

## Collezione di germoplasma di carciofo sanitariamente qualificata

Marina Barba\*, Antonio Tiberini e Anna Taglienti

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

### Phytosanitary qualified artichoke germplasm collection

**Abstract.** The production of virus-free propagative plant material is the prerequisite to obtain artichoke plantlets responding to qualitative requirements considered in the frame of EU and national rules. This crop is affected by many diseases that may cause severe economic losses, i.e., a significant decrease in the quantity and quality of artichoke yield. Among other pathogens, more than 20 viruses are known to infect artichoke causing serious concern to the artichoke industry. Vegetative propagation by crown segments and offshoot facilitates the spread of viral infections from one plant to another seriously compromising yield and quality of production. In view of above it is crucial for artichoke implantation of new fields to have available virus-free plantlets of the main artichoke ecotypes grown in different productive regions and to have diagnostic protocols to assess the presence of viral pathogens especially when the new plantlets have been produced by *in vitro* propagation. To reach these objectives, in the last years we have set up and successfully applied different diagnostic methods in detecting the most important viruses present in both *in vivo* and *in vitro* cultured artichoke germplasm. We, also, describe the results obtained in eliminating viruses from different artichoke clones using three techniques: *in vitro* thermotherapy, meristem shoot culture and cryotherapy, an innovative technique.

**Key words:** virus, diagnosis, virus elimination.

### Introduzione

Il carciofo (*Cynara cardunculus*. var. *scolymus* L.) è una coltura erbacea poliennale originaria del bacino del mediterraneo e coltivata in alcuni areali dell'Europa meridionale (Italia, Spagna, Francia, Grecia, Portogallo), dell'America (California, Cile, Perù, Argentina) e dell'Africa settentrionale (Egitto,

Marocco, Tunisia). L'Italia è il principale paese produttore di questa specie agraria diffusa essenzialmente nelle Regioni centro-meridionali in particolare Puglia, Sicilia, Sardegna, Campania, Lazio e Toscana, ciascuna caratterizzata per la produzione di ecotipi locali appartenenti alla tipologia "carciofo precoce" e/o "carciofo tardivo" a seconda dell'epoca di maturazione e produzione dei capolini (autunno-inverno per i primi, primavera per i secondi).

Grazie alle sue proprietà salutistiche ed al suo largo uso nella dieta mediterranea, il carciofo è considerato una matrice vegetale di pregio, da difendere dall'erosione genetica attraverso il recupero e la conservazione di ecotipi locali nonché attraverso la produzione di nuove *cultivar* ottenute tramite miglioramento genetico.

Al fine di garantire il mantenimento della ricchezza di ecotipi di carciofo studiati e caratterizzati a livello fenotipico e genetico, sono state allestite differenti collezioni presso strutture pubbliche e private interessate allo studio di questa coltura poliennale. Spesso, tuttavia, il germoplasma conservato non è privo di problemi fitosanitari e le sue caratteristiche organolettiche sono inficiate dalla presenza di patogeni tra cui quelli di origine virale rivestono particolare importanza in quanto sistemici e, pertanto, trasmissibili attraverso l'uso di materiale di propagazione infetto.

Ad oggi, sono 24 le specie di fitovirus segnalate su carciofo (Gallitelli *et al.*, 2004), la maggior parte delle quali è presente in Europa e nel bacino del Mediterraneo. Nell'arco di circa cinquant'anni sono stati segnalati, identificati e caratterizzati in Italia 15 virus appartenenti ai generi *Nepovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Tombusvirus*, *Fabavirus* e *Cucumovirus* (tab. 1).

La grande diffusione delle infezioni virali in carciofo è dovuta principalmente alla propagazione agamica delle piante, effettuata di solito dagli stessi coltivatori tramite prelievo di carducci e/o ovoli; inoltre, alcuni dei virus più dannosi sono trasmessi da vettori animali quali afidi (es.: virus latente del carciofo - ArLV- e virus del mosaico del cetriolo - CMV), nematodi (es.: virus italiano latente del carciofo -

\* marina.barba@entecra.it

Tab. 1 - Virus riportati sul carciofo in Italia.  
 Tab. 1 - Viruses reported to infect artichoke crops in Italy.

