



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

Corso di Laurea Triennale in Biotecnologia

**Caratterizzazione fenotipica e molecolare di diverse  
varietà di caigua (*Cyclanthera pedata* L.) per la  
conservazione della biodiversità**

Relatore: Prof. Salvatore Roberto Pilu

Correlatrici: Dott.ssa Elena Cassani

Dott.ssa Martina Ghidoli

Elaborato finale di:

Alice Ferrari  
Matricola 969979

Anno Accademico 2023/2024



# INDICE

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY REPORT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>9</b>
1.1 La Caigua: storia, origine e diffusione.....	9
1.2 Caratteristiche botaniche.....	10
1.3 Tecniche di coltivazione ed esigenze climatiche.....	11
1.4 Utilizzi.....	12
1.5 I patogeni e le malattie.....	12
1.6 Marcatori molecolari .....	13
1.7 Progetto PSR “Caigua” .....	13
<b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>16</b>
3.1 Materiale vegetale .....	16
3.2 Coltivazione in serra.....	17
3.3 Campionamento del materiale vegetale .....	17
3.4 Materiale molecolare.....	18
3.5 Analisi molecolare .....	19
3.5.1 Estrazione del DNA genomico .....	19
3.5.2 Amplificazione DNA genomico mediante microsatelliti cc-SSR .....	19
3.6 Elaborazione dei dati.....	20
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1 Analisi fenotipica .....	21
4.2 Analisi molecolare .....	23
4.2.1 Analisi di sequenza .....	23
4.2.2 Analisi cluster .....	28
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSIONI .....</b>	<b>33</b>
<b>7. RIFERIMENTI .....</b>	<b>34</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>36</b>



## RIASSUNTO

*Cyclanthera pedata* L., più comunemente chiamata caigua, è una pianta originaria delle Ande sudamericane, diffusa soprattutto in Ecuador, Perù, Colombia e Bolivia.

Appartiene alla famiglia delle *Cucurbitaceae*, la stessa che include zucca, anguria, karela e altre.

È una pianta rampicante che produce frutti commestibili utilizzati in Sudamerica come fonte di nutrimento. Il materiale vegetale che si ricava viene essiccato ed importato nel resto del mondo dove il principale utilizzo riguarda il campo erboristico e terapeutico, infatti, i suoi frutti contengono flavonoidi, saponine e glicosidi che svolgono un'azione antiossidante e di controllo dei livelli di colesterolo, pressione sanguigna e glicemia nell'uomo.

Questo elaborato ha lo scopo di caratterizzare dal punto di vista fenotipico e genotipico una cultivar camuna di *Cyclanthera pedata* L., di confrontarla con varietà provenienti da diverse parti del mondo. Le 4 varietà di caigua prese in considerazione appartengono a quattro aree geografiche diverse: Caigua Ciuenlai (Valcamonica, Italia), Caigua commercial variety (Sud Africa), Caigua commercial variety (Perù), Caigua commercial variety (India).

e con piante di altre specie.

Inoltre, al fine di effettuare un confronto con *Cyclanthera*, sono state caratterizzate dal punto di vista genotipico altre specie appartenenti alla famiglia delle *Cucurbitaceae*.

Le specie utilizzate per il confronto sono le seguenti: zucca (Pumkin Olivia F1 levantia), anguria (Watermelon Crimson sweet) e karela (Karela commercial variety).

Per l'analisi fenotipica di caigua sono stati osservati diversi elementi delle piante, in particolare i fiori, le foglie e le dimensioni della pianta.

L'analisi genotipica è stata effettuata utilizzando dei marcatori molecolari di tipo cc-SSR tramite i quali sono state ottenute le sequenze consenso, successivamente allineate e confrontate tra loro.

In seguito al confronto, tramite strumenti bioinformatici è stato ottenuto un albero filogenetico da cui emergono le relazioni di discendenza tra le diverse specie considerate.

Le analisi fenotipiche effettuate hanno evidenziato che non emergono notevoli differenze tra le 4 diverse varietà di caigua.

Le foglie hanno tutte la stessa forma, colore e grandezza, anche i fiori sono tutti uguali tra loro; fa eccezione la varietà Caigua commercial variety (Sud Africa) nella quale non si sono sviluppati fiori e la velocità di crescita e di altezza della pianta è risultata inferiore.

Dal punto di vista genotipico si nota che tra le 4 varietà di caigua c'è un alto grado di omologia di sequenza, questo aspetto è dato, probabilmente, dal fatto che per le analisi molecolari sono stati utilizzati dei marcatori cc-SSR; questo tipo di marcatori è disegnato sul DNA dei cloroplasti in cui il tasso di mutazione è molto basso.

Rispetto alle altre specie, invece, dal dendrogramma è possibile notare che la specie più distante genotipicamente dalla caigua è karela. Questo particolare è emerso osservando l'albero filogenetico, derivato confronto delle sequenze genotipiche.

In conclusione, durante il lavoro di tesi abbiamo osservato che, dal punto di vista fenotipico le 4 varietà analizzate di caigua sono indistinguibili tra loro, fatta eccezione per la varietà proveniente dal Sud Africa.

Dal punto di vista molecolare, il marcatore cc-SSR utilizzato non ha permesso la distinzione tra le quattro varietà.

Sarà quindi necessario utilizzare altri marcatori al fine di evidenziare differenze tra le varietà prese in esame. In particolare, si andranno testare marcatori provenienti anche dalle altre specie analizzate, come zucca e anguria.

## SUMMARY REPORT

*Cyclanthera pedata* L., more commonly known as caigua, is a plant native to the South American Andes, found in Ecuador, Peru, Colombia, and Bolivia. It belongs to the Cucurbitaceae family, the same family that includes pumpkin, watermelon, karela, and others.

It is a climbing plant that produces edible fruits used in South America as a source of nutrition. The plant material is dried and imported to the rest of the world, where its primary use is in the herbal and therapeutic fields. Its fruits contain flavonoids, saponins, and glycosides that have antioxidant properties and help control cholesterol levels, blood pressure, and blood sugar in humans.

This study aims to characterize a Camuna cultivar of *Cyclanthera pedata* L. from a phenotypic and genotypic perspective and compare it with varieties from different parts of the world. The four caigua varieties considered belong to four different geographical areas: Caigua Ciuenlai (Val Camonica, Italy), Caigua commercial variety (South Africa), Caigua commercial variety (Peru), Caigua commercial variety (India).

Additionally, to make a comparison with *Cyclanthera*, other species belonging to the Cucurbitaceae family were genotypically characterized. The species used for comparison are as follows: pumpkin (Pumpkin Olivia F1 levantia), watermelon (Watermelon Crimson sweet), and karela (Karela commercial variety).

For the phenotypic analysis of caigua, various plant elements were observed, particularly the flowers, leaves, and plant size. The genotypic analysis was conducted using cc-SSR molecular markers, through which consensus sequences were obtained, subsequently aligned, and compared.

Following the comparison, a phylogenetic tree was obtained using bioinformatics tools, revealing the descent relationships among the different species considered.

The phenotypic analyses showed no significant differences among the four different caigua varieties. The leaves all have the same shape, color, and size, and the flowers are all identical; the exception is the Caigua commercial variety (South Africa), which did not develop flowers, and the plant's growth rate and height were lower.

From a genotypic perspective, there is a high degree of sequence homology among the four caigua varieties, due to the use of cc-SSR markers for molecular analyses; these markers are designed on chloroplast DNA, where the mutation rate is very low.

Compared to other species, the dendrogram shows that the species most genotypically distant from caigua is karela. This was observed by examining the phylogenetic tree derived from the comparison of genotypic sequences.

In conclusion, during the thesis work, we observed that, from a phenotypic perspective, the four analysed caigua varieties are indistinguishable from each other, except for the variety from South

Africa. From a molecular perspective, the cc-SSR marker used did not allow for the distinction between the four varieties. Therefore, it will be necessary to use other markers to highlight differences among the varieties examined. In particular, markers from other analysed species, such as pumpkin and watermelon, will be tested.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La Caigua: storia, origine e diffusione

*Cyclanthera Pedata* L. (L., Schrad.), comunemente chiamata caigua, è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle *Cucurbitaceae*, la stessa di cui fanno parte zucca, anguria, melone e karela. Le specie appartenenti alla famiglia delle cucurbitacee sono note per essere fonte di metaboliti secondari. La caigua è una pianta nativa delle regioni andine del Sud America (Fig.1), dove viene coltivata sia come fonte alimentare sia per le sue proprietà medicinali. Originaria del Perù, essa fu addomesticata e coltivata fin dall'epoca preispanica. Anche gli Inca utilizzavano i suoi frutti come fonte di nutrimento.

È una pianta che può essere trovata nella catena delle Ande in condizioni spontanee o sub spontanee, dalla Bolivia a Panama e in alcune regioni del Messico. Attualmente nel mondo esistono circa 30 specie di caigua, le nazioni coinvolte nel favorire la diffusione di questa specie sono Ecuador (in particolare la parte meridionale), Bolivia, Colombia e Venezuela; inoltre è stata accertata la sua presenza anche nella parte meridionale del Messico e nell'area caribica (Macchia *et al*, 2009). Oltre al Sud America viene coltivata anche in altre parti del mondo come: Africa, Cina, Nepal e in Europa.

In Europa le prime informazioni relative a questa pianta risalgono al XVIII secolo, quando, nel 1714 Favillée denominò questa specie: *Mormodica striato laevi*.

In Italia, le coltivazioni di caigua sono presenti da circa 50 anni. Si pensa (Rossi *et al* 2019) sia stata importata da migranti di ritorno dalle Americhe e successivamente coltivata in diverse zone alpine come la Valsassina e la Valcamonica dove è meglio conosciuta come "ciuenlai".

