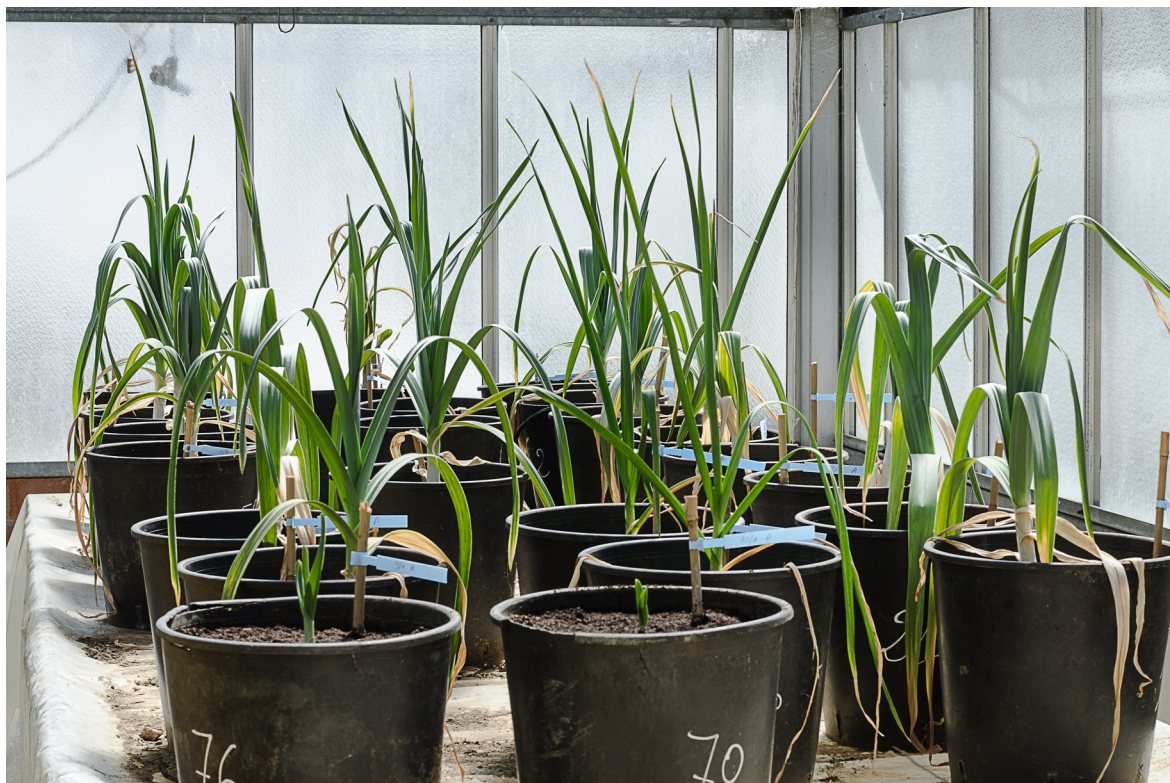


Fig. 7 : accessioni di aglione presso la serra del Dipartimento (data 09/04/2015)

1.2.2. 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 Trasimeno nel quale il Tevere sfociava sotto il colle di Città della Pieve. Una profonda mutazione orogenetica 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 adducendo 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 semipaludose; 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 pianeggiante per kmq 350, poggi e ripiani intermedi per kmq 500, alta collina e montagna kmq 210 (www.valdichiana.it).

La Valdichiana 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 suddiviso 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 Valdichiana, 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 provincia 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 slm; 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 Valdichiana dall'alta valle Tiberina.

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 Valdichiana toscana a Nord dalla Valdichiana 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.

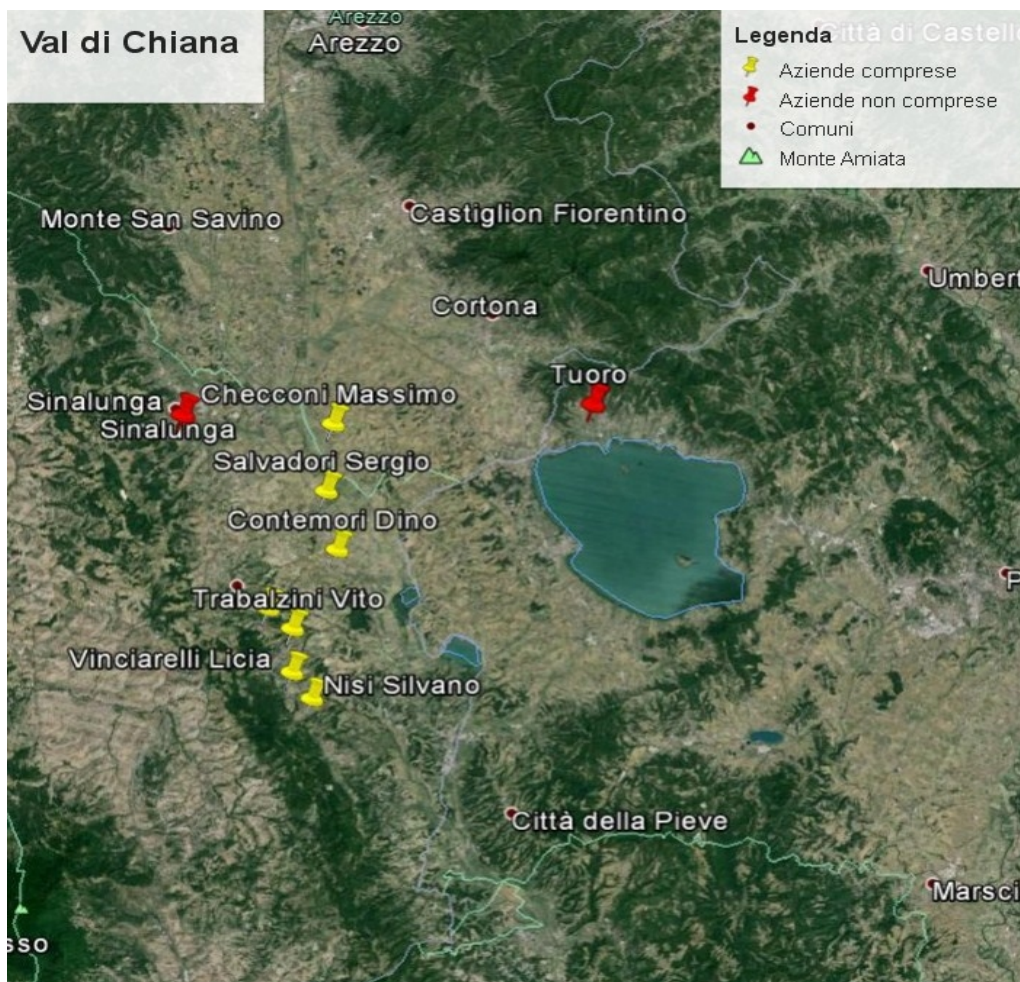


Fig. 8: mappa della Val di Chiana in cui sono ripartate le aziende (Google Earth plus)

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 Valdichiana 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).

1.2.3. Mercato, usi e proprietà

La maggior parte degli agricoltori che coltivano l'Aglione vendono il prodotto sui mercati locali (Fig. 9), tranne qualche caso, riuscendo a spuntare un prezzo al kg anche di 15-18 euro, anche se lo ritengono comunque insoddisfacente, dati i costi e la durata della coltura (circa 8 mesi). Sostengono inoltre che la richiesta del prodotto sia calata perchè molti hanno incominciato ad autoprodurlo e che sia un mercato così di nicchia che marchi di qualità non avrebbero praticamente alcun effetto.

Tutti lo coltivano da circa una ventina d'anni, ma la vera riscoperta è intorno al 2001- 2002. Dai racconti e dalla tradizione l'aglione sembrerebbe non generare allergia e non ha sapore così forte, 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.

L'aglione è sostituito all'aglio in molte ricette della tradizione toscana, perché più dolce ed è fondamentale per i pici all'aglione, appunto, una pasta tipica del senese, stesa a mano e fatta solo con acqua e farina.



Fig. 9: aglione in vendita a 15 euro/kg presso un negozio di alimentari (Montepulciano)

1.3. Varietà da conservazione

Con due provvedimenti comunitari tra il 2008 e il 2009 sono state adottate misure applicative specifiche sulla commercializzazione delle varietà da conservazione. Si tratta della Direttiva della Commissione 2008/62/CE per le specie agricole e della Direttiva della Commissione 2009/145/CE sulle specie ortive.

La direttiva e conseguentemente la disciplina nazionale, definisce le deroghe applicabili alla registrazione delle varietà e alla commercializzazione delle sementi rispetto alle norme applicabili alle varietà convenzionali.

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 località (o le località) dove essa è coltivata tradizionalmente e alle cui condizioni sia naturalmente adatta.

La varietà da conservazione deve essere mantenuta nella regione di origine, dove 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 (da un minimo di 10 a un massimo di 40 ettari).

1.3.1. Quantificazione dei fattori di rischio di erosione

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 Misura 214 del Piano di Sviluppo Rurale, 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

E' in quest'ultima categoria di rischio che si colloca l'aglione, i cui coltivatori sono compresi tra 10 e 30, con un'età media tra i 40 e i 70 anni, superfici (% su superficie regionale del settore) inferiori allo 0,1%, con piante isolate in orti familiari, tutti collocati all'interno di uno stesso areale, piccolo, e con più o meno le stesse tecniche di coltivazione. Il prodotto ha un mercato limitato: è perlopiù dedicato all'autoconsumo o ai mercati locali, tanto da non essere nemmeno iscritto al Registro Nazionale delle Varietà da conservazione. Non esiste per questa risorsa genetica la conservazione *ex situ* e che i nuovi impianti consistono in pochi metri quadrati, tutti destinati all'autoconsumo. D'altra parte però, non essendoci affatto innovazione varietale, non si hanno varietà competitive con quella locale. Per tutte le ragioni sopra elencate il punteggio di rischio per l'aglione, secondo la tabella seguente (n.5) è 22:

Tab. 5: fattori di rischio di estinzione della della risorsa e modalità di valutazione (MIPAAF, 2013).

Fattori di rischio	Descrizione	Livello (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

1.3.2. Valutazione della dimensione delle popolazioni e della struttura genetica delle varietà locali mantenute *in situ*

Per alcune specie a propagazione vegetativa, come l'aglione o come le piante arboree, benché la variabilità intra-varietale sia più limitata che per le colture che si riproducono per seme, questa esiste e andrebbe conservata il più possibile. Essa, infatti, è la base per avviare azioni di selezione massale o clonale, anche sotto il profilo sanitario, recuperando cioè individui esenti dalle fitopatie che si trasmettono per innesto (virosi e fitoplasmosi).

In questa luce occorre considerare che l'esclusione dalla conservazione di varietà risultate sinonimi, per evitare duplicati, possa determinare una perdita di variabilità intra-varietale, e che l'abbandono di una o più accessioni di una varietà vada ponderato anche in funzione dello stato sanitario.

Nel caso di varietà locali coltivate da pochi o singoli agricoltori è necessario e urgente provvedere anche a una conservazione *ex situ*.

E' altresì necessario promuovere la diffusione delle RGV (risorse genetiche vegetali) sul territorio, stimolando un "passaggio di mano" da un agricoltore all'altro all'interno del loro areale di coltivazione.

Quando le dimensioni della popolazione sono ridotte (o tendono a ridursi) è importante tentare di aumentarle, cioè incoraggiare l'agricoltore a coltivare un maggior numero di piante. Quante piante debbano essere coltivate dipende dalla specie e dal suo sistema riproduttivo; viene teoricamente indicato un numero di individui che si riproducono per dare origine alla generazione successiva compreso tra 500 e 5000. Per certe specie, come alcune orticole, è ben difficile raggiungere questi numeri: nel caso dell'aglione vengono selezionati e ripiantati solo i bulbilli più grandi, che molto spesso derivano dalla stessa pianta madre, e tendono così a ridurre ulteriormente la variabilità. E' pertanto fondamentale sia favorire l'azione di conservazione di tutte le aziende che hanno mantenuto la varietà locale che promuovere la produzione di "seme" in ciascuna di esse, evitando la centralizzazione della produzione di semente in una o poche aziende.

1.4. Caratterizzazione genetica

1.4.1. Marcatori genetici

Un marcatore genetico è un qualsiasi carattere controllato geneticamente che presenta varianti tra diversi individui di una stessa specie o di specie diverse. In passato la caratterizzazione genetica si basava sostanzialmente sullo studio di caratteri morfologici,

fenologici e fisiologici, che sono altamente influenzabili dalle condizioni ambientali, ma lo sviluppo delle tecniche per l'analisi diretta del DNA ha offerto nuovi mezzi di valutazione. Lo studio congiunto di caratteri morfologici e molecolari è considerato oggi indispensabile per un corretto lavoro di caratterizzazione genetica.

