

I diritti brevettuali sul materiale di moltiplicazione: il caso della micropropagazione

Stefano Borrini^{1*} e Margherita Beruto²

¹ Società Italiana Brevetti, Roma

² IRF - Istituto Regionale per la Floricoltura, Sanremo (IM)

Industrial property rights on propagating material: the case of micropropagation

Abstract. Micropropagation belongs to an important area of horticulture. Various technological applications derived from such a propagation approach and many varieties, propagated through *in vitro* techniques, entered into the market, sometimes provoking dramatic changes. This paper, surely not intended to be exhaustive, focuses the attention on some aspects connected with the possibility of protecting inventions and new varieties which can be generated by means of *in vitro* techniques. In particular, patent for inventions and plant breeders rights are discussed, assessing their importance in the exploitation of micropropagation techniques.

Key words: industrial patents, *in vitro* culture, micropropagation, essentially derived varieties.

Introduzione

Scopo principale dell'articolo è quello di analizzare sotto il profilo della protezione brevettuale le tecniche di micropropagazione, intese *sensu lato*. L'ottica è quella di evidenziare come facilmente, dietro attività *routinarie*, si possano nascondere prodotti o metodi potenzialmente suscettibili di tutela; sebbene l'ottenimento di tale tutela sia attività dipendente da molteplici fattori, è auspicabile che tra essi non ci sia il non aver saputo riconoscere tale opportunità.

Nell'articolo vengono citati gli strumenti di tutela disponibili per i vari attori tecnologici operanti nel settore della micropropagazione. In termini generali tali strumenti appartengono a due grandi categorie: i brevetti per invenzione industriale, che possono ad esempio proteggere tecniche di moltiplicazione, dispositivi e materiali impiegati nella micropropaga-

zione e le privative per novità vegetali riguardanti ad esempio la protezione di cloni o di interessanti mutazioni suscettibili di originare nuove varietà. Per completezza si vogliono citare anche i marchi d'impresa che, pur non riguardando l'aspetto tecnologico, sono importanti veicoli per contraddistinguere la fonte produttiva e le denominazioni geografiche protette DOP e IGP che riguardano un differente piano di tutela in quanto non possono essere richieste da singoli imprenditori, ma sostanzialmente solo da consorzi. Questi ultimi aspetti, tuttavia, non faranno parte della trattazione condotta nel presente articolo. Nei successivi paragrafi, viceversa, saranno esaminati in maggiore dettaglio oggetto e requisiti di protezione di brevetti e privative. In particolare, saranno considerate le applicazioni brevettuali che possono svilupparsi nell'ambito della micropropagazione, nell'intento di proteggere sia aspetti tecnologici innovativi in grado di conferire un valore aggiunto al prodotto finale, sia le varietà micropropagate o derivate dallo sfruttamento della variabilità genetica inducibile attraverso le tecniche *in vitro*.

Il quadro normativo di riferimento

Il quadro normativo, in via semplificata, può essere ricondotto a due grandi filoni:

- le normative derivate dalla Convenzione UPOV (Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales, http://www.upov.int/about/en/list_publications.html) che comprendono il Regolamento del Consiglio (EC) n. 2100/94 (www.cpvo.europa.eu/main/en) e le norme del CPI (Codice della Proprietà Industriale D. Lgs 10 febbraio 2005, n.30; per un approfondimento vedasi *Commento alla normativa sui diritti derivanti da brevettazione e registrazione* di Gustavo Ghidini e Fabrizio de Benedetti, Edizioni Il Sole 24 Ore Spa[©] 2006) disciplinanti la protezione delle novità vegetali;
- la Convenzione Unione di Parigi a cui può essere ricondotta la Convenzione sul Brevetto Europeo

* stefano.borrini@sib.it

(www.epo.org) e le norme del CPI in materia di brevetti d'invenzione (e marchi d'impresa).

Citati per dovere di completezza anche la *Direttiva in materia di protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche* (Direttiva n. 98/44/CE e la legge italiana di recepimento D.L. 10 gennaio 2006, n.3, convertito con modificazioni dalla l. 22 febbraio 2006, n.78) e gli accordi TRIPS (*Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights*); va preliminarmente precisato che le nuove varietà vegetali possono trovare tutela solo ed esclusivamente nell'ambito delle normative derivate dalla Convenzione UPOV. La definizione di varietà rappresenta lo spartiacque tra i due sistemi. In pratica, qualunque trovato diverso da una varietà vegetale è proteggibile solo come brevetto per invenzione, ivi compreso il metodo di ottenimento di varietà qualora, naturalmente, ne possieda i requisiti. In tale contesto, va rilevato come il termine varietà - in via semplificata - ricomprenda un insieme di individui appartenenti a un *taxon* botanico del più basso grado conosciuto e che, sostanzialmente, sia omogeneo, stabile e distinto nelle sue caratteristiche da varietà note.

I requisiti di protezione di un brevetto e di una privativa

Per ragioni di chiarezza saranno richiamati i requisiti di protezione sia di un brevetto che di una privativa, soffermandosi sul requisito di novità che più direttamente ha influenza sulle attività collegate alla divulgazione dei risultati della ricerca.

Un'invenzione è brevettabile quando è nuova, implica attività inventiva ed è suscettibile di applicazione industriale. Una varietà è proteggibile quando è distinta, omogenea, stabile (requisiti questi spesso indicati come DUS che sta per *Distinctness, Uniformity, Stability*), "commercialmente nuova" ed è contraddistinta da un'ideale denominazione varietale.

La novità, requisito cruciale in entrambe le tipologie di protezione, ha tuttavia una differente rilevanza sulla possibilità di proteggere i risultati della ricerca a seconda che il trovato sia qualificabile come varietà vegetale o come invenzione industriale. E' nuova quella varietà il cui materiale di propagazione o prodotto della raccolta non sia stato posto in commercio in Italia (o nell'Unione Europea, in dipendenza del territorio in cui si chiede protezione) per più di un anno prima della data di deposito della relativa domanda; questo è il motivo per cui si è fatto riferimento ad una "novità commerciale". Nel caso di atti commerciali all'estero, questo termine è esteso a quattro anni, sei per varietà a fusto legnoso. Inoltre per

essere lesiva della novità, la commercializzazione deve essere avvenuta con il consenso del costitutore e ai fini dello sfruttamento della varietà. Per conseguenza, atti di commercializzazione (fraudolenti) ai danni del costitutore o l'esecuzione di prove realmente sperimentali, non costituiscono atti lesivi della novità.

Nel caso dei brevetti per invenzione industriale, la legge stabilisce che un'invenzione è nuova se non è compresa nello stato della tecnica, definito come tutto ciò che è stato reso accessibile al pubblico nel territorio dello Stato o all'estero prima della data di deposito della domanda di brevetto, mediante una descrizione scritta od orale, un'utilizzazione o un qualsiasi altro mezzo. A tale proposito va sottolineato come, nel caso dei brevetti per invenzione industriale, una divulgazione da parte di soggetti diversi dall'inventore (non qualificabile come abuso) risulti lesiva della novità.

Da un confronto delle due definizioni risulta agevole costatare da un lato come, nel caso delle invenzioni industriali, la norma sia, in generale, molto più restrittiva. Dall'altro, sotto un profilo più metodologico, come pubblicazioni scientifiche precedenti il deposito siano lesive della novità se l'oggetto da proteggere è qualificabile come invenzione industriale, mentre non lo siano se si tratta di una varietà vegetale.