Virus	Genere/Famiglia	Epidemiologia	Vettore	Distribuzione
<i>Artichoke Italian latent virus</i> (AILV)	<i>Nepovirus</i> (Subgroup B) <i>Comoviridae</i>	soil-borne	<i>Longidorus apulus</i>	Italia, Bulgaria, Russia
<i>Artichoke mottled crinkle virus</i> (AMCV)	<i>Tombusvirus</i> <i>Tombusviridae</i>	soil-borne	no vettore	Italia, Marocco, Malta, Grecia, Tunisia
<i>Artichoke vein banding virus</i> (AVBV)	<i>Cheravirus</i>	soil-borne	sconosciuto	Italia, Turchia(?), Francia(?)
<i>Artichoke yellow ring spot virus</i> (AYRSV)	<i>Nepovirus</i> (Subgroup C) <i>Comoviridae</i>	soil-borne	sconosciuto	Italia, Grecia
<i>Broad bean wilt virus</i> (BBWV)	<i>Fabavirus</i> <i>Comoviridae</i>	tramissione per insetto	afidi	Italia, Francia
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i> <i>Bromoviridae</i>	tramissione per insetto	afidi	Italia, Grecia, Francia, Tunisia
<i>Pelargonium zonate spot virus</i> (PZSV)	<i>Anulavirus</i> <i>Bromoviridae</i>	tramissione per insetto	tripidi	Italia
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>Tobamovirus</i>	trasmissione per contatto	sconosciuto	Italia
<i>Artichoke latent virus S</i> (ArLVS)	<i>Carlavirus</i> <i>Flexiviridae</i>	tramissione per insetto	afidi	USA, Italia, Marocco
<i>Artichoke latent virus M</i> (ArLVM)	<i>Carlavirus</i> <i>Flexiviridae</i>	tramissione per insetto	sconosciuto	Italia
<i>Artichoke latent virus</i> (ArLV)	<i>Potyvirus</i> <i>Potyviridae</i>	tramissione per insetto	<i>Myzus persicae</i>	Bacino Mediterraneo, Brasile
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	<i>Potyvirus</i> <i>Potyviridae</i>	tramissione per insetto	afidi	Italia, Grecia
<i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)	<i>Potyvirus</i> <i>Potyviridae</i>	tramissione per insetto	afidi	Italia
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	<i>Tospovirus</i> <i>Bunyaviridae</i>	tramissione per insetto	tripidi	Argentina, Australia, Italia, Spagna

AILV) e tripidi (virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro - TSWV), incrementando la possibilità di diffusione in campo di queste malattie.

Gli agenti virali più frequentemente segnalati in carciofo sono:

- ArLV presente in tutte le aree di coltivazione italiane dove colpisce la quasi totalità delle piante,
- AILV presente particolarmente in Puglia dove i terreni sono spesso infestati dai nematodi vettori,
- TSWV segnalato di frequente in zone circoscritte ma assai dannoso e la cui diffusione è legata all'andamento stagionale favorente lo sviluppo delle popolazioni di tripidi vettori,
- AMCV rinvenuto sporadicamente ma presente in tutte le zone di coltivazione (Pasquini *et al.*, 2004b; Pasquini e Gallitelli, 2006).

Considerata la scarsa disponibilità di germoplasma di carciofo sanitariamente qualificato ed idoneo ad essere utilizzato a livello vivaistico per la produzione di giovani piantine, in ottemperanza alle norme fitosanitarie sulla commercializzazione di materiale di propagazione vegetale, è stato avviato un lavoro di recupero di ecotipi italiani di carciofo in collaborazione

con differenti Istituzioni italiane coinvolte nella caratterizzazione genetica degli ecotipi più interessanti coltivati nei territori di propria competenza (Gallitelli e Barba, 2003).

L'azione di valorizzazione del germoplasma italiano è stata perseguita, nell'ambito del progetto nazionale CAR.VAR.VI. (Valorizzazione di germoplasma di carciofo attraverso la costituzione varietale e il risanamento da virus), attraverso il coinvolgimento del Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale del CRA in alcune tematiche di fondamentale importanza quali:

- la messa a punto di metodi diagnostici molecolari in grado di individuare infezioni singole e/o miste in campioni vegetali;
- il risanamento di germoplasma di carciofo mediante l'uso di diverse tecniche, a seconda della tipologia e dell'ecotipo;
- la costituzione di una collezione *in vitro* di germoplasma sano di carciofo e l'esplorazione di altre tecniche di conservazione del germoplasma (crioconservazione).

Nell'articolo si riportano i risultati conseguiti nelle diverse linee di attività.

## Materiali e metodi

### Messa a punto di metodi diagnostici

Sono stati messi a punto tre metodi di diagnosi molecolare (RT-PCR, RealTime qRT-PCR e Microarrays) in grado di rilevare infezioni singole e/o miste in matrici vegetali.