1.4.2. Marcatori morfologici

I marcatori morfologici prevedono una selezione “a vista” effettuata sulla variabilità fenotipica. Alcuni distinguono caratteri qualitativi (o mendeliani), derivati dall'espressione di un singolo gene o di pochi geni, e discontinui, descrivibili cioè mediante numeri naturali (come “1” per la presenza di un carattere e “0” per la sua assenza); alcuni esempi possono essere la presenza di nanismo, di albinismo o di maschiosterilità. Altri marcatori morfologici distinguono caratteri quantitativi (o metrici) poligenici, cioè trasmessi da più geni, e che pertanto presentano una distribuzione continua. Ne sono esempi la dimensione o la forma dei semi, dei fiori o delle foglie, il portamento e il livello di ramificazione. L'uso di questi marcatori presenta alcune controindicazioni quali: alta influenzabilità da parte dell'ambiente (il fenotipo infatti altro non è che il risultato dell'interazione tra genotipo e ambiente), difficoltà nel correlare il carattere considerato alla sua base genetica, e impossibilità di riconoscere l'eterozigote dall'omozigote dominante in caso di dominanza completa (molto comune tra i caratteri qualitativi).

A livello internazionale, per le metodologie di caratterizzazione morfologica, viene generalmente preso come modello il sistema internazionale dell'UPOV (*Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétale*, Unione per la Protezione delle Nuove Varietà di Pianta). E' importante però tenere presente che le varietà locali non hanno le stesse caratteristiche delle varietà migliorate, sulle quali sono stati tarati i criteri UPOV. Esse, infatti, sono spesso contraddistinte da variabilità interna elevata e pertanto alcune procedure previste (ad esempio quelle relative alla valutazione della “omogeneità”) non sono sempre applicabili.

Per la caratterizzazione di una varietà locale, quindi, si rende necessario valutare i caratteri su singoli individui e poi ricorrere ad appropriate analisi statistiche.

I requisiti per la caratterizzazione morfo-fisiologica sono i seguenti:

- il materiale da esaminare deve essere rappresentativo della varietà;
- il materiale da esaminare deve essere possibilmente sano, non affetto da gravi fitopatie ed avere un sufficiente grado di germinazione;
- le prove devono essere effettuate in idonee condizioni ambientali e colturali

affinché i fattori che influenzano l'espressione dei caratteri possano essere controllati;

- le prove devono essere condotte con adeguati schemi sperimentali (prevedendo la presenza di varietà testimoni, repliche, un numero sufficiente di piante per replica, valutando se necessario ogni singola pianta) ed elaborando i dati con appropriati metodi statistici;
- le annotazioni dei livelli di espressione dei caratteri devono essere oggettive.

1.4.3. Marcatori molecolari

Un marcatore molecolare può essere definito come quel *locus* genomico, rilevabile con sonde (*probes*) o inneschi (*primers*) 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. I marcatori molecolari non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, coprono qualsiasi parte del genoma permettendo di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili, non presentano effetti epistatici o pleiotropici, sono strumenti di indagine estremamente efficaci ed affidabili e trovano larga applicazione nella ricerca di base e in quella applicata, possono essere utilizzati su DNA estratto da qualsiasi tessuto, sono neutrali, stabili e numerosi, presentano elevato grado di polimorfismo e le loro analisi sono automatizzabili. Le problematiche ad essi associate sono 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.

Tra i marcatori molecolari, i microsatelliti si stanno diffondendo sempre più, poiché hanno alto grado di polimorfismo, sono codominanti, riproducibili e relativamente semplici da interpretare.

1.4.4. 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;
- 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.

Il costo dell'uso dei marcatori molecolari - in particolare in relazione al rapporto costi/benefici - è di difficile quantificazione, perchè 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 esser condotta in osservazioni ripetute e su un elevato numero di campioni (MIPAAF, 2013).

1.4.5. 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).

1.4.5.1. I Cloroplasti

Sono organelli citoplasmatici semiautonomi delimitati da una doppia membrana. Essi mostrano molte similarità con le cellule procariotiche. Infatti, come i batteri, contengono nucleoidi, regioni contenenti molecole di DNA circolare non associato a proteine istoniche, e ribosomi di dimensioni inferiori rispetto a quelli che si trovano nel citoplasma delle cellule eucariotiche. Anche il processo di divisione dei plastidi, come anche dei mitocondri, la fissione binaria, è simile alla divisione cellulare batterica. Sulla base di queste similarità, si ritiene oggi che i plastidi si siano originati da procarioti fotosintetici (precursori dei cianobatteri) entrati in stretta associazione con una cellula ospite più grande, dando luogo alle cellule eucariotiche ancestrali (teoria endosimbiotica).

Diversamente dai mitocondri, i plastidi sono organelli citoplasmatici caratteristici delle cellule vegetali. Le due membrane esterne delimitano un compartimento interno contenente una matrice più o meno omogenea, lo stroma: questo è attraversato da un sistema di membrane, i tilacoidi, che si presentano sotto forma di sacchi appiattiti.

Più in dettaglio i cloroplasti sono i plastidi deputati all'attività fotosintetica. Hanno forma globosa o discoidale, con dimensioni in genere comprese tra 1 e 10 μm di lunghezza e tra 4 e 6 μm di diametro. Le cellule del mesofillo (il parenchima fotosintetico delle foglie) possono contenere anche fino a 150 cloroplasti. I tilacoidi del cloroplasto sono organizzati in sacchi, chiamati grana, dall'aspetto di dischi appiattiti, impilati uno sull'altro. I vari grana di un cloroplasto sono connessi da tilacoidi stromatici (o intergranari). Le membrane tilacoidali contengono pigmenti fotosintetici (clorofilla) e pigmenti accessori (carotenoidi) che, complessati con altre proteine, formano i fotosistemi ovvero le unità funzionali della raccolta dell'energia luminosa. Durante la fase attiva della fotosintesi, inoltre, i cloroplasti possono accumulare temporaneamente amido, in forma di granuli, e lipidi, in aggregati dall'aspetto globoso chiamati plastoglobuli.

In seguito al loro ingresso nella cellula ospite, ipotizzato dalla teoria endosimbiotica, questi organelli hanno perso o trasferito al genoma nucleare gran parte dei loro geni, contribuendo alla generazione, dal punto di vista evolutivo, di nuovi genomi nucleari.

Nel corso dell'evoluzione infatti, la riduzione della capacità codificante dei genomi

citoplasmatici ha reso tali organelli dipendenti da proteine codificate da geni nucleari, sintetizzate nel citoplasma e successivamente importate negli organelli. Al tempo stesso, anche la cellula ospite è diventata dipendente dalla capacità di questi organelli di convertire l'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Pertanto, una buona funzionalità cellulare richiede una coordinata espressione dei tre sistemi genetici presenti in ciascuna cellula vegetale.

I genomi citoplasmatici, al contrario di quello nucleare, non sono ereditati secondo le leggi di Mendel, di conseguenza, per tali genomi, si parla di ereditarietà non mendeliana. Nella maggior parte delle piante superiori, i genomi plastidiali e mitocondriali sono ereditati per via uniparentale (uno solo dei genitori trasferisce i genomi citoplasmatici alla progenie), come nelle angiosperme, dove sono generalmente ereditati per via materna. In questo tipo di ereditarietà, l'esclusione dei plastidi può avvenire nelle cellule riproduttive del polline, durante la prima mitosi, dopo la prima mitosi o durante la fecondazione.

Il Plastoma o genoma plastidiale (ptDNA, *plastid* DNA) è costituito da una molecola circolare di DNA a doppia elica, con dimensioni variabili tra 120-160 kb, che codifica circa 120 geni. Nelle piante superiori tale genoma è caratterizzato da una struttura molto conservata, con un'evoluzione a livello nucleotidico molto lenta, variabile in differenti regioni, e con un basso contenuto percentuale (30-40%) in Guanine e Citosine. Una particolare caratteristica di questo genoma è quella di contenere due sequenze ripetute di 10-25 kb (IR_A e IR_B *Inverted Repeats*) orientate nel genoma in senso inverso. Queste due sequenze ripetute dividono il genoma in una regione piccola (SSC, *Small Single Copy*) e una regione grande a singola copia (LSC, *Large Single Copy*). In molte specie, come alcune leguminose, una copia delle regioni ripetute invertite è stata completamente persa durante l'evoluzione; ciò suggerisce che la ripetizione non sia essenziale per la funzione del genoma plastidiale.

Ogni plastide possiede copie identiche del plastoma che sono ancorate alla membrana interna in gruppi chiamati nucleoidi, tipici dei sistemi procariotici: ciascuno contiene 2-20 copie di DNA. Il numero di plastidi e di copie di ptDNA per cellula è altamente variabile e dipende dal tipo di cellula. Generalmente, nei diversi plastidi sono presenti numerose copie del genoma plastidiale, ciò spiega come mai tale genoma costituisca circa il 10-20% del DNA totale, nonostante le sue dimensioni siano più piccole rispetto a quelle del genoma nucleare. La maggior parte dei geni presenti nel genoma plastidiale codifica per componenti degli enzimi fotosintetici, per componenti del sistema di espressione

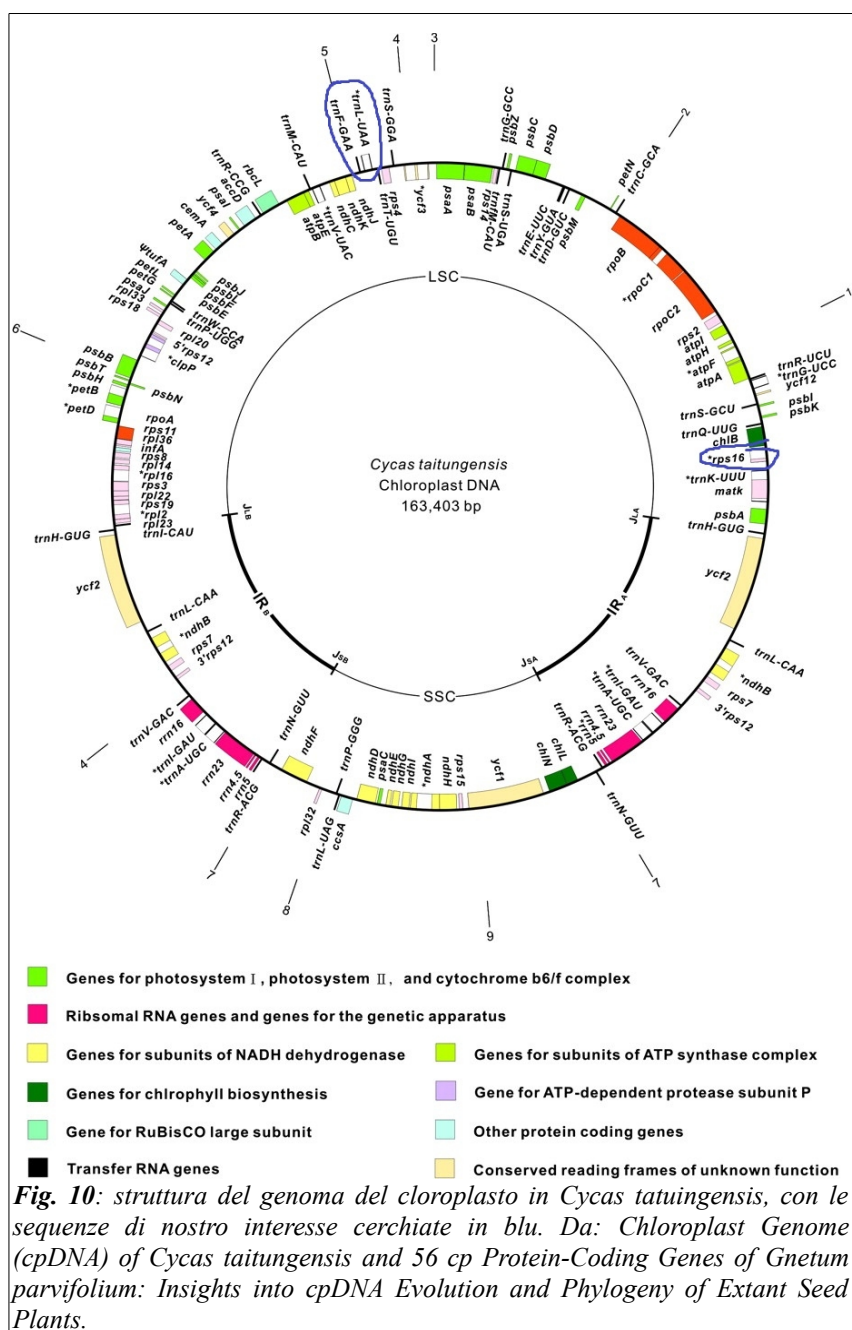
plastidiale e altre proteine. Similmente ai batteri, molti geni plastidiali sono raggruppati in operoni, per cui sono co-espressi sotto il controllo dello stesso promotore.

I geni che codificano per componenti del sistema di espressione plastidiale rappresentano la classe di geni plastidiali più numerosa, in quanto costituita dai geni degli rRNA (16S, 23S, 4,5S e 5S), dei tRNA, delle proteine ribosomiali, delle subunità dell'RNA polimerasi (Rao *et al.*, 2014).

Particolarmente importante nelle nostre analisi è il gene del cloroplasto *rps16* (Fig. 10), codificante la proteina ribosomiale S16 (Neuhaus *et al.*, 1989), interrotto da un introne di gruppo II in molte piante terrestri differenti (Downie e Palmer, 1992). Per quelle specie la cui sequenza è disponibile, la lunghezza di questo introne varia considerevolmente, da 707 a 951 pb (Oxelman *et al.*, 1997). Come altre regioni non codificanti del genoma del cloroplasto, questo locus si sta chiaramente evolvendo con rapidità, come evidenziato dall'accumulo di molte mutazioni riguardanti la lunghezza (Curtis e Clegg, 1984; Zurawski e Clegg, 1987; Clegg e Zurawski, 1992).