Cosa è proteggibile e quali sono i diritti conferiti da un brevetto

Come precedentemente sottolineato, con la normativa sulle novità vegetali è possibile proteggere solo e soltanto oggetti qualificabili come varietà; la normativa sui brevetti per invenzione industriale consente la protezione di prodotti, procedimenti, dispositivi e usi nuovi, industrialmente applicabili e inventivi. Non è scopo del presente articolo fornire una trattazione approfondita dell'argomento, tuttavia, può essere importante, in un contesto di tecniche *in vitro* applicate ai programmi di miglioramento genetico, citare alcune tipologie di invenzioni industriali possibili: un *gene* (proteggibile se isolato dal contesto biologico e associato ad una funzione), un particolare mezzo di coltura, un procedimento (ad esempio il proiettile biologico) o una classificazione tassonomica superiore alla varietà.

I diritti conferiti

I diritti di brevetto per invenzione industriale consistono nella facoltà esclusiva di attuare l'invenzione e di trarne profitto nel territorio dello Stato. I diritti conferiti da una privativa riguardano il materiale di propagazione (quali la moltiplicazione, il condiziona-

mento a fine moltiplicazione, la messa in vendita e la vendita, l'esportazione e l'importazione verso e dalla Comunità Europea e il magazzinaggio per uno degli scopi riportati) e, a certe condizioni, i prodotti della raccolta. Va tuttavia precisato che, quando un prodotto (inteso *sensu lato*) è stato legittimamente immesso in commercio, il diritto di brevetto si intende esaurito (cosiddetto principio di *esaurimento del diritto*), con la principale conseguenza che il titolare non può più vantare i suoi diritti. Una situazione particolare si verifica quando l'oggetto della protezione di un brevetto per invenzione industriale è costituito da materiale vivente autoreplicante (ad esempio frammenti di DNA). Per tener conto di questa particolarità, la normativa applicabile in tale caso (la citata Direttiva n. 98/44/CE e legge di attuazione) stabilisce che la protezione attribuita da un brevetto ad un prodotto contenente o consistente in un'informazione genetica si estende "a qualsiasi materiale nel quale il prodotto è incorporato e nel quale l'informazione genetica è contenuta e svolge la sua funzione". Un esempio di applicazione di tale normativa può essere considerato il seguente: l'inserimento di un gene brevettato (ad esempio resistenza a fusariosi) nel genoma della specie *Dianthus caryophyllus* produce un materiale vegetale non qualificabile brevettualmente come varietà. Varietà ottenute da programmi di miglioramento genetico che impiegano tale materiale vegetale e che esprimono resistenza a fusariosi sono soggette, in ogni riproduzione, ai diritti del titolare del brevetto sul gene. Come facilmente intuibile, tale argomento è tuttora caldamente dibattuto, per cui si rimanda a testi specifici sull'argomento per gli approfondimenti del caso (*Commento alla normativa sui diritti derivanti da brevettazione e registrazione* di Gustavo Ghidini e Fabrizio de Benedetti, Ed. Il Sole 24 Ore Spa[®], 2006).

La micropropagazione e i brevetti

Un dato comunemente accettato - forse sarebbe meglio parlare di luogo comune - è quello secondo il quale sarebbero meritevoli di protezione brevettuale solo e soltanto quei trovati di particolare rilevanza. Al contrario, un esame delle domande depositate nei vari settori tecnologici mostra chiaramente come i richiedenti molto spesso considerino anche invenzioni apparentemente "banali" come meritevoli di protezione. A sostegno di quanto affermato, si vuole riportare l'esempio riferito al brevetto europeo n. 303 578, regolarmente concesso e riferito ad un nuovo sistema di moltiplicazione vegetativa delle rose. L'invenzione è data dalla semplice inversione delle tecniche di moltiplicazione adottate, come di seguito riassunto:

Metodo classico: talea → radicazione → innesto (comporta la realizzazione di una talea dal portainnesto, la sua radicazione e l'innesto della varietà da coltivare)

Metodo innovativo brevettato: innesto → talea → radicazione (prevede l'innesto di gemme della varietà di interesse sul portainnesto, la produzione di talee e la loro successiva radicazione).

L'invenzione consegue l'importante vantaggio di poter realizzare l'operazione di radicazione in un luogo diverso da quello di produzione delle talee e senza trasporto di terra, a vantaggio della valorizzazione di filiere internazionali.

Il carattere interdisciplinare delle tecniche di micropropagazione rende spesso non agevole la ricerca brevettuale. La nostra ricerca tra le domande PCT nella classe A01H 4/ (classificazione internazionale che riguarda *Plant reproduction by tissue culture techniques*, ricercando la parola *micropropagation* nel testo del brevetto), effettuata relativamente al periodo 2002-2011, ha prodotto un numero di brevetti piuttosto limitati in valore assoluto (38) ma con un trend percentuale di crescita consistente nel periodo esaminato. Malauguratamente, il contributo italiano si rivela un fatto del tutto episodico. Il ritardo italiano nel deposito dei brevetti è purtroppo comune a tutti i settori tecnologici e trova una possibile giustificazione nelle dimensioni generalmente medio-piccole delle aziende italiane di micropropagazione e nella conseguente limitata disponibilità di risorse per l'industrializzazione di un prodotto. La richiamata difficoltà delle imprese vale in maggior misura per i nostri ricercatori che, spesso, nel collaborare con le imprese per lo sviluppo di prodotti, incontrano maggiori difficoltà, sia sotto il profilo burocratico che del credito, di quelle dei ricercatori stranieri. Tali difficoltà rischiano di mettere in secondo piano i vantaggi di un brevetto, cioè il fatto che un brevetto sia uno strumento giuridico che concede diritti materiali che consentono di impedire a terzi di attuare l'invenzione o, nel caso di privative, di moltiplicare la varietà senza esserne autorizzati dal titolare. La posizione di chi si appella alla presunta difficoltà di difendere giudiziariamente un brevetto per non depositarlo non tiene conto che un brevetto vale per quello che vi è validamente descritto e dunque non basta "cambiare una virgola" per uscire dall'ambito di protezione. Viceversa, alcune riflessioni portano a considerare che procedere alla brevettazione nei processi di micropropagazione può risultare estremamente vantaggioso. A titolo di esempio, analizzando l'incidenza dei costi di brevettazione sul prezzo del prodotto finito, si può stimare che, ipotizzando un prezzo medio di vendita di una pianta

micropropagata a 0,20 - 0,35 €, si debba aggiungere solo un 5 - 10 % per effetto della presenza di un'invenzione protetta da brevetto: un limitato incremento di costo a fronte di un messaggio di qualità. Va infine ricordato che il brevetto, oltre che sfruttato in proprio, può essere dato in licenza (o ceduto) ad un terzo, opportunità particolarmente vantaggiosa per le Università e gli istituti di ricerca in genere che, sempre più, sono chiamati ad affrontare con piglio imprenditoriale la propria attività.

