



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

CURRICULUM AGRICOLTURA SOCIALE

**CARATTERIZZAZIONE MORFOMETRICA DI DUE
POPOLAZIONI DI ONOPORDUM TAURICUM
WILLD. NELL'APPENNINO CENTRALE**

**MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF TWO
ONOPORDUM TAURICUM WILLD.
POPULATIONS IN THE CENTRAL APENNINES**

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

SARA ROMANO

Relatore:

PROF. SIMONA CASAVECCHIA

Correlatori:

PROF. SILVIA ZITTI

DOTT. SIMONE PESARESI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

INDICE

1	ABSTRACT.....	3
2	INTRODUZIONE.....	4
2.1	L'uso di piante per la caseificazione	4
2.2	Il genere <i>Onopordum</i> L.	6
2.2.1	<i>Onopordum tauricum</i> Willd.....	7
3	OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	10
4	MATERIALI E METODI.....	11
4.1	Area di studio e campionamento	11
4.2	Analisi morfometrica delle piante	13
4.2.1	<i>Tratti morfometrici</i>	13
4.2.2	<i>Analisi statistiche</i>	18
4.3	Caratterizzazione morfometrica delle cipsele	19
4.4	Test di germinazione	23
4.5	Raccolta e conservazione di materiale vegetale per l'estrazione del DNA.....	26
5	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	28
5.1	Caratterizzazione morfometrica delle popolazioni.....	28
5.2	Caratterizzazione morfometrica delle cipsele	38
5.3	Test di germinazione	40
6	CONCLUSIONI.....	46
7	BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	48
8	RINGRAZIAMENTI.....	49

1 ABSTRACT

The purpose of this work project is to characterize two spontaneous populations of *Onopordum tauricum* Willd. in the Appennino area: one placed in Cupi (Marche) and the other one in Colfiorito (Umbria).

A morphometric study of plants and seeds has been conducted relying on qualitative and quantitative parameters. We collected data and then, using multivariate analysis (PERMANOVA) for selected traits, we tried to characterize and describe the species morphometric variance and to test the differences between populations. This test is based on the calculation of morphometric distances between each individual of the two populations.

Thanks to Classification Tree, we established that there was a significant difference between the populations for the aspect described as *La* (length of the wing of the stem). Plants of Colfiorito have $La \geq 1.05$ mm while Cupi ones ≤ 1.05 mm. Furthermore, after a morphometric analysis of seeds using *ImageJ*, a software capable of measuring various parameters, such as area, perimeter, circularity, length, width, roundness, solidity and mean grey value, we were able to define that Colfiorito's cypselas were greatly bigger than those of Cupi.

In addition to that, the work aimed to design a protocol for seeds germination, in collaboration with the Germoplasm Bank of National Majella Park. In order to overcome the seeds dormancy, the cypselas had been submitted to pre-treatments as chemical scarification with H_2SO_4 for 2 and 4 minutes and then $20^\circ C$, two different concentrations of GA3 solution, humic acids and temperature of $25^\circ C$, prechilling followed by $25^\circ C$ and vernalization with $5^\circ C$ for 30, 50 and 100 days. Also we re-created different conditions in a controlled environment, such as temperature of $5^\circ C$, $20^\circ C$, $25^\circ C$ without light sources, and temperature of $15^\circ C$, $20^\circ C$, $25^\circ C$ with 12 hours of light. We estimated that vernalization with $5^\circ C$ for 50 days and then photoperiod of 12 hours of light with $20^\circ C$ was the best combination in order to overcome dormancy and obtain *Onopordum tauricum* seedlings.

Key words: *Onopordum tauricum* Willd., morphometric characterization, morphometric variance, intraspecific variability, germination physiology, germination protocol.

2 INTRODUZIONE

2.1 L'uso di piante per la caseificazione

Il bacino del Mediterraneo è noto a livello mondiale nell'ambito della caseificazione; numerose sono infatti le varietà di formaggio prodotte con latte ovino, caprino e vaccino. Nel corso degli anni la richiesta di formaggi prodotti con sostanze di origine vegetale, detti *veg-friendly*, sta aumentando.

La caseificazione condotta con proteasi vegetali ha, in realtà, origini molto antiche, come testimonia Columella nel *De Rustica*:

“Conviene coagulare il latte con caglio di agnello o di capretto, quantunque si possa anche rapparendere con il fiore di cardo silvestre o coi semi del cartamo o col latte di fico. In ogni modo il cacio migliore è quello che è stato fatto col minimo possibile di medicamento”

(Lucio Giunio Moderato Columella, "De Rustica", 50 d.C.)

Le proteasi vegetali, utilizzate come agenti coagulanti, sono presenti in diversi organi vegetali come foglie, fiori, frutti, radici e semi. Lo sfruttamento di enzimi vegetali potrebbe far fronte a diverse problematiche quali l'elevato costo del caglio di origine animale, motivazioni di carattere religioso (ebraismo, islamismo), etiche (vegetarianismo), politiche (Paesi Bassi, Francia e Germania vietano l'utilizzo di caglio di origine transgenica, derivante da DNA ricombinante) o sanitarie (BSE o TSE) e intolleranze ed allergie che impediscono l'utilizzo del caglio animale.

Dall'altra parte, esistono anche problematiche legate all'utilizzo di caglio vegetale, come la bassa resa di questo o possibili modificazioni organolettiche come ad esempio sapore amaro e difetti della consistenza. Pertanto, sono in corso diversi programmi di ricerca finalizzati alla selezione di nuovi enzimi vegetali potenzialmente utilizzabili nella produzione dei formaggi.

In letteratura è possibile reperire numerosi studi sulle proprietà caglianti di alcune specie appartenenti alla Famiglia delle Asteracee ed in particolare di specie appartenenti alla tribù delle Carduae.

Fino ad ora, per questi scopi, sono state utilizzate e studiate prevalentemente specie erbacee perenni del genere *Cynara L.*¹ e in particolare *Cynara cardunculus L* che rappresenta la specie in assoluto più studiata ai fini della caseificazione; di questa specie si conoscono due pool genici, uno originario dell'est del Mediterraneo e presente in Italia, Grecia e Tunisia e un altro dell'ovest del Mediterraneo presente in Spagna² e in Portogallo.

Di questa specie si conoscono alcuni aspetti riguardanti la composizione chimica, quali l'elevato contenuto di polifenoli con effetti benefici per la salute umana in quanto possiedono attività antibatteriche, antiossidanti, anti HIV, epatoprotettrici, di inibizione nel processo di sintesi di colesterolo ecc.; tuttavia le proprietà nutraceutiche e nutrizionali non sono ancora pienamente conosciute³.

Uno degli obiettivi delle diverse ricerche in corso è quello di coltivare queste specie con pratiche agronomiche sostenibili in modo tale da garantire, a livello industriale e semi-industriale, il prodotto per un periodo di tempo prolungato e con rese più costanti rispetto allo sfruttamento di piante selvatiche che dipendono invece dalle variazioni stagionali. Il cardo è una specie estremamente adatta al clima mediterraneo per via del positivo bilancio tra le fasi di crescita e l'andamento climatico, inoltre ha la capacità di fotosintetizzare durante il periodo invernale e di assorbire nutrienti dagli strati più profondi del suolo⁴. La coltivazione di queste specie comporterebbe una riduzione dello sfruttamento delle popolazioni selvatiche e quindi una riduzione della perdita della biodiversità locale.

Particolarmente adatti per un'agricoltura di tipo sostenibile sono gli ecotipi locali e le specie delle aree più svantaggiate del mediterraneo.

Con il progetto europeo PRIMA "Valorization of thistle-curdled in Mediterranean areas" ("VEGGIE-MED-CHEESES") in cui il seguente lavoro di tesi si inserisce, si intende studiare e modificare la tecnologia impiegata nella caseificazione per sostenere lo sviluppo di aziende locali attraverso la valorizzazione di formaggi tipici locali prodotti con caglio vegetale estratto da diverse specie di cardi selvatici, valutare la fattibilità dal punto di vista sociale, economico e tecnologico dello sfruttamento di piante erbacee mediterranee come alternative al caglio animale, stabilire le condizioni per effettuare un miglior controllo sulla sicurezza sulla qualità dei formaggi tradizionali, basandosi sulle conoscenze tradizionali e sull'eredità culinaria ed infine apportare modifiche per migliorare la filiera di produzione dei formaggi.

Al progetto partecipano diversi partner scientifici e numerosi stakeholders ognuno dei quali possiede competenze specifiche per poter condurre le diverse tipologie di ricerca descritte nelle varie Work Packages in cui il progetto si articola, ognuna con obiettivi e attività specifiche.

Il presente lavoro di Tesi si inserisce nelle Work Packages 1 e 2 nell'ambito delle quali vengono studiate alcune specie di cardi selvatici utilizzabili per la produzione di formaggi locali tradizionalmente prodotti con caglio animale. In particolare, con il mio lavoro di tesi mi sono occupata

della caratterizzazione di due popolazioni selvatiche di *Onopordum tauricum* Willd. attraverso lo studio morfometrico quali-quantitativo e lo studio della fisiologia della germinazione dei semi.

2.2 Il genere *Onopordum* L.

Dal punto di vista tassonomico *Onopordum* L. è un genere appartenente alla famiglia delle *Asteraceae*; attualmente l'AGP (Angiosperm Phylogeny Group) lo colloca all'interno della sottofamiglia *Carduoideae* (tribù *Cardueae*)⁵, mentre precedentemente era stato inserito, in un primo momento nella tribù *Cynarae* (sottotribù *tubiflorae*) e successivamente nella tribù *Cardueae*, sottofamiglia *Cichorioideae*.

Onopordum comprende specie erbacee bienni robuste, erette e notevolmente spinose. Queste presentano generalmente fusti alati mentre raramente sono di tipo acaulescente.

Le foglie sono dentate-pennatosette oppure pennato lobate, spinose o raramente indivise.

I capolini possono essere solitari o portati in corimbi, situati nella porzione terminale del fusto.

Le brattee dell'involucro del capolino sono strettamente serrate e spinose. I fiori sono rossastri, violacei o rosa, di tipo tubuloso e costituiti da quattro verticilli: un calice modificato in pappo, una corolla gamopetala, 5 stami fusi tramite le antere e un ovario uniloculare con un singolo ovulo inserito nella porzione apicale. I filamenti delle antere presentano delle piccole papille⁶.

Il ricettacolo è faveolato, vale a dire caratterizzato da numerosi piccoli favi o alveoli su cui sono ancorati gli acheni i quali sono ovoidali, oblungi, più o meno tetrangolari, glabri, spesso con frange trasversali. Questi frutti possiedono un pappo di setole piumose, barbellate o scabre.

Esistono circa 60 specie distribuite in Asia occidentale e centrale, nel Nord Africa, nelle isole Canarie e nell'Europa sud-orientale. Sono presenti anche in altre aree geografiche dove sono state accidentalmente introdotte⁶.

2.2.1 *Onopordum tauricum* Willd.

Onopordum tauricum Willd. è una specie emicriptofita bienne.



Figura 1. *Onopordum tauricum* Willd. durante l'antesi

L'altezza varia da 20 a 200 cm circa; i fusti sono verdi e alati fino all'apice. Le ali sono larghe e terminano con delle spine patenti. La pianta è densamente ghiandolosa per la presenza di numerosi peli ghiandolari su fusti, foglie, brattee del capolino e fiori.

Tra le foglie basali e quelle cauline si può osservare un elevato polimorfismo; le prime formano la tipica struttura "a rosetta" e sono oblunghe e lanceolate, grossolanamente dentellate con lobi di forma triangolare con presenza di spine e ghiandole che conferiscono il caratteristico odore muschiato. Le foglie cauline, invece, decorrono lungo il fusto in modo alterno e presentano lobi spinosi.