Gli introni di gruppo II sono escissi dai trascritti di mRNA da una serie di reazioni autocatalizzate (Michel *et al.*, 1989) e mostrano una netta relazione tra l'importanza funzionale dei suoi lineamenti strutturali e la probabilità di cambiamenti evolutivisti (Learn *et al.*, 1992; Clegg *et al.*, 1994). I domini V e VI dell'introne, e parte del dominio I, come le regioni che ospitano i siti di legame dell'esone, sono richiesti per l'elaborazione corretta del trascritto e, pertanto, evolvono più lentamente (Learn *et al.*, 1992). Riguardo l'introne *rps16*, infatti, i domini V e VI sono altamente conservati, con relativamente pochi indels⁵ e un alto grado di conservazione della sequenza. . In contrasto, la bassa conservazione delle sequenze dei domini II e III suggerisce che queste regioni non possano essere parte integrante del corretto funzionamento dell'introne.

5 Indel: Si usa come abbreviazione di un evento di mutazione/ricombinazione che può far parte di due classi: un'inserzione (**in**sertion) o una delezione (**de**lection) che possono essere avvenute nel corso degli anni e che hanno prodotto delle differenze negli individui. Possono essere state causate da un errore di trascrizione del genoma, dall'inserimento di elementi trasponibili o dalla ricombinazione genetica.

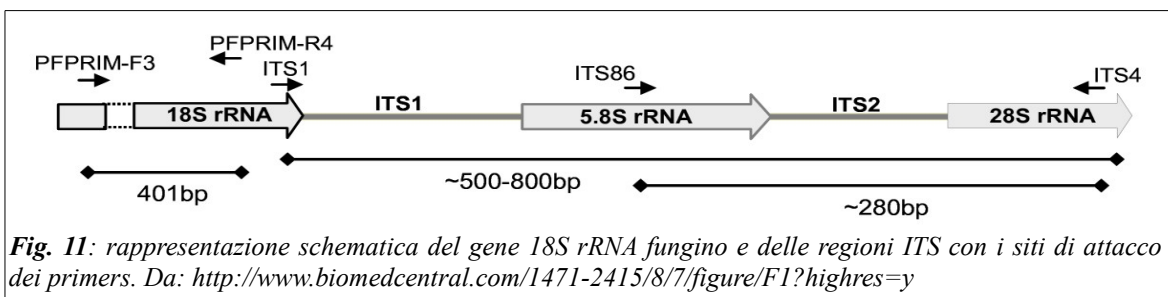


L'utilità dell'introne *rps16* nella stima della filogenesi in altri gruppi di piante è favorita da due fattori: primo, i primers esone-specifici sono costruiti per essere universali tra le angiosperme, essendo basati su sequenze consenso da tabacco, orzo e riso, e finché il gene *rps16* esisterà intatto e funzionale, questi primer vi si appaieranno. Secondo, l'intero introne è facilmente sequenziato e amplificato tramite PCR usando metodologie standard, anche da DNA estratti da campioni d'erbario di fino a 25 anni (R. Downie, S. Katz-Downie, 1999).

L'altro frammento di cloroplasto usato è lo spaziatore intergenico *trnL-F*, largamente usato in studi filogeografici sulle piante (Wang *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012).

1.4.5.2. ITS

L'altra regione presa in considerazione per il nostro studio è l'ITS (*Internal Transcribed Region*): regione non codificante del DNA ribosomiale che viene trascritta come parte del 35S rRNA (Fig.11). In particolare in *Saccharomyces cerevisiae* il DNA ribosomiale (rDNA) è codificato da una regione lunga approssimativamente 1÷2 Mb, costituita da 100÷200 ripetizioni in tandem di 9,1 kb. Ogni ripetizione contiene i geni per 5S, 5,8S, 25S, e 18S RNA ribosomiale (rRNA), così come tre tipi di regioni di spaziatura (*spacer regions*): spaziatori interni trascritti ITS1, ITS2, spaziatori esterni trascritti, 5'ETS, 3'ETS (*external transcribed spacers*) e spaziatori non trascritti NTS1, NTS2 (*non-transcribed spacers*). Come in molti eucarioti, i geni, codificanti per 18S, 5,8S, and 25S rRNA, sono trascritti dalla RNA polimerasi I in un singolo precursore, il 35 pre-rRNA, che include anche le due sequenze ITS1 e ITS2. La trascrizione inizia in 5'ETS e termina in 3'ETS. Il 5S rRNA è trascritto separatamente dalla RNA polimerasi III. Il 35S pre-rRNA è processato a partire dal taglio 3'ETS. Le regioni ITS si sono dimostrate essere un'ottima fonte di dati per studi filogenetici nelle piante a livello intragenerico (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Dubouzet e Shinoda, 1999; Friesen *et al.*, 2000). L'allineamento e la comparazione delle sequenze di ITS è molto usato in tassonomia perchè sono facili da amplificare (grazie all'elevato numero di copie di rRNA) e hanno un alto tasso di mutazione anche tra specie vicine nella scala evolutiva. Probabilmente quest'osservazione si può spiegare con la bassa pressione evolutiva a cui sono sottoposte sequenze non funzionali (Bertonati, 2008).



Per studiare le relazioni dentro al Genere *Allium*, la regione ITS dell'rDNA nucleare è stata sequenziata da 195 specie di *Allium* e varia in lunghezza tra le 612 pb in *A. cyathophorum* e le 661 in *A. triquetrum*.

2. SCOPO DELLA TESI

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.

In tale senso è volta l'attività di caratterizzazione genetica, tramite marcatori molecolari, sulla varietà locale di Aglione della Val di Chiana svolta presso il Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia, ed oggetto della presente tesi.

Lo studio ha lo scopo di chiarire la classificazione botanica, in modo da aprire la strada ad una futura iscrizione al Registro Regionale delle varietà da conservazione quindi di preservare la biodiversità, sia *in situ* che *ex-situ* e valorizzare la risorsa stessa.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiale genetico di partenza

Il materiale genetico oggetto della tesi è stato raccolto, non senza difficoltà, per l’attaccamento degli agricoltori al “seme” per l’anno successivo, da otto piccoli agricoltori della Val di Chiana: per ogni accessione sono stati seminati, all’interno di vasi di plastica nera, almeno due bulbilli, come riportato in Tabella 6: una replica di ogni accessione (contrassegnata con la lettera A) è stata posta su bancali all’interno della serra del Dipartimento (Fig. 12), , mentre l’altra replica (indicata con la lettera B) è stata posta all’esterno in apposite aiuole (Fig. 13). La semina è avvenuta manualmente in data 08/10/2014, tranne che per le accessioni 8/1 e 8/2, che sono state seminate il 27/10/2014 senza le tuniche esterne. Solamente le accessioni 4/2 A e B risalgono al 2013, per cui, presunta una diminuzione di germinabilità, si è preferito mettere due bulbilli nello stesso vaso. In data 10/05/2015 si è deciso di trasferire anche le accessioni contrassegnate dalla lettera A all'esterno insieme alle altre, poiché visibilmente sofferenti per le temperature troppo elevate che si verificavano sotto serra. Le temperature nel periodo iniziale e i tempi di emergenza sono riportati in Appendice A.



Fig. 12: accessioni appena prima della semina all'interno della serra del Dipartimento, contrassegnate con la lettera A



Fig. 13 : accessioni appena seminate, site nelle aiuole adiacenti alla serra del Dipartimento, contrassegnati con la lettera B

Tab. 6 : materiale vegetale utilizzato nella sperimentazione, con provenienza e anno.
*N.B.: * = Bulbi di un anno derivanti da due piante differenti; ** = Bulbilli probabilmente derivanti da piante differenti*

Agricoltore	Accessioni dentro (A)	Accessioni fuori (B)	Anno
1) Mulino Giuliotti Sant'Albino, Montepulciano (SI)	1/1 A	1/1 B	2014
	1/2 A	1/2 B	2014
	1/3 A	1/3 B	2014
	1/4 A	1/4 B	2014
2) Silvano Nisi Sarteano (SI)	2/1 A	2/1 B	2014
	2/2 A	2/2 B	2014
	2/3 A	2/3 B	2014
3) Checconi Massimo Chianacce, Cortona (AR)	3/1 A	3/1 B	2014
	3/2 A	3/2 B	2014
	3/3 A	3/3 B	2014
4) Salvadori Sergio Abbadia di Montepulciano, Montepulciano (SI)	4/1 A	4/1 B	2014
	4/2 A	4/2 B	2013
5) Vinciarelli Licia Chianciano Terme (SI)	5/1 A	5/1 B	2014
6) Trabalzini Vito Chianciano Terme (SI)	6/1 A	6/1 B	2014
	6/2 A *	6/2 B *	2014
	6/3 A **	6/3 B **	2014
7) Soc.Agr. Mazzoni Voghiera (FE) Aglio bianco di Voghiera DOP (CONTROLLO)	7/1 A	7/1 B	2014
	7/2 A	7/2 B	2014
8) Contemori Dino Acquaviva, Montepulciano (SI)	8/1 A	8/1 B	2014
	8/2 A	8/2 B	2014

3.2. Estrazione del DNA genomico

I tessuti vegetali 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 (NanoDrop® - 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.

3.3. Amplificazione delle sequenze tramite PCR

Inizialmente tutti i loci scelti sono stati testati con amplificazioni di prova su DNA estratto da 3 genotipi in modo da ottimizzare le miscele di reazione: la coppia di primer rps-F (5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3') e rps-R2 (5'-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC-3') (Oxelman *et al.*, 1997) è stata scartata perché amplificava due bande: una di giusto peso molecolare (circa 700 pb) e l'altra di peso molecolare molto inferiore. Le reazioni di amplificazione, eseguite successivamente su tutti i 34 campioni in esame e i 4 campioni delle cultivar di riferimento, sono state condotte in un volume totale di 25 µl così composto: 2,5 µl di buffer, 1 µl di dNTP, 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 termociclatore Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), impostato in modo da avere il seguente profilo termico: denaturazione a 94°C per 1' seguita da 32 cicli composti da 94°C per 30'', 58°C per 30'', 72°C per 1' e terminante con un ciclo di 72°C per 10' e portate dal termociclatore a 4°C. Le due coppie di primer utilizzati sono stati TAB-C (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'), TAB-F (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). Dieci µl della miscela di reazione sono stati separati su gel di agarosio (concentrazione 1,8%) 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, dNTP non incorporati, disco fogliare, buffer ed eventuali prodotti secondari rimasti in soluzione. Tutti questi prodotti, in particolar modo primer e dNTP, quando si trovano in eccesso disturbano la reazione di sequenziamento, effettuata successivamente, dando pessimi risultati. Pertanto è stata necessaria una purificazione effettuata utilizzando il kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare); mentre per i prodotti di PCR riamplicati è stato utilizzato l'ExoSAP-IT (GE Healthcare).

Di seguito è riportato il protocollo di purificazione del kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification:

- Aggiungere 500 µl di Capture Buffer type 3 al campione;
- Mixare accuratamente;
- Controllare che il colore della mix Capture Buffer type 3- campione sia giallo o arancione chiaro;
- Posizionare una colonnina GFX MicroSpin™ (contenente il filtro di silice) nell'apposito Collection tube da 2 mL e caricare la mix precedentemente prodotta; centrifugare per 30 s a 16'000 g, gettare via il filtrato e mettere la colonnina con il filtro nel sottotubo;
- Aggiungere 500 µl di Wash Buffer type 1; centrifugare per 30 s a 16'000 g, gettare via il Collection tube con il filtrato. Trasferire la colonnina con il DNA fissato al filtro, in un Dnase-free microcentrifuge tube pulito da 1,5 mL.
- Aggiungere 25 µl di H₂O nella colonnina. Attendere 60 s a temperatura ambiente e centrifugare per 1 min a 16'000 g.
- Gettare la colonnina con il filtro e conservare il filtrato, contenente il prodotto di PCR (DNA) purificato.

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 (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

Le reazioni di sequenziamento e relativa corsa elettroforetica sono state effettuate presso la GATC Biotech di Constanza (Germania).

3.7. Analisi bioinformatiche

Tutte le sequenze sono state verificate, controllate e assemblate con i programmi contenuti nel pacchetto del software Vector NTI Advance® 11.5 (Invitrogen), successivamente allineate e analizzate da un punto di vista filogenetico con il programma Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5.0 (MEGA5).

3.8. Assemblaggio delle sequenze

Per l'assemblaggio dei frammenti di DNA è stato utilizzato il programma Contig Express, presente nel pacchetto del software Vector NTI 11.5. Per ogni campione abbiamo 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.

3.9. Allineamento delle sequenze

Inizialmente, tutte le sequenze nucleotidiche di ITS e del trnL-F corrispondenti alle specie di *Allium* sono state scaricate dalla banca dati GenBank, nel sito NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Successivamente, il programma MEGA5 ha permesso

l'allineamento multiplo sia delle sequenze scaricate dal web sia delle sequenze relative ai campioni di Aglione prelevati nelle aziende, precedentemente controllate e assemblate.