A titolo di esempio, di seguito, si vogliono riportare alcune note riflessive circa le tematiche di brevettazione che possono sortire nell'ambito della micropropagazione. Una prima tematica è rappresentata dalle tecniche applicate per il controllo e la verifica dello stato fitosanitario del materiale vegetale da micropropagare o prodotto dai processi di micropropagazione. Come risaputo, è fondamentale che nel processo di micropropagazione venga assicurata la sanità fitopatologica del materiale moltiplicato, affinché attraverso tale sistema non si effettui una diffusione di fitopatie che comprometterebbero la produzione stessa. Tra i diversi sistemi diagnostici utilizzati negli schemi di produzione, l'applicazione di test immunoenzimatici (test ELISA) riveste un'importante posizione, anche in considerazione della relativa semplice applicazione di tali tecniche, la loro affidabilità e velocità d'impiego. Una ricerca esplorativa tra le banche dati brevettuali produce come risultato 547 famiglie brevettuali in cui si rivendica o si fa uso di tecniche ELISA in qualche modo collegate alla micropropagazione; ciò a ulteriore conferma della possibilità di proteggere miglioramenti di tecniche e/o prodotti esistenti. Il crescente interesse nella produzione di qualità fa, pertanto, presagire come tali tecniche ed altre di carattere molecolare possano rappresentare soggetto di studio e quindi di possibile brevettabilità.

Argomento di brevettazione nel campo della micropropagazione è spesso stato l'applicazione dei protocolli di moltiplicazione di determinate specie con la specifica del mezzo colturale o dell'espianto utilizzato per iniziare la coltura (quale, ad esempio, il *Differential medium used for producing haploid regeneration plant of meadow reed fescue*, brevetto cinese CN201010197834A, depositato il 3 giugno 2010). La complessità del procedimento di micropropagazione implica, tuttavia, lo svolgimento di diversi stadi operativi (tre stadi - inizio della coltura, moltiplicazione e radicazione delle plantule - in accordo a Murashige e Skoog, 1962; cinque stadi - preparazione delle piante madri, inizio della coltura, moltiplicazione, radicazione *in vitro* ed *in vivo*, acclimatazione - secondo Debergh e Maene, 1981) che presentano

peculiarità per le quali approcci tecnici innovativi possono contribuire al miglioramento della produzione e, finanche, all'ottenimento di una produzione fino a quel momento non sviluppata.

E' noto che una delle problematiche maggiori della micropropagazione nei Paesi industrializzati è rappresentata dall'elevato costo delle piantine prodotte. Tali costi sono principalmente attribuibili al costo della manodopera specializzata impiegata e dell'energia (Debergh e Maene, 1981; De Paoli e Masini, 2009; Venturi *et al.*, 2009). Diventano quindi fondamentali tutte quelle operazioni volte ad ottimizzare il protocollo di produzione e la qualità del materiale prodotto, a ridurre la manodopera e a minimizzare i costi energetici. Tali ottimizzazioni sono state, pertanto, oggetto di invenzioni. Ad esempio, seppure non esaustivo, si riportano le riproduzioni grafiche di due brevetti relativi alla possibilità di meccanizzare la fase di moltiplicazione del materiale vegetale:

- dispositivo di cui alla domanda PCT/AU9/00413 riguardante un sistema automatico per l'ottenimento di microtalee in piante con internodi allungati (fig. 1),
- dispositivo di cui alla domanda PCT/NL2003/00610 relativa al taglio di piante a rosetta (fig. 2).

Tali sistemi di robotizzazione si integrano in una vasta branca dell'ingegneria robotica, indirizzata alla meccanizzazione dei sistemi di produzione (Aitken-Christie, 1991; Kozai *et al.*, 1991) che nel nostro secolo hanno costituito un'importante rivoluzione tecnologica in grado di modificare profondamente alcuni apparati produttivi, quali la produzione di embrioni somatici, i sistemi di trasferimento *in vivo* e la raccolta, lo stoccaggio e la spedizione del prodotto finito. Sebbene diverse interessanti applicazioni possano svilupparsi da tali sistemi per il settore della micropropagazione, è doveroso sottolineare, tuttavia, che la fase di moltiplicazione *in vitro* è estremamente delicata e spesso, pur agendo con robot di estrema precisione - da 1 a 100 mm -, i tessuti, molto fragili, possono danneggiarsi, con conseguenze negative per la crescita successiva delle plantule. Inoltre risulta piuttosto complicato garantire la necessaria asepsi e, in certi sistemi, non proponibile la sostituzione dell'attività dell'operatore, in grado di eseguire un'accurata selezione delle plantule da trasferire nel nuovo substrato.

A conclusione di questa brevissima rassegna sulle domande di brevetto relative alla micropropagazione, si vuole sottoporre all'attenzione del lettore alcune riflessioni di carattere generale sulle invenzioni. Come già notato la micropropagazione è tecnica interdisciplinare che utilizza risultati provenienti da settori diversi (ad esempio le metodologie ELISA). La racco-

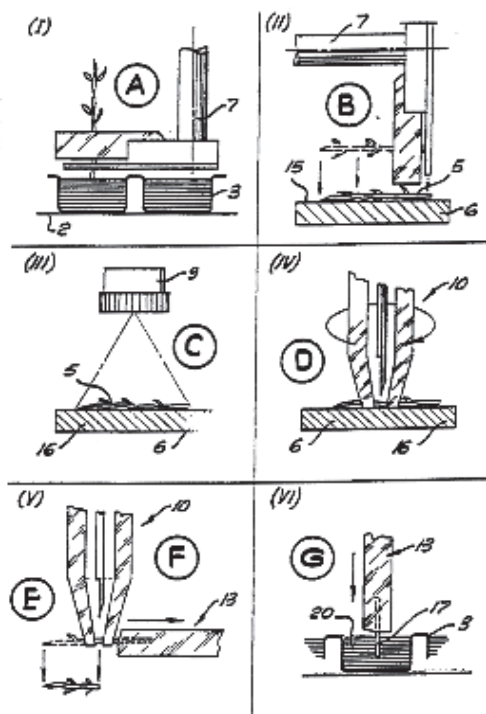


Fig. 1 - Sistema automatico per la divisione del materiale vegetale moltiplicato *in vitro*. Si tratta di germogli con internodi distanziati che sono trasportati alla postazione di lavoro, esaminati mediante analisi d'immagine e successivamente suddivisi in microtalee trasferite su substrati nuovi (domanda PCT/AU9/00413).

Fig. 1 - Apparatus for dividing *in vitro* plant material. Shoots are transported to a dividing station, evaluated by means of the image analysis and subsequently divided in micro-cuttings which are eventually transferred to a new growing medium (application PCT/AU9/00413).

mandazione è quella di tener conto che anche metodologie sviluppate esclusivamente per la micropropagazione possono trovare applicazione - anche brevettuale - in altri settori: questo aspetto deve essere costantemente valutato perché, come indicato in precedenza, una pubblicazione avvenuta senza prestare la dovuta attenzione alle possibili implicazioni brevettuali, priva l'invenzione del fondamentale requisito della novità.