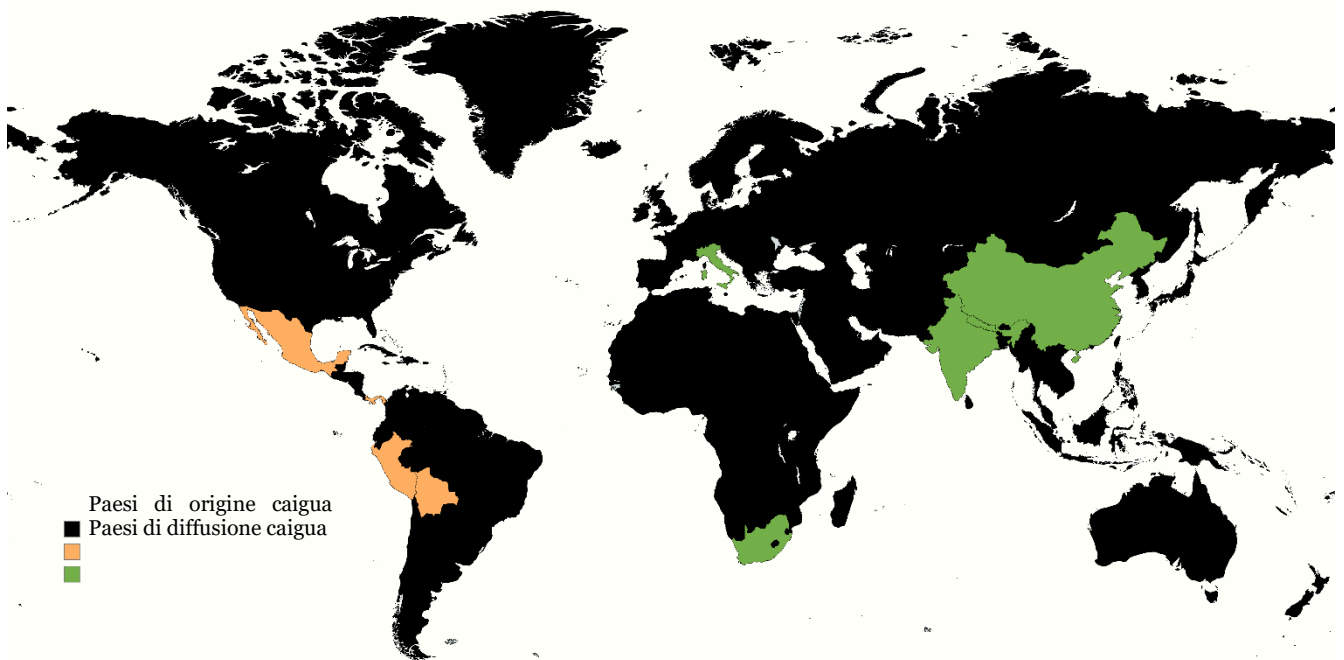


Figura 1: Paesi di origine della pianta di caigua (arancione) e Paesi in cui si è diffusa (verde)

Questa coltivazione non è stata sottoposta a programmi di miglioramento genetico, per questo si considera come landrace lombarda (Giupponi *et al* 2023). Quando si parla di landrace ci si riferisce ad una varietà autoctona e addomesticata, adattata localmente e con alta capacità di tollerare stress biotici e abiotici, risultando in una stabilità di resa elevata (Zeven A., 1998).

## 1.2 Caratteristiche botaniche

La caigua è una pianta annuale a portamento rampicante, può raggiungere altezze fino a 4-5 metri. Le foglie (Fig.2) hanno dimensioni comprese tra i 6 e i 14 cm di lunghezza, sono: palmate, lobate, glabre, profumate e di colore verde pallido, ciascuna costituita da 5 a 7 foglioline ellittiche.



Figura 2: Foglia di una pianta di caigua

Si tratta di una specie monoica, infatti, la stessa pianta produce sia fiori maschili che fiori femminili. I fiori maturano in tempi diversi per evitare fenomeni di autofecondazione. La fioritura avviene prevalentemente sui rami laterali e i fiori sono piccoli, le antere centrali sono di colore giallo e i petali, che solitamente sono 5, hanno colore bianco-giallo pallido. Una distinzione possibile tra i fiori maschili e quelli femminili è la seguente: quelli maschili crescono in gruppi da 10 a 20, mentre quelli femminili sono solitari. In entrambi i fiori il perianzio è semplice e i sepali sono rappresentati da 5 sporgenze verdi. La corolla è a coppa e di colore giallastro, le cui dimensioni sono maggiori nei fiori femminili. Gli stami sono uniti e terminano con una sola antera ad anello che caratterizza il genere *Cyclanthera*.

Il tipo di impollinazione è entomofila facilitata dalla presenza di peli bicellulari altamente specializzati posizionati sulle antere. Questi peli producono una colla che attacca i granuli di polline agli insetti ospite (Vogel, S 1981).

Il frutto (Fig. 3) è un pepo a forma di ovale irregolare con dimensioni comprese tra 5 e 15 centimetri di lunghezza e un diametro tra 2,5 cm e 8 cm. La superficie esterna è liscia, di colore verde – giallastro, in alcuni casi possono essere presenti spine molli. La consistenza del frutto è morbida al tatto e al suo interno presenta un mesocarpo bianco e spugnoso. Quando raggiunge lo stadio di maturazione, il frutto è quasi del tutto cavo e al centro sono presenti 8 – 12 semi.

I semi sono oblungi di colore nero, con una superficie irregolare e legnosa, un margine dentato, di dimensioni pari a 12/16 mm e appiattiti.



*Figura 3: Frutto caigua*

### **1.3 Tecniche di coltivazione ed esigenze climatiche**

*Cyclanthera pedata* L. è una pianta che viene coltivata tutto l'anno ed è in grado di adattarsi facilmente a diverse tipologie di ambiente. Questa pianta è estremamente versatile e viene coltivata in diverse parti del mondo, adattandosi a una varietà di ambienti con caratteristiche differenti. Solitamente si sviluppa in ambienti tipici dell'America latina in cui ci sono molte ore di luce e climi umidi con temperature comprese tra i 12 e i 18 gradi. In più, la sua crescita è favorita dalla presenza di azoto, fosforo e potassio nel terreno.

Con la sua diffusione e lo sviluppo di nuove varietà si è scoperto essere una pianta resistente anche ai climi più freddi e in grado di nascere a 2.880 metri di altitudine rispetto al livello del mare.

Per quanto riguarda la coltivazione di caigua, si sviluppa nel seguente modo: i semi vengono seminati utilizzando il metodo del foro di semina, ogni seme viene posto a una distanza di 0,5 – 1 cm, in file doppie ad una distanza di circa 4 m.

Per un corretto sviluppo sono necessari terreni profondi, ben drenati e con un PH pari a 6-7 poiché, si è visto che in terreni acidi la crescita risulta danneggiata.

Siccome si tratta di una pianta che si sviluppa verticalmente, come aiuto si utilizzano reti o supporti verticali su cui la pianta si aggrappa grazie ai viticci prensili.

Il tempo necessario per l'inizio della fioritura e di allegagione dipende da diversi fattori: latitudine, data di semina e dal genotipo. Infine, la raccolta dei frutti avviene tra giugno e luglio.

## 1.4 Utilizzi

La pianta di caigua viene utilizzata principalmente in due ambiti, quello alimentare e quello medicinale.

In ambito alimentare acquisiscono importanza i frutti che sono commestibili sia crudi che cotti. I frutti più giovani hanno un sapore simile al cetriolo e alla fava, vengono utilizzati in insalate o conservati sott'olio e sott'aceto. Fino dai tempi dei Maya questi frutti vengono consumati anche cotti, farciti e fritti eliminando prima i semi. In America, invece, vengono consumati anche i germogli e le foglie più giovani.

In ambito medico, invece, la caigua viene utilizzata come pianta officinale. Grazie ai principi attivi contenuti in essa, è responsabile di effetti protettivi contro il rischio alcune patologie (Montoro *et al* 2001). Il succo che si ricava dal frutto è utile per abbassare i livelli di colesterolo, regolarizzare la pressione sanguigna e trattare altri problemi circolatori. Oltre al succo, si utilizzano anche le foglie, in seguito a processi di bollitura fungono da antinfiammatori. Infine, i semi vengono essiccati, ridotti in polvere e utilizzati a piccole dosi per eliminare eventuali parassiti intestinali.

Tra i due campi di utilizzo, in Europa, quello che prevale è quello medico - erboristico. Oggi i prodotti a base di caigua vengono venduti sottoforma di compresse e risultano ottimi soprattutto nei processi di miglioramento del metabolismo dei carboidrati e del colesterolo. In più, uno studio (Frigerio *et al.* 2021) ha mostrato che gli estratti di caigua, insieme a quelli di carciofo e fieno greco sono utili per prevenire e trattare l'ipercolesterolemia senza l'utilizzo di statine e di monacolina K.

## 1.5 I patogeni e le malattie

La caigua è una pianta che non presenta grandi problematiche a livello di malattie e parassiti che potrebbero danneggiarla. Nonostante si tratta di una pianta resistente, gli insetti principali che potrebbero indebolirla e ridurre il raccolto sono i seguenti:

- Il ragno rosso: si tratta di un piccolo acaro rosso simile ad un ragno che colpisce gravemente le piante di caigua ritardando la crescita e riducendo la resa dei frutti. È un parassita molto dannoso per le colture stagionali, prospera nelle regioni in cui il clima è caldo e secco. Per nutrirsi il ragno rosso attacca i tessuti vegetali, in particolare la parte inferiore delle foglie. I sintomi che si sviluppano sono piccolissime macchie bianche o gialle sulle foglie che poi tendono a scolorirsi completamente fino a cadere, in altri casi, la pianta viene rivestita da ragnatele.
- Lombrichi: sono tarme che escono di notte, attaccano la parte inferiore della pianta, la quale tende a cadere. Da qui la pianta può germogliare nuovamente ma la crescita è rallentata e meno produttiva.