### Scelta del materiale vegetale

Sono stati collezionati, durante monitoraggi eseguiti in 6 regioni italiane (tab. 2), campioni vegetali appartenenti ad oltre 20 ecotipi di carciofo. La fase iniziale, comune ai diversi metodi messi a punto, ha previsto l'estrazione degli acidi nucleici utilizzando il Kit Qiagen RNAeasy Mini (Qiagen Inc. Valencia, CA) seguendo il protocollo suggerito dal produttore. La concentrazione dell'RNA totale è stata determinata mediante la misurazione dell'assorbanza a 260 nm utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA). Inoltre, è stato scelto di confrontare e paragonare la resa dei diversi metodi molecolari messi a punto su 6 campioni prelevati nell'areale di Tarquinia (Tar 1-6) (tab. 3).

### RT-PCR

I saggi molecolari di RT-PCR sono stati effettuati impiegando coppie di primer specifici (Pasquini *et al.*,

Tab. 2 - Campioni di carciofo collezionati in 6 regioni italiane.

Tab. 2 - Artichoke samples collected in 6 Italian regions.

Regione	Ecotipo
Campania	Bianco Pertosa, Petrelcina, Capuanella nera, Capuanella Olivastra, Capuanella Carbone, Castel San Lorenzo, Castellammare, Tondo di Paestum, Montoro, Pascaiola
Marche	Jesino, Ascolano, Urbisaglia, Castorano, Tardivo di Pesaro, Montelupone, Mazzaferata
Toscana	Graleo (2 cloni), Tema (2 cloni)
Lazio	C3 (8 cloni), Opal, Apollo (2 cloni), Violetto di Toscana, S4
Puglia	Violetto di Provenza (2 cloni)
Sardegna	Spinoso Sardo (2 cloni)

Tab. 3 - Efficienza diagnostica dei differenti metodi molecolari nell'identificazione di 4 virus.

Tab. 3 - Diagnostic efficiency of the different molecular techniques on 4 viruses.

Campione	RT-PCR	qRT-PCR	Micro array									
	ArLV			AILV			AMCV			TSWV		
Tar-1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Tar-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Tar-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tar-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Tar-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Tar-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2003; 2004a) disegnate per verificare la presenza dei seguenti virus: ArLV, AILV, AMCV, TSWV e CMV. I primer sono stati utilizzati in un protocollo di one-step RT-PCR, in cui le condizioni di reazione sono state uniformate per renderle applicabili a tutte le coppie di primer.

In particolare, due  $\mu\text{l}$  di RNA totale sono stati aggiunti ad una miscela di RT-PCR (25  $\mu\text{l}$  di volume) contenenti 5  $\mu\text{l}$  di buffer 10x (Promega, Madison, WI, USA), 2.5 mM di ogni dNTP, 0,05 ng di ciascun primer (tab. 2), 20 U di RNase-OUT (Invitrogen, California, USA), 1,5 U di AMV RT (Promega), 0,75 U di Go-Taq polimerasi (Promega). La trascrizione inversa è stata realizzata a 46 °C per 30 min, seguita da un passaggio di denaturazione a 95 °C per 3 min e da 35 cicli di amplificazione suddivisi nei seguenti passaggi: 45 sec a 94 °C, 30 sec a 60 °C e 45 sec a 72 °C, con un'estensione finale di 10 min a 72 °C. I prodotti amplificati sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel al 1,5% di agarosio e colorazione con etidio bromuro.

### Realtime qRT-PCR

È stato messo a punto un saggio di multiplex RealTime PCR. Sono state disegnate *ex novo* coppie di primer e sonde specifiche per ArLV, AILV, AMCV e TSWV utilizzando, in particolare, sonde MGB specifiche marcate rispettivamente in FAM, HEX, Cy5, TET. Un  $\mu\text{l}$  di RNA è stato aggiunto ad una miscela di reazione di 25  $\mu\text{l}$  di volume: 12,5  $\mu\text{l}$  di Taqman 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,625  $\mu\text{l}$  Multiscribe™ e Rnase Inhibitor Mix (Applied Biosystem), 10  $\mu\text{M}$  di ogni primer, 5  $\mu\text{M}$  ed acqua a volume.