Le varietà essenzialmente derivate

A dispetto di alcuni preconcetti, è un dato di fatto che nel tempo, la legislazione in materia di protezione di novità vegetali (come quella brevettuale in genere) si è dovuta necessariamente adeguare allo sviluppo della ricerca e della tecnologia per rendere efficace la protezione conferita. Per il settore della micropropagazione assume particolare rilevanza l'introduzione del concetto di *varietà essenzialmente derivata* (edv) che verrà discusso nel seguito, con riferimento alle mutazioni che, prese in via semplificata quale risultato della variabilità somaclonale, possono talora verificarsi durante la micropropagazione. Nell'ottica di

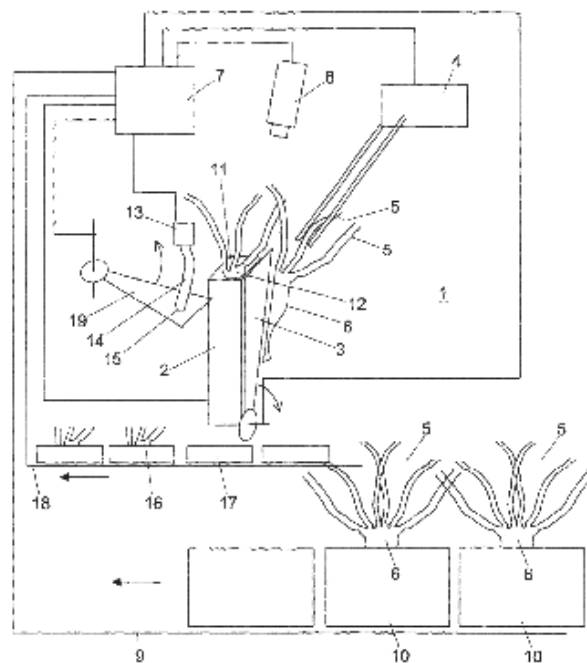


Fig. 2 - Metodo per separare le piante *in vitro* "a rosetta". Il sistema prevede che le piante siano prese e posizionate parallelamente all'asse longitudinale di un supporto (indicato con il n. 2 nella figura) che ha un'apertura nella quale sono inserite le piante. Le piante sono quindi sezionate e trasferite su nuovo substrato (domanda PCT/NL2003/00610).

Fig. 2 - Method for separating "rosette" *in vitro* plants. The method comprises different steps: plants are transported and positioned on the longitudinal axis of an elongated holder (n. 2 in the figure), having a longitudinal opening where plantlets are put. Then plantlets are cut and transferred to a new growing medium (application PCT/NL2003/00610).

considerare la problematica in un contesto più generale, va ricordato che prima della Convenzione UPOV del 1991, una mutazione (ad esempio in un fiore) apparteneva a chi la scopriva assieme al diritto di proteggerla brevettualmente; al costituente della varietà madre, dalla quale la mutazione derivava, nulla era dovuto. La Convenzione UPOV del 1991 ha modificato tale situazione creando una "dipendenza" della mutazione dalla varietà madre protetta: in particolare, il costituente della mutazione potrà proteggerla a proprio nome (naturalmente se ne sussistono i requisiti), ma per poterla sfruttare avrà bisogno dell'autorizzazione del costituente della varietà madre. Quanto precede deriva dalla modifica inserita nella Convenzione UPOV del 1991 in base alla quale i diritti del costituente si estendono: (a) alle varietà che sono derivate essenzialmente dalla varietà iniziale protetta, qualora tale varietà non sia essa stessa una varietà essenzialmente derivata. La norma prevede inoltre che i diritti del costituente si estendano anche (b) alle varietà che non sono distinte dalla varietà protetta e (c) alle varietà la cui produzione richiede l'utilizzazione ripetuta della varietà protetta.

La procedura che prevede il riconoscimento di una edv prevede una semplice forma di registrazione, senza l'intervento di alcuna autorità ufficiale, ma solo con l'accordo del costitutore della varietà madre e della edv.

La brevettazione e la ricerca

I rapporti tra ricerca e brevettazione, momenti (crono)logicamente successivi e distinti, sono stati, e sono tuttora, oggetto di accesa discussione. In particolare, soprattutto nel mondo accademico, è diffusa la preoccupazione che la brevettazione costituisca un impedimento alla libertà di ricerca. Tale preoccupazione va immediatamente confutata sottolineando come la legge brevetti stabilisca che la ricerca anche su invenzioni brevettate da terzi è libera da ogni vincolo o monopolio brevettuale. Tuttavia, nel momento in cui la finalità di ricerca viene meno e, ad esempio, si perviene ad una nuova invenzione oggetto di sfruttamento commerciale, sarà necessario valutare attentamente i diritti brevettuali dei terzi.

Un altro problema relativo ai rapporti tra ricerca e brevettazione si verifica nelle situazioni in cui la ricerca è condotta congiuntamente da più entità (come, ad esempio, nei Programmi Quadro dell'UE) tra le quali esiste una libera circolazione di informazioni. In tali casi è cruciale prestare attenzione alla identificazione delle informazioni possedute dalle singole entità prima dell'inizio della ricerca, a quanto viene sviluppato nel corso della stessa ricerca e alla definizione di eventuali diritti brevettuali. Questo avvertimento può suonare un po' anacronistico in ambienti quali quelli universitari, da sempre restii a porre barriere alla conoscenza; ma, purtroppo, in alcuni casi, ciò può portare a perdite irrimediabili di diritti brevettuali, spesso con pesanti negativi risvolti economici. Non sempre brevettare è la soluzione migliore, ma se si sceglie la via della brevettazione è necessario conoscerne e osservarne le regole. Nel caso di trasferimento di materiale autoreplicante (piante, microrganismi, varietà vegetali) una raccomandazione generale può essere almeno quella di corredare ogni materiale che viene trasferito - anche per soli scopi di ricerca - di alcune indicazioni che possono essere sinteticamente riassunte come segue: (a) identificare/definire esattamente il materiale che viene trasferito, (b) definire esattamente i motivi per i quali viene trasferito (possibilmente spiegando e chiarendo che si tratta di motivazioni di ricerca) e (c) indicare i prevedibili e immaginare anche gli imprevedibili sviluppi brevettuali futuri e la loro proprietà.

Conclusioni

Dagli anni '60, la micropropagazione ha presentato un importante sviluppo come processo industriale, interessante da un punto di vista sia scientifico che commerciale. Le varie tecniche che si sono sviluppate da tale processo hanno coinvolto diversi campi di indagine (propagazione, miglioramento genetico e fitopatologia). Altresì, diverse varietà sono state diffuse o create attraverso le tecniche *in vitro*. Il presente articolo ha voluto porsi come nota riflessiva circa le possibilità offerte per la protezione e la valorizzazione delle tecnologie e varietà sviluppate attraverso la micropropagazione.

Riassunto

La micropropagazione rappresenta un importante settore del vivaismo ortoflorofrutticolo. Diverse applicazioni tecnologiche da essa derivate e diverse varietà propagate od ottenute attraverso tale sistema di propagazione hanno interessato il mercato, a volte rivoluzionandone gli equilibri. In questo lavoro, certamente non esaustivo, si è voluto porre l'attenzione su alcuni aspetti legati alla possibilità di proteggere le invenzioni che possono originarsi nell'esecuzione delle tecniche *in vitro*, così come le varietà che da tali tecniche possono essere ottenute. In particolare, sono presentate tematiche relative ai brevetti per invenzione industriale e alle privative per novità vegetali, discutendo la loro valenza ai fini della valorizzazione della tecnica di micropropagazione.