- Mosca bianca: la caratteristica principale di questo parassita riguarda la sua fase giovanile durante la quale vive nella parte inferiore delle foglie da cui assorbe la linfa e rende la pianta debole. In più, le mosche bianche possono diventare vettori di virus.
- Nematodi del bulbo e del fusto: sono organismi microscopici che causano la deformazione delle foglie e una riduzione della crescita e della resa. L'aspetto peggiore di questi nematodi è che si conservano per molti anni nel terreno e in altre piante ospiti.

Le malattie più comuni, invece, sono le seguenti:

- Chaupadera: è una malattia che provoca il disseccamento delle piantine in germinazione e generalmente si osserva uno strangolamento a livello del collo della pianta.
- Appassimento: è una malattia causata principalmente dai funghi del terreno che infettano le radici e i fusti portando al disseccamento della pianta quando è ricca di frutti. Per ridurre questa problematica è importante tenere sempre sotto controllo i livelli di umidità riducendo così l'avvizzimento.
- Oidiosi: è una malattia causata da un fungo che vive sulle foglie, si nutre della linfa presente nella pianta e si presenta sotto forma di polvere bianca che ricopre le foglie stesse. Come rimedio è necessario eseguire dei trattamenti con lo zolfo.

Nelle regioni delle Americhe centrali e meridionali le piante spesso vengono coltivate con l'utilizzo di fitofarmaci e antiparassitari che a causa del loro impatto ambientale, non possono essere utilizzati nei paesi dell'Unione Europea.

## **1.6 Marcatori molecolari**

I marcatori molecolari sono ampiamente utilizzati per la caratterizzazione del germoplasma, l'impronta genetica per l'identificazione varietale e la costruzione di mappe di collegamento genetico per il tagging di tratti importanti (Dilbag Singh *et al*, 2017). Si tratta di sequenze di DNA variabili che possono essere facilmente identificabili e che vengono ereditate in modo mendeliano.

Per la fase di caratterizzazione molecolare di questo progetto sono stati usati marcatori molecolari cc-SSR (*single strand repeat*), ovvero sequenze di DNA ripetute in tandem, presenti sui cloroplasti delle piante di tabacco, con lo scopo di differenziare i diversi campioni presi in esame.

## **1.7 Progetto PSR “Caigua”**

Il progetto finanziato dalla regione Lombardia, “Caratterizzazione di cultivar di caigua della Lombardia per la conservazione e la valorizzazione di risorse agro-alimentari e officinali innovative” si inserisce nell'ambito dell'Operazione 10.2.01 del PSR (Piano di Sviluppo Rurale) 2014-2020, mirata alla conservazione della biodiversità animale e vegetale.

Il progetto si propone di raccogliere i semi delle cultivar tradizionali lombarde di caigua, che sono ancora coltivate e conservate in situ da agricoltori locali. Successivamente, queste cultivar saranno caratterizzate sia dal punto di vista morfologico, sia dal punto di vista genetico, attraverso l'uso di

marcatori molecolari SSR. Inoltre, verranno condotte analisi fitochimiche per determinare il contenuto di acidi caffeilchinici, saponine, polifenoli e flavonoidi presenti nei frutti, nelle foglie e nei germogli delle piante. Un altro aspetto fondamentale del progetto è la valutazione della bioattività degli estratti delle cultivar lombarde, confrontandoli con quelli delle cultivar sudamericane, per studiare le loro proprietà protettive sul sistema cardiovascolare.

I risultati attesi dal progetto includono la conservazione e la valorizzazione delle cultivar tradizionali di caigua lombarde, la promozione della biodiversità agricola e alimentare, e lo sviluppo di nuove filiere agroalimentari ed erboristico-medicinali. Inoltre, il progetto mira a incrementare la conoscenza scientifica sulle proprietà agronomiche, genetiche e fitochimiche della caigua, favorendo così la nascita di nuove opportunità economiche per le aziende agricole lombarde e altri soggetti operanti nel settore.

Il progetto è realizzato dall'Università degli Studi di Milano, attraverso il Centro di Ricerca Coordinata Ge.S.Di.Mont. e il Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DISAA), in collaborazione con l'Università di Siena e l'Azienda Agricola "Il Castagneto".

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Gli obiettivi di questo lavoro di tirocinio sono:

- Caratterizzazione fenotipica di quattro varietà di caigua provenienti da diverse parti del mondo.
- Caratterizzazione genotipica delle quattro varietà mediante cc-SSR.
- Confronto a livello molecolare delle sequenze di caigua ottenute, con le sequenze di altre specie appartenenti alla famiglia delle *cucubitaceae* come anguria, zucca e karela.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Materiale vegetale

In questo lavoro sono state coltivate e campionate in serra 4 varietà diverse di *Cyclanthera pedata* L. più comunemente definita caigua. In totale sono state prese in esame 8 piante, due per ciascuna varietà.

Oltre alle piante di caigua, sono state coltivate anche piante di anguria, karela e zucca necessarie per le seguenti analisi molecolari.

*Tabella 1: Sono riportati il codice e l'origine attribuiti alle diverse varietà di caigua, anguria, karela e zucca utilizzate per la caratterizzazione genetica.*

<b>Pianta</b>	<b>Origine</b>	<b>Codice</b>
Caigua Ciuenlai	Local farmer in the Camonica valley	A
Caigua Commercial variety	Imported from South Africa (Rarepalmseeds)	B
Caigua Commercial variety	Imported from Peru (Herbareru)	C
Caigua Commercial variety	Imported from India (Gatum Global India)	D
Watermelon Crimson sweet	Italy	A5
Karela Commercial variety	Non determined	K
Pumpkin Olivia F1 Levantia	Levantia seed	Z3



I semi delle varietà di caigua seminati sono illustrati nelle figure seguenti:

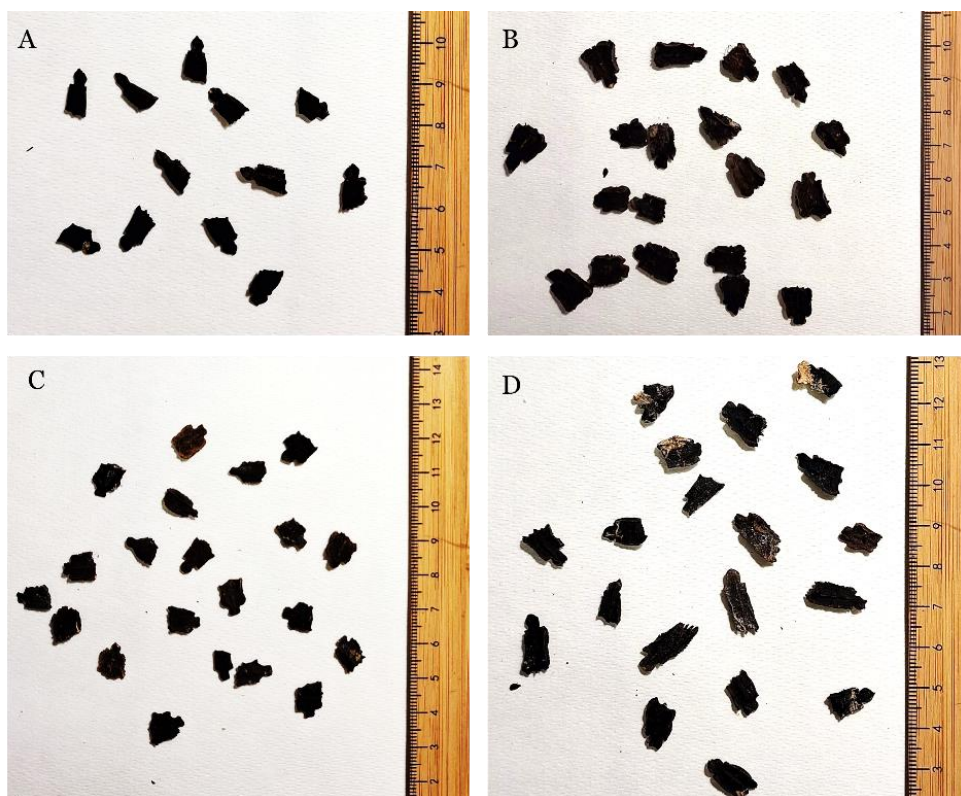


Figura 4: Semi di caigua A) varietà della Val Camonica, B) varietà del Sud Africa, C) varietà del Perù, D) varietà dell'India.

### 3.2 Coltivazione in serra

La coltivazione in serra è stata effettuata presso la serra della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano a partire dal mese di gennaio 2024.

Il materiale vegetale utilizzato è stato coltivato ad una temperatura di 22,5 °C, all'interno di vasi dal diametro di circa 20 cm e come substrato di coltivazione è stato usato un terriccio universale.

Durante il processo di crescita delle piante sono stati aggiunti dei sostegni in bambù in modo da consentire il corretto sviluppo in altezza delle cultivar rampicanti.

Sempre in serra, verso fine febbraio 2024, sono state seminate anche piante di anguria, zucca e karela. Queste sono state fatte germinare all'interno di vaschette di alluminio con terriccio universale.

### 3.3 Campionamento del materiale vegetale

Il campionamento delle piante di caigua è stato svolto in serra l'8 febbraio 2024 (23 giorni dopo la data di semina) nel seguente modo: sono stati prelevati due cotiledoni, appartenenti a due piante diverse della stessa varietà, per ciascuna delle quattro varietà coltivate. Sono stati posti all'interno di

fogli di alluminio precedentemente nominati con il codice corrispondente alla varietà e conservati in freezer a -20°C.