3.10. Alberi filogenetici

Una volta ottenuto l'allineamento multiplo (contenente le sequenze delle specie di *Allium* più le sequenze dei campioni), grazie ancora al software MEGA5 è stato possibile ricavare, direttamente dall'allineamento, un albero filogenetico, impostando i parametri che consentono di calcolare la relazione genetica migliore.

3.11. Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica è stata eseguita in data 1 marzo 2015, quando i lembi fogliari più esterni erano in senescenza e le foglie interne erano completamente sviluppate, mentre il rilevamento dei caratteri riguardanti i bulbi è stato fatto al momento della raccolta come indicato nelle schede descrittive morfologiche del porro e dell'aglio in Appendice B. Data la notevole somiglianza dell'aglione sia con l'aglio che con il porro si è infatti preferito utilizzare entrambe le schede contemporaneamente. Sono stati rilevati sia caratteri con valori continui (caratteri quantitativi misurabili) che caratteri qualitativi ai quali sono stati assegnati valori numerici discreti su una scala da 1 a 9 o valori 1/9 per assenza/presenza. Le piante sono state allevate in serra, in condizioni ambientali molto diverse da quelle tipiche della coltura per cui i valori dei singoli caratteri possono risultare difforni da quelli reali.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Caratterizzazione morfologica

Dato il basso numero dei campioni (32 per l'aglione e 4 per l'aglio), la caratterizzazione morfologica è statisticamente poco attendibile, considerato che le popolazioni sono solamente 8 e che la specie è propagata vegetativamente. La maggior parte della variabilità infatti potrebbe essere dovuta alla dimensione del bulbillo piantato inizialmente: si può comunque evincere e sottolineare l'uniformità nei caratteri qualitativi, ad esempio la maschiosterilità dovuta ad antere completamente prive di polline e di un giallo molto chiaro. Inoltre si notano subito le differenze di dimensioni rispetto all'aglio comune (Fig. 14), sia nella parte epigea (altezza pianta, lunghezza e larghezza lembi fogliari), che nella parte epigea (dimensione bulbo).



Fig. 14: Aglione a sinistra, aglio comune a destra

4.2. Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico, ha dato problemi in alcuni campioni; il problema sussisteva al momento delle centrifugazioni, probabilmente a causa delle sostanze mucillaginose e delle saponine contenute nelle foglie che impedivano al supernatante (la fase liquida) di separarsi dal resto (fase solida). Si è visto che il fenomeno si verificava nelle Eppendorf contenenti una maggiore quantità di materiale grindato: e, infatti, la

riduzione della quantità di materiale vegetale di partenza ha fatto ottenere un DNA di buona qualità e quantità (Fig. 15)

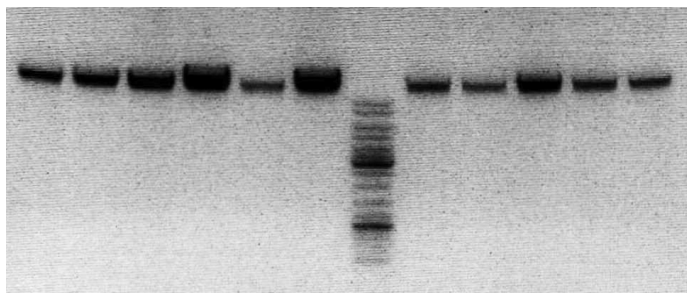


Fig. 15: gel elettroforetico per valutare la qualità del DNA genomico estratto

4.3. Amplificazione tramite PCR

Come riportato nel paragrafo 3.3, il primo step della sperimentazione è consistito nel testare i primer per PCR (Figure 16, 17 e 18). Come si evince dalla Figura 16, la coppia di primer RPS-F e RPS-R2 amplificava due distinti frammenti: uno corretto (circa 700 pb) e un'altro di circa 250 pb, quindi è stata scartata.

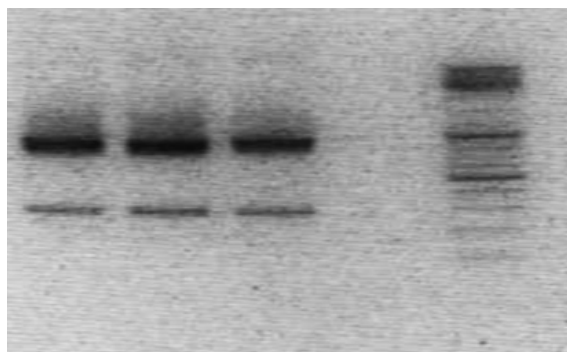


Fig. 16: prova su 3 campioni con i primer *rps-F* e *rps-R2*, scartati perchè oltre all'amplicone atteso, si forma una banda di circa 250 pb

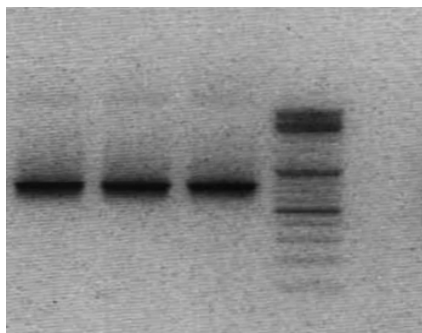


Fig. 17 : prova primer *ITS4* e *ITS5*

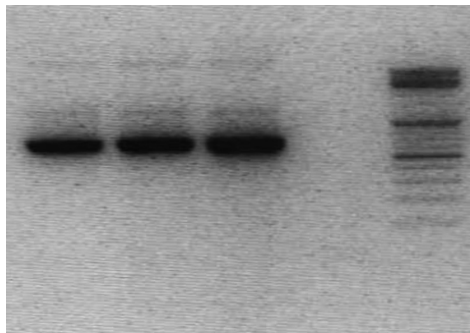


Fig. 18: prova primer *TAB-C* e *TAB-F*

L'amplificazione di tutti i campioni è stata dunque eseguita con le altre due coppie di primer (ITS e TAB) e i risultati sono stati ottimi (Figura 19). I prodotti di PCR sono quindi stati purificati e sequenziati.

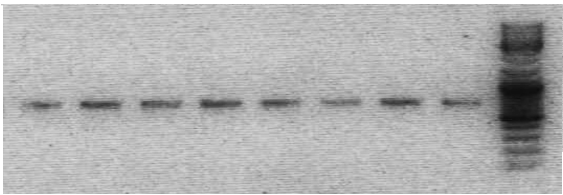


Fig. 19 : PCR con primer TAB-C e TAB-F su alcuni campioni delle popolazioni da analizzare

4.4. Sequenziamento

Soltanto 2 sequenze su 60 (3,3%) sono risultate di non facile interpretazione, nelle altre invece la qualità era piuttosto elevata anche se, in alcuni casi, è stata comunque necessaria l'analisi manuale degli elettroferogrammi, che ha permesso di evidenziare anche un caso di eterozigosi (Fig. 20).



Fig. 20: Elettroferogramma del campione 2/3A in cui si evince la presenza di eterozigosi a 4 loci SNP (indicati dalle frecce nere)

4.5. Analisi bioinformatiche e conclusioni

L'ultimo step della ricerca è stato di analizzare tutti i dati, ottenuti dal sequenziamento, attraverso tool bioinformatici. Per la caratterizzazione molecolare delle accessioni di aglione, abbiamo quindi focalizzato l'attenzione sulla cosiddetta *filogenesi molecolare*, tecnica basata sulla tendenza a divergere di alcune sequenze aminoacidiche o in questo caso nucleotidiche, originatesi da un progenitore comune. Essa consente di costruire alberi filogenetici che illustrano le distanze e i rapporti evolutivi tra le sequenze analizzate, permettendo di stabilire dei rapporti di parentela tra l'aglione e le altre specie del genere *Allium* presenti in banca dati: le sequenze ottenute per le due regioni del genoma del cloroplasto analizzate sono state processate insieme alle altre, scaricate da GenBank

(NCBI) dal programma MEGA5, il quale ha permesso la realizzazione di un allineamento multiplo mediante l'algoritmo ClustalW.

L'allineamento delle sequenze per il gene trnL-F ha evidenziato una perfetta identità per tutte le accessioni di aglione considerate; in riferimento all'ITS invece è stato riscontrato un caso di eterozigosi. Quindi per il gene trnL-F è stato costruito l'albero filogenetico considerando una unica sequenza, mentre per l'ITS l'albero è stato costruito con due sequenze: la 2/3A, eterozigote (come mostrato in figura 20), e una no (1/1A).

A questo punto, una volta allineate le sequenze, prima di costruire gli alberi filogenetici, abbiamo usufruito dell'opzione "Find Best DNA/Protein Models (ML)" presente nel programma MEGA5, allo scopo di selezionare il modello più adatto, relativo all'algoritmo Maximum Likelihood, per la creazione dell'albero filogenetico. Sulla base della lunghezza e dei polimorfismi presenti nelle sequenze allineate, il programma ha calcolato i seguenti metodi:

- Per ITS: il metodo Kimura 2-parameter (K2) + invariants sites (+I) (Tab. 7)
- Per trnL-F: il metodo Tamura 3-parameter (T92) + Gamma distributed (+G)

Dopo aver valutato i parametri sono stati costruiti gli alberi filogenetici. Il primo riguardante ITS è mostrato nella Figura 21; il secondo riguardante il gene trn-L-F è raffigurato nella Figura 22.

Tab.7: Best methods per la costruzione dell'albero ITS.

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)[1]. 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. Le analisi evolutive sono state condotte con MEGA6 [2].

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)
K2+I	39	3.663.093	3.370.598	-1.646.182	0.84	n/a	2.77	0.250	0.250	0.250	0.250	0.033	0.033	0.184	0.033	0.184	0.033	0.033	0.184	0.033	0.184	0.033	0.033
K2+G	39	3.665.426	3.372.931	-1.647.349	n/a	0.05	2.74	0.250	0.250	0.250	0.250	0.033	0.033	0.183	0.033	0.183	0.033	0.033	0.183	0.033	0.183	0.033	0.033
K2+G+I	40	3.670.185	3.370.196	-1.644.975	0.68	0.60	2.82	0.250	0.250	0.250	0.250	0.033	0.033	0.184	0.033	0.184	0.033	0.033	0.184	0.033	0.184	0.033	0.033
T92+G	40	3.670.377	3.370.388	-1.645.072	n/a	0.05	2.73	0.264	0.264	0.236	0.236	0.035	0.032	0.173	0.035	0.173	0.032	0.035	0.193	0.032	0.193	0.035	0.032
HKY+I	42	3.675.369	3.360.393	-1.638.062	0.84	n/a	2.80	0.229	0.298	0.200	0.273	0.039	0.026	0.202	0.030	0.148	0.035	0.030	0.221	0.035	0.170	0.039	0.026
T92+G+I	41	3.677.598	3.370.116	-1.643.929	0.19	0.06	2.76	0.264	0.264	0.236	0.236	0.035	0.031	0.174	0.035	0.174	0.031	0.035	0.194	0.031	0.194	0.035	0.031
HKY+G	42	3.679.171	3.364.196	-1.639.963	n/a	0.05	2.81	0.229	0.298	0.200	0.273	0.038	0.026	0.202	0.030	0.148	0.035	0.030	0.221	0.035	0.170	0.038	0.026
TN93+I	43	3.684.597	3.362.129	-1.637.923	0.84	n/a	2.81	0.229	0.298	0.200	0.273	0.038	0.026	0.188	0.030	0.159	0.035	0.030	0.238	0.035	0.158	0.038	0.026
HKY+G+I	43	3.686.227	3.363.759	-1.638.738	0.20	0.06	2.85	0.229	0.298	0.200	0.273	0.038	0.026	0.203	0.029	0.149	0.035	0.029	0.222	0.035	0.171	0.038	0.026
TN93+G	43	3.688.267	3.365.798	-1.639.758	n/a	0.05	2.82	0.229	0.298	0.200	0.273	0.038	0.026	0.185	0.029	0.161	0.035	0.029	0.240	0.035	0.156	0.038	0.026
TN93+G+I	44	3.693.426	3.363.465	-1.637.584	0.63	0.42	2.88	0.229	0.298	0.200	0.273	0.038	0.025	0.186	0.029	0.162	0.034	0.029	0.242	0.034	0.157	0.038	0.025
GTR+I	46	3.711.003	3.366.057	-1.636.867	0.84	n/a	2.76	0.229	0.298	0.200	0.273	0.045	0.038	0.186	0.035	0.158	0.026	0.044	0.235	0.028	0.156	0.028	0.021
GTR+G	46	3.713.543	3.368.597	-1.638.137	n/a	0.05	2.72	0.229	0.298	0.200	0.273	0.045	0.038	0.186	0.035	0.156	0.026	0.044	0.234	0.029	0.157	0.029	0.021
T92+I	40	3.719.549	3.419.560	-1.669.658	0.49	n/a	2.61	0.264	0.264	0.236	0.236	0.036	0.033	0.171	0.036	0.171	0.033	0.036	0.191	0.033	0.191	0.036	0.033
GTR+G+I	47	3.720.466	3.368.028	-1.636.846	0.20	0.05	2.76	0.229	0.298	0.200	0.273	0.045	0.038	0.186	0.035	0.158	0.026	0.044	0.236	0.028	0.156	0.028	0.021
JC+G	38	3.730.683	3.445.682	-1.684.731	n/a	0.05	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
JC+G+I	39	3.738.075	3.445.580	-1.683.674	0.18	0.06	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
K2	38	3.757.281	3.472.280	-1.698.029	n/a	n/a	2.58	0.250	0.250	0.250	0.250	0.035	0.035	0.180	0.035	0.180	0.035	0.035	0.180	0.035	0.180	0.035	0.035
T92	39	3.761.566	3.469.071	-1.695.419	n/a	n/a	2.58	0.264	0.264	0.236	0.236	0.037	0.033	0.170	0.037	0.170	0.033	0.037	0.190	0.033	0.190	0.037	0.033
HKY	41	3.770.158	3.462.676	-1.690.209	n/a	n/a	2.60	0.229	0.298	0.200	0.273	0.041	0.027	0.198	0.031	0.145	0.037	0.031	0.217	0.037	0.167	0.041	0.027
TN93	42	3.779.505	3.464.530	-1.690.130	n/a	n/a	2.60	0.229	0.298	0.200	0.273	0.041	0.027	0.193	0.031	0.149	0.037	0.031	0.223	0.037	0.162	0.041	0.027
GTR	45	3.807.328	3.469.874	-1.689.782	n/a	n/a	2.58	0.229	0.298	0.200	0.273	0.045	0.036	0.192	0.035	0.148	0.031	0.042	0.221	0.031	0.161	0.034	0.023
JC+I	38	3.819.410	3.534.409	-1.729.094	0.12	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
JC	37	3.820.344	3.542.838	-1.734.314	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

Dall'albero filogenetico del gene ITS (Fig. 21) si evince che l'aglione è filogeneticamente molto simile alle diverse subspecie di *Allium ampeloprasum* anche se si colloca in un sub-cluster ben definito (85% di Bootstrap). Dall'albero appare evidente che l'aglione è geneticamente simile anche all'aglio comune (*A. sativum*) e inoltre la perfetta similarità genetica (100% di Bootstrap) riscontrata tra l'aglio bianco di Voghera (7/1 A) e *A. sativum* dimostra che le amplificazioni ed il successivo il sequenziamento sono avvenuti correttamente.