La reazione di amplificazione è stata realizzata in un termociclatore specifico per RealTime AbiPrism 7500 (Applied Biosystem), seguendo i seguenti passaggi: 48 °C per 30 min, 95 °C per 10 min, e 40 cicli di denaturazione a 95 °C per 15 sec ed una fase di allungamento a 60 °C per 1 min. I risultati sono stati visualizzati ed analizzati mediante software SDS.

### Microarray

È stata messa a punto una tecnica di ibridazione molecolare inversa utilizzando una piattaforma Combimatrix attraverso la quale è stato possibile sintetizzare un chip contenente sonde appositamente disegnate per l'identificazione dei principali virus del carciofo presenti in Italia (tab. 1). I campioni, provenienti da piante sintomatiche e asintomatiche coltivate in diversi areali geografici di produzione, erano costituiti da tessuto fogliare da cui è stato possibile estrarre come precedentemente descritto l'RNA totale utilizzato, dopo marcatura indiretta con un fluoroforo specifico, per le successive fasi di ibridazione seguendo il protocollo descritto (Tiberini e Barba, 2012).

### Risanamento

Per la produzione di cloni di carciofo sanitariamente qualificati si è proceduto secondo tecniche di risanamento precedentemente messe a punto quali coltura d'apice e termoterapia *in vitro* (Barba *et al.*, 2004; Babes *et al.*, 2004), e innovative (crioterapia) utilizzando germoplasma di carciofo di tipologia precoce e/o tardiva geneticamente caratterizzato e selezionato tra i principali ecotipi di carciofo prodotti in Italia. I diversi esperimenti di risanamento sono stati effettuati utilizzando piante in cui era stata rilevata la presenza di uno o più virus.

### Coltura d'apice

La tecnica della coltura d'apice ha previsto la moltiplicazione *in vitro* del meristema apicale prelevato da apici vegetativi delle piante in attiva crescita. L'apice, sezionato attraverso l'uso di uno stereomicroscopio, aveva dimensioni variabili a seconda dell'ecotipo in esame tra 0,1 e 0,4 mm. Successivamente gli apici sono stati trasferiti su terreno contenente le vitamine, i macro e microelementi di Murashige e Skoog (1962), saccarosio 30 g/l, IBA 0,1 mg/l, 6-BA 0,5 mg/l, 2-ip 0,01 mg/l, agar 8 g/l, pH=5,7 (Repetto *et al.*, 1997).

Ottenuta la ricrescita, le piantine sono state sotto-

poste a successivi cicli di moltiplicazione su substrato solido in camera di crescita ad una temperatura di circa 23 °C, luminosità di 3.500-4.000 lux e fotoperiodo di 16 h luce e poi fatte radicare seguendo il protocollo descritto (Babes *et al.*, 2004).

### Termoterapia *in vitro*

Germogli di circa 3 cm di lunghezza, allevati *in vitro*, sono stati esposti ad una temperatura finale di 38 °C per alcune settimane (3-5). Dai germogli sopravvissuti sono stati prelevati e allevati apici meristemati come precedentemente descritto.

### Crioterapia

L'eradicazione dei virus tramite crioterapia si basa sull'eliminazione delle cellule infette grazie agli effetti letali selettivi delle temperature ultra-basse (in genere -196 °C, la temperatura dell'azoto in fase liquida). Il criotrattamento è stato effettuato seguendo la tecnica della vitrificazione (Sakai *et al.*, 1990) adattata per il carciofo come precedentemente descritto (Taglienti e Barba, 2012a). Apici di dimensioni 1-1,5 mm sono stati posti su terreno solido contenente le vitamine, i macro e microelementi di Murashige e Skoog (1962) e saccarosio 0,3 M e conservati per 24 ore al buio a 4 °C. Sono poi stati trasferiti in cryovials da 1,8 ml e trattati a 25 °C per 30 minuti con 1 ml di una soluzione osmoprotettiva contenente macro e microelementi e vitamine di Murashige e Skoog, glicerolo 2 M e saccarosio 0,4 M. Successivamente sono stati eseguiti il trattamento vitrificante, l'immersione in azoto liquido e la messa in coltura su terreno di ricrescita seguendo il protocollo precedentemente descritto (Taglienti e Barba, 2012b).

### Allestimento di una collezione di germoplasma sano

In collaborazione con altre Unità Operative afferenti al Progetto CAR.VAR.VI. è stata allestita una collezione di germoplasma di carciofo rappresentativa dei principali ecotipi tardivi e precoci coltivati in Italia (tab. 4). Dalle piantine ricevute sono stati prele-

Tab. 4 - Ecotipi di carciofo inclusi nella collezione *in vitro*.  
Tab. 4 - Artichoke ecotypes belonging to *in vitro* collection.