Oltre al campionamento di materiale vegetale di caigua, il 7 marzo 2024 (12 giorni dopo la semina) si è provveduto a campionare anche il materiale proveniente da zucca (*Cucurbita maxima L.*), anguria (*Citrullus lanatus L.*) e karela (*Momordica sessifolia L.*) come riportato in Tabella 1.

### 3.4 Materiale molecolare

Al fine di amplificare il DNA genomico estratto sono stati testati 6 marcatori cc-SSR (Chung et al., 2003) elencati in Tabella 2. Le sequenze dei marcatori considerate sono state disegnate sulla sequenza del genoma cloroplastico presente nelle piante di tabacco.

Una volta validata la robustezza e la ripetibilità della PCR con i primer indicati, si è utilizzato il primer ccSSR-1 con lo scopo di evidenziare le putative differenze tra le varietà prese in esame.

<i>Tabella 2: Sono riportate le relative sequenze dei primer forward e reverse, la temperatura di melting di ciascun marcatore e la lunghezza dell'amplicone.</i>			
	<b>Sequenza primers (5'-3')</b>	<b>Tm (C°)</b>	<b>Expected size (bp)</b>
ccSSR-1F	TCAAATGATACATAGTGCGATACA	51	174
ccSSR-1R	AATAAAGGATTTCTAACCATCTT	46	
ccSSR-5F	TCTGATAAAAAACGAGCAGTTCT	50	270
ccSSR-5R	GAGAAGGTTCATCGGAACAA	52	
ccSSR-8F	TTGATCTTTTACGGTGCTTCCTCTA	54	249
ccSSR-8R	TCATTACGTGCGACTATCTCC	52	
ccSSR-10F	TCTAGGATTTACATATACAACAT	46	149
ccSSR-10R	CATCATTATTGTATACTCTTTCA	46	
ccSSR-12F	CCAAAACTTGGAGATCCAACACTAC	54	249
ccSSR-12R	TTCCATAGATTTCGATCGTGGTTTA	52	

Il marcatore cc-SSR1 ha sequenza 1F 5'-TCAAATGATACATAGTGCGATACA-3' e 1R 5'-AATAAAGGATTTCTAACCATCTT-3', dimensioni pari a 174 bp, è situato nel gene TrnK e ha motivo di ripetizione SSR (simple sequence repeat).

## **3.5 Analisi molecolare**

### **3.5.1 Estrazione del DNA genomico**

Per l'estrazione del DNA genomico è stato seguito il protocollo di estrazione veloce.

1. Prelevare 100 mg di tessuto fogliare da ciascun campione con l'aiuto di un carotatore da 9 mm, in modo tale da avere la stessa quantità di tessuto per ogni campione (5 dischetti del diametro di 9 mm)
2. Inserire il tessuto fogliare in una provetta da 2 µL
3. Spingere il tessuto sul fondo della provetta utilizzando un puntale la cui estremità è stata precedentemente sigillata con una fiamma
4. Aggiungere 300 µL di tampone di estrazione (2M NaCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.0; 70mM EDTA, pH 8.0; 20mM sodium meta-bisulfite) e 100 µL di SLS 5%
5. Macinare il tessuto con il puntale sigillato
6. Incubare in stufa alla temperatura di 60°C per mezz'ora
7. Preparare nuove provette da 1.5 ml riportando i codici assegnati ai campioni
8. Centrifugare per 15 minuti a 13 000 rpm (rivoluzioni per minuto)
9. Trasferire 150 µL di surnatante nelle nuove provette
10. Aggiungere 150 µL di Ammonio Acetato 5M e 300 µL di Isopropanolo
11. Miscelare invertendo le provette e centrifugare per 15 minuti a 13 000 rpm
12. Eliminare il surnatante e lasciare asciugare all'aria il pellet per 15 minuti
13. Quando il pellet è secco, risospenderlo in Tris EDTA buffer e conservato a -20°C.

La qualità dell'estrazione di DNA è stata valutata utilizzando un gel di agarosio all'1%, con l'aggiunta di etidio bromuro e un marker di peso semi-quantitativo "λ", che allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, al fine di apportare eventuali diluizioni ed ottenere per tutti i campioni una concentrazione finale di 1 ng/µl. Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per le reazioni di PCR.

### **3.5.2 Amplificazione DNA genomico mediante microsatelliti cc-SSR**

La mix di reazione per la PCR preparata per ogni coppia di primers e con un volume finale di 25 µL, è stata allestita con:

- 1 µL di DNA genomico alla concentrazione di 1ng/µL
- 5 µL di Buffer colourless 5X
- 2,5 µL di MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µL di primer forward
- 0,5 µL di primer reverse
- 0,5 µL di mix di nucleotidi o dNTP
- 0,125 µL di TAQ polimerasi
- 14,875 µL di acqua MilliQ

Il programma impostato sul termociclatore era il seguente:

- Fase 1 = denaturazione della doppia elica del DNA: 94°C per 2'
- Fase 2 = denaturazione degli amplificati: 94°C per 1'
- Fase 3 = temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primer:
- Fase 4 = attivazione della TAQ polimerasi: 72°C per 1'
- Fase 5 = ciclo finale con attività di proofreading della TAQ polimerasi: 72°C per 5'

Dalla fase 2 alla fase 4 i passaggi sono stati ripetuti per 35 volte. In seguito all'amplificazione del DNA genomico mediante PCR, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 5% addizionato di Etidio Bromuro che ha consentito la visualizzazione dei risultati tramite raggi UV.

Inoltre, al fine di ridurre i possibili errori derivati dalla reazione di PCR, sono state effettuate tre repliche biologiche per ogni campione.

### **3.6 Elaborazione dei dati**

Gli ampliconi ottenuti utilizzando il primer ccSSR-1 sono stati inviati per il sequenziamento in outsourcing (BMR Genomics-Padova) e le sequenze ottenute sono state allineate e analizzate con gli strumenti bioinformatici BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

L'elaborazione dei dati ottenuti è avvenuta tramite i seguenti software:

- “NCBI Blast”: programma bioinformatico in grado di evidenziare la similarità presente tra la sequenza data e le sequenze presenti in banca dati.
- “Clustalw”: programma bioinformatico in grado di effettuare allineamenti multipli tra le sequenze in esame.

Con questi software è stato inoltre possibile, ottenere un albero filogenetico in seguito ad un'analisi UPGMA tra le diverse varietà di zucca, anguria, karela e caigua prese in esame.

L'analisi UPGMA è un metodo basato su algoritmi di clustering. Tramite parametri matematici è in grado di stabilire le relazioni genetiche esistenti tra i campioni presi in esame e da queste ottenere un dendrogramma.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Analisi fenotipica

L'analisi fenotipica delle diverse varietà di caigua ha considerato alcuni tratti botanici come lo sviluppo vegetativo delle piante (Fig.5); le dimensioni il colore delle foglie (Fig.6) e le infiorescenze (Fig.7).

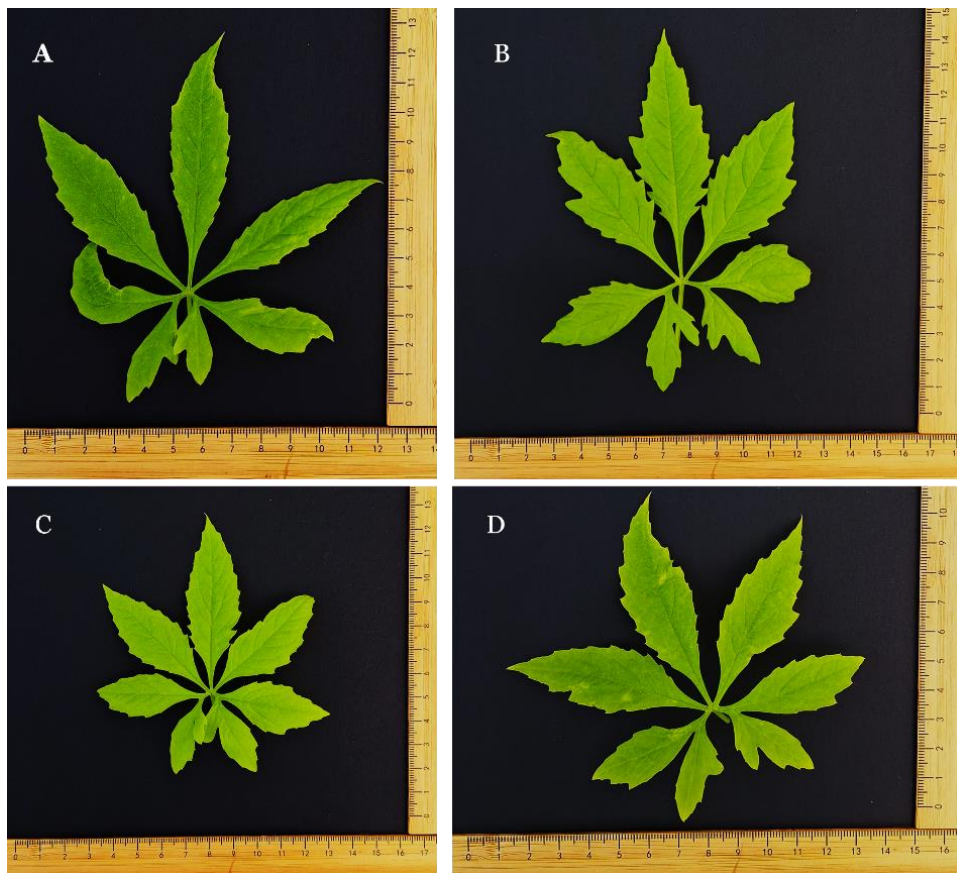
Per quanto riguarda lo sviluppo vegetativo, tra le quattro varietà notiamo che quelle provenienti dalla Val Camonica, dal Perù e dall'India sono cresciute velocemente in altezza sfruttando i supporti in legno. La varietà proveniente dal Sud Africa (Fig. 5B) è cresciuta ad una velocità ridotta rispetto alle altre e ha raggiunto un'altezza minore.