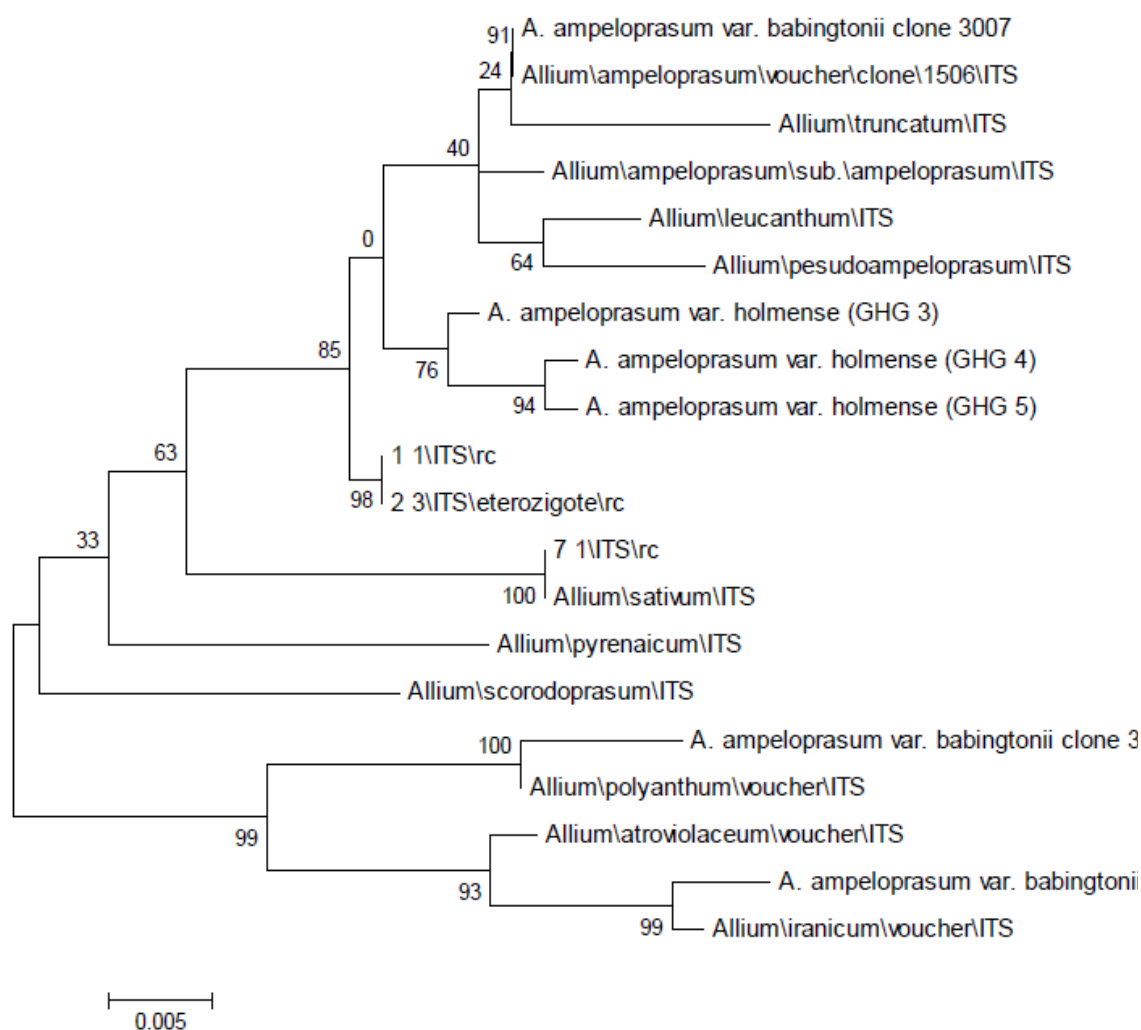


Fig. 21: Albero filogenetico per il gene ITS

In riferimento all'albero filogenetico ottenuto per il gene trnL-F (Fig. 22), si può constatare che l'aglione si trova in un sub-cluster insieme all'*A. ampeloprasum* var. *babingtonii* (porro selvatico), tale similarità genetica è corroborata da un valore di Bootstrap del 74% (Fig. 23). Anche in questo caso la validità del sequenziamento è confermata dalla similarità tra l'accessione 7/1 (aglio bianco di Voghera) e *A. sativum* (96% di Bootstrap).

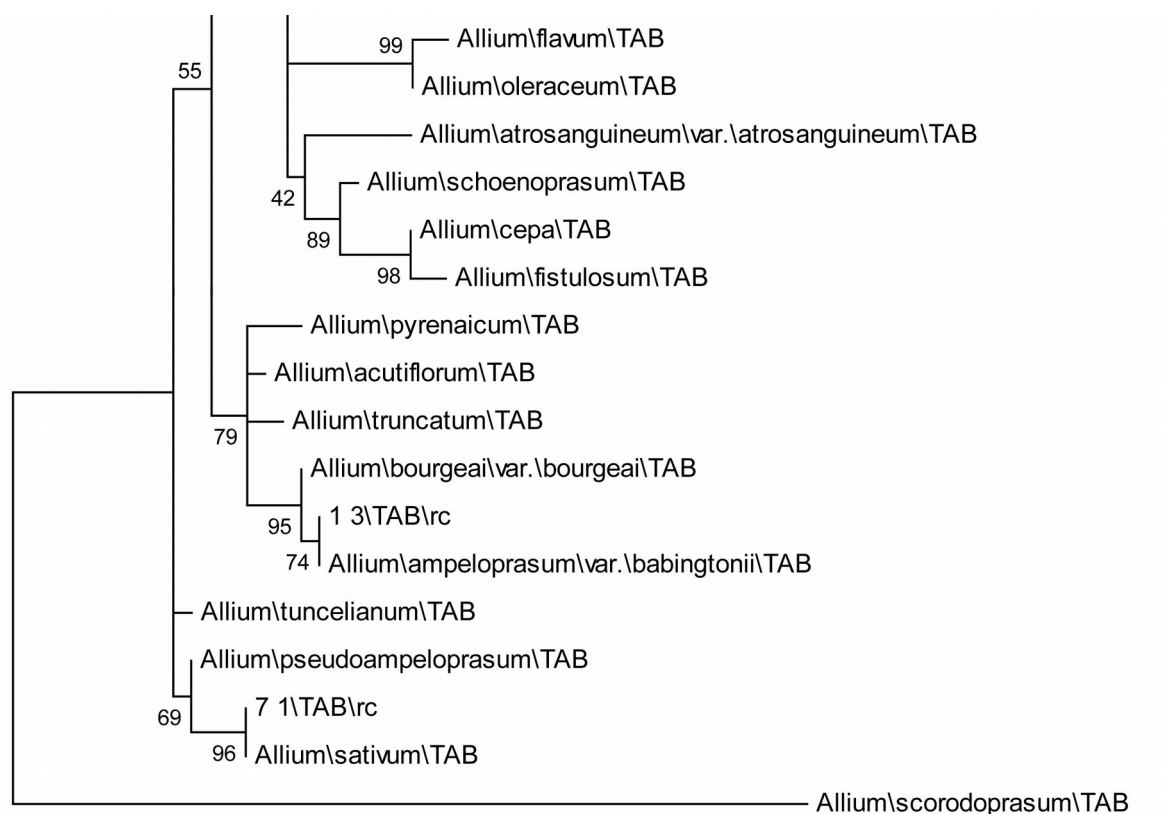


Fig. 23: particolare dell'albero per il gene *trnL-F*

Da notare che in banca dati esisteva una sola sequenza *trnL-F* ascrivibile all'*A. ampeloprasum* var. *babingtonii* mentre ne esistevano diverse per l'ITS. Il diverso risultato ottenuto per i due alberi riguardo alla vicinanza dell'aglione all'*A. ampeloprasum* var. *babingtonii* potrebbe essere dovuto all'errato inserimento in banca dati della sequenza *trnL-F* oppure alla elevata variabilità di questa subspecie. L'obiettivo futuro di questo lavoro sarà di reperire dalle banche di germoplasma internazionali campioni di *A. ampeloprasum* var. *babingtonii* e *A. ampeloprasum* var. *holmense*, che Guenaoui *et al.* (2012) indicano come "aglione", estrarne il DNA, amplificarne le due regioni di riferimento e sequenziarle. Questo servirà a chiarire i dubbi circa l'origine e/o la errata classificazione delle sequenze disponibili in banca dati.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, I., Wendel, J.F.. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molec Phylogenet Evol* 29:417-434.
- Aoba, T. 1968. Studies on propagation of *Allium rosenbachianum* Regel. II. Process of bulb formation in seedling. (In Japanese with English summary). *J. Japanese Soc. Hort. Sci.* 37:166-171
- 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
- Astley, D., Innes, N.L., and van der Meer, Q.P.. 1982. Genetic resources of *Allium* species: a global report. IBPGR, Rome
- Astley, D. 1990. Conservation of genetic resources. p. 177-198. In: H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.), *Onions and allied crops*. Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL
- Augusti, K.T. 1990. Therapeutic and medicinal values of onion and garlic. p. 94-108. In: H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.), *Onions and allied crops*. Vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Augusti, K.T. 1996. Therapeutic values of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.). *Indian J. Expt. Biol.* 34:634-640
- 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
- Baitulin, I.O., Agafonova, G., Rabinowitch, H.D., Kamenetsky, R. 2000. Creation of gene bank of Central Asian species of the genus *Allium* L., their biology and economic potential. (in Russian). p. 87-94. In: E.I. Granovsky and E.E. Fain (eds.), *State and perspectives of scientific collaboration Kazakhstan-Israel*, Almaty, 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
- Barandiaran X., Martin, N., Rodriguez-Conde, M.F., Di Pietro, A., Martin, J. 1999a. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) *Plant Cell Rep.* 18:434-437
- Barandiaran X., Martin, N., Rodriguez-Conde, M.F., Di Pietro, A., Martin, J. 1999b. An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *HortScience* 34:348-349

- Barandiaran X., Martin, N., Rodriguez-Conde, M.F., Di Pietro, A., Martin, J. 1999c. An efficient method for the *in vitro* management of multiple garlic accessions. In *Vitro Cellular Developmental biology - Plant* 35:466-469
- Berghoef, J., Zevenbergen, A.P. 1992. Effects of environmental conditions on flower initiation and development of *Allium sphaerocephalon* L. *Acta Hort.* 325:91-96
- Bergner, P. 1996. The healing power of garlic, pp 3-26. Prima Publishing, Rocklin, CA.
- Blattner, F.R. 2004. Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 289–299
- Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* 252:114-119.
- Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J., Jain, M.K., Apitz-Castro, R. 1986. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic and synthetic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 108:7045-7055.
- Block, E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus *Allium*- Implications for the organic-chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie Intl. Edition.* 31:1135-1178
- Block, E., Birringer, M., Jiang, W., Nakahodo, T., Thompson, H.J., Toscano, P.J., Uzar, H., Zhang, X., Zhu, Z. 2001. *Allium* chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity and chemistry of *se*-alk(en)ylselenocysteines and their γ -glutamyl derivatives and oxidation products. *J. Agr. Food Chem.* 49:458-470
- Bothmer, R. 1970. Cytological studies in *Allium* I. Chromosomenumbers and morphology in *Allium* Sect. *Allium* from Greece. *Bot Notisier* 123:267-288.
- 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.
- Bradeen, J.M., Bark, O., Havey, M.J. 1994. Assessment of nuclear RFLPs as a taxonomic tool in *Allium* section *cepa* (*Alliaceae*). *Plant Genome II Conf.* San Diego, CA, Jan. 1994
- Brewster, J.L. 1990. Physiology of crop growth and bulbing. pp. 53-88. In: H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.), *Onions and allied crops*, Vol I. CRC Press, Boca Raton, FL
- Brewster, J.L. 1994. *Onions and other vegetable Alliums*. CAB Int., Wallingford, UK
- Brewster, J.L.. 1995. *Onions and other vegeteable Alliums*. In: Fordham R (ed) *Scientia Horticulturae* 62 (1-2):145-146. Wallingford, U.K..
- Burba, J.L. 1993. Producción de “Semilla” de Ajo. Asociación Cooperadora EEA, La Consulta, Argentina
- Chase M.W., Reveal, J.L., Fay, M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical*

Cheremushkina, V.A. 1985. Morphogenesis and life forms of rhizomatous *Alliums*. (in Russian). Ph.D. Thesis. Novosibirsk, USSR

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

Coley-Smith, J.R., King, J.E. 1969. The production by species of *Allium* of alchyl sulphides and their effects on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. Ann. Appl. Biol. 64:289-301.