Unità Operativa	Ecotipi
ENEA	Grato 1, Campagnano, Castellammare, C3
Università di Bari	Locale di Mola, Violetto di Provenza
Università di Catania	Violetto di Sicilia
CRA-ORA	Jesino, Ascolano, Urbisaglia, Castorano, Tardivo di Pesaro, Montelupone, Mazzaferrata
Università di Pisa	Carciofo di Chiusure, Terom, Empolese e Violetto di Toscana
CRA-ORT	Bianco di Pertosa, Capuanella carbone, Capuanella nera, Capuanella olivastra, Castellammare, Castel san Lorenzo, Montoro, Pascaiola, Pietrelcina, Tondo di Paestum

vati, sterilizzati e mantenuti *in vitro* germogli appartenenti agli ecotipi elencati. Lo stato sanitario dei cloni in collezione è stato verificato mediante la tecnica di diagnosi molecolare *onestep-RT-PCR*, (utilizzando di volta in volta primers specifici per il rilevamento dei principali virus del carciofo). In particolare è stata accertata la presenza dei seguenti virus: ArLV, AILV, AMCV e TSWV.

I cloni più interessanti e risultati infetti da uno o più virus sono stati sottoposti a risanamento utilizzando una o più delle tecniche di risanamento sopra descritte.

## Risultati

### Diagnosi

I tre metodi di diagnosi messi a punto sono risultati idonei a rilevare la presenza di infezioni virali singole e/o miste in matrici vegetali di carciofo proveniente da campo. In particolare:

- *RT-PCR*. Ogni saggio di RT-PCR si è rivelato affidabile, sensibile e specifico nell'accertare la presenza del rispettivo agente virale. Attraverso la reazione di amplificazione genica è stato possibile ottenere i prodotti di amplificazione della dimensione attesa per i rispettivi virus target, ed in dettaglio degli ampliconi di 276, 620, 453, 416 e 875 bp rispettivamente per ArLV, TSWV, AILV, AMCV e CMV. Il protocollo universale messo a punto ha permesso di ottenere dei prodotti di amplificazione equiparabili in resa e pulizia per ogni virus, a prescindere dal diverso germoplasma di partenza. Inoltre per ogni virus investigato le bande visualizzate sul gel di agarosio sono state comparabili per nitidezza ed intensità.
- *RealTime qRT-PCR*. Il protocollo diagnostico per la multiplex RealTime qRT-PCR ha permesso una diagnosi sensibile, specifica e quantitativa di ogni virus, simultaneamente in ogni campione, senza perdere in resa ed affidabilità. Le diverse coppie di primer e sonde, specifiche per ogni virus, hanno reagito solo ed esclusivamente con i rispettivi virus target, senza nessun evento di reazione incrociata ed aspecifica. Le curve di amplificazione hanno mostrato un andamento lineare e direttamente proporzionale alla quantità relativa del patogeno specifico all'interno del campione. Il saggio è stato efficace non solo nell'identificazione del singolo patogeno ma anche nella diagnosi simultanea di infezioni miste (per es. l'infezione di ArLV e AILV, nel campione Tar-5) (tab. 3).
- *Microarray*. Come riportato in bibliografia, per ogni evento di ibridazione sono stati sufficienti 2 µg di RNA totale per ottenere dei buoni e nitidi

segnali di ibridazione. Non ci sono stati eventi di ibridazione incrociata e aspecifica e l'intensità dei segnali è stata ottima con un basso rumore di fondo. Per i campioni prelevati nei diversi areali colturali italiani è stato possibile identificare la presenza dei singoli virus: ArLV (il più diffuso), AILV, AMCV e TSWV. Quest'ultimo virus, in particolare, è stato recentemente segnalato in nuovi focolai di infezione nel Lazio. In alcuni campioni sono state rilevate infezioni miste da ArLV e AILV. In tutte le ibridazioni, il livello del rumore di fondo è stato molto basso indicando un ottimo livello della qualità dell'ibridazione, altresì testimoniato dall'assenza di ibridazioni nei controlli negativi rappresentati da oligonucleotidi casuali, e da altri controlli interni forniti dal produttore.

### Risanamento

I risultati ottenuti sono variati in funzione della tecnica utilizzata e della tipologia del germoplasma sottoposto a risanamento (tab. 5).