Possiamo anche osservare che la pianta della varietà proveniente dal Sud Africa (Fig. 5B) ha sviluppato un numero di foglie maggiore nella parte inferiore del fusto a differenza delle altre piante in cui la quantità di foglie si distribuisce in modo più omogeneo.



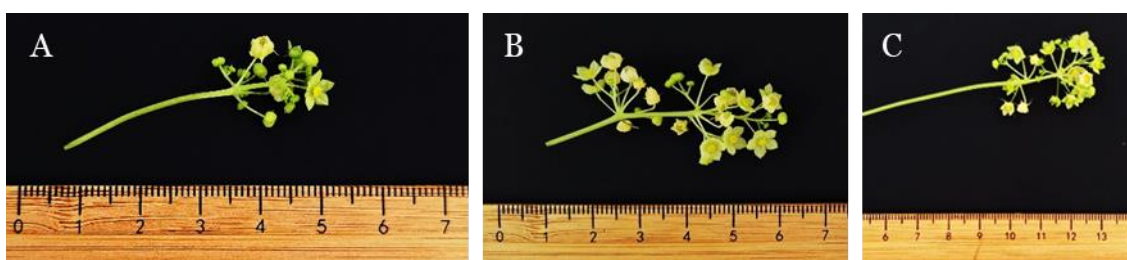
*Figura 5: Sviluppo vegetativo delle varietà di caigua coltivate in serra. Piante delle quattro diverse varietà di caigua coltivate in serra. A) Varietà della Val Camonica; B) Varietà del Sud Africa; C) Varietà del Perù; D) Varietà dell'India.*

Osservando le foglie più attentamente possiamo notare che sono tutte glabre, lobate e ciascuna è costituita da 7 foglioline ellittiche più piccole. Le foglioline ellittiche della varietà italiana risultano più affusolate rispetto alle altre. La colorazione è verde brillante e molto simile per tutte e quattro le varietà.



*Figura 6: Foglie delle quattro diverse varietà di caigua coltivate in serra. A ciascuna foglia è stato assegnato il numero del campione corrispondente a una determinata varietà. A) Varietà della Val Camonica; B) Varietà del Sud Africa; C) Varietà del Perù; D) Varietà dell'India.*

Per quanto riguarda il processo di fioritura abbiamo ottenuti i seguenti risultati. La varietà provenienti dalla Val Camonica, Perù e India hanno sviluppato infiorescenze maschili alle estremità dei rami della pianta. In tutti i tre i casi, i fiori presentano le stesse caratteristiche fenotipiche.



*Figura 7: Infiorescenza maschile per ogni varietà di caigua coltivata; A) varietà importata dalla Val Camonica; B) varietà importata dal Perù; C) varietà importata dall'India.*

Ogni fiore è costituito da 5 petali bianco/giallo pallido, al centro sono ben visibili le antere gialle e intorno ad esse i peli bicellulari che producono una sostanza collosa utile nel processo di impollinazione. Non sono presenti immagini relative all'infiorescenza maschile della varietà di caigua originaria del Sud Africa perché non è andata in contro al processo di fioritura.

## 4.2 Analisi molecolare

Per il processo di amplificazione del DNA estratto da ciascuna pianta presa in esame, è stato utilizzato il marcatore molecolare cc-SSR1. In seguito all'amplificazione, per verificare i risultati è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 5%, da cui abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

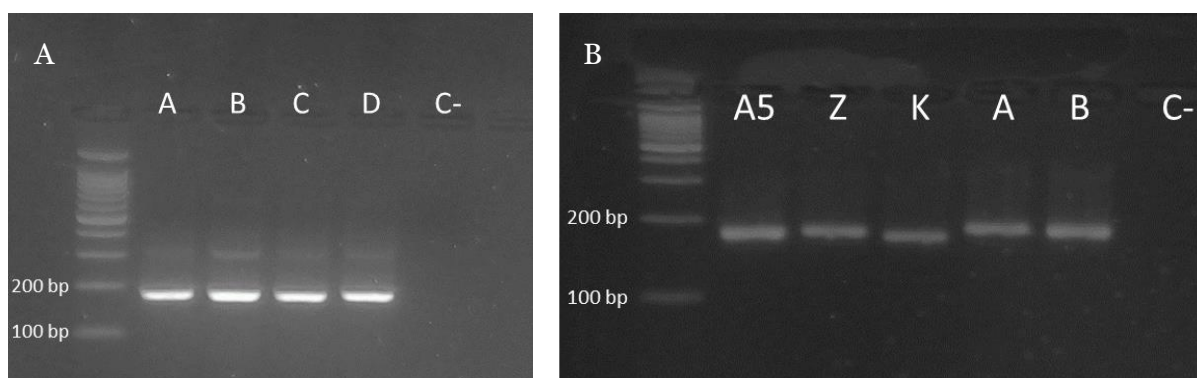


Figura 8: Gel di agarosio che mostra A) I quattro campioni di caigua (A, B, C and D) amplificati con il marcatore cc-SSR1; B) i campioni di anguria (A5), zucca (Z), karela (K) e due campioni di caigua (A and B) amplificati con il marcatore cc-SSR1.

### 4.2.1 Analisi di sequenza

Gli ampliconi sono stati sequenziati in outsourcing dall'azienda BMR Genomics di Pavia. Una volta ottenute le sequenze di tutti i campioni presi in esame, è stato possibile allinearle e analizzarle con i programmi bioinformatici BLAST e CLUSTALW da cui abbiamo ottenuto i risultati seguenti.

Nella seguente immagine (Fig.8) è riportato il BLAST della sequenza di caigua rispetto alle sequenze presenti nel database. È possibile osservare una percentuale di identità di sequenza con il genoma plasmidico di *Cyclanthera Pedata* pari al 100%.

```

Query: C4cf Query ID: 1c1|Query_852549 Length: 145

>Cyclanthera pedata chloroplast, complete genome
Sequence ID: NC_046860.1 Length: 155027
>Cyclanthera pedata chloroplast, complete genome
Sequence ID: MN542391.1 Length: 155027
Range 1: 3525 to 3668

Score:267 bits(144), Expect:7e-67,
Identities:144/144(100%), Gaps:0/144(0%), Strand: Plus/Plus

Query 1      GTaaaaaaaGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCT 60
            |||
Sbjct 3525    GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCT 3584

Query 61     ATCCTCTCTTTTCGTTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAA 120
            |||
Sbjct 3585    ATCCTCTCTTTTCGTTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAA 3644

Query 121    AAAGATGGTTAGAAATCCTTTATT 144
            |||
Sbjct 3645    AAAGATGGTTAGAAATCCTTTATT 3668

```

Figura 9: Analisi BLAST della sequenza di caigua rispetto a quelle presenti nel database.

Nella seguente immagine (Fig.10) è riportato il BLAST della sequenza di anguria ottenuta, rispetto alle sequenze presenti nel database. È possibile osservare una percentuale di identità di sequenza con il genoma plasmidico di Citrullus lanatus pari al 98%.

```

Query: ANGIURIA Query ID: 1c1|Query_493473 Length: 111

>Citrullus amarus isolate Grif16135 chloroplast, complete genome
Sequence ID: NC_035974.1 Length: 157008
>Citrullus amarus isolate Grif16135 chloroplast, complete genome
Sequence ID: MF536694.1 Length: 157008
Range 1: 3559 to 3664

Score:187 bits(101), Expect:4e-43,
Identities:106/108(98%), Gaps:2/108(1%), Strand: Plus/Plus

Query 1      GAAAATACGCGTGTAAAGACTTATCAACGGACTCTCTATCCTCTCTTTTCTTTTGCCATCT 60
            |||
Sbjct 3559    GAAAATA-G-GTGTAAAGACTTATCAACGGACTCTCTATCCTCTCTTTTCTTTTGCCATCT 3616

Query 61     AATTGGTTTATATTTTAGGATAAAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATT 108
            |||
Sbjct 3617    AATTGGTTTATATTTTAGGATAAAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATT 3664

```

Figura 10: Analisi BLAST della sequenza di anguria rispetto alle sequenze presenti nel database.



Nella seguente immagine (Fig.11) è riportato il BLAST della sequenza di zucca ottenuta rispetto alle sequenze presenti nel database. È possibile osservare una percentuale di identità di sequenza con il genoma plasmidico di Cucurbita maxima del 98%.

```

Query: zucca Query ID: 1c1|Query_23671 Length: 129

>Cucurbita pepo chloroplast, complete genome
Sequence ID: NC_038229.1 Length: 157343
>Cucurbita pepo chloroplast, complete genome
Sequence ID: MH031787.1 Length: 157343
Range 1: 3611 to 3737

Score:224 bits(121), Expect:4e-54,
Identities:126/128(98%), Gaps:1/128(0%), Strand: Plus/Plus

Query 1      GTAAAAATAATAATAGATACCCTGTAAATAGGTAAGCACTTATCAACGGACTCTCTATCC  60
           |||
Sbjct 3611   GTAAAAATAATAATAGATACCCTGTAAATAGGTAAG-ACCTATCAACGGACTCTCTATCC  3669

Query 61     TCTCTTTTCTTTTGCCATCTAATGGGTTTTTATTTTAGGATAAAAAAGATGGTTAGAAAT  120
           |||
Sbjct 3670   TCTCTTTTCTTTTGCCATCTAATGGGTTTTTATTTTAGGATAAAAAAGATGATTAGAAAT  3729

Query 121    CCTTTATT  128
           |||
Sbjct 3730   CCTTTATT  3737

```

Figura 11: Analisi BLAST della sequenza di zucca rispetto alle sequenze presenti nel database.