Le infiorescenze, raggruppate in corimbi terminali, sono dette capolini. Essi sono di forma emisferica, con un diametro che varia dai 4 ai 6 cm, situati in posizione terminale; il capolino portato dal fusto principale risulta essere di dimensioni maggiori. Le squame dell'involucro sono embricate, verdi o violacee, lesiniformi, con una larghezza di 3-5 mm, disposte su più serie; presentano ghiandole sia

Mar Nero, dove il clima risulta essere continentale steppico, con inverni freddi, estati calde e precipitazioni estremamente scarse, e il bacino del mediterraneo orientale.

La specie si sviluppa in terreni incolti, nei pascoli frequentati dagli ovini, soprattutto nelle zone in cui gli animali stazionano più a lungo e presso gli ovili in quanto beneficia delle concentrazioni di sostanza organica azotata, ad un'altitudine che varia da 0 fino a 1500 m.

3 OBIETTIVO DELLA RICERCA

Il presente lavoro di tesi è focalizzato sullo studio morfometrico e della fisiologia della germinazione di due distinte popolazioni di *Onopordum tauricum* dell'Appennino Umbro-Marchigiano.

Attraverso l'analisi multivariata dei tratti morfometrici quantitativi e qualitativi della pianta e delle cipsele, si intende caratterizzare e descrivere la variazione morfometrica della specie e testare eventuali differenze tra le due popolazioni.

Le analisi sulla fisiologia della germinazione, condotte in collaborazione con la Banca del Germoplasma Vegetale del Parco Nazionale della Majella, sono finalizzate all'individuazione di un protocollo ideale di germinazione delle cipsele in ambiente controllato.

Attualmente sono inoltre in corso analisi molecolari tramite l'approccio NGS, che, integrate con quelle morfometriche, hanno l'obiettivo di identificare l'esistenza di distinti ecotipi. I risultati di tali indagini non vengono riportati in questa tesi poiché le analisi sono ancora in corso di svolgimento.

Si ipotizza che i risultati di tali analisi possano consentire la selezione dei tratti di interesse per il progetto VEGGIE-MED-CHEESES.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Area di studio e campionamento

Le analisi esplorative in campo hanno permesso di individuare le due popolazioni di Onopordo presso le località di Cupi di Visso (MC; altitudine di 1000m slm), e Colfiorito (PG; altitudine 760 m slm) (Figure 2 e 3).



Figura 2. Localizzazione della popolazione studiata a Cupi di Visso (MC)

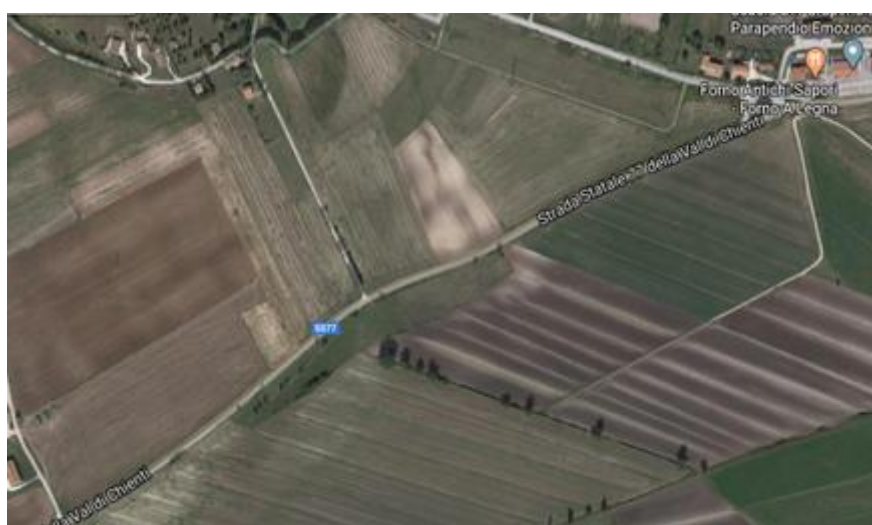


Figura 3. Localizzazione della popolazione di Colfiorito (PG)

In un primo momento sono stati effettuati dei sopralluoghi preliminari per accertarsi della presenza della specie, dopodiché per entrambe le popolazioni sono stati presi in considerazione 20 individui, scelti in maniera casuale. In campo sono state effettuate alcune misurazioni e conteggi sulla pianta intera mentre per le valutazioni da effettuare in laboratorio sono state collezionate tre foglie e tre capolini per ogni individuo, per poter avere almeno 3 repliche per ogni parametro da valutare.

A fine estate è stata effettuata la raccolta dei capolini contenenti semi maturi e successivamente, in laboratorio, i semi sono stati separati dalle altre parti del frutto e del capolino per poter effettuare lo studio morfometrico sulle cipsele e la semina su piastre di Petri in gel di Agarosio ai fini delle prove di germinazione.



Figura 3. Immagine A: Tre capolini prelevati dalla pianta numero 3 della popolazione di Colfiorito, catalogati, misurati, sezionati longitudinalmente e fotografati. Immagine B: Tre capolini della pianta numero 10 della popolazione di Cupi, catalogati, misurati, sezionati longitudinalmente e fotografati.



Figura 4. Esempio di campioni di foglia della pianta numero 11 (Cupi)

4.2 Analisi morfometrica delle piante

4.2.1 *Tratti morfometrici*

I parametri morfometrici qualitativi e quantitativi, misurati per ogni singolo individuo di Onopordo, sono stati selezionati in accordo a quelli utilizzati per il cardo selvatico e per il carciofo coltivato⁹ e che fanno riferimento alla classificazione UPOV (Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà Vegetali). (Vedi tabella 1)

Ai parametri di tipo qualitativo esaminati sono stati attribuiti valori numerici corrispondenti ai valori descrittivi a seguito di osservazioni sui diversi campioni, mentre quelli di tipo quantitativo sono stati valutati tramite conteggio e misurazioni.

Tabella 1. Tratti morfometrici qualitativi e quantitativi utilizzati per le analisi morfometriche.

<i>Tipologia parametro</i>	<i>di</i>	<i>Co dic e</i>	<i>Parametri e valori descrittivi</i>
Qualitativo	Pos ca		Posizione capolino (1: terminale, 2: laterale);
	Por t		Portamento (1: eretto, 2: semi eretto, 3: orizzontale);
	Cf		Colore foglia (1: verde giallastro, 2: verde chiaro, 3: grigiastro, 4: verde scuro, 5: verde cenere, 6: verde grigio);
	IC V		Intensità colore verde (3: chiaro, 5: medio, 7: scuro);
	TC V		Tinta del colore verde (1: assente, 2: gialla, 3: grigia);
	Pf		Peli nella pagina superiore (1: presenti, 9: assenti);
	Nlb s		Numero dei lobi secondari (1: assenti o molto pochi, 3: pochi, 5: medio, 7: molti, 9: moltissimi);
	Flb s		Forma dei lobi secondari (1: molto acuta, 2: acuta, 3: arrotondata);
	T		Taglia del capolino (1: piccolo, 2: medio, 3: grande);
	Fc		Forma del capolino centrale (1: circolare, 2: ellittico, 3: ovale, 4: triangolare, 5: trasversalmente ampiamente ellittico);
	Cc		Colore del silk (1: viola, 2: blu viola, 3: bianco);
	Fre c		Forma del ricettacolo (1: curvo, 2: piatto, 3: leggermente depresso, 4: fortemente depresso);
	Fbr		Forma delle brattee esterne (1: più large che lunghe, 2: tanto larghe quanto lunghe, 3: più lunghe che larghe);

	Cbr	Colore delle brattee (1: verde, 2: verde con striature viola, 3: viola con striature verdi, 4: prevalentemente viola, 5: tutto viola).
Quantitativo (conteggio)	Rlat	Numero di ramificazioni laterali, definito tramite conteggio
	Nf	Numero delle foglie, definito tramite conteggio
	Nc	Numero dei capolini, definito tramite conteggio
	Nali	Numero delle ali del fusto, definito tramite conteggio
	Nlb	Numero dei lobi, definito tramite conteggio, delle coppie dei lobi fogliari e del lobo apicale
Quantitativo (misurazioni)	H	Altezza (cm) della pianta, misurata con un metro a partire dalla base fino all'apice dell'asse centrale
	La	Lunghezza dell'ala compresa la spina (cm); misurazione dall'attaccatura dell'ala fino all'apice della spina
	Las	Lunghezza della spina dell'ala (mm); misurazione della sola spina
	Lelb	Lunghezza delle spine nei lobi (mm); misurazione della spina presente sull'apice del lobo
	Dc	Diametro del capolino (cm); misurato con righello doppio decimale sul campione sezionato
	Dre	Diametro del ricettacolo (cm), misurato con righello doppio decimale sul campione sezionato
	Ere	Spessore ricettacolo(cm); misurato con righello doppio decimale su campione sezionato
	Lebr	Lunghezza delle spine delle brattee (cm)
	Lf	Lunghezza della foglia (cm); misurata dalla parte basale fino all'apice con righello doppio decimale
Lef	Lunghezza delle spine nella foglia (mm)	

	Llb	Lunghezza del lobo più lungo (cm)
	Lrl b	Larghezza del lobo più lungo (cm)



Figura 5. Esempi di alcuni parametri quantitativi misurati sul ricettacolo; Erec= spessore del ricettacolo; Drec= diametro del ricettacolo



Figura 6. Esempi di alcuni parametri quantitativi misurati sulla foglia. Llb=lunghezza del lobo più lungo; Leib= lunghezza della spina nei lobi

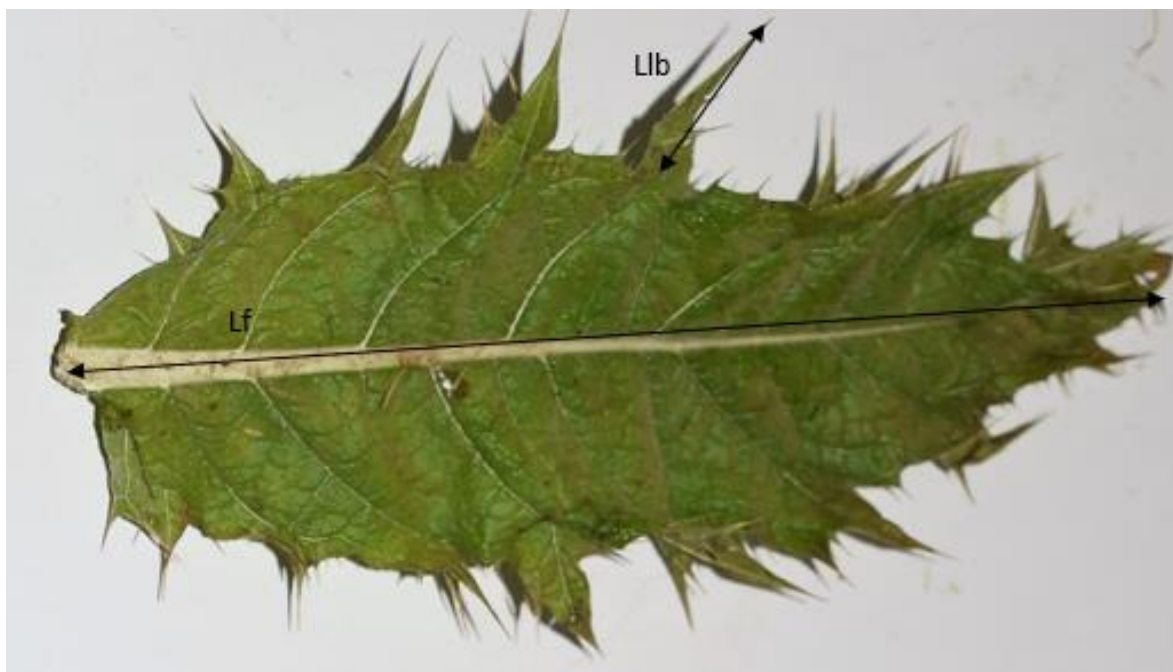


Figura 7. Esempi di parametri quantitativi utilizzati per misurare la foglia: Lf= lunghezza della foglia; Llb=lunghezza del lobo più lungo



Figura 8. Esempi di parametri quantitativi per misurare l'ala del fusto: La= Lunghezza dell'ala compresa la spina; Las= lunghezza dell'ala senza la spina.