Parole chiave: brevetto industriale, coltura *in vitro*, micropropagazione, varietà essenzialmente derivata

Bibliografia

- AITKEN-CHRISTIE J., 1991. *Automation*. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation*, pp 363-388. Kluwer Academic Publishers.
- BERUTO M., BISIGNANO A., 2011. *La Micropropagazione in floricultura tra ricerca e mercato*. *Italus Hortus* 18(1): 25-34.
- DEBERGH P., MAENE L., 1981. *A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture*. *Sci. Hort.*, 14: 335-345.
- DE PAOLI G., MASINI M., 2009. *Il laboratorio di micropropagazione commerciale: organizzazione e tecnica per contenere i costi di produzione*. *Italus Hortus*, 16 (2): 84-88
- KOZAI T., TING K.C., AITKEN-CHRISTIE J., 1991. *Considerations for automation of micropropagation systems*. In: *Automated Agriculture for the 21st Century*, Proc. 1991 Symp. Amer. Soc. Agr. Eng.: 503-517.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- VENTURI A., VENTURI V., BERUTO M., 2009. *Trent'anni di micropropagazione in Italia*. *Italus Hortus*, 16(2): 89-92.

Eradicazione di viroidi mediante embriogenesi somatica in vite

Ivana Gribaudo^{1*}, Giorgio Gambino¹, Rosalina Vallania¹, Beatriz Navarro Ramirez² e Francesco Di Serio²

¹ CNR IVV Istituto di Virologia Vegetale, UOS Grugliasco (TO)

² CNR IVV Istituto di Virologia Vegetale, UOS Bari

Somatic embryogenesis allows elimination of viroids in grapevine

Abstract. Viroids are small, circular, non-protein-coding RNAs infecting higher plants, which, in turn, may develop symptoms, resulting in economic losses in several crops. Grapevine is one of the most permissive, natural viroid host: five viroid species, belonging to three different genera, have been isolated from grapevine plants. Similarly to viruses, the most effective strategy for preventing or reducing the spread of viroids relies on the use of pathogen-free propagation material. Unfortunately, the effectiveness of techniques traditionally adopted to eradicate viruses (meristem tip culture, thermotherapy) seems poor in eliminating viroids from infected grapevines. Indirect somatic embryogenesis proved to be effective at eliminating the most important viruses affecting grapevines. Accordingly, this technique was tested as a method for eradicating two widespread viroids, *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) and *Hop stunt viroid* (HSVd), from four grapevine cultivars. Both viroids were detected by RT-PCR in grapevine floral organs used for initiating embryogenic cultures, as well as in undifferentiated cells of embryogenic and non-embryogenic calli from anthers and ovaries. In contrast, somatic embryos differentiated from these infected calli were viroid-free, and viroids were not detected in embryo-derived plantlets even three years after their transfer to greenhouse conditions. A wider spatial distribution of HSVd than GYSVd-1 within proliferating calli was revealed by *in situ* hybridization, whereas no hybridization signal was detected in the somatic embryos. In addition, GYSVd-1 and HSVd were localised in the nucleus of infected cells, showing their nuclear accumulation. Somatic embryogenesis was compared to *in vitro* thermotherapy: after the heat treatment, HSVd and GYSVd-1 were detected in all *in vitro* plantlets of the cultivar Roussan, and in all lines analysed after 3 years of culture in greenhouse. The high efficiency with which somatic embryogenesis eliminates viroids and viruses from several infected grapevine cultivars should allow to obtain virus- and viroid-free material, which would be

useful not only for sanitary selection but also for basic research on plant-virus and plant-viroid interactions in grapevine.

Key words: HSVd, GYSVd-1, *Vitis vinifera*, *in situ* hybridization, sanitation.

Introduzione

L'embriogenesi somatica è un sistema di rigenerazione molto utilizzato nel settore biotecnologico. Com'è noto, consiste nella differenziazione di embrioni da tessuti di diverso tipo, appartenenti a foglie, piccioli, antere e filamenti dell'antera, ovari immaturi, internodi, ecc. È ampiamente adottata, in vite come in altre specie, per la rigenerazione a partire da cellule sottoposte a trasferimento genico; inoltre è utilizzabile in programmi di breeding basati su variazioni somaclonali e, spesso ancora a livello sperimentale, per la conservazione di germoplasma (Martinelli e Gribaudo, 2009). Recentemente la rigenerazione mediante embriogenesi somatica indiretta si è dimostrata essere un metodo particolarmente efficace anche nell'eliminare i più importanti virus della vite. Di conseguenza, si è voluto valutare la validità di questa tecnica anche nell'eradicazione di due viroidi ampiamente diffusi nelle viti coltivate: *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1), uno degli agenti causali della picchiettatura gialla della vite, e *Hop stunt viroid* (HSVd).

I viroidi sono agenti infettivi costituiti da una piccola molecola di RNA circolare incapace di codificare proteine; infettano piante superiori e, in alcuni casi, possono indurre sintomi anche rilevanti e conseguenti danni economici (Flores *et al.*, 2005; Ding, 2009). La vite è una specie particolarmente permissiva nei riguardi dei viroidi: almeno 5 specie appartenenti alla famiglia *Pospiviroidae* sono state isolate da piante di vite (Little e Rezaian, 2003). Tra queste, GYSVd-1 e *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) sono agenti causali della malattia denominata "Picchiettatura gialla della vite" (Koltunov *et al.*, 1989), caratterizzata da macchie gialle sulla lamina

* i.gribaudo@ivv.cnr.it

fogliare che possono, in determinate condizioni ambientali, causare danni a carico della produzione. Ad altri viroidi della vite quali HSVd, *Citrus exocortis viroid* (CEVd) e *Australian grapevine viroid* (AGVd) (Sano *et al.* 1985; Garcia-Arenal *et al.*, 1987; Rezaian, 1990) non sono stati finora associati sintomi specifici. Tuttavia, infezioni latenti da viroidi sono comunque pericolose in quanto le piante infette possono servire da fonte di inoculo ai danni di altre specie più suscettibili; inoltre una duplice infezione da GYSVd-1 e *Grapevine fanleaf Virus* (GFLV) può portare ad una sindrome denominata “vein banding disease” (Szychowski *et al.*, 1995). Come per i virus, non sono al momento disponibili metodi diretti di lotta contro i viroidi e l'utilizzo di materiale di propagazione sano è fondamentale per prevenire o ridurre la diffusione di questi agenti infettivi.