Nella seguente immagine (Fig.12) è riportato il BLAST della sequenza di karela ottenuta, rispetto alle sequenze presenti nel database. È possibile osservare una percentuale di identità di sequenza con il genoma plasmidico di Momordica sessifolia del 99%.

```

Query: KARELA Query ID: 1c1|Query_141139 Length: 105

>Momordica charantia isolate OHB3-1 chloroplast, complete genome
Sequence ID: NC_036807.1 Length: 158844
>Momordica charantia isolate OHB3-1 chloroplast, complete genome
Sequence ID: MG022622.1 Length: 158844
Range 1: 3470 to 3574

Score:191 bits(103), Expect:3e-44,
Identities:104/105(99%), Gaps:0/105(0%), Strand: Plus/Plus

Query 1      TCAAATGATACATAGTGCGATACAGTCAAACAAGGTATTACAGTaaaaaaaaTAATAATA  60
           |||
Sbjct 3470   TCAAATGATACATAGTGCGATACAGTCAAACAAGGTATTACAGTAAAAAAAAAATAATAATA  3529

Query 61     GAAACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGACTNTCTTTCCT  105
           |||
Sbjct 3530   GAAACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGACTCTCTTTCCT  3574

```

Figura 12: Analisi BLAST della sequenza di karela rispetto alle sequenze presenti nel database.

In seguito, con il programma bioinformatico CLUSTAL W, sono state ottenute le sequenze consenso sia per le varietà di caigua che per anguria, zucca e karela studiate. È stato effettuato un allineamento multiplo.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

+3498
C1 GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCTATCCTCTCTTTTCGT
C2 GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCTATCCTCTCTTTTCGT
C4 GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCTATCCTCTCTTTTCGT
C3 GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCTATCCTCTCTTTTCGT
*****

C1 TTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA
C2 TTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA
C4 TTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA
C3 TTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA
*****

```

Figura 13: Allineamento delle quattro sequenze di caigua con il programma CLUSTALW. La nomenclatura qui riportata è stata modificata per l'esperimento. C1 corrisponde alla varietà A, C2 alla varietà B, C3 alla varietà C e C4 alla varietà D.

Da questo allineamento abbiamo ottenuto la sequenza consenso di caigua riportata di seguito:

```

GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCTATCCTC
TCTTTTCGTTTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAAAAAGATGGTTAG
AAATCCTTTATTA

```

Sempre con lo stesso scopo e procedimento sono state ottenute le sequenze consenso di anguria, zucca e karela. Queste sono poi state allineate tra loro e con la sequenza di caigua ottenuta in precedenza.

Dall'allineamento multiplo delle sequenze ottenute, con il programma bioinformatico CLUSTALW, abbiamo potuto osservare la presenza di alcune parti di genoma coincidenti. Altre, invece, presentano basi diverse. Questa diversità è facilmente visibile nella Fig. 14 che include tutte le quattro sequenze ottenute.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
                                                                 A
ZUCCA      -----GTAAAAATAATAATAGATACCCTGTAATAGGT--AAGACTTATCAACGGACTCT
ANGURIA    -----GAAAAATAGGTGTAAGACTTATCAACGGACTCT
CAIGUA     GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCCTCGTAAATAGGT--AAGACTTATCAACGGATTCT
KARELA     -----TCAAAT--GATACATAGTGCGATACAGT
                                     * * * * *
                                     * * * * *

ZUCCA      CTATCCTCTCTTTTCTTTTGCCAT-----CTAATGGGTTTTTATTTTAGGATA-----
ANGURIA    CTATCCTCTCTTTTCTTTTGCCAT-----CTAATTGGTTTATATTTTAGGATA-----
CAIGUA     CTATCCTCTCTTTTCGTTTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGAT
KARELA     CAAAAAAGGTATTACAGTAAAAA----ATAATAATAGAAACCTCGTAAATA---GGTA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ZUCCA      AAAAAGATGATTAGAAATCCTTTATTA--
ANGURIA    AAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTAGA
CAIGUA     AAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA--
KARELA     AGACTTATCAACGGACTCTCTTTCTCT---
          * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 14: Allineamento di sequenza tra zucca, anguria, caigua e karela

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
                                                                 B
CAIGUA     GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCCTCGTAAATAGGTAAGACTTATCAACGGATTCTCT
ZUCCA      -----GTAAAAATAATAATAGATACCCTGTAATAGGTAAGACTTATCAACGGACTCTCT
          ** *****
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CAIGUA     ATCCTCTCTTTTCGTTTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGATAA
ZUCCA      ATCCTCTCTTTTCTTTTGCCAT-----CTAATGGGTTTTTATTTTAGGATA-----AA
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CAIGUA     AAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA
ZUCCA      AAAGATGATTAGAAATCCTTTATTA
          *****