4.2.2 Analisi statistiche

I valori dei tratti morfometrici misurati sono stati registrati in un foglio elettronico (Excel). È stata ottenuta una matrice di 120 repliche (20 individui x 3 repliche x 2 popolazioni) x 27 variabili (tratti morfologici).

Per testare le differenze tra le due popolazioni abbiamo applicato la *Permutational Multivariate Analysis of Variance* (PERMANOVA)¹⁰. PERMANOVA è un test statistico multivariato non parametrico basato sulla verifica dell'“Ipotesi nulla”: i centroidi dei gruppi (i centroidi delle popolazioni definiti nello spazio multivariato delle variabili morfologiche) sono equivalenti. Il rifiuto dell'ipotesi nulla significa che i centroidi dei gruppi sono significativamente distanti nello spazio

delle variabili morfologiche e che le 2 popolazioni sono, di fatto, morfologicamente differenti. Il test quindi si basa sul calcolo delle distanze morfometriche tra tutti gli individui delle 2 popolazioni.

Per applicare la PERMANOVA ai nostri dati abbiamo effettuato le seguenti operazioni:

- i) ordinato gli individui nello spazio multivariato morfometrico tramite una tecnica di ordinamento adatta a matrici di dati misti (quantitative e qualitative) (`dudi.hillsmith()` function R package `ade4`,¹¹);
- ii) calcolato le distanze euclidee utilizzando gli scores dell'ordinamento;
- iii) applicato la PERMANOVA alle distanze euclidee ottenute (preliminarmente è stata verificata l'omogeneità della dispersione dei gruppi) utilizzando le funzioni `adonis()` a `betadisper()` R `vegan` Package¹².

La Classification Tree¹³ è stata utilizzata per individuare il carattere o i caratteri morfologici e i rispettivi valori soglia che maggiormente discriminano le 2 popolazioni.

4.3 Caratterizzazione morfometrica delle cipsele

Nelle due popolazioni studiate, dopo aver individuato le piante da campionare, sono stati prelevati i capolini maturi (Figura 9). Questi sono stati posti all'interno di buste di carta e portati nel laboratorio della Banca del Germoplasma dove successivamente è stato eseguito il sezionamento lungo l'asse verticale del capolino per l'estrazione delle cipsele con annesso il pappo di setole.

Quest'ultimo deve essere rimosso per ottenere una buona scansione dei frutti nelle fasi successive, ottenendo così le cipsele pronte ad essere scansionate.

Una fase importante è la rimozione dei semi rovinati, danneggiati da insetti o vuoti che presentano dunque una morfologia alterata come consigliato dal "Manuale per la raccolta dei semi di specie selvatiche"¹⁴.



Figura 9. Capolino maturo sezionato



Figura 10. Cipsele prive del pappo di setole

Le cipsele, 100 per la popolazione di Cupi e 100 per la popolazione di Colfiorito, sono state disposte su uno scanner in maniera ordinata, utilizzando lo sfondo più appropriato per la corretta visualizzazione del seme, si procede con il posizionamento sul piano di lettura della carta millimetrata e di un Pantone di colori per avere un sistema di riferimento numerico e colorimetrico (Figura 11).

La caratterizzazione morfologia e colorimetrica dei semi può essere effettuata velocemente utilizzando delle tecniche di *image analysis* tramite l'utilizzo di scanner, computer e il software, *ImageJ*.

I vantaggi di questa tecnologia sono svariati: è rapida, precisa, riproducibile e non distruttiva e fornisce informazioni su diverse porzioni vegetali, nel nostro caso in particolare, sulle cipsele.

Sfruttando questa tecnica sono state effettuate le misure sulle due popolazioni di *Onopordum* analizzando oltre venti variabili, di cui le più importanti sono illustrate nella Tabella 2.

<i>Tipologia parametro</i>	<i>Parametro</i>
<i>Quantitativo</i>	Area (mm ²)
	Perimetro (mm)
	Circolarità (area/ perimetro ²)
	Lunghezza (mm)
	Larghezza (mm)
	Rapporto asse maggiore /asse minore
	Rotondità $4 \cdot \text{area} / (\pi \cdot \text{asse maggiore}^2)$
Solidità (area/area convessa)	
<i>Qualitativo</i>	Valore medio del colore grigio della cipsele

Tabella 2. Principali variabili utilizzati per la caratterizzazione morfometrica e colorimetrica dei semi.

Il software utilizzato permette di evidenziare l'area ricoperta dai semi e di nominare ognuno di essi con un numero; inoltre è in grado di rilevare una moltitudine di fattori relativi alla forma a partire dai

più semplici come la lunghezza e la larghezza, fino alla valutazione della solidità (Area/Area convessa del seme), della circolarità (si consideri che un valore di 1.0 corrisponde ad un cerchio perfetto), del colore (osservando il valore medio in scala di grigio dove 0 equivale al nero mentre 255 equivale al bianco).

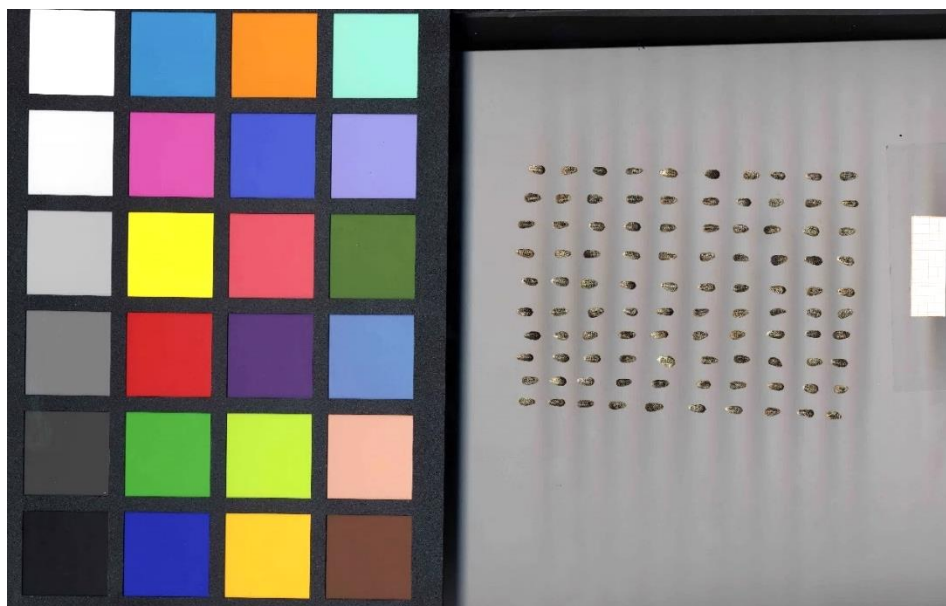


Figura 11. Immagine acquisita delle cipsele dallo scanner, con Pantone di colori e carta millimetrata.

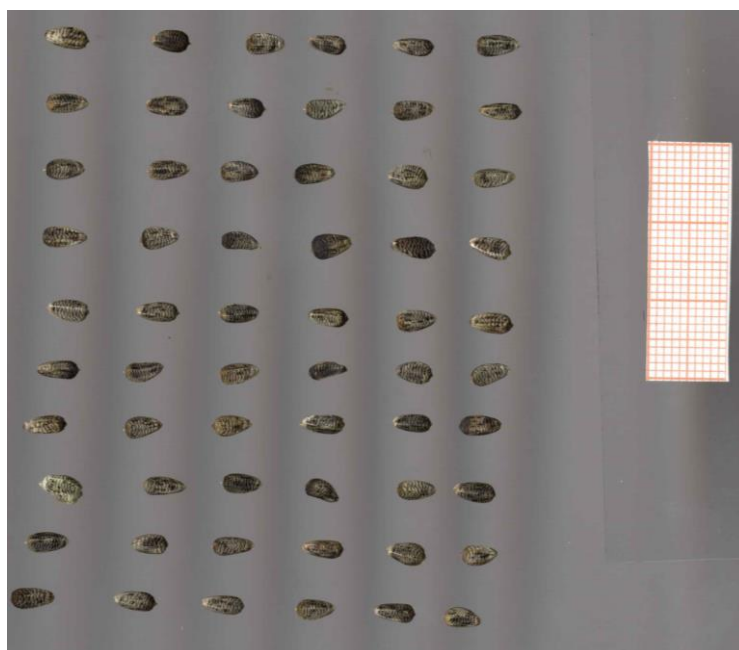


Figura 12. Particolare delle cipsele e della carta millimetrata della Fig. 11.

4.4 Test di germinazione

Dopo aver prelevato i capolini maturi, questi sono stati accuratamente trattati per separare il pappo di setole dalle cipsele; azione necessaria per poter collezionare gli acheni. I semi sono stati quindi adagiati su Piastre Petri di 90 mm sulle quali è stato precedentemente collocato il substrato di gel di Agarosio all'1%, preparate sotto cappa a flusso laminare per mantenere una condizione di sterilità; successivamente le piastre sono state poste in ambiente sterile con temperatura, umidità e fotoperiodo controllati. Le camere di crescita utilizzate, precisamente Panasonic MLR-352 e Panasonic MIR-154, hanno consentito di regolare sia il termoperiodo che il fotoperiodo.

Sono state inizialmente condotte diverse prove per osservare la capacità germinativa, ovvero la quantità di semi in grado di geminare, per cui le piastre sono state sottoposte a differenti, ma costanti temperature, rispettivamente a 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C e fotoperiodo di 12 ore. I test preliminari hanno fatto registrare valori di germinabilità molto bassi, sempre inferiori al 20%; ciò ha portato alla conclusione che i semi di questa specie sono affetti da un qualche tipo di dormienza. Un aspetto importante del ciclo biologico di alcune specie di *Onopordum* è infatti la dormienza dei semi, ovvero l'incapacità di germinare pur trovandosi in condizioni climatiche e ambientali idonee; ciò è dovuto a cause di tipo fisiologico. Esistono studi che hanno dimostrato come una serie di trattamenti con acido gibberellico (GA3) e nitrato di potassio (KNO₃) sui semi di *Onopordum acanthium* abbiano favorito l'emissione della radichetta ¹⁵.

Sono stati pertanto effettuati diversi pre-trattamenti per individuare il metodo ottimale per interrompere la dormienza e stimolare la germinazione:

- scarificazione chimica con acido solforico (H₂SO₄) per la durata di 2 minuti, successivamente a 20°C
- scarificazione chimica con H₂SO₄ per la durata di 4 minuti, successivamente a 20°C
- trattamento dei semi con una soluzione di 500ppm di acido gibberellico (GA3)
- trattamento dei semi con una soluzione di 250ppm di GA3
- trattamento dei semi con acidi umici con una temperatura di 25°C
- trattamento di preraffreddamento e successivamente temperatura di 25°C
- vernalizzazione a 5°C per 30 giorni
- vernalizzazione a 5°C per 50 giorni
- vernalizzazione a 5°C per 100 giorni

Inoltre, sono stati fatti ulteriori test a temperature diverse e con diverse condizioni di luce:

- al buio con una temperatura di 5°C
- al buio con una temperatura di 20°C
- al buio con una temperatura di 25°C
- con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio e temperatura di 15°C
- con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio e temperatura di 20°C
- con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio e temperatura di 25°C

L'emissione della radichetta è il criterio su cui ci siamo basati per calcolare la velocità di germinazione, ovvero il tempo necessario ai semi affinché avvenga la germinazione