Materiali e metodi

Espianti florali (antere e ovari) sono stati prelevati da infiorescenze immature di *Vitis vinifera* cv Cari, Provinè, Roussan e Nebbiolo. Le piante madri erano state saggiate per la presenza di GYSVd-1 e HSVd mediante RT-PCR come descritto in seguito; sulle stesse piante sono stati eseguiti saggi virologici mediante multiplex RT-PCR (Gambino e Gribaudo, 2006). Gli espanti sono stati coltivati seguendo un protocollo precedentemente messo a punto (Gribaudo *et al.*, 2004), consistente in coltura per 3 mesi su un substrato per l'induzione di callogenesi contenente 4,5 µM di acido 2,4 diclorofenossiacetico (2,4-D) e 8,9 µM di 6-benzilaminopurina (BAP), seguita dal trasferimento su un secondo substrato per la proliferazione degli embrioni contenente 10 µM di acido 2-naftossiacetico (NOA), 1 µM di BAP e 20 µM di acido 3-indolacetico (IAA). Le colture sono state mantenute a 26 °C al buio. Singoli embrioni sono stati isolati e trasferiti su un substrato di germinazione privo di fitoregolatori. Il vitigno Roussan è stato anche sottoposto a termoterapia *in vitro*, secondo il metodo descritto da Gribaudo *et al.* (2006): piantine radicate, coltivate *in vitro* su un substrato privo di fitoregolatori esogeni, sono state mantenute a 34 °C per un periodo variabile da 40 a 99 giorni, interrompendo il trattamento quando le piantine mostravano evidenti segni di stress termico. Al termine di questo periodo le gemme apicali (di circa 2 mm) e le gemme ascellari più vicine all'apice sono state isolate e coltivate fino all'ottenimento di piante radicate. Piante ottenute da embrioni somatici o da termoterapia sono state individualmente micropropagate mediante ripetute subcolture di talee apicali su substrati senza

ormoni, quindi trasferite in terriccio e ambientate in serra; la serra è stata solo parzialmente riscaldata durante l'inverno per permettere alle piante lignificate di entrare in dormienza.

Per rilevare la presenza dei viroidi (GYSVd-1 e HSVd) sono state prelevate foglie, antere e ovari dalle piante madri, calli, embrioni somatici, piante *in vitro* e in serra. Lo studio della presenza dei viroidi nei calli embriogenici e non embriogenici è stato possibile solo per la cv Provinè, a causa della bassa efficienza embriogenica di Cari, Roussan e Nebbiolo. Il metodo di prelievo ed i dettagli delle analisi RT-PCR effettuate sono stati descritti da Gambino *et al.* (2011). I primers specifici per i viroidi in esame sono stati quelli descritti da Eiras *et al.* (2006) e Polivka *et al.* (1996). La reazione è stata effettuata a partire da 1 µl di cDNA in 20 µl di miscela di reazione composta da 0,2 mM dNTPs, 0,25 mM di ciascun primer, 1,5 mM MgCl₂ e 0,5 unità Taq polymerase (PlatinumTaq polymerase, Invitrogen). Il ciclo di temperature utilizzato comprendeva 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30s, 55 °C per 30s e 72 °C per 30s. L'amplificazione del *Vitis* 18S rRNA mediante primers specifici (Gambino e Gribaudo, 2006) è stata utilizzata come controllo delle PCR per escludere la presenza di inibitori o la degradazione dell'RNA. I prodotti di reazione sono stati separati attraverso corse elettroforetiche in gel di agarosio al 2% e visualizzati ai raggi UV dopo colorazione con etidio bromuro.

Per l'ibridazione *in situ*, campioni di calli embriogenici di Provinè sono stati raccolti a 4 mesi dall'inizio della coltura. Prima dell'inclusione in paraffina i calli sono stati inclusi in 3% agar per preservarne l'integrità morfologica. I protocolli seguiti per la fissazione e la disidratazione dei campioni, l'ottenimento di sezioni di 8 mm, l'ibridazione e l'analisi immunologica sono descritti in Gambino *et al.* (2011). Le sonde per la rilevazione di GYSVd-1 e HSVd sono state generate mediante trascrizione *in vitro* da sequenze precedentemente descritte (Navarro *et al.*, 2009). Il substrato cromogenico per la visualizzazione delle sonde ibridate era composto da nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato (NBT/BCIP), risultante in un precipitato blu visibile al microscopio ottico.

Risultati

Le analisi effettuate mediante RT-PCR sulle piante madri appartenenti a 4 cultivar di vite hanno evidenziato la presenza di entrambi i viroidi, in infezione mista con GFLV. I viroidi sono risultati presenti anche negli organi florali (antere e ovari) usati come espanti per l'allestimento delle colture embriogeniche, così

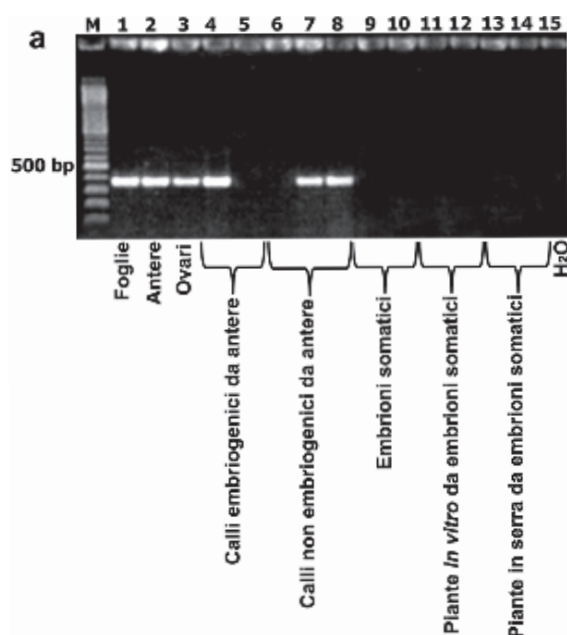
come nei calli di Provinè ottenuti, sia embriogenici che non-embriogenici, mentre le due specie di viroidi non sono state rilevate negli embrioni somatici differenziati dai calli dei 4 vitigni in studio (fig. 1 e tab. 1). Per escludere la possibilità che i risultati negativi di RT-PCR potessero essere dovuti a basse concentrazioni dei viroidi nelle piantine *in vitro*, le analisi sono state anche effettuate su piante di Provinè, Roussan e Cari derivanti da embrioni somatici e coltivate in serra per 3 anni: tutte le piante saggiate sono risultate esenti dai viroidi (fig. 1 e tab. 2). L'efficienza di risanamento dell'embriogenesi somatica è stata confrontata con quella della termoterapia *in vitro* applicata alla cultivar Roussan: i viroidi erano ancora presenti in tutte le linee di Roussan ottenute con termoterapia, sia durante la coltura *in vitro* che dopo 3 anni di coltivazione in serra (fig. 1b e tab. 2). Le stesse piante da termoterapia sono risultate invece risanate dal GFLV originariamente presente nelle piante madri.

Tab. 1 - Incidenza dell'infezione da viroidi in calli ed embrioni della cv Provinè.

Tab. 1 - Incidence of viroid infections during somatic embryogenesis from explants of cv Provinè.

	GYSVd-1 ^a	HSVd ^a
Callo non embriogenico da antere	6/8	6/8
Callo non embriogenico da ovari	9/10	10/10
Callo embriogenico da antere	3/5	3/5
Embrioni somatici	0/9	0/9

^a numero di campioni infetti / numero totale di campioni



La distribuzione spaziale dei viroidi nei calli in proliferazione della cv Provinè è stata analizzata mediante ibridazione *in situ*. La colorazione blu intenso ha evidenziato la presenza dell'RNA viroidale nelle sezioni di masserelle proembriogeniche ibridate con sonde RNA *full-length* per HSVd e GYSVd-1. La localizzazione dei segnali di ibridazione supporta la presunta localizzazione nucleare di questi viroidi. Cellule infette da GYSVd-1 sono state rilevate con maggior frequenza nelle parti esterne dei calli in pro-

Tab. 2 - Incidenza dell'infezione da viroidi in piante originate da embriogenesi somatica (ES) o termoterapia (T)

Tab. 2 - Incidence of viroid infections in plants generated by somatic embryogenesis (ES) or thermotherapy (T).