```

Figura 15: Allineamento di sequenza tra caigua e zucca

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
                                                                 C
CAIGUA     GTAAAAAAGAATAATAATAGATACCCTCGTAAATAGGT--AAGACTTATCAACGGATTCT
ANGURIA    -----GAAAAATAGGTGTAAGACTTATCAACGGACTCT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CAIGUA     CTATCCTCTCTTTTCGTTTCCCATGTAATCTAATGAGTTTAGATTTTAGGATATTAGGAT
ANGURIA    CTATCCTCTCTTTTCTTTTGCCAT-----CTAATTGGTTTATATTTTAGGATA-----
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CAIGUA     AAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTA--
ANGURIA    AAAAAGATGGTTAGAAATCCTTTATTAGA
          *****

```

Figura 16: Allineamento di sequenza tra caigua e anguria

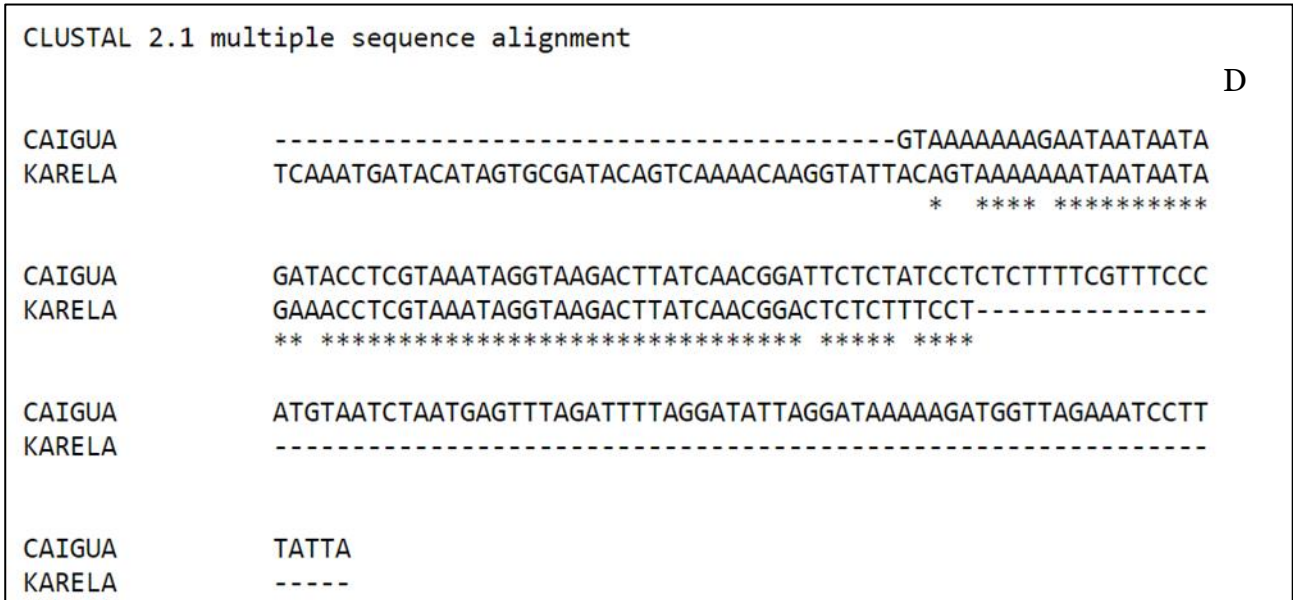


Figura 17: Allineamento di sequenza tra caigua e karela

#### 4.2.2 Analisi cluster

Dop aver estratto il DNA e ottenuto la sequenza del genoma di caigua, abbiamo realizzato il seguente albero di similarità (Fig.19), con lo scopo di verificare e confermare le analisi svolte.

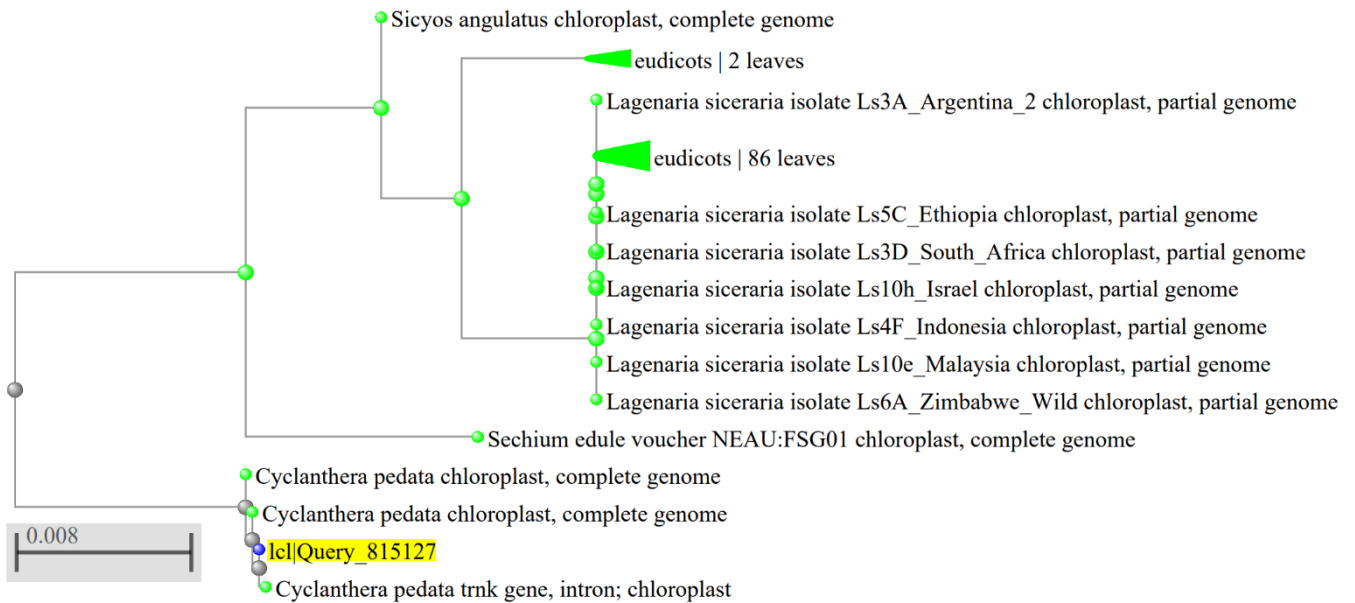


Figura 18: Albero filogenetico elaborato inserendo la sequenza consenso di genoma di caigua ottenuta evidenziata in giallo.

La costruzione di questo albero è avvenuta inseguito ad allineamenti *pairwise* tra la sequenza di query e le sequenze presenti nel database del database. Rappresenta le relazioni evolutive e di similarità tra le sequenze.

Successivamente, in seguito all'estrazione di DNA genomico dalle piante di caigua e conseguente allineamento delle sequenze, è stato elaborato il seguente albero filogenetico a conferma delle analisi svolte.

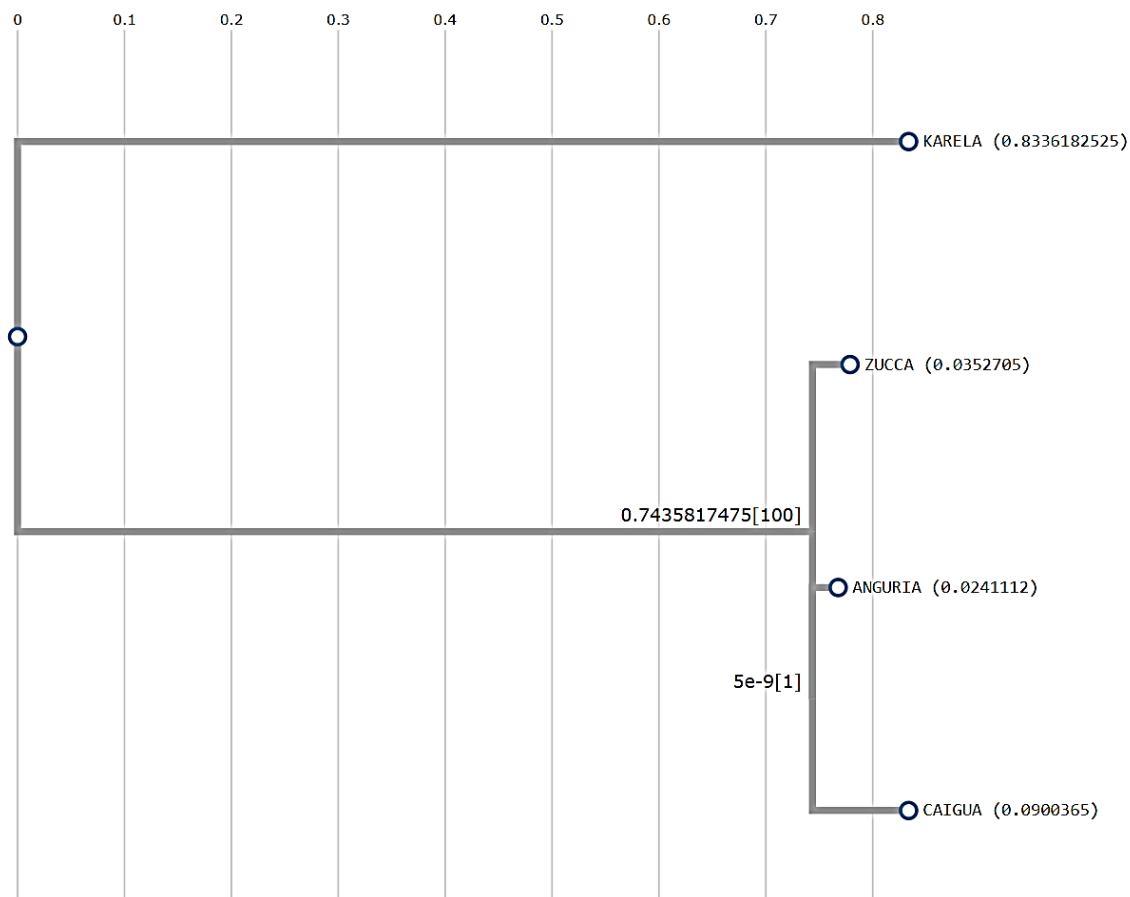


Figure 19: Albero filogenetico elaborato da un'analisi UPGMA delle varietà prese in esame di zucca, anguria, karela e caigua.

Con l'obiettivo di evidenziare le relazioni genetiche esistenti tra le diverse varietà in esame, i risultati molecolari ottenuti hanno consentito di elaborare i dati mediante analisi UPGMA come mostrato nella Figura 19. L'analisi UPGMA ha permesso di stabilire le relazioni genetiche esistenti tra i campioni delle piante prese in esame.

In questo albero filogenetico si nota facilmente la distanza evolutiva presente tra le varietà di caigua studiate e la karela. Già nella prima parte di grafico è riportato un netto distacco. Per quanto riguarda zucca e anguria, si trovano a una minore distanza evolutiva con la caigua.

## 5. DISCUSSIONE

La caigua (*Cyclanthera pedata L.*), è considerata importante per le sue potenziali proprietà benefiche sulla salute, motivo per cui è oggetto di diversi studi scientifici.

Questo vegetale è particolarmente studiato per la sua capacità di influenzare positivamente i profili lipidici e glucidici nel corpo umano. Questo effetto è attribuibile alla presenza, nei suoi frutti, di fibre solubili e fitosteroli, composti che si legano al colesterolo nel tratto digestivo, favorendone l'eliminazione e riducendone l'assorbimento intestinale. Tali effetti contribuiscono a ridurre i livelli di colesterolo LDL e ad aumentare quelli di colesterolo HDL, supportando così la salute cardiovascolare.

Nel contesto del diabete, la caigua sta guadagnando attenzione per il suo ruolo nel controllo della glicemia. La sua capacità di modulare il metabolismo degli zuccheri la rende un possibile alleato nella gestione del diabete di tipo 2. Queste proprietà, unite al suo elevato contenuto di vitamine e minerali essenziali, fanno della caigua un alimento funzionale o "superfood" con un significativo potenziale per lo sviluppo di integratori alimentari e nutraceutici. In questo caso giocano un ruolo importante gli acidi caffeilchinici e le saponine presenti nella pianta in particolare nelle foglie e nei germogli.

Inoltre, le sue proprietà antiossidanti e antinfiammatorie la rendono un obiettivo di studio per la prevenzione delle malattie croniche e la protezione dai danni ossidativi.

L'interesse scientifico si estende anche alla valutazione delle varietà locali di caigua, come quella coltivata nella Val Camonica in Italia, nota come "Ciuenlai". Questi studi mirano a determinare le caratteristiche genetiche e agronomiche specifiche che differenziano queste varietà da quelle native sudamericane. Comprendere le specifiche ecologiche e nutrizionali della caigua è fondamentale per valorizzarla come risorsa alimentare e medicinale (Marco Zuccolo, *et al 2023*).

In questo elaborato, nell'ambito del progetto PSR finanziato dalla regione Lombardia, ci siamo posti l'obiettivo di caratterizzare dal punto di vista fenotipico e molecolare 4 varietà di *Cyclanthera Pedata L.* provenienti da diverse parti del mondo.

In seguito ai risultati ottenuti possiamo affermare che dal punto di vista fenotipico 3 varietà di caigua coltivate in serra sono risultate indistinguibili tra loro. Questo aspetto riguarda tutti i caratteri analizzati come: altezza della pianta, foglie e fiori.

La varietà provenienti dalla Val Camonica, dal Perù e dall'India hanno sviluppato piante alte circa 2m. Tutte le piante si sono sviluppate velocemente in altezza grazie alla presenza di supporti in legno e ai viticci, tipici della *cucurbitaceae*, che si attorcigliano a spirale.

Tutte le piante presentano foglie glabre e palmate, costituite da 7 foglioline ellittiche. Hanno tutte una colorazione verde e qualche piccola sfumatura giallognola. Questo dettaglio si pensa dipenda dalle condizioni di luce e temperatura presenti in serra.

Allo stesso tempo, è possibile notare, che tra le piante coltivate c'è un'eccezione. La varietà di caigua proveniente dal Sud Africa risulta più tardiva rispetto alle altre. La pianta è cresciuta più lentamente raggiungendo un'altezza inferiore. La principale differenza riguarda il processo di fioritura. Nonostante fosse sottoposta alle stesse condizioni di temperatura, luce e umidità delle altre varietà considerate, non è andata in contro al processo di fioritura. Quest'ultimo è un evento complesso, viene influenzato da diversi fattori, sia ambientali che genetici.

Tra i fattori ambientali rientra il fotoperiodo. *Cyclanthera pedata* L. è una specie originaria del Sud America, ma la varietà commerciale che ha mostrato comportamento anomalo deriva dal Sud Africa. Questo cambiamento geografico potrebbe aver influenzato il comportamento della pianta, in particolare il fotoperiodo.

Il fotoperiodo corrisponde al ciclo di luce e buio a cui la pianta è sottoposta, funge da indicatore stagionale (Wang *et al*, 2024). Confrontando i fotoperiodi si è visto che, nelle ande risulta costante durante tutto l'anno con minime variazioni stagionali (Marco Zuccolo, *et al* 2023). In Sud Africa, invece, il fotoperiodo è più variabile con notevoli differenze tra estate e inverno (Alan Barrett *et al*. 2021).

Considerando questi aspetti è possibile quindi dedurre che la varietà di caigua del Sud Africa, ha mostrato una crescita e produttività diversa rispetto alle altre perché in passato è andata incontro a un processo di adattamento.

Un'altra spiegazione possibile a questo fenomeno riguarda la componente genetica di questa varietà proveniente dal Sud Africa. È stato osservato che le cucurbitaceae, la famiglia a cui appartiene anche la caigua, mostrano una grande variabilità a livello dei geni che regolano il processo di fioritura. Nel caso della *Luffa acutangola*, è stato studiato che ci sono differenze strutturali tra i geni specifici per la fioritura tra una varietà e l'altra (Huang *et al*. 2024).