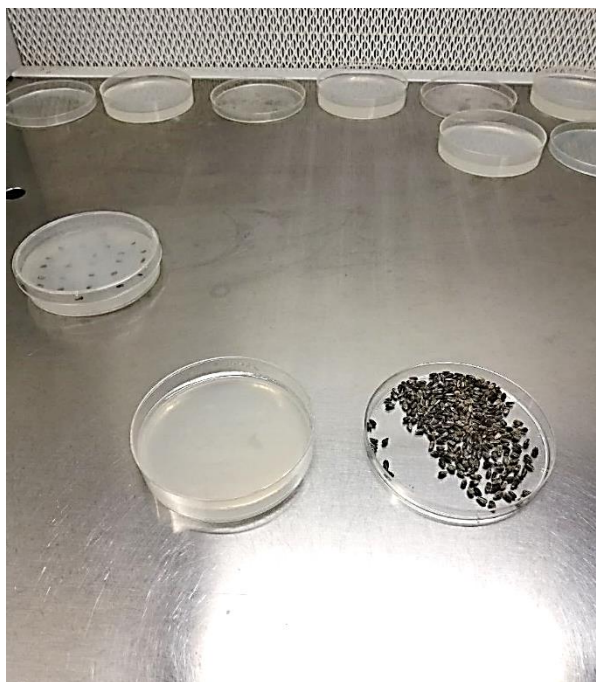


Figura 11. Una piastra di 90 mm di diametro con substrato di gel d'Agaroso su cui verranno disposti 25 acheni di *Onopordum tauricum*

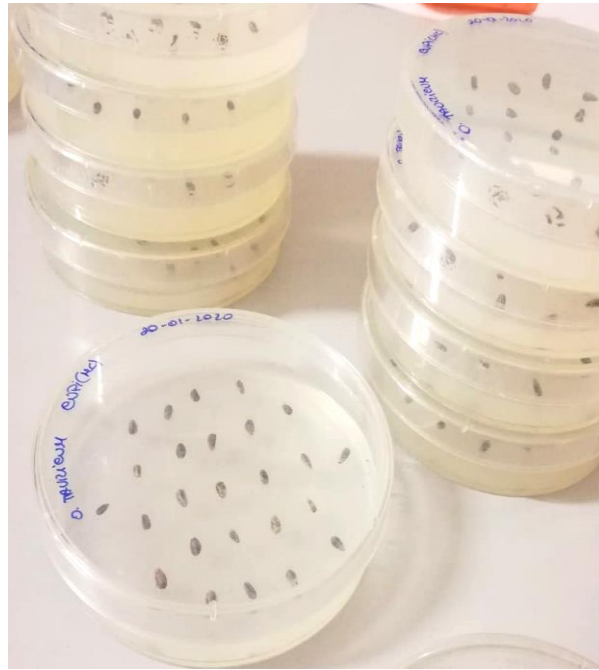


Figura 12. Semi di *Onopordum tauricum*, delle località di Cupi di Visso e Colfiorito su piastre di Petri con substrato di gel d'Agaroso all'1%.

Sono stati effettuati dei controlli periodici sotto cappa a flusso laminare per evitare contaminazioni ed osservare così l'emersione della radichetta.

Per completare il confronto tra le due popolazioni, sono stati fatti alcuni tests di germinabilità separatamente sui semi provenienti dalle due popolazioni; i tests utilizzati per il confronto sono i seguenti:

- al buio con una temperatura di 5°C
- al buio con una temperatura di 20°C
- al buio con una temperatura di 25°C
- con fotoperiodo di 12 ore e una temperatura di 20°C
- trattamento dei semi con una soluzione di 500ppm di GA3
- trattamento dei semi con una soluzione di 250ppm di GA3
- vernalizzazione a 5°C per 30 giorni
- vernalizzazione a 5°C per 50 giorni

4.5 Raccolta e conservazione di materiale vegetale per l'estrazione del DNA

Il campionamento del materiale vegetale da utilizzare per le successive analisi molecolari, non incluse nel presente lavoro di tesi, è stato effettuato utilizzando il “tea bags method”¹⁶. Il metodo consiste nel prelievo di una foglia per ogni individuo delle due popolazioni e della sua collocazione in bustine di materiale traspirante utilizzate per le infusioni di tè o di altre tisane. Su ogni bustina viene posto il nome della località di raccolta e il numero della pianta da cui il campione è stato collezionato. Le “tea bags” vengono quindi poste in un recipiente a chiusura ermetica in cui viene inserito un certo quantitativo di Silica Gel, un polimero costituito da di-idrossido di silicio, caratterizzato da proprietà disidratanti e adsorbenti (Figura 15). In questa maniera le foglie si essiccano rapidamente impedendo la formazione di muffe e la proliferazione di batteri che potrebbero danneggiare il DNA.

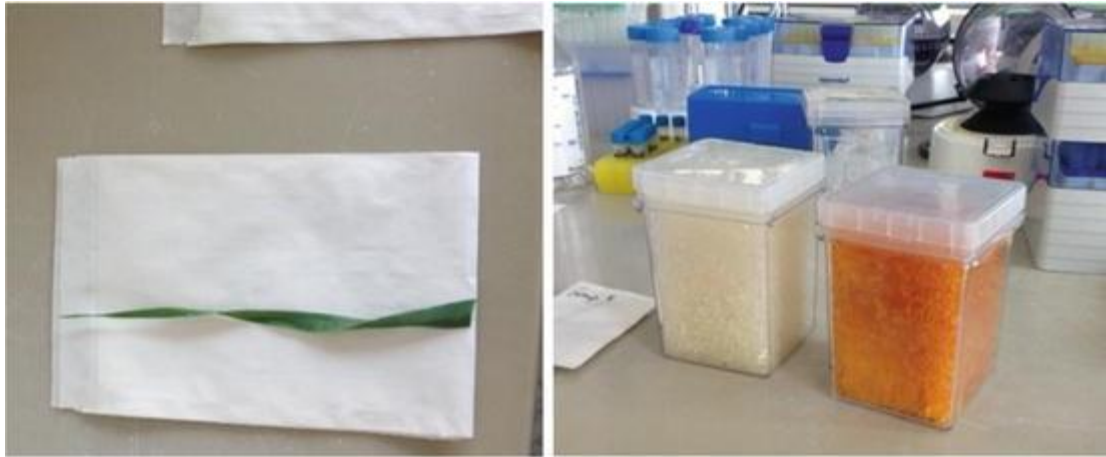


Figura 135. Esempi di Tea bags contenenti campioni di foglie e Silica gel.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Caratterizzazione morfometrica delle popolazioni

In Tabella 3 sono riportati i tratti morfologici-morfometrici delle 2 popolazioni.

ID PIANTA	Loc	Nali	Nc	Nf	Nlb1	Nlb2	Nlb3	Nlbs1	Nlbs2	Nlbs3	Rlat
1	Visso	4	19	52	11	11	11	3	3	3	6
2	Visso	4	9	40	11	11	11	1	1	1	7
3	Visso	4	43	72	11	11	11	3	3	3	11
4	Visso	4	13	67	9	9	11	1	1	1	6
5	Visso	4	8	50	11	11	9	3	3	3	5
6	Visso	4	17	79	11	11	11	3	3	3	9
7	Visso	4	65	218	11	11	11	3	3	3	12
8	Visso	4	110	292	15	15	13	1	3	3	21
9	Visso	4	5	21	9	7	9	1	1	1	3
10	Visso	4	4	33	9	9	7	1	1	1	2
11	Visso	4	24	82	13	13	13	1	1	1	10
12	Visso	4	12	52	15	13	13	1	1	1	5
13	Visso	4	84	218	15	15	15	1	1	1	19
14	Visso	4	34	127	17	15	15	1	1	1	9
15	Visso	4	6	31	13	15	15	1	1	1	4
16	Visso	4	60	341	17	15	15	1	1	1	23
17	Visso	4	18	85	13	15	15	3	3	3	5
18	Visso	4	18	80	15	17	17	1	1	1	6
19	Visso	4	4	34	11	11	11	1	1	1	3
20	Visso	4	12	61	15	15	13	1	1	1	4
21	Colfiorit	4	19	120	15	17	15	1	1	1	11
22	Colfiorit	4	9	81	13	15	13	1	1	1	5
23	Colfiorit	4	43	328	13	13	17	1	1	1	11
24	Colfiorit	4	98	518	15	17	19	1	1	1	18
25	Colfiorit	4	8	50	15	15	15	1	1	1	6
26	Colfiorit	4	7	35	13	13	13	1	1	1	7
27	Colfiorit	4	24	194	13	15	15	1	1	1	7
28	Colfiorit	4	8	63	15	15	15	1	1	1	7
29	Colfiorit	4	29	152	15	15	15	1	1	1	8
30	Colfiorit	4	16	129	15	17	15	1	1	1	9
31	Colfiorit	4	16	81	13	17	15	1	1	1	5
32	Colfiorit	4	4	31	13	15	17	1	1	1	3
33	Colfiorit	4	51	359	15	15	15	1	1	1	5
34	Colfiorit	4	34	219	13	15	11	1	1	1	5
35	Colfiorit	4	15	113	13	13	11	1	1	1	7
36	Colfiorit	4	13	89	17	15	13	1	1	1	6
37	Colfiorit	4	26	147	13	13	15	1	1	1	9
38	Colfiorit	4	32	177	13	15	15	1	1	1	11
39	Colfiorit	4	16	79	13	11	11	1	1	1	6
40	Colfiorit	4	51	230	17	17	17	1	1	1	16

ID PIANTA	Loc	Cbr1	Cbr2	Cbr3	Cc1	Cc2	Cc3	Cf1	Cf2	Cf3	Fbr1	Fbr2	Fbr3
1	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
2	Visso	2	2	4	1	1	1	1	1	1	3	3	3
3	Visso	1	2	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
4	Visso	2	2	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3
5	Visso	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
6	Visso	2	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3
7	Visso	3	3	3	1	1	1	3	3	1	3	3	3
8	Visso	2	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
9	Visso	1	1	3	1	1	1	2	2	2	3	3	3
10	Visso	1	3	4	1	1	1	1	1	1	3	3	3
11	Visso	1	3	4	1	1	1	1	1	1	3	3	3
12	Visso	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3
13	Visso	2	2	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
14	Visso	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
15	Visso	1	1	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3
16	Visso	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
17	Visso	1	2	2	1	1	1	2	2	1	3	3	3
18	Visso	1	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3	3
19	Visso	1	2	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
20	Visso	1	1	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3
21	Colfiorit	1	1	2	1	1	1	1	2	2	3	3	3
22	Colfiorit	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
23	Colfiorit	1	1	3	1	1	1	2	2	2	3	3	3
24	Colfiorit	1	3	3	1	1	1	2	2	2	3	3	3
25	Colfiorit	2	2	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
26	Colfiorit	2	2	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
27	Colfiorit	2	3	4	1	1	1	1	1	1	3	3	3
28	Colfiorit	2	2	4	1	1	1	1	1	1	3	3	3
29	Colfiorit	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
30	Colfiorit	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
31	Colfiorit	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3
32	Colfiorit	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3
33	Colfiorit	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3
34	Colfiorit	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	Colfiorit	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	Colfiorit	2	3	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3
37	Colfiorit	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	Colfiorit	2	1	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3
39	Colfiorit	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	Colfiorit	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ID PIANTA	Loc	Fc1	Fc2	Fc3	Flbs1	Flbs2	Flbs3	Frec1	Frec2	Frec3	ICV1	ICV2	ICV3
1	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
2	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
3	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
4	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
5	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
6	Visso	3	3	3	1	1	1	2	2	2	3	3	3
7	Visso	3	3	3	2	1	1	1	2	2	5	5	5
8	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
9	Visso	3	3	3	1	1	1	1	2	2	3	3	3
10	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
11	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
12	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
13	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
14	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
15	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
16	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
17	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
18	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	5
19	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
20	Visso	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
21	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
22	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
23	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
24	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
25	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
26	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
27	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
28	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
29	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
30	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
31	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
32	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
33	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
34	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3
35	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
36	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
37	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
38	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
39	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3
40	Colfiorit	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3