- *Coltura d'apice*. In generale è stato osservato che la coltura d'apice può essere applicata con successo a tutti gli ecotipi considerati. Per alcune accessioni è stato particolarmente difficile isolare un apice meristematico di dimensioni ridotte che garantisse, pertanto, l'ottenimento di tessuti sani. La morfologia di alcuni apici caratterizzati da una struttura allungata e da abbozzi fogliari compatti ha ridotto le possibilità di ottenere un congruo numero di apici vitali e sani.
- *Termoterapia in vitro*. La termoterapia *in vitro* non è risultata una tecnica applicabile a germoplasma precoce di carciofo. In generale, il carciofo ha manifestato sofferenza quando esposto ad elevate temperature ma, mentre accessioni appartenenti alla tipologia "tardivo" hanno resistito al trattamento a caldo consentendo il successivo espianto dell'apice, i germogli provenienti da ger-

Tab. 5 - Risultati rappresentativi del risanamento effettuato su alcuni ecotipi di carciofo "precoci" e "tardivi".  
Tab. 5 - Results of virus eradication on some artichoke early and late ecotypes.

Ecotipo	Virus	Coltura d'apice	Termoterapia	Crioterapia
Grato 1	ArLV	100 %	50 %	15 %
Campagnano	ArLV	100 %	30 %	20 %
Castellammare	ArLV	100 %	n.d.	10 %
C3	ArLV	70 %	n.d.	20 %
Locale di Mola	ArLV	n.d.	0	80 %
Violetto di Provenza	ArLV	n.d.	0	70 %

moplasma “precoce” sono morti per disidratazione dei tessuti non consentendo di procedere all’espianco dell’apice.

- *Crioterapia*. Il protocollo di criotrattamento ha dato risultati estremamente variabili a seconda della tipologia e dell’ecotipo di carciofo sottoposto a risanamento confermando quanto osservato per altre specie (Matsumoto e Sakai, 2003). In particolare, le accessioni precoci hanno mostrato un’estrema facilità di ricrescita dopo l’immersione in azoto liquido e nella maggior parte dei casi il tasso di moltiplicazione del materiale trattato è risultato maggiore rispetto al controllo. Le accessioni tardive si sono invece dimostrate recalcitranti al criotrattamento; la rigenerazione è stata pressoché nulla e mai superiore al 30%.

#### *Allestimento di una collezione di germoplasma sano*

L’applicazione di metodi di diagnosi e risanamento e la collaborazione con le altre Unità Operative afferenti al progetto hanno consentito di costituire una collezione di germoplasma di alta qualità sanitaria rappresentativa dei principali ecotipi tardivi e precoci coltivati in Italia. Tale collezione è mantenuta *in vitro* presso il CRA-PAV e dispone attualmente dei seguenti ecotipi: Grato, Castellammare, Campagnano, Montoro, Pascaiola, Castel San Lorenzo, Capuanella Carbone, Petrelcina, C3, Locale di Mola, Violetto di Provenza. Le piantine sono periodicamente sottoposte ad analisi diagnostica per verificare che si mantengano virus-esenti.

#### **Discussione**

Il carciofo costituisce una matrice vegetale molto complessa in cui non è facile osservare una sintomatologia chiara e linearmente associabile ad un patogeno specifico. Inoltre, la poca disponibilità di sieri per il virus del carciofo, rendono l’ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) scarsamente applicabile per una diagnosi ad ampio spettro; al tempo stesso la presenza di contaminanti e inibitori nella tessuto fogliare del carciofo, ha richiesto un’accurata messa a punto dei saggi molecolari sviluppati e confrontati in questo lavoro, che si sono mostrati specifici, affidabili e sensibili e possono costituire una valida integrazione e/o alternativa ad altri metodi di diagnosi molecolare precedentemente messi a punto e utilizzati in attività di monitoraggio (ibridazione molecolare tradizionale mediante l’utilizzo di ribosonde specifiche) (Gallitelli et al., 2004).

Sia l’RT-PCR che la RealTime qRT-PCR hanno dimostrato un’efficienza diagnostica del tutto parago-

nabile e sovrapponibile, anche se quest’ultima dimostra una maggior affidabilità e sensibilità, unita alla possibilità di poter diagnosticare fino a 4 virus (ArLV, AILV, AMCV e TSWV) in una sola reazione di amplificazione.