Coley-Smith, J.R. 1986. A comparison of flavor and odor compounds of onion, leek and garlic and *Allium fistulosum* in relation to germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. Plant Pathol. 35: 370-376

Craig, W.J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. Am. J. Clinical Nutr. 70:491-499

Currah, L., Ockendon, D. J., Maude, R. B. 1984. Breeding for Botrytis resistance in onions. 3rd Eucarpia *Allium* Symp. Sept. 4-6, 1984, Wageningen, The Netherlands. p. 6-10

Dalezkaya, T.V., Nikiforova, V.N. 1984. Study of seed germination in some *Allium* species. (in Russian). p. 24-25, In: V.I. Nekrasov (ed.), Ecological problems of seed production in introduced forms. Abstracts of papers from the 7th All-Union Conf.. Zinatne, Riga, Latvia

Darbyshire, B., Steer, B.T. 1990. Carbohydrate biochemistry. p. 1-16, In H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.). Onions and allied crops, Vol. III, CRC Press, Boca Raton, FL

Davis, R.M. 1995. Diseases caused by viruses and mycoplasma-like organisms. p. 54- 70. In: H.F. Schwartz, and S.K Mohan (eds.), Compendium of Onion and Garlic Diseases. APS Press, St. Paul, MN

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., Van Bockstaele, E. 2002. Leek: advances in agronomy and breeding. p. 431-458, In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop science: recent advances. CAB Int., Wallingford, U.K

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 Hertogh, A.A., Zimmer, K. 1993. *Allium* - ornamental species. p.187-200. In: A.A. De Hertogh and M. Le Nard (eds.) The physiology of flower bulbs. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

De Mason, D.A. 1990. Morphology and anatomy of *Allium*. p. 27-51. In: H.D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.), Onions and allied crops, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL

De Ponti, O.M.B., Inggamer, H. 1984. Resistance to the onion fly in *Allium cepa* and *Allium fistulosum*. 3rd Eucarpia *Allium* Symp. Sept. 4-6, 1984, Wageningen, The Netherlands, p. 21-23

De Vries, J. N., Weitsma, W. A., Jongerius, R. 1992a. Introgression of characters from *Allium roylei* Stearn into *A. cepa* L. p. 321-325. 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.

De Vries, J. N., Weitsma, W. A., De Vries, T. 1992b. Introgression of leaf blight resistance from *Allium roylei* Stearn into *A. cepa* L. Euphytica 62:127-133.

De Vries, J. N., Weitsma, W. A., Jongerius, R., De Vries, T. 1992c. Linkage of downy mildew resistance genes *Pd* and *Pd* from *Allium roylei* Stearn in progeny of its interspecific hybrid with onion (*A. cepa* L.). Euphytica 64:131-137

De Wilde-Duyffjes B.E.E. 1976. A revision of the genus *Allium* L. (Liliaceae) in Africa. *Belmontia* 7: 75-78

Dorsch, W. 1996. *Allium cepa* L. (onion): part 2. Chemistry, analysis and pharmacology. *Phytomedicine* 3:391-397

Dowker, B. D. 1990. Onion breeding. p. 215-232. In: H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.). Onions and allied crops, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL

Downie, S.R. , Katz-Downie D.S. 1999. Phylogenetic analysis of chloroplast rps16 intron sequences reveals relationships within the woody southern African Apiaceae subfamily Apioideae

Druselmann, S. 1992. Vergleichende Untersuchungen an Vertretern der *Alliaceae* Agardh. 1. Morphologie der Keimpflanzen der Gattung *Allium* L. *Flora* 186:37-52

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

Eady, C.C. 2002. Genetic transformation of onions. p. 119-144. In: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop science: recent advances. CAB Int., Wallingford, UK

Engeland, R.I. 1991. Growing great garlic. Filaree Prod., Okanogan, WA

Etoh, T., Noma, Y., Nishitarumizu, Y., Wakamoto, T. 1988. Seed productivity and germinability of various garlic clones collected in Soviet Central Asia. Mem. Faculty Agr. Kagoshima Univ., 24, p. 129-139

Etoh, T., Simon, P. W. 2002. Diversity, fertility and seed production of garlic. p. 101- 117. In: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop science: recent advances. CAB Int., Wallingford, UK

Evenor, D., Levi-Nissim, A., Afgin, L., Lilien-Kipnis, H., Watad, A.A. 1997. Regeneration of plantlets and bulblets from explants and callus of *Allium aflatunense* cultivars and selection from indigenous Israeli *Allium ampeloprasum*. Acta Hort. 430:325-330

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

Fenwick, G. R., Hanley, A.B. 1990. Chemical composition. p. 17-31. In: H. D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.), Onions and allied crops, Vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL

Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Michaux-Ferriere, N., Kahane, R. 2002. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep. 21:197-203

Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Triaire, D., Michaux-Ferriere, N., Kahane, R. 2005. Establishment of embryogenic cell suspensions cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. Plant Sci

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.

Figliuolo, G., Di Stefano, D.. 2007. Is single bulb garlic *Allium sativum* or *Allium ampeloprasum*? Sci Hortic 114:243-249.

Freeman, G.G., Whenham, W.J. 1975. A rapid spectrophotometric method of determination of thiopropanal S-oxide (lachrymator) in onion (*Allium cepa*) and its significance in flavour studies. J. Sci. Food Agri. 26:1529-1543

Friesen, N. 1992. Systematics of the Siberian polyploid complex in subgenus *Rhizirideum* (*Allium*). In: Hanelt P, Hammer K, Knu"pffer 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, 55–66

Fritsch, R. 2001. Taxonomy of the genus *Allium*: Contribution from IPK Gatersleben,

- 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
- García Lampasona, S., Martínez, L., Burba, J. L. 2003. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Euphytica* 132:115-119
- Green, O.C., III, Polydoris, N.G. 1993. Garlic, cancer and heart disease: review and recommendations, pp. 21-41. GN Communications, Chicago, IL.
- Gregory, M., Fritsch, R.M., Friesen, N.W., Khassanov, F.O., McNeal, D.W. 1998. Nomenclator Alliorum. *Allium* Names and Synonyms - a World Guide. Royal Bot. Gard. Kew, UK
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., Smith, B. 2001. Onions - A global benefit to health. *Phytotherapy Res.* 16:603-615
- Gubb, I.R., MacTavish, H.S. 2002. Pre- and postharvest considerations. p. 233-265. In: H.D. Rabinowitch and L. Currah, (eds.) *Allium* Crop Science: Recent Advances. CAB Int., Wallingford, U.K.
- 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.
- Guern, M., Lecorff, J., Boscher, J. 1991. Comparative karyology of the *Allium ampeloprasum* complex in France. *Buletin de la Societè Botanique de France-Lettres Botaniques* 138:303-313.
- Gutterman, Y., Kamenetsky, R., van Rooyen, M. 1995. A comparative study of seed germination of two *Allium* species from different habitats in the Negev Desert highlands. *J. Arid Environ.* 29:303-315
- 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''pffer H. eds. *The genus Allium: taxonomic problems and genetic resources*. Proceedings of an international symposium held at Gatersleben, Germany, 11–13 June 1991. Institut für 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

Haque, M.S., Wada, T., Hattori, K. 1998. Efficient plant regeneration in garlic through somatic embryogenesis from root tip explants. *Plant Prod. Sci.* 1:216-222

Hashimoto, S., Miyazawa, M., Kameoka, H. 1984. Volatile flavor components of *Allium grayi* Regel. *J. Sci. Food Agr.* 35:353-356

Havey, M.J. 1992. Restriction enzyme analysis of the chloroplast and nuclear 45S ribosomal DNA of *Alliums* sections *Cepa* and *Phyllodolon*. *Pl. Syst.Evol.* 183:17-31

Havey, M.J. 1999. Advances in new alliums. p. 374–378. In: J. Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA

Hořrandl, E., Paun, O., Johansson, J.T., et al. 2005. Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus s. l.* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36:305–327

Hovius, H.Y. Marilyn, Goldman, Irwin L., Parkin, Kirk L. 2005. Flavor precursor [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide] Concentration and composition in onion plant organs and predictability of field white rot reaction of onions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(2): 196-202

Huang, R.F., Xu, J.M., Yu, H. 1995. A study on karyotypes and their evolutionary trends in *Allium* Sect. *Bromatorrhiza* Ekberg (Liliaceae). *Cathaya* 7:133–145

Huang, De-Quing, Li, Qin-qin, Zhou, Chun-Jing, Zhou, Song-Dong, He, Xing-Jin, 2014. Intraspecific differentiation of *Allium wallichii* (Amaryllidaceae) inferred from chloroplast DNA and internal transcribed spacer fragments

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

Itakura Y., Ichikawa M., Mori Y., Okino R., Udayama M., Morita T. 2001. How to distinguish garlic from the other *Allium* vegetables

Li, Qin-qin, Zhou, Song-Dong, He, Xing-Jin, Yu, Yan, Zhang, Yu-Cheng, Wei, Xian-qin. 2010. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *rps16* sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China

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

Jones, H.A., Mann, L.K. 1963. Onions and Their allies. Botany, Cultivation, and Utilization. Interscience Publ., New York

Jones, M.G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A.B., Collin, H. A. 2004. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J.Exp. Bot.* 55:1903-1918

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. 1992. Morphological types and root systems as indicators of evolutionary pathways in the genus *Allium*. pp. 129-135. 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

Kamenetsky, R. 1994a. Life cycle, flower initiation and propagation of the desert geophyte *Allium rothii*. Int. J. Pl. Sci. 155:597-605

Kamenetsky, R. 1996. Life cycle and morphological features of *Allium* L. species in connection with geographical distribution. Bocconeia 5:251-257

Kamenetsky, R., Gutterman, Y. 2000. Germination strategies of some *Allium* species of the subgenus *Melanocrommyum* from the arid zone of Central Asia. J.Arid Environ. 45:61-72

Kamenetsky, R., Fritsch, R. 2002. Ornamental *Alliums*. p 459-492 In: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.) *Allium* crop science: recent advances. CAB Int., Wallington, UK

Kamenetsky, R., Rabinowitch, H.D. 2002. Florogenesis. p 31-57. In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop sciences: recent advances, CAB Int., Wallingford, UK

Kamenetsky, R., London Shafir, I., Baizerman, M., Khassanov, F., Kik, C., Rabinowitch, H.D. 2004b. Garlic (*Allium sativum* L.) and its wild relatives from Central Asia: evaluation for fertility potential. Acta Hort. 637:83-91.

Kamenetsky, R., London Shafir, I., Khassanov, F., Kik, C., van Heusden, A.W., Vrieling, 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

Keller, E.R.J., Lesemann, D.E., Maab, H.I., Meister, A., Lux, H., Schubert, I. 1995. Maintenance of an *in vitro* collection of *Allium* in the Gatersleben genebank – problems and use. p. 347-352. In: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (eds.), Current issues in plant molecular and cellular biology. Proc. VIII Int. Cong. for Plant, Tissue Cell Culture, Florence, 1994.