Cultivar	Metodo di risanamento	Piante saggiate	GYSVd-1 ^a	HSVd ^a
Provinè	ES	<i>In vitro</i>	0/33	0/33
		di 1 anno	0/1	0/1
		di 3 anni	0/8	0/8
Cari	ES	<i>In vitro</i>	0/16	0/16
		di 1 anno	0/7	0/7
		di 3 anni	0/10	0/10
Roussan	ES	<i>In vitro</i>	0/13	0/13
		di 1 anno	0/2	0/2
	T	di 3 anni	0/2	0/2
		<i>In vitro</i>	34/34	34/34
Nebbiolo	ES	di 3 anni	4/4	4/4
		<i>In vitro</i>	0/21	0/21

^a numero di campioni infetti / numero totale di campioni

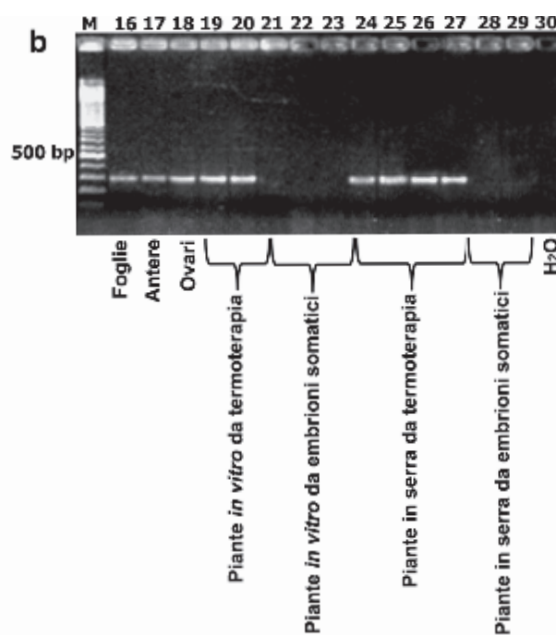


Fig. 1 - Analisi in gel di agarosio dei risultati dell'amplificazione mediante RT-PCR con primers specifici per GYSVd1 (a) e HSVd (b) su campioni delle cv Provinè (a) e Roussan (b) rispettivamente. M: 100 bp DNA ladder. Da Gambino *et al.*, 2011 (disponibile su www.springerlink.com).

Fig. 1 - Agarose gel analyses of RT-PCR assays with primers specific for GYSVd1 (a) and HSVd (b) performed on representative samples of cv Provinè (a) and Roussan (b) respectively. M: 100 bp DNA ladder. From Gambino *et al.*, 2011 (available at www.springerlink.com).

liferazione, mentre HSVd ha evidenziato una distribuzione più ampia nei calli esaminati. Nessun segnale di ibridazione era presente negli embrioni somatici individuabili all'interno dei calli, confermando i risultati delle analisi RT-PCR.

Discussione

I viroidi sono ampiamente presenti nelle viti coltivate (Little e Rezaian, 2003), anche in cloni virus-essenti. Le tecniche tradizionali di eradicazione dei virus (termoterapia e coltura di meristemi) si sono rivelate inadeguate nell'eliminazione dei viroidi dalle viti infette. Nonostante in passato sia stata riportata l'eradicazione di viroidi della vite mediante coltura di meristemi (Duran-Vila *et al.*, 1988), l'uso di saggi molecolari più avanzati ha rilevato la frequente presenza di viroidi in piante ottenute con questa tecnica (Wan Chow Wah e Symon, 1997). Anche la termoterapia è apparsa poco efficace nei confronti dei viroidi, come indicato già da Barlass *et al.* nel 1982 e confermato da nostri dati preliminari. L'embriogenesi somatica ha dato prova di avere una altissima efficienza nell'eradicazione dei virus della vite, siano essi floematici (Goussard *et al.*, 1991; Gambino *et al.*, 2006) che appartenenti al genere *Nepovirus* (Borrotto-Fernandez *et al.*, 2009; Gambino *et al.*, 2009), con percentuali di successo anche molto superiori rispetto a coltura di meristemi e termoterapia (Gribaudo *et al.*, 2006). Nel presente lavoro tutte le piante originate da embrioni somatici sono risultate esenti dai viroidi che infettavano le piante madri, indicando che l'efficienza di risanamento è sia estremamente alta che indipendente dalla cultivar. Oltre agli aspetti applicativi, questa capacità potrebbe risultare preziosa nell'ambito di studi sulle interazioni pianta-virus e pianta-viroidi in vite, studi che al momento sono limitati dai rischi di effetti sinergici o antagonistici tra virus e viroidi presenti nel materiale in studio e dalle difficoltà di disporre di materiale esente da questi patogeni.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano A. Schneider e F. Mannini per aver messo a disposizione le piante madri.

Riassunto

La rigenerazione mediante embriogenesi somatica si è dimostrata essere un metodo efficace nell'eliminare i più importanti virus della vite; la sua validità è stata quindi valutata anche per l'eradicazione di due viroidi ampiamente diffusi: *Grapevine yellow speckle*

viroid 1 (GYSVd-1) e *Hop stunt viroid* (HSVd). Le analisi effettuate mediante RT-PCR su 4 vitigni hanno evidenziato la presenza di entrambi i viroidi negli organi fiorali usati come espianti così come nei calli ottenuti, ma non negli embrioni somatici differenziati dai calli né nelle piante da essi originate. La distribuzione dei viroidi nei calli è stata analizzata mediante ibridazione *in situ*, dimostrandone, tra l'altro, la localizzazione nucleare.

Parole chiave: HSVd, GYSVd-1, *Vitis vinifera*, ibridazione *in situ*, risanamento.

La ricerca è stata in parte finanziata dalla Regione Piemonte (Progetto Tech4Wine) e dal Dipartimento Agroalimentare del CNR (Premio 2008 "A. Leone e D. Mariotti" per il co-finanziamento di ricerche di eccellenza nel settore Agroalimentare a F. Di Serio).

Bibliografia

- BARLASS M., SKENE K.G.M., WOODHAM R.C., KRAKE L.R., 1982. *Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture*. Annals of Applied Biology 101: 291-295.
- BORROTO-FERNANDEZ E.G., SOMMERBAUER T., POPOWICH E., SCHARTL A., LAIMER M., 2009. *Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous Vitis vinifera cv. Domina leads to Arabis mosaic virus-free plants*. Eur. J. Plant Path. 124: 171-174.
- DING, B., 2009. *The biology of viroid-host interactions*. Ann. Rev. Phytopath. 47: 105-131.
- DURAN-VILA N., JUAREZ J., ARREGUI J.M., 1988. *Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture*. Am. J. Enology and Viticulture 39: 217-220.
- EIRAS M., TARGON M.L.P.N., FAJARDO T.V.M., FLORES R., KITAJIMA E.W., 2006. *Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid doubly infecting grapevine in Brazil*. Fitopatologia Brasileira 31: 440-44.
- FLORES R., HERNÁNDEZ C., MARTÍNEZ DE ALBA A.E., DAROS J.A., DI SERIO F., 2005. *Viroids and viroid-host interactions*. Ann. Rev. Phytopath. 43: 117-139.
- GAMBINO G., BONDAZ J., GRIBAUO I., 2006. *Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine*. Eur. J. Plant Path. 114: 397-404.
- GAMBINO G., GRIBAUO I., 2006. *Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA internal control*. Phytopath. 96: 1223-1229.
- GAMBINO G., DI MATTEO D., GRIBAUO I., 2009. *Elimination of Grapevine fanleaf virus from three Vitis vinifera cultivars by somatic embryogenesis*. Eur. J. Plant Path. 123: 57-60.
- GAMBINO G., NAVARRO B., VALLANIA R., GRIBAUO I., DI SERIO F., 2011. *Somatic embryogenesis efficiently eliminates viroid infections from grapevines*. Eur. J. Plant Path. 130(4): 511-519.
- GARCIA-ARENAL F., PALLAS V., FLORES R., 1987. *The sequence of a viroid from grapevine closely related to severe isolates of Citrus exocortis viroid*. Nucleic Acids Res. 15: 4203-4210.
- GOUSSARD P.G., WIID J., KASDORF G.G.F., 1991. *The effectiveness of in vitro somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines*. South African J. Enology and Viticulture 12: 77-81.
- GRIBAUO I., GAMBINO G., VALLANIA R., 2004. *Somatic embryogenesis from grapevine anthers: identification of the optimal developmental stage for collecting explants*. Am. J. Enology and Viticulture 55: 427-430.