Inoltre, dato il numero di virus riportati in carciofo e dato l’interesse per la produzione di cloni di carciofo virus-esenti e dei programmi di certificazione proposti per il carciofo, la messa a punto di un saggio di ibridazione molecolare inversa (Microarray), per 14 differenti virus, utilizzando una piattaforma Combimatrix (Tiberini e Barba, 2012), può rappresentare un ottimo strumento diagnostico per un’identificazione multipla e simultanea di diversi patogeni. Sebbene il costo della metodologia rimanga ancora un fattore limitante per numerosi laboratori, la possibilità e la potenzialità di individuare in un solo evento di ibridazione fino a 14 patogeni, può rappresentare un guadagno di tempo, risorse, reagenti e personale coinvolto.

La coltura d’apice ha confermato l’efficacia nel risanamento da ArLV in tutti gli ecotipi considerati.; Questa tecnica non è però facilmente applicabile a tutti i binomi ospite-virus, infatti, in alcuni ecotipi, è estremamente difficile isolare un apice di ridotte dimensioni; inoltre, alcuni virus sono particolarmente invasivi e quindi presenti anche nei tessuti meristemati dell’apice. Questa tecnica, inoltre, richiede un operatore molto esperto e tempi di rigenerazione spesso lunghi (1-2 mesi).

Il trattamento termoterapico rallenta la replicazione virale, aumentando la probabilità di prelevare porzioni di tessuto meristemato virus-esente. Le probabilità di risanamento sono direttamente proporzionali ai tempi di esposizione a 38°C, ma le alte temperature inducono nel carciofo il riposo vegetativo, per cui non è sempre possibile eseguire cicli termoterapici molto lunghi riducendo così l’efficacia del trattamento. Nel caso della tipologia “precoce” non è stato possibile individuare una periodo di tempi di esposizione valida per ottenere sia la sopravvivenza che il risanamento delle piantine.

In presenza di infezioni miste, provocate da più virus contemporaneamente, la termoterapia si è dimostrata un valido strumento per potenziare i risultati della coltura d’apice nel risanamento da ArLV e AILV.

Alla luce delle lacune presentate dalle due tecniche tradizionali, la crioterapia si è dimostrata uno strumento innovativo avente buone potenzialità e diversi vantaggi rispetto ai trattamenti tradizionali. La crioterapia è realizzabile con strumentazione a basso costo, presenta maggiore facilità operativa e tempi di risana-

mento ridotti. Il principio di funzionamento si basa sul fatto che le cellule della cupola meristematica presentano dimensioni minori, vacuoli molto piccoli e un elevato rapporto nucleo/citoplasma rispetto alle cellule differenziate, risultando quindi più resistenti al criotattamento. Sfruttando questa differenza fisiologica tra cellule, il trattamento a freddo elimina selettivamente le cellule differenziate e infette, ottenendo di conseguenza un apice risanato. Si è osservata la tolleranza degli ecotipi “precoci”, ed al contrario l’estrema sensibilità dei “tardivi” al freddo; questo fenomeno, molto interessante dal punto di vista genetico e fisiologico, è inoltre estremamente utile dal punto di vista pratico, poiché la crioterapia risulta complementare alla termoterapia (utile sui “tardivi” ma inefficace sui “precoci”). La crioterapia può inoltre essere considerata una valida alternativa per eradicare i virus difficilmente eliminabili con le tecniche tradizionali (ad esempio, AILV).

La collezione di germoplasma di carciofo costituita presso il CRA-PAV riveste un’importanza fondamentale per sostenere il miglioramento qualitativo della coltura ed il recupero di ecotipi locali. Il mantenimento di tale collezione prevede però un impegno non indifferente di risorse umane e finanziarie, che nel caso di collezioni più vaste diventa spesso insostenibile. Per questo motivo è necessario prendere in esame metodi di conservazione alternativi. Alla luce di ciò si è considerato il trattamento criogenico, che può essere utilizzato per la conservazione del germoplasma: il mantenimento a temperatura ultra-bassa permette di conservare un’ampia gamma di organi e tessuti vegetali (apici vegetativi da vitrocoltura, semi ed assi embrionali, embrioni somatici, polline) in condizioni di assoluta sicurezza genetico-sanitaria, a basso costo e per un tempo in linea di principio indeterminato. Gli esperimenti preliminari hanno ricalcato quelli eseguiti per la crioterapia, risultando per il momento efficaci ed applicabili solo agli ecotipi “precoci”.