ID PIANTA	Loca	Pf1	Pf2	Pf3	Port	Posca	T1	T2	T3	TCV1	TCV2	TCV3
1	Visso	9	9	9	1	1	2	2	3	2	2	2
2	Visso	9	9	9	1	1	2	2	2	2	2	2
3	Visso	9	9	9	1	1	2	2	3	2	2	2
4	Visso	9	9	9	1	1	2	3	3	2	2	2
5	Visso	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
6	Visso	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
7	Visso	9	9	9	1	1	2	2	2	1	1	2
8	Visso	9	9	9	1	1	2	2	2	2	2	2
9	Visso	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
10	Visso	9	9	9	1	1	3	2	1	2	2	2
11	Visso	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
12	Visso	9	9	9	1	1	3	2	2	2	2	2
13	Visso	9	9	9	1	1	3	2	2	2	2	2
14	Visso	9	9	9	1	1	3	2	2	2	2	2
15	Visso	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
16	Visso	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
17	Visso	9	9	9	1	1	3	2	1	1	1	2
18	Visso	9	9	9	1	1	3	2	2	2	2	1
19	Visso	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
20	Visso	9	9	9	1	1	3	2	1	1	1	1
21	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	2	1	1
22	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
23	Colfiorit	9	9	9	1	1	3	2	1	1	1	1
24	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	1	1	1
25	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
26	Colfiorit	9	9	9	1	1	1	1	1	2	2	2
27	Colfiorit	9	9	9	1	1	3	2	1	2	2	2
28	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
29	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
30	Colfiorit	9	9	9	1	1	3	1	1	2	2	2
31	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
32	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
33	Colfiorit	1	1	1	1	1	3	3	2	2	2	2
34	Colfiorit	9	9	9	1	1	3	2	1	2	2	2
35	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
36	Colfiorit	9	9	9	1	1	1	1	1	2	2	2
37	Colfiorit	9	9	9	1	1	3	3	1	2	2	2
38	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	1	1	2	2	2
39	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2
40	Colfiorit	9	9	9	1	1	2	2	1	2	2	2

ID PIANTA	Loc	D1	D2	D3	Drec1	Drec2	Drec3	Erec1	Erec2	Erec3	H
1	Visso	10	10	11,8	4	4,2	5	0,7	0,7	0,9	105
2	Visso	6,8	7,1	8,4	2,5	2,6	3,5	6	6	9	106
3	Visso	6,8	7,5	9,5	2,8	3,2	4,2	4	4	4,5	139
4	Visso	5,8	8,5	7,6	2,8	4,5	3,8	5	6	5	117
5	Visso	7,5	6,5	5	3,5	2,9	2,3	6	2	2,5	109
6	Visso	9	7,5	7	3,2	2,8	2,7	3	2,5	2,5	128
7	Visso	8	7,6	7	3,2	3,3	3,9	4,5	4,5	4	103
8	Visso	8,9	7,9	7,6	3,9	3	2,8	6	5	5	162
9	Visso	9	7,2	5,2	3,5	2,8	1,9	5	4,5	3	89
10	Visso	9,2	7	4,5	4	3	2	6	5	4	104
11	Visso	9,4	6,9	6	3,5	2,4	2,1	5	4	4	119
12	Visso	10,4	8,8	6,3	4,8	3,9	3	7	5	4	138
13	Visso	11	9,4	7	4,3	4	2,9	6	5	4	178
14	Visso	10	8,2	7,5	4,7	3	2,8	7	4	4	152
15	Visso	9	6,6	6,7	3,4	2,6	2,8	6	3	2,5	110
16	Visso	6,7	7,3	6,3	3,5	3,3	2,4	4,5	5	3,5	194
17	Visso	10,7	8,6	6,7	4,7	3,4	2,6	6	4	4	169
18	Visso	11	7,9	7,8	4,4	3	2,8	5	4	3,5	180
19	Visso	7,9	6,1	5,3	3,5	2,9	1,8	4,5	4	3	114
20	Visso	9,3	8,4	6,2	4	3,7	2,5	5	5	3	124
21	Colfiorit	8,2	7	6,2	3,5	3	2,8	5	3	3	154
22	Colfiorit	8,3	5,2	6,2	3,9	2,1	2,5	4,5	3,5	3,5	131
23	Colfiorit	9,8	8,7	6,9	4,3	3,8	2,8	4	4	3	185
24	Colfiorit	9,6	6,6	6,5	4,1	2,7	2,6	5	4	3,5	174
25	Colfiorit	8	7,2	6,5	3,3	3	2,6	4	4	3	133
26	Colfiorit	6,7	6,2	5,3	2,7	2,3	2,1	3	3	2,5	102
27	Colfiorit	9	8,2	6,2	4	3,7	2,4	4	3	3,5	178
28	Colfiorit	8	7,3	6,9	3,7	3	2,9	4	4	3,5	154
29	Colfiorit	8,8	6,2	6,5	4	2,9	2,7	4	3	3,5	148
30	Colfiorit	9,5	7,2	6,7	4	3,1	2,9	4,5	3,5	3,5	180
31	Colfiorit	8,5	7,2	5,7	3,4	2,8	2,2	4,5	3,5	3	105
32	Colfiorit	6,8	5,7	5	2,7	2,5	1,9	3	3	2	75
33	Colfiorit	9,1	8,5	5,5	4,2	3,7	2,6	4	4	3	218
34	Colfiorit	8,8	7	4,5	4,2	3	2,3	4	3,5	2,5	123
35	Colfiorit	8,2	7	4,1	4	3,8	2	3	5	2	128
36	Colfiorit	7,1	5,5	5,4	3,5	2,7	2,5	4	4	3,5	131
37	Colfiorit	8,9	8,5	8,3	4,4	3,6	3,4	2	3,5	3	197
38	Colfiorit	8,5	6,6	5,9	3,7	3,2	2,5	4	4	3,5	195
39	Colfiorit	8	7,6	6,6	4	3,5	3	7	6	4	135
40	Colfiorit	8,4	7,3	5,5	4,3	3,5	2,3	3	3	2	194

ID PIANTA	Loc	La	Las	Lebr1	Lebr2	Lebr3	Lef1	Lef2	Lef3	Leib1	Leib2
1	Visso	3,4	5,5	4	5	6	5	4,5	4,5	5	4
2	Visso	1	3,5	3	3,5	3	2	2,5	3	2	2
3	Visso	2,2	3	2,5	3	3,5	3	4,5	4,5	2,5	2,5
4	Visso	0,11	5	3,5	3	4	4,5	4	5,5	3,5	5
5	Visso	0,8	4	4	3	4,5	5	3	4	3	3
6	Visso	1,6	5	4,5	5	5	5	4,5	5,5	3	4
7	Visso	1,4	4	4	4	4	3	3	3	3	3
8	Visso	0,12	5	4,5	4	4	5	6	6	4,5	5
9	Visso	0,11	5	4	3,5	3	4	3	3	4	2,5
10	Visso	0,8	4	4	4	3	3	3	4	3	3
11	Visso	0,9	5	5	5	3	6	6	6	5	6
12	Visso	0,12	5	4	4	3	4	4	3	3	3
13	Visso	0,15	8	4	4	4	5	5	5	4	5
14	Visso	0,8	6	5	3,5	3	5	5	5	4	5
15	Visso	0,5	4	5	5	5	4,5	4	4	3	3
16	Visso	0,11	7	2	4	3	5	6	5	4	5
17	Visso	0,1	7	4,5	4	4	4,5	4,5	4,5	4	4
18	Visso	0,11	5	5	4	4	4	3	3,5	4	3
19	Visso	0,5	4	3,5	2,5	2,5	3,5	4	4	3	4
20	Visso	0,9	5	3	2,5	2,5	4	4	3	3	3
21	Colfiorit	2,7	7	2	2,5	2	5,5	5	5	4	3
22	Colfiorit	1,4	5	2,5	2,5	3	3,5	4	4	2,5	2,5
23	Colfiorit	2,9	7	3,5	3	3	6	5,5	6	3	4
24	Colfiorit	2,3	7	3	3	2,5	6	6	6	4	4
25	Colfiorit	1,8	5	4	4	4	4,5	4	4,5	3,5	3,5
26	Colfiorit	1,8	4	2,5	2,5	2,5	3	3,5	3,5	3	3
27	Colfiorit	2,7	7	4	4	3	6	6	6	5	4
28	Colfiorit	1,9	6	3,5	2,5	3	4	4	4	3,5	3,5
29	Colfiorit	1,7	6	3	2,5	2,5	3,5	3,5	3,5	3	3
30	Colfiorit	2,2	7	3,5	3,5	3	4,5	4,5	4,5	3,5	3,5
31	Colfiorit	2,2	5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3	3	3
32	Colfiorit	1,1	5	2,5	2,5	2	3,5	2,5	3	2,5	2
33	Colfiorit	3,2	7	4	4	3	4,5	4,5	4,5	4	3,5
34	Colfiorit	2,2	7	4	3,5	3,5	4,5	4,3	4,4	4	3,5
35	Colfiorit	2,8	7	3,5	3,5	2,5	4,5	4,5	4,5	3	3,5
36	Colfiorit	2,6	5	3,5	3,5	3	3,5	3	3,5	2,5	2,5
37	Colfiorit	2,7	7	4	3,5	3	5,5	5	4	3,5	3
38	Colfiorit	2,6	6	3	2,5	3	3	3	3,5	2,5	2,5
39	Colfiorit	2,5	6	3	3	3	4	5	5	3,5	3
40	Colfiorit	3,4	7	3,5	3	3	5	5	5	3	3,5

ID PIANTA	Loc	Lelb3	Lf1	Lf2	Lf3	Llb1	Llb2	Llb3	Lrlb1	Lrlb2	Lrlb3
1	Visso	2,5	32,5	35	40	5,3	4,9	6	4,5	3,9	3,7
2	Visso	3	21	24	20,5	2,5	3,2	3,2	1,4	3,2	2,7
3	Visso	2	41	35	42	4,5	4	5,2	3,5	3,5	5,6
4	Visso	5	26	23,5	27,5	3,5	3	3,3	1,9	1,4	2,2
5	Visso	3	26	17	15	3,2	2,6	2,2	3	1,7	1,8
6	Visso	3,5	44	35,5	28	4,3	3,7	4,5	4	3	3
7	Visso	3	30	25	25	4,5	3	4	3,3	2	2,6
8	Visso	5	48	42	32	5,5	4,5	6,2	4,5	4,2	2,4
9	Visso	3	19	18,8	17,8	3,1	3	2,5	2,3	2,2	1,3
10	Visso	3	26	24	19,5	3,5	2,7	2,5	1,9	1,7	1,9
11	Visso	5	32	29	30	5,5	5	5,4	2,5	3,2	2,7
12	Visso	3	37	36	29	4,5	5,2	4,5	2,9	2,6	2,5
13	Visso	4	46,5	50,5	25,5	6,9	8,1	4,7	4	4,6	3,7
14	Visso	4	42,5	30,5	26,5	5,8	5	4	2,6	2,4	2,3
15	Visso	3,5	32	18	17	3,7	2,4	3	1,9	1,4	1,5
16	Visso	3	27	25	23,5	4,2	4,1	3,5	2,1	1,8	2,5
17	Visso	4	52	44	45	6,6	5,7	6,3	3	2,5	2,5
18	Visso	3	38	32	31	6,4	5,9	4,8	3,8	2,9	2,2
19	Visso	2,5	21,5	15,5	17	2,1	3,2	2,6	1,6	2,3	1,7
20	Visso	2,5	29,5	28	20,5	4,5	4,2	3,5	2,3	1,5	1,5
21	Colfiorit	4	30	33	30	4,2	4,7	4,2	1,9	2,3	2,2
22	Colfiorit	2,5	23,5	24,3	20,5	3	2,5	2,1	2,2	1,7	1,7
23	Colfiorit	2,5	41,3	32,5	47	4,2	4,3	5,5	2,3	2,7	2,7
24	Colfiorit	3,5	59,5	53,5	52	6,5	5,7	6,5	3,3	3,5	3,5
25	Colfiorit	3,5	27,2	22,3	24,2	3,7	2,7	3,3	2,3	1,8	1,5
26	Colfiorit	3	21,6	21,8	17,4	2,7	2,3	2	1,4	1,4	1,2
27	Colfiorit	4	58	49,5	35	6	6,3	4,5	2,8	2	1,9
28	Colfiorit	3,5	26	26	27	3,5	3,4	3,6	1,5	1,9	2
29	Colfiorit	3	55,6	41	31	6,3	6,4	4,8	2,8	2,9	3
30	Colfiorit	3	56	55	38,5	4,5	5,2	4,8	2,3	2,6	2,5
31	Colfiorit	2,5	28,5	31,5	29,5	3,5	3,5	3,7	1,9	2	2
32	Colfiorit	2,5	22,5	21,5	17	2,7	2,5	1,7	2,1	2,3	1,5
33	Colfiorit	3,5	55	46	43	5,5	6	6	4,5	5	5,2
34	Colfiorit	3	39	37	31	5,2	4,5	4,5	3,7	3	3,2
35	Colfiorit	3,5	24	23	18	3,5	3	3	2,5	2,4	2
36	Colfiorit	2,5	55	33	30,6	3	2,8	3	2,6	2,3	2,2
37	Colfiorit	3	29	23,5	26,5	4	4,5	4,6	2,5	2,3	2,2
38	Colfiorit	2,5	45,5	36	39	4,5	4,5	3,8	2,9	2,4	3,2
39	Colfiorit	3	21	15,5	14,3	3,3	4,2	2,8	2,2	2,2	1,7
40	Colfiorit	3,5	48	38,5	40,5	5,7	5	5,6	2,4	2,7	2,4

Tabella 3. Dati raccolti sulla base dei parametri qualitativi e quantitativi per i 40 individui presi in esame, con le relative 3 repliche.