Dal punto di vista molecolare, grazie al sequenziamento di alcune parti del genoma delle quattro varietà di caigua ottenute, è stato possibile allinearle con il sistema bioinformatico BLASTN. Questo processo ha confermato l'omologia di sequenza con i dati presenti nel database. Una spiegazione possibile al risultato di questa analisi è il fatto che per lo studio molecolare sono stati utilizzati marcatori cc-SSR ottenuti dal DNA cloroplastidiale, il quale, presenta una struttura molto conservata nel tempo.

Un altro degli obiettivi di questa tesi riguarda un confronto a livello molecolare delle sequenze di caigua ottenute con le sequenze di anguria, zucca e karela sempre appartenenti alla famiglia delle *cucurbitaceae*.

L'allineamento delle sequenze di caigua con quelle delle piante appartenenti alle altre specie ha fatto emergere notevoli differenze. Questo aspetto non era emerso in seguito alla corsa elettroforetica su gel. Infatti, osservando il gel riportato in Figura 8, possiamo notare che le bande rappresentanti gli ampliconi di anguria e zucca sono molto vicine alle bande rappresentati i due campioni di caigua. L'unica banda leggermente più bassa è quella del campione di karela.

Le sequenze consenso ottenute per ciascuna specie sono state utilizzate nello svolgimento di un'analisi UPGMA. Quest'ultima ha permesso la costruzione di un albero filogenetico in cui è possibile osservare che la specie genotipicamente più distante dalla caigua è la karela. Anguria e zucca sono evolutivamente vicine alla caigua.

È stato possibile condurre questo studio e ottenere i dati precedentemente mostrati grazie all'utilizzo dei marcatori cloroplastidiali cc-SSR. Già in passato questi marcatori sono risultati utili per le analisi molecolari nello studio delle relazioni genetiche presenti tra piante appartenenti alla famiglia delle *cucurbitaceae*.

In entrambi i casi è stato possibile capire la presenza di relazioni filogenetiche tra le specie prese in esame. In questo caso, osservando il dendogramma si nota la presenza di un antenato comune a zucca, anguria e caigua. Per ottenere risultati più descrittivi e completi delle relazioni genetiche tra le diverse specie è necessario utilizzare un maggiore numero di frammenti. Inoltre, per svolgere un'analisi filogenetica più completa, si stanno sequenziando ulteriori frammenti di cc-SSR (Chung et al., 2003).



## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, possiamo affermare che dal punto di vista fenotipico tre varietà di caigua analizzate sono indistinguibili tra di loro, invece, la quarta varietà proveniente dal Sud Africa è l'unica che si è distinta per il ciclo vegetativo. Quest'ultima, infatti, oltre ad essersi sviluppata più lentamente rispetto alle altre, non è mai andata in contro al processo di fioritura. I motivi attribuibili a ciò riguardano la necessità di un fotoperiodo diverso o la modificazione a livello genetico di questa varietà.

Dal punto di vista molecolare, il marcatore cc-SSR1 utilizzato non è risultato utile per distinguere le quattro varietà di caigua. Confrontando invece, le sequenze consenso ottenute di caigua, zucca, anguria e karela, il marcatore cc-SSR1 ha permesso di differenziare la specie di appartenenza delle rispettive piante. Possiamo quindi affermare che si tratta di un marcatore specie specifico.

In seguito a questo studio è emerso che in futuro sarà necessario utilizzare altri marcatori al fine di evidenziare differenze tra le varietà prese in esame. In particolare, si andranno testare marcatori provenienti dalle altre specie analizzate risultate filogenicamente vicine alla caigua, come zucca e anguria.

## 7. RIFERIMENTI

**Sang-Min Chung, Deena S. Decker-Walters, and Jack E. Staub**, 2003. *Genetic relationships within the Cucurbitaceae as assessed by consensus chloroplast simple sequence repeats (ccSSR) marker and sequence analyses.*

**Marco Zuccolo, Davide Pedrali, Luca Giupponi, Gigliola Borgonovo, Angela Bassoli, Annamaria Giorgi**, 2023. *Characterization of an Italian landrace of *Cyclanthera pedata* (L.) Schrad. of herbal and horticultural interest.*

**Zeven, A**, 1998. *Landraces: A review of definitions and classifications.* Euphytica 104, 127–139 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1018683119237>

**Paola Montoro, Virginia Carbone, Francesco De Simone, Cosimo Pizza, Nunziatina De Tommasi**, 2001. *Studies on the Constituents of *Cyclanthera pedata* Fruits: Isolation and Structure Elucidation of New Flavonoid Glycosides and Their Antioxidant Activity.*

**Frigerio J., Tedesco E., Benedetti F., Insolia V., Nicotra G., Mezzasalma V., Pagliari S., Labra M., Campone L.**, 2021. *Anticholesterolemic activity of three vegetal extracts (Artichoke, Ciguca and Fenugreek) and their unique blend.*

**Vogel Stefan**, 1981. *The glue-producing anther hairs of *Cyclanthera pedata* (Cucurbitaceae).*

**Huang, A.; Feng, S.; Ye, Z.; Zhang, T.; Chen, S.; Chen, C.; Chen, S.**, 2024. *Genome Assembly and Structural Variation Analysis of *Luffa acutangula* Provide Insights on Flowering Time and Ridge Development.* Plants 2024, 13, 1828. <https://doi.org/10.3390/plants13131828>.

**Mario Macchia, Paola Montoro, Lucia Ceccarini, Ilaria Molfetta e Cosimo Pizza**, 2009. *Agronomic and phytochemical characterization of *Cyclanthera pedata* Schrad. cultivated in central Italy.*

**Dilbag Singh, Rajinder Singh, Jagdeep Singh Sandhu, Parveen Chunneja**, 2017. *Morphological and genetic diversity analysis of *Citrullus* landraces from India and their genetic inter relationship with continental watermelons.*

**Qingqing Wang, Wei Liu, Chun Chung Leung, Daniel A. Tartè and Joshua M. Gendron**, 2024. *Plants distinguish different photoperiods to independently control seasonal flowering and growth.* Vol 383, Issue 6683. DOI:10.1126/science.adg9196.

[Plants distinguish different photoperiods to independently control seasonal flowering and growth | Science](#) (Ultimo accesso in data 10 ottobre 2024).

**Andrés Schwember, Paloma Segura, Samuel Contreras (Departamento de Ciencias Animales)**, 2014. *Caigua, curcubitácea nativa con potencial hortícola*.

**Fondazione Slow Food per la Biodiversità Onlus**. *Achojcha, arca del Gusto*. <https://www.fondazione Slow Food.com/it/arca-del-gusto-slow-food/achojcha/>, (Ultimo accesso effettuata in data 11 ottobre 2024).

**J. A. M. Rezende, Dept de entomologia, fitopatologia e zoologia agricola**, 2007. *Cyclanthera pedata var. edulis: New Host of Papaya ringspot virus-type W in Brazil*. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.10.1155D> (Ultimo accesso in data 10 ottobre 2024).

## **8. RINGRAZIAMENTI**

*Ringrazio il Prof. Pilu che mi ha dato la possibilità di svolgere questo percorso di tirocinio rendendolo divertente e mai banale insegnandoci ogni giorno qualcosa in più.*

*Vorrei ringraziare anche le mie correlatrici, Elena e Martina, che condividendo le loro conoscenze mi hanno seguita e aiutata in questa esperienza, sempre disponibili e pronte a dare buoni consigli.*

*Ringrazio tutte le persone che in questi tre anni ci sono sempre state. In particolare, sono felice e grata di avere incontrato i miei compagni dell'aula 9, gli amici con cui ho costruito ricordi speciali.*

*Ringrazio anche Pio, il custode di agraria, che ha reso l'università un po' più casa.*

*Infine, ringrazio i miei genitori e la mia famiglia per il coraggio e il sostegno che mi forniscono da sempre, credendo in me più di quanto faccia io stessa.*