## Conclusioni

La possibilità di condurre ricerche coordinate ed armonizzate per un periodo di tempo congruo ha consentito di raggiungere importanti acquisizioni nel settore della difesa di questa specie tipica mediterranea. Sono stati infatti perfezionati alcuni metodi di diagnosi e di risanamento ma, soprattutto, sono stati definiti nuovi protocolli di diagnosi multipla in grado di ridurre i tempi di lavorazione in laboratorio ed è stata affrontata una innovativa tecnica di risanamento basata sulla esposizione a temperature ultra-basse che,

come per altre specie, potrebbe dimostrarsi particolarmente utile per la valorizzazione delle risorse genetiche locali legate al territorio che sempre di più destano interesse nel settore vivaistico e produttivo. Queste attività hanno consentito e consentiranno di iscrivere al Registro Nazionale delle Varietà alcuni cloni di carciofo caratterizzati dal punto di vista genetico e garantiti per la qualità sanitaria.

## Riassunto

La produzione di germoplasma esente da virus è alla base dello sviluppo di un vivaismo del carciofo rispondente ai requisiti qualitativi e fitosanitari richiesti dalle normative vigenti. Grazie alla messa a punto di diversi metodi di diagnosi molecolare è stato possibile selezionare alcuni ecotipi di carciofo sanitariamente qualificati ed identificare i principali agenti virali responsabili del deperimento di questa coltura. Il germoplasma di pregio trovato infetto è stato avviato a cicli di risanamento attraverso l’utilizzo di tecniche tradizionali e/o innovative quali il trattamento a freddo. La coltura d’apice, la termoterapia *in vitro* e la crioterapia hanno consentito di costituire piante madri sane appartenenti ai più importanti ecotipi di carciofo tardivo e precoce coltivati nell’Italia centro-meridionale.

**Parole chiave:** virus, diagnosi, risanamento, collezione germoplasma.

## Bibliografia

- BABES G., LUMIA V., PASQUINI G., DI LERNIA G., BARBA M., 2004. *Production of virus free artichoke germplasm*. Acta Hort. 660: 467-470.
- BARBA M., DI LERNIA G., BABES, G., CIRULLI F., 2004. Produzione e conservazione di germoplasma di carciofo di tipo romanesco esente da virus. *Italus Hortus*, 11, 5-10.
- GALLITELLI D., BARBA M., 2003. *Normativa vivaistica in Italia*. In: Atti Giornate nazionali di studio sul carciofo “Vivaismo e strategie di sviluppo”.
- GALLITELLI D., RANA G.L., VOVLAS C., MARTELLI G.P., 2004. *Viruses of globe artichoke: an overview*. Journal of Plant Pathology 86 (4, Special issue): 267-281.
- MATSUMOTO T., SAKAI A., 2003. *Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (Vitis) by a two-step vitrification protocol*. Euphytica 131: 299-304.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-97.
- PASQUINI G., GALLITELLI D., 2006. *Difesa del carciofo: le infezioni virali*. In Atti Convegno “Il Carciofo: dal laboratorio al mercato”: 25-27.
- PASQUINI G., LUMIA V., BARBA M., 2003. *Diagnosis in “late” artichoke germplasm*. Acta Horticulturae 660: 497-500.
- PASQUINI G., LUMIA V., BARBA M., 2004a. *Diagnosis of Artichoke latent virus (ArLV) and other relevant viruses in “late” artichoke germplasm*. Acta Hort. 660: 497-500.

- PASQUINI G., LUMIA V., BARBA M., 2004b. *Diffusione e diagnosi dei virus in carciofo di tipo romanesco*. ItalusHortus 11: 70-73
- REPETTO A., CADINU M., LEONI S., GALLITELLI D., SALTARELLI P., BARBAROSSA L., GRECO F., 1997. *Effetto della coltura in vitro di apici meristemati sull'ottenimento di piante di carciofo "Spinoso Sardo" e "Masedu" esenti da virus*. Notiziario sulla protezione delle piante 7: 189-195.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1990. *Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis var. brasiliensis Tanaka) by vitrification*. Plant Cell Rep. 9: 30-33.
- TAGLIENTI A., BARBA M., 2012a. *Prove preliminari per lo sviluppo di un protocollo di crioconservazione in carciofo*. Atti II Conv. Naz. Micropropagazione, Acta Italus Hortus, in stampa.
- TAGLIENTI A., BARBA M., 2012b. *A shoot tip vitrification protocol for artichoke cryopreservation and cryotherapy*. Proc. VIII Int Symp. Artichoke, Cardoon and their Wild Relatives. Acta Hort., in stampa
- TIBERINI A., BARBA M., 2012. *Development of oligonucleotide-based microarray for detection of multiple artichoke viruses*. Journal of Plant Pathology, in stampa.