Keller, E.R.J., Lesemann, D.E. 1997. Application of *in vitro* culture to onion and garlic for the management and use of genetic resources at Gatersleben. Acta Hort. 433:141-150

Keller, E.R.J. 2002. Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). p. 37-47. In: L.E. Towill and Y.P.S. Bajai (eds.), Biotechnology in agriculture and forestry Vol. 50 Cryopreservation of Plant Germplasm II, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

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 Tyanshanya. (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.)
- Kik, C. 2002. Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. p.81-100. In: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop science: recent advances. CAB Int., Wallingford, UK
- King, J.E., Coley-Smith, J.R., 1969. Production of volatile alchyl sulphides by microbial degradation of synthetic alliin and alliin-like compounds in relation to germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ann. Appl. Biol.* 64:303-314
- Klaas, M., Friesen, N. 2002. Molecular markers in *Allium*
- Koch, H.P., Lawson, L.D. 1996. Garlic. The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore
- Kofoet, A., Kik, C., Weitsma, W. A., De Vries, J.N. 1990. Inheritance of resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.) from *Allium roylei* Stearn in the backcross *Allium cepa* L. x (*A. roylei*. x *A. cepa*). *Plant Breed.* 105:144-149
- Kofoet, A., Zinkernagel, V. 1990. Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.) in *Allium* species. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Zash.* 97:13-23
- Kollmann, F. 1986. Genus *Allium* L. p. 74-99. In: N. Feinbrun-Dothan (ed.), *Flora Palaestina*, Vol. 4. Jerusalem, Israel
- Kondo, T., Hasegawa, H., Suzuki, M. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 19:989- 993
- Lawson, L.D. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe. Chemistry and biological activity.* ACS Symposium series 691 (Lawson, L.D. & Bauer, R. Eds.), pp 176-209. American Chemical Society, Washington, DC.
- Maaß, H.I., Klaas, M. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor.Appl.Gen.* 91:89-97

- Maggioni, L. 2004. Conservation and use of vegetable genetic resources: A European perspective. *Acta Hort.* 637:13-30
- Mann, L.K. 1952. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. *Hilgardia* 21:195-249
- McCollum, G.D.. 1987. Onion and allies. In: Simmonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*. Longman, England, pp 186-190.
- Mathew, B.. 1996. A review of *Allium* section *Allium*. *Royal Bot. Gard, Kew* 176 pp.
- Maude, R.B. 1990. Leaf disease of onion. p. 173-189 In: H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.). *Onions and allied crops*. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL
- McNeal, D.W., Ownbey, M. 1973. Bulb morphology in some western North American species of *Allium*. *Madrono* 22(1): 10-24
- 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.
- 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.
- Nagakubo, T., Nagasawa, A., Ohkawa, H. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell Organ Culture* 32:175-183
- Negri, V. 2005. Agro-Biodiversity Conservation In Europe: Ethical Issues. *J. of Agricultural and Environmental Ethics*, 18 , 1: 3-25
- Novak, F.J. 1990. *Allium* tissue culture. p. 233-250. In: H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.) *Onions and allied crops*. Vol I, CRC Press Boca Raton, FL
- Parolo, M.E., Orioli, G.A., Croci, C.A. 1997. High-pressure liquid chromatographic determination of free polyamines in garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Hort.* 433:463-467
- Pastor, J., Valdes, B. 1985. Bulb structure in some species of *Allium* (*Liliaceae*) of the Iberian Peninsula. *Ann. Musei Goulandris* 7:249-261
- Pateña L.F., Rasco-Gaunt, S.M., Chavez-Lapitan, V.P., Bariring, A.L., Barba, R.C. 1998. Seed production and in vitro conservation systems for garlic and shallot. *Acta Hort.* 461:503-508

- Peters, R. J., Netzer, D., Rabinowitch, H.D. 1984. A progress report: Pink root resistance in *Allium cepa* L. x *Allium fistulosum* L. hybrids and progeny. Eucarpia, 3rd *Allium* Symp. Wageningen, The Netherlands. Sept. 4-6, 1984, p. 70-73
- Pinto, J.T., Rivlin, R.S. 1999. Garlic and other allium vegetables in cancer prevention. In: Nutritional oncology (Heber, D., Blackburn, G., and Go, U.L.M, eds.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 393-403
- Pistrick, K. 1992. Phenological variability in the genus *Allium* L. p. 243-249 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
- Pooler, M.R., Simon, P.W. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. Euphytica 68:121-130
- Rabinowitch, H.D. 1979. Doubling of onion bulbs as affected by size and planting date of sets. Ann. Appl. Biol. 93:63-66
- Rabinowitch, H.D. 1997. Breeding alliaceous crops for pest resistance. Acta Hort. 433:223-237
- Raineri, R.R. 2002. L'aglio nel territorio della S.O.A.T. Paceco
- Randle, W.M., Lancaster, J.E. 2002. Sulphur compounds in alliums in relation to flavour quality. p. 329-356. In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop science: recent advances. CAB Int., Wallingford, U.K
- Randle, W.M., Lancaster, J.E., Shaw, M.L., Sutton, K.H., Hay, R.L., Bussard, M.L. 1995. Quantifying onion flavor compounds responding to sulfur fertility: sulfur increases levels of alk(en)yl cysteine sulfoxides and biosynthetic intermediates. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120:1075-1081
- Rao, R., Leone, A. 2014. Biotecnologie e genomica delle piante. Pp. 6,7,18,19,20. Idelson-Gnocchi
- 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.
- Righi, V. 2013. Caratterizzazione genetica della roveja (*Pisum sativum* subsp. *Sativum* var. *Arvense* (L.) Poir.) di Civita di Cascia. Pagg. 42,43,44. Tesi di laurea magistrale, università di Perugia
- Rivlin, R.S. 1998. Patient with hyperlipidemia who received garlic supplements. Lipid Management. Report from the Lipid education council 3:6-7

- Rivlin, R.S. 2001. Historical Perspective on the use of garlic. American Society for Nutritional Sciences.
- Roberts, E.H. 1972. Viability in seeds. Chapman and Hall, London
- Robledo-Paz, A., Villalobos-Arámbula, V.M., Jofre-Garfias, A.E. 2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. In Vitro Cell. Develop.Biol.-Plant 36:416-419
- Rouamba, A., Sandmeyer, M., Sarr, A., Ricroch, A. 2001. Allozyme variation within and among populations of onion (*Allium cepa* L.) from West Africa. Theor. Appl. Genet. 103:855-861
- Salomon, R. 2002. Virus diseases in garlic and propagation of virus-free plants. p. 311-328. In: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium* crop science: recent advances, CAB Int., Wallingford, UK
- Sawahel, W. A. 2002. Stable genetic transformation of garlic plants using particle bombardment. Cell. Mol. Biol. Let. 7:49-59
- Schulz, H., Krueger, H., Herchert, N., Keller, R.R.J. 2000. Occurrence of volatile secondary metabolites in selected *Allium* wild types. J. App. Bot. 74(3-4):119-121
- Schweisguth, B. 1984. The use of exotic germplasm in breeding onions for temperate climates. 3rd Eucarpia *Allium* Symp. Sept. 4-6, 1984, Wageningen, The Netherlands. p.44-48
- Senula, A., Keller, E.R.J., Lesemann, D. E. 2000. Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for the establishment of an in vitro collection of garlic (*Allium sativum*) Acta Hort. 550:21-128
- Sher, N. 1980. Hybrid protoplast formation by fusion of enucleated protoplasts, "cytoplasts", and nucleated protoplasts, "minioplasts". (in Hebrew). M. Sc. Thesis. Hebrew Univ. Jerusalem
- Simon, P.W., Jenderek, M.M. 2004. Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. Plant Breeding Review, 23:211-244
- Sklyarevsky, L.Y. 1975. The medical proprieties of food plants. (in Russian). Nauka, Moscow
- Specht, C.E., Keller, E.R.J. 1997. Temperature requirements for seed germination in the species of the genus *Allium* L. Genetic Res. Crop Evol. 44:509-517
- 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
- Storsberg, J., Schulz, H., Keller, E.R.J. 2003. Chemotaxonomic classification of some *Allium* wild species on the basis of their volatile sulphur compounds. J. Appl. Bot. 77:160-162
- Takagi, H. 1990. Garlic *Allium sativum* L. pp. 109-146. In: H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds) Onions and allied crops, Vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL
- 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
- Traub, H.P. 1968. The subgenera, sections and subsections of *Allium* L. Plant Life 24: 147-163
- USDA, National Nutrient Database for Standard Reference Release 26 Basic Report August 13, 2014
- Van der Meer, Q.P. 1984. Breeding for resistance to yellow stripe virus in leeks (*Allium porrum* L.) – progress report. 3rd Eucarpia *Allium* Symp. Sept. 4-6, 1984, Wageningen, The Netherlands. p. 16-19
- Van der Meer, Q.P., De Vries, J.N. 1990. An interspecific cross between *Allium roylei* Stearn and *Allium cepa* L., and its backcross to *A. cepa*. Euphytica 47:29-31
- Van der Meer, Q.P., Hanelt, P. 1990. Leek (*Allium ampeloprasum*). pp. 179-196. In: J. L. Brewster and H.D. Rabinowitch (eds). Onions and allied crops, Vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL
- 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.
- Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Bolland, C.J., Miller, A. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonium* L.) by meristem-tip culture. J. Hort. Sci. 62:211-220
- 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

Xu, P., Yang, C., Qu, S., Yang, C.Y., Srinives, P. 2001. Inflorescence meristem culture and economic analysis of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) in commercial production. Acta Hort. 555:283-288

Zheng, S.J., Henken, B., Krens, F.A., Kik, C. 2003. The development of an efficient cultivar independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. Cell. Dev. Biol. Plant 39: 288-292

Zheng, S.J., Henken, B., Ahn, Y.K., Krens, F.A., Kik, C. 2004a. The development of a reliable transformation protocol for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm. Mol. Breeding 14: 293-307

Zheng, S.J., Henken, B., Krens, F.A., Kik, C. 2004b. Genetic transformation of *Allium cepa* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. p. 281-290. In: I.S. Curtis (ed.), Transgenic crops of the world - essential protocols., Kluwer Acad. Press, Dordrecht, the Netherlands.

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

Ziv, M., Hertz, N., Biran, Y. 1983. Vegetative reproduction of *Allium ampeloprasum* L. *in vivo* and *in vitro*. Israel J. Bot. 32:1-9

Sitografia

[http://www.treccani.it/enciclopedia/its_\(Enciclopedia_della_Scienza_e_della_Tecnica\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/its_(Enciclopedia_della_Scienza_e_della_Tecnica)/)

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

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

6.APPENDICE

APPENDICE A:

TEMPERATURE ED EMERGENZA					
Data	Minima (IN)	Massima (IN)	Minima (OUT)	Massima (OUT)	Note
09/10/14	19	43	12	26	
10/10/14	15	43	12	27	
11-12/10/14	17		12	27	
13/10/14		31	17	25	
14/10/14	17	31	16	22	
15/10/14	18	31	17	26	
16/10/14	19	44	18	25	
17/10/14	19	46	20	24	
18-19/10/14	15		14	26	
20/10/14		42	13	24	
21/10/14	16	30	13	23	
22/10/14	15	34	8	19	
23/10/14	9	31	4	15	Emergenza campioni 5/1 B, 1/1 B, 6/2 B
24/10/14	10	34	10	17	
25-26/10/14	9		6	17	Emergenza 3/3 B, 6/1 A, 6/2 A
27/10/14		34	8	16	Semina 8/1 A e B, 8/2 A e B
28/10/14	9	31	9	17	Emergenza 1/1 A
29/10/14	10	32	7	17	Emergenza 1/3 A
30/10/14	9	36	5	18	Emergenza 2/2 B, 2/3 B, 3/2 B, 3/2 A, 5/1 A
31/10/14	9	37	7	17	Emergenza 1/3 B, 2/1 B, 1/2 B
1-2/11/14	8		4	21	Emergenza 3/1 A
03/11/14		35	4	19	
04/11/14	11	35	9	21	Emergenza 3/1 B, 4/1 B, 1 /2 A
05/11/14	14	28	15	22	Emergenza 2/1 A
06/11/14	14	21	14	16	Emergenza 7/2 A, 2/3 A
07/11/14	12	30	13	17	Emergenza 4/1 A
8-9/11/14	12		12	20	Emergenza 8/1 B, 8/1 A, 7/1 A, 2/2 A, 1 /4 A
10/11/14		23	11	18	Emergenza 7/1 B, 7/2 B, 8/2 B
11/11/14	11	33	10	19	
12/11/14	12	21	10	14	
13/11/14	12	33	12	17	Emergenza 1/4B, 8/2 A
14-15-16/11/14	8		9	16	Emergenza 6/1 B
17/11/14		15	7	14	
18/11/14	9	34	8	17	
19/11/14	8	31	7	16	
20/11/14	8	31	4	7	Emergenza 3/3 A
21/11/14	7	27	2	9	
22-23/11/14	13		8	17	
24/11/14		30	7	10	
25/11/14	11	25	7	12	
26/11/14	13	20	11	14	Emergenza 4/2 B
27/11/14	13	19	11	14	
28/11/14	11	24	6	13	
29-30/11/14	11		7	17	Emergenza 4/2 A
01/12/14		27	13	19	
02/12/14	10	16	7	13	
03/12/14	11	16	10	15	
04/12/14	11	21	10	16	
05/12/14	10	27	8	12	
6-7-8/12/14	8		4	12	
09/12/14		11	4	11	
10/12/14	7	29	5	10	
11/12/14	7	29	1	10	
12/12/14	5	22	-2	9	
13-14/12/14	6		4	15	
08/01/15					Emergenza 6/3 B

Le minime sono state registrate al giorno stesso, le massime al giorno precedente, in quanto le rilevazioni avvenivano di mattina. L'ultima rilevazione della settimana è del venerdì, la prima il lunedì mattina.

2- PORRO
(Allium porrum L.)