La PERMANOVA ha dimostrato che le due popolazioni sono differenti in termini morfometrici (Tabella 4).

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr (>F)	
Pop	1	213.04	0.14167	19.477	0.001	***
Residual	118	1290.71	0.85833			
Total	119	1503.75	1.00000			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Tabella 4. Output dei risultati ottenuti dalla PERMANOVA

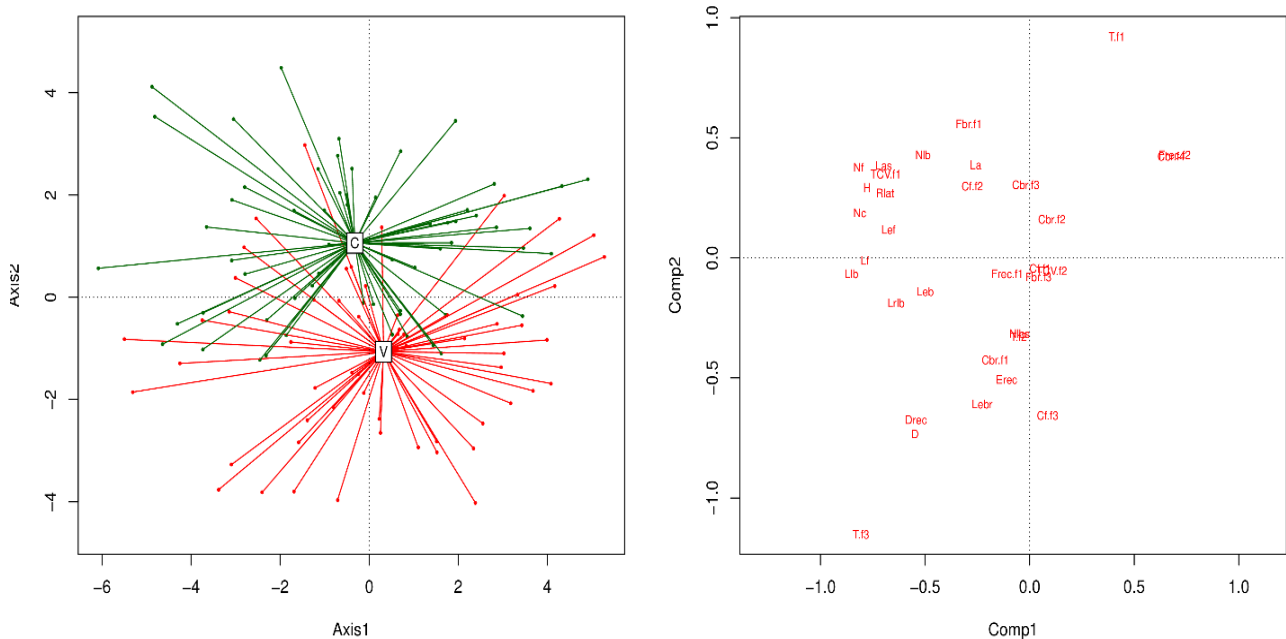


Figura 14. Ordinamento degli individui nello spazio multivariato morfometrico

Nella Figura 16 gli individui delle 2 popolazioni sono ordinati in accordo ai primi due principali gradienti di variazione morfometrica (che rappresentano il 38% della variazione totale della matrice).

Le due popolazioni si differenziano soprattutto nel secondo gradiente. La popolazione di Cupi è caratterizzata da maggiori valori di La (lunghezza dell'ala del fusto) e di alcune variabili qualitative come la taglia del capolino, la forma delle brattee esterne etc.

La popolazione di Visso invece ha valori di La inferiori e valori maggiori per quanto riguarda invece lo spessore del ricettacolo, la lunghezza delle spine nelle brattee, il diametro del ricettacolo etc.

Il primo gradiente rappresenta invece una variazione interna alle popolazioni.

Il “*Classification tree*” (CART) ha evidenziato, con un'accuratezza del 90%, che il carattere morfologico maggiormente predittivo e discriminante tra queste 2 popolazioni è il La. La popolazione di Colfiorito presenta il parametro $La \geq 1.05$ cm, mentre la popolazione di Visso possiede un $La <$ di 1.05 cm (Figura 17)

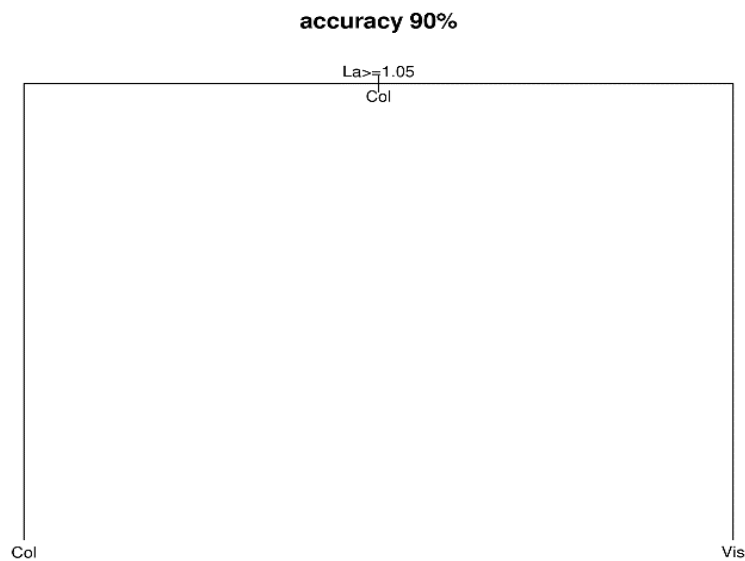


Figura 17. Classification tree della matrice dei dati morfometrici delle popolazioni di Onopordo di Colfiorito e Visso. La (lunghezza dell'ala) è il carattere discriminante delle 2 popolazioni.

5.2 Caratterizzazione morfometrica delle cipsele

In Tabella 5 è possibile osservare i risultati ottenuti dall'elaborazione del software ImageJ: i parametri quantitativi considerati, come lunghezza e larghezza sono tendenzialmente maggiori nelle cipsele di Colfiorito con valori, rispettivamente di 5,42mm e 2,66mm contro i 5mm e i 2,52mm della popolazione di Cupi. Le cipsele di Colfiorito, inoltre, sono caratterizzate da una colorazione più scura con un valore medio del grigio pari a 79,93.

Tabella 5. Risultati dell'elaborazione dati ottenuta con il software ImageJ

	<i>Onopordum tauricum</i> - Colfiorito	<i>Onopordum tauricum</i> – Cupi
Area (mm²)	10,81945	9,42062
Perimetro (mm)	14,35159	13,54182
Circolarità	0,66309	0,64775
Lunghezza (mm)	5,42681	5,00511
Larghezza (mm)	2,66991	2,52215
AR	2,02114	1,9935
Rotondità	0,49977	0,50461
Solidità	0,96242	0,95651
Valore medio in scala di grigio	79,93348	87,21681

Per i parametri circolarità, rotondità e solidità non sono evidenziate variazioni notevoli, perciò la forma e la densità delle cipsele delle due popolazioni risultano piuttosto simili (Tabella 5). I grafici delle Figure 18, 19 e 20 evidenziano i valori di alcuni parametri riportati in Tabella 5, nelle due popolazioni.

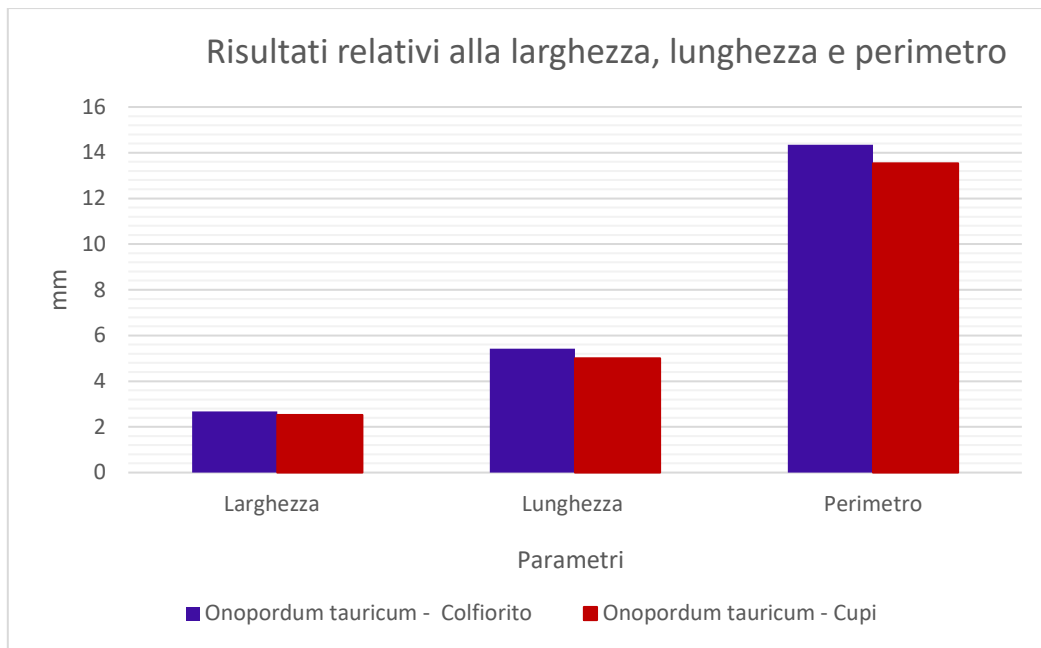


Figura 18. Rappresentazione grafica dei risultati delle misure eseguite dal software ImageJ con particolare riferimento ai parametri 'lunghezza' e 'larghezza'