Scheda descrittiva morfologica

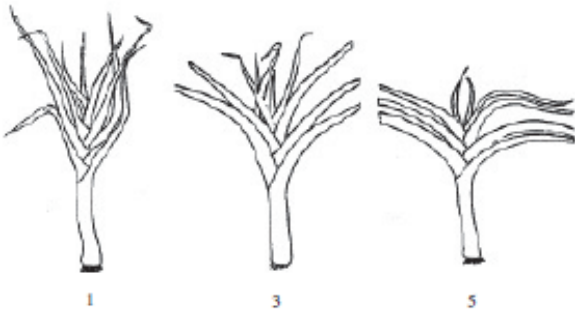
La descrizione dei caratteri indicati nella prima colonna con GIBA è raccomandata dal Gruppo di lavoro Biodiversità Agricola. La descrizione dei caratteri n. 5, 6, 10, 11, 14, 17, indicati nella seconda colonna con asterisco (*) è obbligatoria ai fini dell’iscrizione al Catalogo delle “varietà da conservazione”.

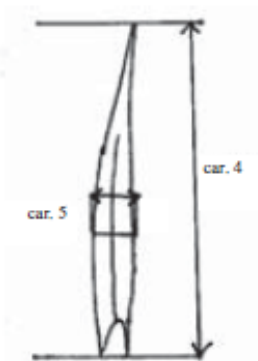
N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO
---------	---------------	-----------	-------------------------------------	-------------------------

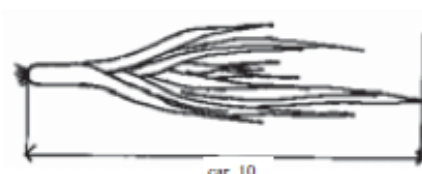
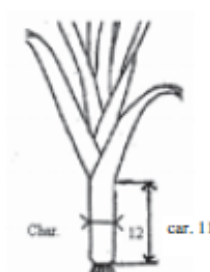
1	1 (a)	PIANTA: altezza	1	molto bassa	De Carentan 2
			3	bassa	D'Hiver de Saint Victor
			5	media	Bleu de Solaise
			7	alta	Kingston, Long géant du Verdet
			9	molto alta	Bulgaarse Reuzen



2	2 (a)	FOGLIAME: portamento	1	eretto	Rese
			3	semieretto	Linx, Upton
			5	orizzontale	De Carentan 2, D'Elbeuf, Jaune gros du Poitou



N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE		VARIETA' DI RIFERIMENTO
3	3 (b)	LEMBO FOGLIARE: curvatura	3	debole	Bell, Lampton
			5	media	Flextan, Linx
			7	forte	Blauwgroene Winter, Bulgaarse Reuzen
					
4	4 (b)	LEMBO FOGLIARE: lunghezza del lembo più lungo	3	corto	Artemis, Conora, De Carentan 2, D'Elbeuf, Kalmar
			5	medio	Flextan, Porridor, Rese
			7	lungo	Kingston, Kong Richard, Maxim
5 GIBA	5 (*) (b)	LEMBO FOGLIARE: larghezza del lembo più lungo	3	stretto	Lampton, Rustic
			5	medio	De Liège
			7	largo	Jaune gros du Poitou, Rese, Striker
					
6 GIBA	6 (*) (b)	LEMBO FOGLIARE: colore	1	verde giallastro	Jaune gros du Poitou
			2	verde	Premier
			3	verde grigiastro	Zwitserse Reuzen
			4	verde bluiastro	Blauwgroene Winter, Libertas, Olaf, Porridor
7	7 (b)	LEMBO FOGLIARE: intensità del colore	3	chiaro	
			5	medio	
			7	scuro	
8	8 (b)	LEMBO FOGLIARE: pigmentazione antocianica (da osservare dopo un periodo di gelate notturne)	1	assente o molto lieve	Jaune gros du Poitou
			3	lieve	Azur
			5	media	
			7	forte	Nepal
			9	molto forte	D'Hiver de Saint Victor

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO
9	9 (b)	LEMBO FOGLIARE: glaucescenza	1 assente o molto lieve	Jaune gros du Poitou, Kingston
			3 lieve	Carlton, Gros long d'été 2, Rese
			5 media	D'Elbeuf, Linx
			7 forte	Bleu de Solaise, Flextan
			9 molto forte	
10 GIBA	10 (*) (c)	PIANTA: lunghezza (misurata su pianta raccolta con le foglie più lunghe allineate con il fusto)	1 molto corta	
			3 corta	De Carentan 2
			5 media	Bleu de Solaise, Jaune gros du Poitou
			7 lunga	Kingston, Rese, Titan
			9 molto lunga	Bulgaarse Reuzen
				
11 GIBA	11 (*) (c)	FUSTO: lunghezza	1 molto corto	
			3 corto	Artemis, Bleu de Solaise, D'Hiver de Saint Victor
			5 medio	Gros long d'été 2
			7 lungo	Lampton, Maxim
			9 molto lungo	Kingston Kong, Richard
12 GIBA	12 (c)	FUSTO: diametro (a metà lunghezza)	1 molto piccolo	
			3 piccolo	Lampton, Titan
			5 medio	Géant précoce
			7 grande	Premier, Zwitserse Reuzen
			9 molto grande	Jaune gros du Poitou
				
13	13 (c)	FUSTO: rapporto lunghezza/diametro	3 basso	D'Hiver de Saint Victor
			5 medio	Easton, Gros long d'été 2
			7 alto	Bulgaarse Reuzen
				

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE		VARIETA' DI RIFERIMENTO
14 GIBA	14 (*) (c)	FUSTO: formazione del bulbo	1	assente o molto debole	Jolant, Roxton, Striker
			3	debole	Hafnia, Lampton, Linx, Titan
			5	media	Bleu de Solaise, Premier
			7	forte	Artemis, Jaune gros du Poitou
			9	molto forte	Carentan 2
15	15 (c)	FUSTO: restringimento verso la base	1	assente	Herfstreuzen 2
			9	presente	D'Elbeuf
 1  9					
16	16	<u>SOLO VARIETA' A MOLTIPLICAZIONE VEGETATIVA:</u> SCAPO: lunghezza	3	corto	
			5	medio	
			7	lungo	
Osservazione da effettuare su scapo verde, completamente sviluppato, prima che inizi ad aprirsi e disseccarsi.  3  5  7					
17 GIBA	17 (*)	<u>SOLO VARIETA' A MOLTIPLICAZIONE VEGETATIVA</u> FIORE: sterilità maschile	1	assente	
			9	presente	
Carattere da osservare a completa fioritura strofinando delicatamente un foglio di carta nera sulla testa dell'infiorescenza: se la varietà è sterile non si vedrà polline sulla carta. In varietà maschio-sterili le antere sono vuote e seccano molto velocemente.					
Note (a) Le osservazioni vanno eseguite quando i lembi fogliari più esterni entrano in senescenza. (b) Le osservazioni del lembo vanno effettuate sulla foglia completamente sviluppata. (c) Le osservazioni vanno eseguite a maturità commerciale.					

3 - AGLIO
(Allium sativum L.)

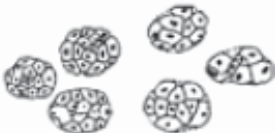
Scheda descrittiva morfologica

La descrizione dei caratteri indicati nella prima colonna con GIBA è raccomandata dal Gruppo di lavoro Biodiversità Agricola. La descrizione dei caratteri n. 2, 3, 10, 14, 15, 21, 27, 28, 29, 32, 33, 34, indicati nella seconda colonna con asterisco (*) è obbligatoria ai fini dell'iscrizione al Catalogo delle "varietà da conservazione".

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE		VARIETA' DI RIFERIMENTO
1 GIBA	1	FOGLIAME: densità	3	bassa	Ramses
			5	media	Printanor
			7	alta	Germidour
2 GIBA	2 (*)	FOGLIAME: portamento	1	eretto	Jolimont
			2	da eretto a semi-eretto	Printanor
			3	semi-eretto	Jardinor
 123					
3 GIBA	3 (*)	FOGLIA: colore verde	3	chiaro	
			5	medio	Messidrome
			7	scuro	Germidour
4	4	FOGLIA: glaucescenza	1	assente o molto debole	
			3	debole	Sprint
			5	media	Messidrome
			7	forte	Germidour, Moratop
			9	molto forte	Gayant, Printanor
5 GIBA	5	FOGLIA: lunghezza (della foglia più lunga)	3	corta	Jardinor
			5	media	Moraluz, Morasur
			7	lunga	Sultop

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO
6 GIBA	6	FOGLIA: larghezza (come per car. 5)	3 stretta	Ramses
			5 media	Printanor
			7 larga	Germidour
7 GIBA	7	FOGLIA: forma in sezione trasversale	1 fortemente concava	
			2 leggermente concava	Ramses
			3 appiattita	Germidour
8 GIBA	8	FALSO STELO: intensità della pigmentazione antocianica della base	1 assente o molto debole	Printanor
			3 debole	Messidrome
			5 media	
			7 forte	Germidour
			9 molto forte	
9 GIBA	9	FALSO STELO: larghezza della base	3 stretta	Ramses
			5 media	Printanor
			7 larga	Germidour
10 GIBA	10 (*)	FALSO STELO: scapo fiorale	1 assente	Germidour
			9 presente	Rose de Lautrec
11 GIBA	11	SCAPO FIORALE: curvatura	1 assente	Morasur, Sultop
			9 presente	Iberose
				
12 GIBA	12	SCAPO FIORALE: lunghezza (L)	3 corto	Rose de Lautrec
			5 medio	Morasol
			7 lungo	Sultop
				
13 GIBA	13	SCAPO FIORALE: bulbilli	1 assenti	Rose de Lautrec
			9 presenti	Germidour
				
14 GIBA	14 (*)	BULBO: taglia	3 piccolo	Fructidor
			5 medio	Printanor
			7 grande	Messidrome

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO
15 GIBA	15 (*)	BULBO: forma in sezione longitudinale	1 ellittica trasversale stretta 2 ellittica trasversale larga 3 tondeggiante	Sprint Germidour De Roumanie
				
16	16	BULBO: forma in sezione trasversale	1 ellittica 2 tondeggiante	Fructidor Sprint
17	17	BULBO: posizione dei bulbilli all'estremità superiore del bulbo	1 interni 2 allo stesso livello 3 esterni	Sprint Corail Germidour
				
18 GIBA	18	BULBO: posizione del disco della radice	1 depresso 2 appiattito 3 protuberante	Germidour Rose de Lautrec
19 GIBA	19	BULBO: forma della base	1 depressa 2 appiattita 3 arrotondata	Germidour, Ramses Printanor De Roumanie
				
20	20	BULBO: compattezza dei bulbilli	3 laschi 5 medi 7 compatti	Sprint Germidour Printanor
21 GIBA	21 (*)	BULBO: colore di fondo delle tuniche esterne secche	1 bianco 2 bianco-giallastro 3 bianco-rossastro	Printanor, Ramses Vigor Max, Vigor Supreme Germidour
22 GIBA	22	BULBO: striature antocianiche sulle tuniche esterne secche	1 assenti 9 presenti	Printanor, Ramses Germidour, Sprint
23	23	BULBO: aderenza delle tuniche esterne secche	3 debole 5 media 7 forte	Sprint Messidrome Printanor, Gayant
24	24	BULBO: spessore delle tuniche esterne secche	3 sottili 5 medie 7 spesse	Ramses Morasur Jolimont
25 GIBA	25	BULBO: numero dei bulbilli	3 basso 5 medio 7 alto	Mondor Printanor Ramses

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE		VARIETA' DI RIFERIMENTO
26 GIBA	26	BULBO: distribuzione dei bulbilli	1	radiale	Rose de Lautrec, Sprint
			2	non radiale	Blanc de Beaumont, Messidrome, Rougeatre de Vendée
 12					
27 GIBA	27 (*)	BULBO: bulbilli esterni	1	assenti	Sprint, Sultop
			9	presenti	Blanc de Beaumont, Morasol
 19					
28 GIBA	28 (*)	BULBILLO: taglia	3	piccolo	Rose de Lautrec
			5	medio	Printanor
			7	grande	Germidour
29 GIBA	29 (*)	BULBILLO: colore della tunica	1	bianco	Ramses
			2	crema	Messidrome
			3	rosa	Printanor
			4	porpora	Morasol, Sprint
			5	bruno	Corail
30 GIBA	30	BULBILLO: intensità colore della tunica	3	debole	Printanor
			5	media	Ibérose, Sultop
			7	forte	Morasol, Morasur, Moratop
31 GIBA	31	BULBILLO: striature antocianiche della tunica	1	assenti	Ramses
			9	presenti	Morasur
32 GIBA	32 (*)	BULBILLO: colore della polpa	1	bianco	Printanor
			2	giallastro	Germidour
33 GIBA	33 (*)	EPOCA DI MATURAZIONE COMMERCIALE	1	molto precoce	Ramses
			3	precoce	Sprint
			5	media	Germidour, Messidrome
			7	tardiva	Printanor
			9	molto tardiva	Gayant
34 GIBA	34 (*)	FINE DELLA DORMIENZA DEI BULBILLI NEL BULBO	1	molto precoce	Ramses
			3	precoce	Sprint
			5	media	Rose de Lautrec
			7	tardiva	Fructidor
			9	molto tardiva	Gayant

Dopo la raccolta i bulbi vengono conservati ad una temperatura ottimale di 20 - 25°C senza separare i bulbilli. La fine della dormienza viene valutata osservando la percentuale di bulbi germogliati.

Note

FOGLIA, FOGLIAME e SCAPO FIOREALE: tutte le osservazioni devono essere effettuate prima della recinatura delle foglie.

BULBI: tutte le osservazioni devono essere effettuate su bulbi raccolti durante la prova.