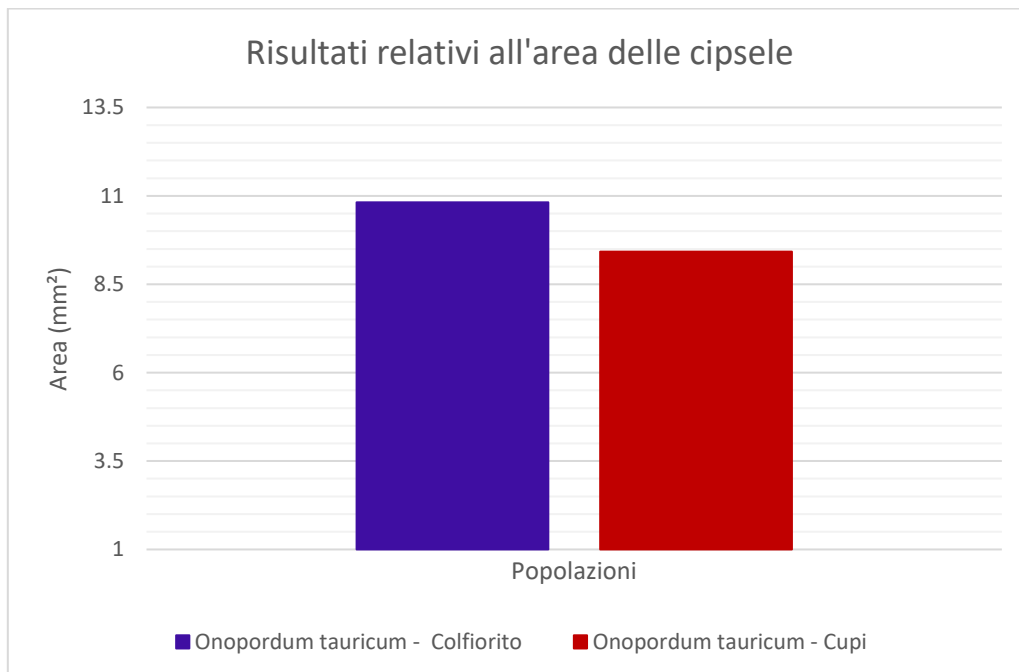


Figura 19. Rappresentazione grafica dei risultati delle misure eseguite dal software ImageJ con particolare riferimento al parametro 'area'

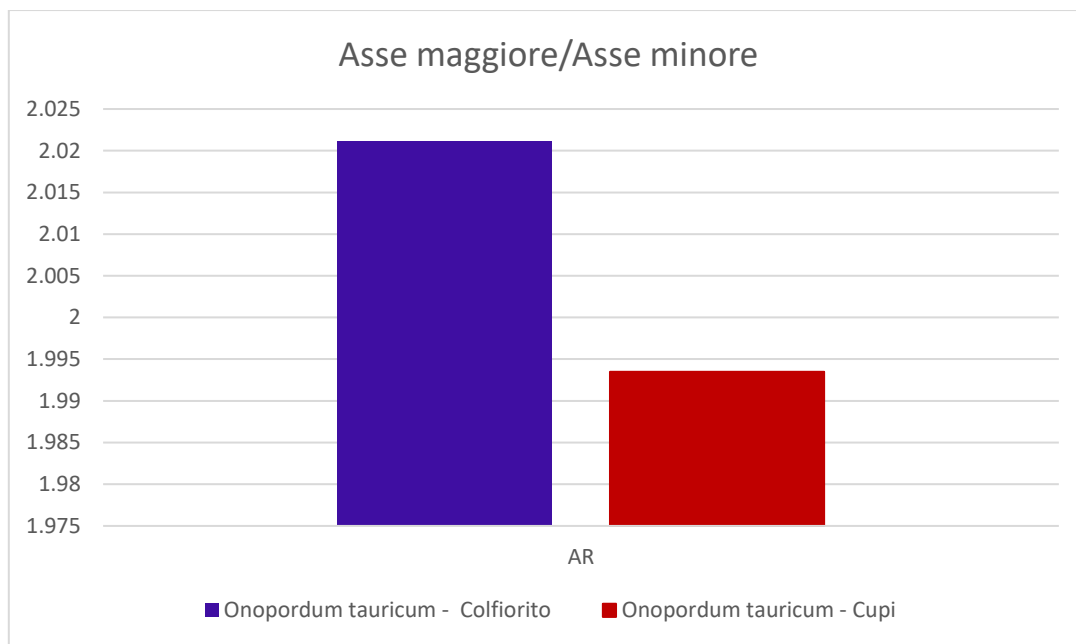


Figura 20. Rappresentazione grafica dei risultati delle misure eseguite dal software ImageJ con particolare riferimento al parametro 'AR'(Asse maggiore/Asse minore)

5.3 Test di germinazione

Dalle prove condotte in laboratorio abbiamo potuto stimare la percentuale finale di germinazione e la velocità di germinazione, ovvero il tempo necessario per ottenere la germinazione del 50%+1 dei semi e il ritardo in giorni di germinazione in relazione alle diverse condizioni. Le prove preliminari alle temperature costanti di 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C e fotoperiodo di 12 ore, hanno riportato valori di germinabilità (M) sempre molto bassi, inferiori al 20% (Fig. 21).

Valori così bassi di germinabilità indicano la presenza di una dormienza che deve essere interrotta affinché il seme possa germinare.

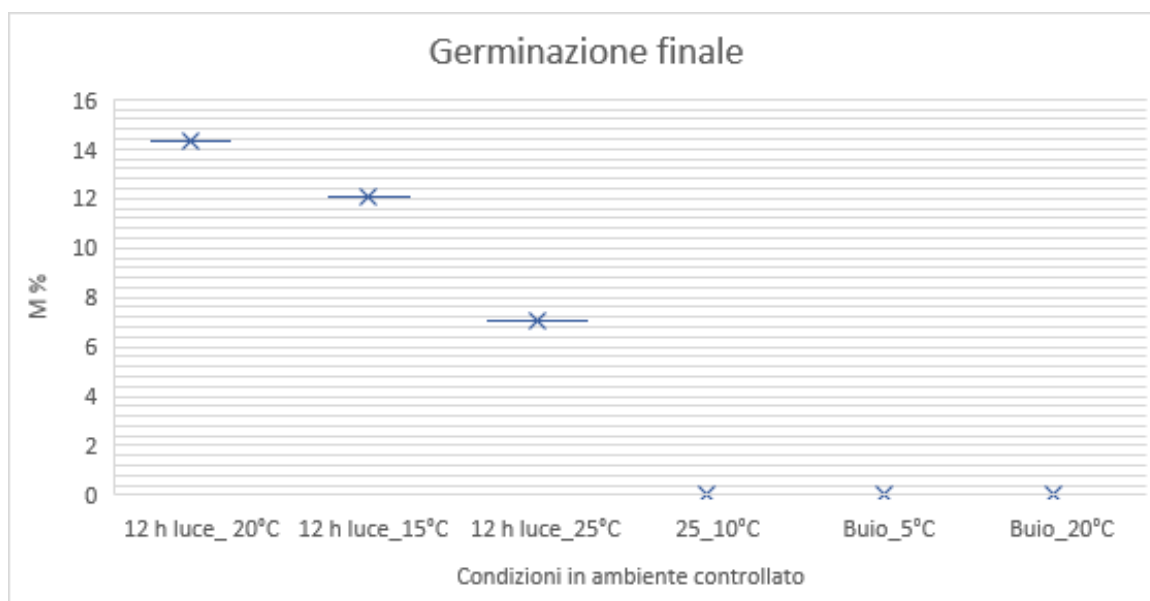


Figura 21. Percentuale finale di germinazione con temperatura e fotoperiodo controllati

Tabella 4 Valori di germinabilità totale (M%) riportati nei diversi test.

<i>Test svolti</i>	<i>M (%)</i>	<i>ANOVA groups</i>
Trattamento con GA3_500	93.55263	a
Trattamento con GA3_250	84.69642	a
Vernalizzazione 50 d e 20°C	80.32508	a
Vernalizzazione 30 d e 20°C	57.11988	b
4 minuti in H2SO4 e 20°C	21.6557	c
2 minuti in H2SO4 e 20°C	17.25899	cd
Vernalizzazione 100 d e 20°C	15.86806	cde
Fotoperiodo di 12 h a 20°C	14.29094	cde
Fotoperiodo di 12 h 15°C	12.08333	cdef
25°C	7.034744	def

Pre-raffreddamento + 25°C	5.270468	def
Acidi umici a 25°C	2.5	ef
25_10°C	0	f
Buio a 5°C	0	f
Buio a 20°C	0	f

Come è possibile osservare nelle Tabella 12 e nella Figura 22, i pre-trattamenti che hanno dato i risultati migliori in termini di germinazione totale (M) e di velocità di germinazione sono l'utilizzo di Gibberelline (GA3_500 e GA3_250) e, con valori di poco inferiori, la vernalizzazione dei semi per 50 giorni a 5°C. Una volta effettuato uno di questi pre-trattamenti i semi germinano facilmente a 20°C. L'utilizzo delle Gibberelline ha portato ad una germinabilità del 93% (GA3_500) e dell'84% (GA_250); la vernalizzazione a 5°C per 50 giorni ha riportato una germinabilità dell'80%, mentre riducendo i giorni a 30 anche la germinabilità si riduce a circa il 57%.

La scarificazione chimica con H2SO4 non ha dato, invece, risultati soddisfacenti, con una percentuale di germinazione finale del 20% circa e con un ritardo nell'emissione della radichetta di 8-9 giorni (Figura 23); nel caso del preraffreddamento e dell'utilizzo di acidi umici con successiva germinazione a temperatura di 25°C, le percentuali raggiungono valori estremamente inferiori, rispettivamente di 5,2 e 2,5% (vedi Tabella 12)

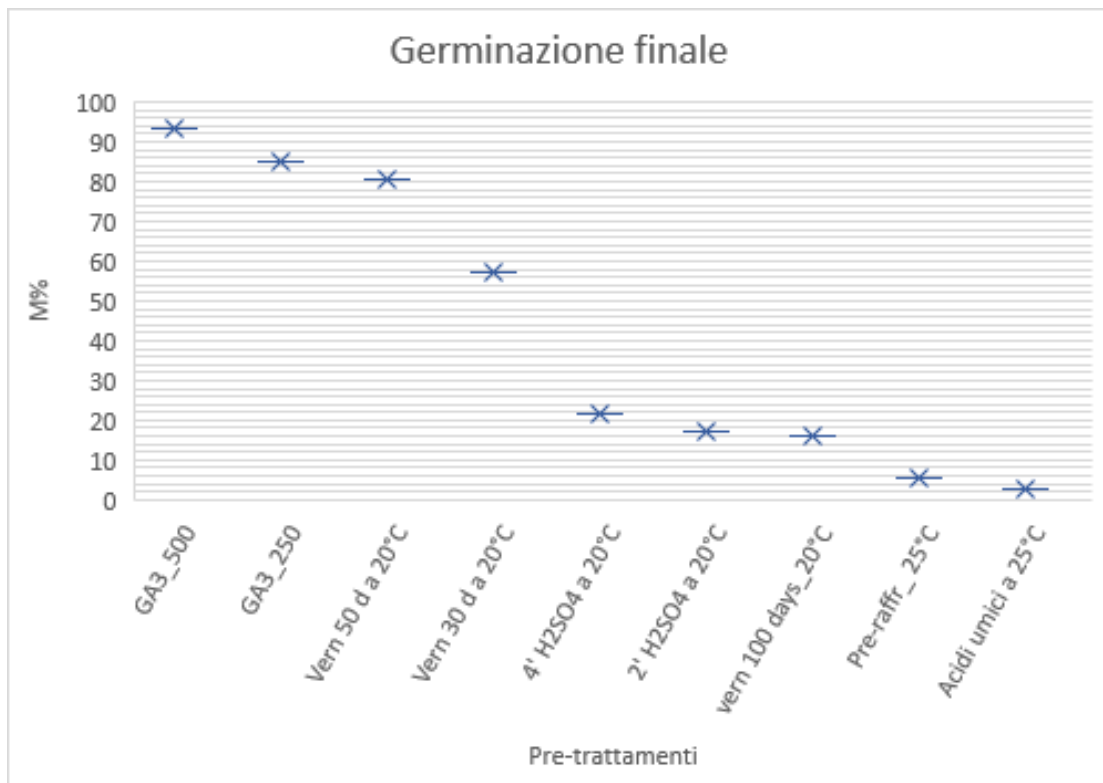


Figura 22. Percentuale di germinazione finale per ogni tipologia di pre-trattamento eseguito.

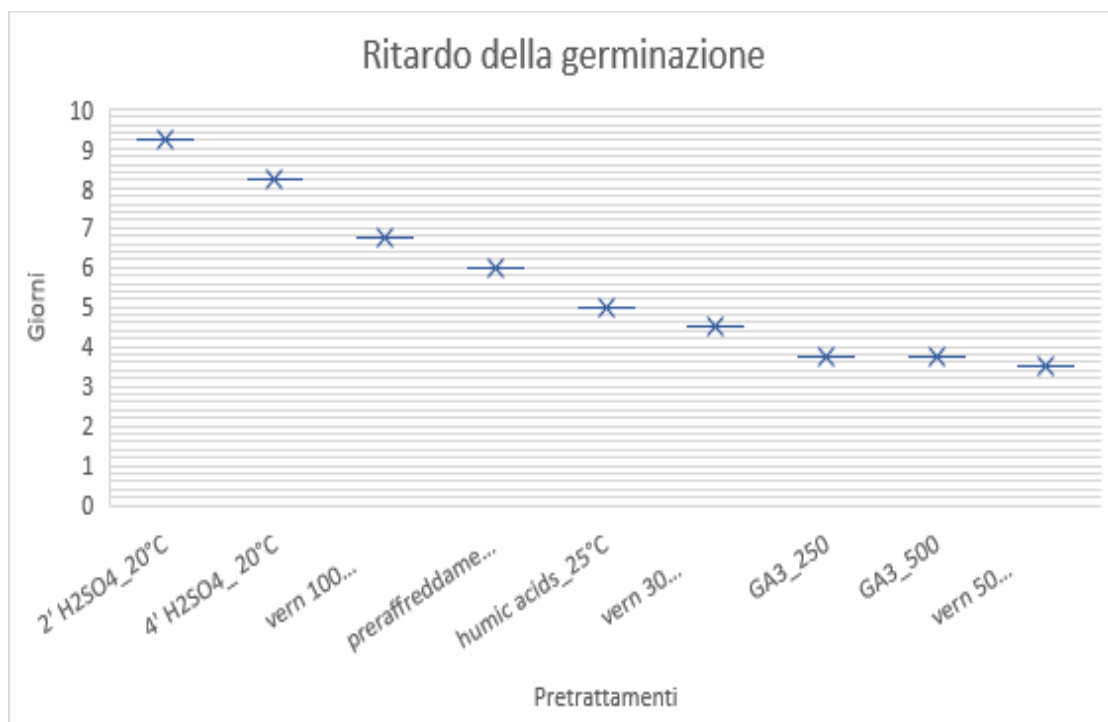


Figura 23. Ritardo di germinazione, misurato in giorni, dei semi sottoposti ai diversi pre-trattamenti. Come si evince dalla Figura 23, i trattamenti preliminari che consentono di avere una germinazione nel più breve tempo possibile (tra i 3,75 e i 4,5 giorni) sono quelli che prevedono la vernalizzazione e l'utilizzo di GA3.



Figura 24. Seme di *Onopordum tauricum* con emissione della radichetta

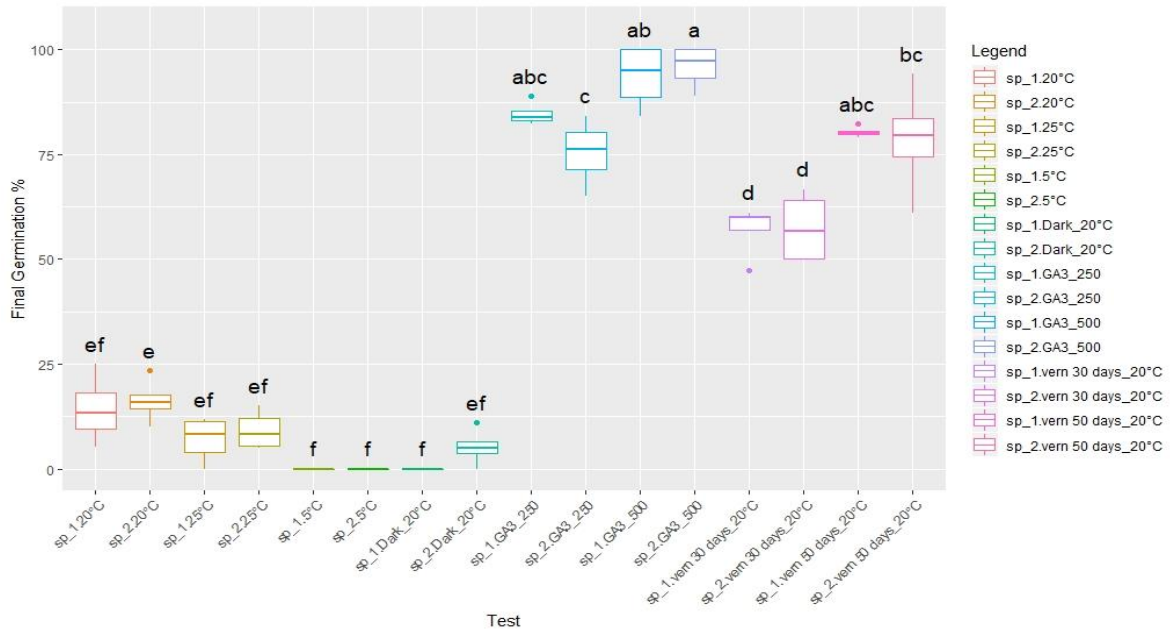


Figura 25. Confronto tra le due popolazioni di *Onopordum tauricum*

6 Come risulta dai dati nella Figura 25, i tests, applicati alle due popolazioni separatamente (indicate in figura come sp1 e sp2), hanno evidenziato un comportamento molto simile, senza differenze significative, in termini di germinabilità dei semi e di velocità di germinazione.

CONCLUSIONI

In sintesi, in base ai risultati delle analisi discusse nel precedente capitolo, dalle ricerche effettuate nel presente lavoro di tesi emerge che le due popolazioni di Onopordo sono significativamente differenti in termini morfometrici (tabella 4). Il carattere maggiormente discriminante è quello relativo alla lunghezza dell'ala compresa la spina (Figura 17). Le variazioni dei seguenti parametri: spessore del ricettacolo, diametro del ricettacolo e taglia del capolino, forma delle brattee esterne etc, possono essere collocate all'interno della variabilità di tipo intraspecifico.

Con le analisi morfometriche effettuate sulle cipsele è emerso che la popolazione di Colfiorito ha frutti di dimensioni maggiori rispetto a quelli della popolazione di Cupi, pur essendo i capolini di dimensioni simili.

Quelle effettuate sono, di fatto, analisi preliminari alle quali seguiranno ulteriori studi che prenderanno in esame un maggior numero di popolazioni, localizzate in differenti aree geografiche, per poter ottenere risultati più precisi e completi.

Dalle prove condotte risulta accertata la dormienza fisiologica dei semi, ovvero la necessità del seme di assumere una certa quantità di ore in freddo per germinare, già accertata nelle diverse specie di *Onopordum* L.; nel caso di *Onopordum acanthium*, ad esempio, è causata da un inibitore chimico idrosolubile che deve essere lisciviato o disattivato per rendere possibile la successiva germinazione.¹⁷

Grazie agli studi condotti sulla fisiologia della germinazione dei semi è stato possibile redigere un protocollo utile alla produzione di una buona quantità di plantule di *Onopordum tauricum*. Tale protocollo prevede un pre-trattamento di vernalizzazione e, dunque refrigerazione, degli acheni posti nelle piastre Petri con substrato di Agarosio concentrato all'1% ad una temperatura i 5°C per la durata di 50 giorni.

Trascorsi i 50 giorni, le piastre dovrebbero essere poste in condizioni ambientali caratterizzate da un fotoperiodo di 12 ore di luce ad una temperatura costante di 20°C, ma è risultato essere possibile anche la messa a dimora dei semi in contenitori con del terriccio per evitare lo stress successivo del trapianto della plantula.

Benchè i pre-trattamenti con gibberelline abbiano mostrato un'efficacia indiscussa nella percentuale di germinazione finale (M%) che abbiamo osservato raggiungere il 93.55% per GA_500, si preferisce ricorrere all'utilizzo di semi pre-trattati con vernalizzazione per l'interruzione della dormienza fisiologica; infatti l'utilizzo dell'ormone gibberellico può portare alla produzione di plantule che presentano malformazioni, anomalie o ritardi nella crescita.

In base alle prove condotte non risultano esserci differenze statisticamente significative nella germinazione finale tra le due popolazioni utilizzando le varie condizioni create in laboratorio.

Con le successive analisi molecolari attualmente in corso di svolgimento, sarà possibile verificare una possibile differenza genotipica tra le due popolazioni e, più in generale, tra le diverse popolazioni italiane di *Onopordum tauricum*.

7 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- 1 Roseiro, L. B., Gómez-Ruiz, J. A., García-Risco, M. & Molina, E. Vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication. *Le Lait* **83**, 343-350 (2003).
- 2 Ammar, I. B., Sonnante, G. & Dridi, B. A. M. Genetic variability in wild cardoon (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*) revealed by SSR markers and morphological traits. *Scientia Horticulturae* **185**, 76-81 (2015).
- 3 Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. & Florou-Paneri, P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture* **2**, 228-243 (2012).
- 4 Fernández, J., Curt, M. D. & Aguado, P. L. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial crops and Products* **24**, 222-229 (2006).
- 5 Spears, P. in *Outline of angiosperm phylogeny: Orders, families, and representative genera with emphasis on Oregon native plants* (2013).
- 6 Kubitzki, K., Rohwer, J. & Bittrich, V. *The families and genera of vascular plants*. Vol. 1 (Springer, 1990).
- 7 <https://www.floraitaliae.actaplantarum.org/viewtopic.php?f=95&t=21432>.
- 8 Pesce, G. R. & Mauromicale, G. in *The Globe Artichoke Genome* 1-19 (Springer, 2019).
- 9 Ammar, I. B. *Evaluation de la diversité génétique et valorisation biochimique du cardon spontané (Cynara cardunculus L.) en Tunisie*, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, (Décembre 2015).
- 10 Anderson, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology* **26**, 32-46 (2001).
- 11 Thioulouse, J. & Dray, S. Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* **22**, 1-14 (2007).
- 12 Oksanen, J. *et al.* Package ‘vegan’ community ecology package. See <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html> (2018).
- 13 De'Ath, G. Multivariate regression trees: a new technique for modeling species–environment relationships. *Ecology* **83**, 1105-1117 (2002).
- 14 ENSCONET. in *Seed Collecting Manual for Wild Species* (2009).
- 15 Qaderi, M. M. & Cavers, P. B. Interpopulation variation in germination responses of Scotch thistle, *Onopordum acanthium* L., to various concentrations of GA₃, KNO₃, and NaHCO₃. *Canadian Journal of Botany* **78**, 1156-1163 (2000).
- 16 Wilkie, P., Poulsen, A. D., Harris, D. & Forrest, L. L. The collection and storage of plant material for DNA extraction: The teabag method. *Gardens' Bulletin Singapore* **65**, 4 (2013).
- 17 Cavers, P., Qaderi, M., Threadgill, P. & Steel, M. The biology of Canadian weeds. 147. *Onopordum acanthium* L. *Canadian journal of plant science* **91**, 739-758 (2011).

8 RINGRAZIAMENTI

Un grazie di cuore va alla Professoressa Simona Casavecchia, che con la sua umanità e professionalità è stata un grande supporto per me. La ringrazio per aver creduto in me anche quando io stessa facevo fatica.

Grazie ai professori Silvia Zitti, Simone Pesaresi e Maurizio Bianchelli, che mi hanno accompagnato ed aiutato nello svolgimento di questo lavoro creando sempre un clima estremamente piacevole e amichevole.

Ringrazio la mia famiglia per avermi dato la possibilità di raggiungere questo traguardo, spronandomi sempre ad ottenere buoni risultati e per aver compreso i momenti di difficoltà vissuti.

Un enorme abbraccio va agli amici, quelli di sempre e quelli incontrati durante il soggiorno anconetano, i compagni di corso e le compagne di casa; la famiglia che ho scelto e con cui ho vissuto i momenti di spensieratezza più belli e divertenti, che porterò sempre con me.

Grazie Mauro, perché senza di te non sarei mai arrivata fin qui, mi hai dato la forza per superare i momenti più cupi, una soluzione quando non vedevo soluzioni e calore quando tutto era gelido. Tu sei stato la scoperta più bella che potessi fare.