- GRIBAUDO I., GAMBINO G., CUOZZO D., MANNINI F., 2006. *Attempts to eliminate Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine clones*. J. Plant Path. 88: 293-298.
- KOLTUNOW A.M., KRAKE L.R., JOHNSON S.D., REZAIAN M.A., 1989. *Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently*. J. General Virology 70: 3411-3419.
- LITTLE A., REZAIAN M.A., 2003. *Grapevine viroids*. In: Viroids (A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles e J.S. Semancik Eds.), CSIRO Publishing (Collingwood, Australia): 195-206.
- MARTINELLI L., GRIBAUDO I., 2009. *Strategies for effective somatic embryogenesis in grapevine (Vitis spp.)*. An appraisal. In: Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology (K. Roubelakis-Angelakis Ed.), 2^a edizione, Springer (Dordrecht, NL): 461-493.
- NAVARRO B., PANTALEO V., GISEL A., MOXON S., DALMAY T., BISZTRAY G., DI SERIO F., BURGÁN J., 2009. *Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction*. PLoS One, 4: e7686. Doi:10.1371/journal.pone.0007686.
- POLIVKA H., STAUB U., GROSSH.J., 1996. *Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I*. J. General Virology 77: 155-61.
- REZAIAN M.A., 1990. *Australian grapevine viroid: Evidence for extensive recombination between viroids*. Nucleic Acids Res. 18: 1813-1818.
- SANO T., OHSHIMA K., UYEDA I., SHIKATA E., MESHİ T., OKADA Y., 1985. *Nucleotide sequence of grapevine viroid: A grapevine isolate of hopstunt viroid*. Proc. Japan Ac. 61B: 265-268.
- SZYCHOWSKI J.A., MCKENRY M.V., WALKER M.A., WOLPERT J.A., CREDİ R., SEMANCIK J.S., 1995. *The vein-banding disease syndrome: a synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus*. Vitis 34: 229-232.
- WAN CHOW WAH Y.F., SYMONS R.H., 1997. *A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples*. J. Virological Methods 63: 57-69.

Controllo delle batteriosi in germogli di calla

Grazia Marino^{1*}, Francesca Gaggia², Sara Barberini³ e Barbara Ruffoni³

¹Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

³CRA - FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

Control of bacteria development in shoot cultures of calla lily

Abstract. Bacterial contamination is a major problem for plant *in vitro* culture. *Melia azedarach* extracts and carnosic acid (AC, from *Salvia somalensis*) are investigated for their activity against bacterial isolates and contaminants of calla lily (*Zantedeschia aethiopica*) shoots, and for their effect on shoot growth. *Melia* extracts had a positive effect on plant growth at low concentrations, whereas high extract amounts (20 ml/100 ml medium) were phytotoxic. Ethanolic extracts of *Melia* seeds (SE) and fruit (pulp and skin, PE) showed a high antimicrobial activity on bacterial isolates. Moreover, PEE (10 ml/100 ml), obtained after ethanol evaporation from PE, strongly reduced bacteria development in the shoots, without causing phytotoxic effects. AC induced senescence and reduced root growth as its concentration increased. It exerted a strong growth inhibition in bacterial suspensions especially at 200 and 400 mg/l, and also had variable bacteriostatic effects at lower, non phytotoxic concentrations.

Key words: antimicrobial activity, carnosic acid, *Melia azedarach*, *Zantedeschia aethiopica*

Introduzione

La calla (*Zantedeschia aethiopica*) viene commercializzata prevalentemente per la produzione di fiore reciso. Tuttavia, alcuni genotipi a taglia ridotta sono stati recentemente selezionati per la produzione in vaso. La micropropagazione è stata inoltre sperimentata con successo per diverse varietà (Ruffoni *et al.*, 2009).

Le contaminazioni batteriche sono un grave problema per molte specie vegetali micropropagate con conseguenze economiche rilevanti. Gli antibiotici non sono sempre efficaci nel controllo delle batteriosi e sono talvolta fitotossici (Cassels, 1997). Estratti di

diversi tessuti di *Melia azedarach* hanno mostrato attività fungicida e battericida (Khan *et al.*, 2008; Marino *et al.*, 2009). E' inoltre nota l'attività antimicrobica di alcuni diterpeni, come l'acido carnosico, estratti da *Salvia* spp. (Ulubelen *et al.*, 2001).

Nel presente lavoro vengono valutati l'attività antimicrobica di estratti di *M. azedarach* e dell'acido carnosico ed il loro effetto sulla crescita *in vitro* di germogli di calla.

Materiali e metodi

Le colture di calla erano mantenute su un mezzo (ZP) con composizione base MS (Murashige and Skoog, 1962) e con 6-benzyladenina (BA) 3 mg/l; pH 5.65 prima della sterilizzazione (120 °C per 20 min). Le condizioni di coltura standard erano: 22±2 °C, fotoperiodo di 16 h a 28-30 mmol m⁻²s⁻¹ PAR (lampade Philips TLD 36 W/840).

I ceppi batterici utilizzati erano stati isolati in precedenza da diverse piante *in vitro*: Kk, Sp e Bc, rispettivamente *Kocuria kristinae*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Bacillus circulans* (Marino *et al.*, 2009); *Xanthomonas campestris* (Xc) e *Roseomonas gilardi* (Rg) (identificati con metodo BIOLOG[®], USA) e A17, in via di identificazione. I germogli sono stati inoculati per immersione della base in sospensioni di Sp, Bc, Kk e A17 in fase di crescita esponenziale (10⁶ cellule ml⁻¹) e subcoltivati tre volte in ZP.

Gli estratti di *Melia*, ottenuti da piante adulte di un clone micropropagato (Marino *et al.*, 2009), erano: FA, 40 g di foglie/100 ml di acqua distillata (pH 4,5); PA e PE (pH 5,5-6), da frutto (polpa più buccia) nella stessa proporzione peso/volume, rispettivamente in acqua o etanolo (ET-OH) al 50%; SA e SE (pH circa 6), da semi rispettivamente in acqua o Et-OH 50%. Un ulteriore estratto, PEE, è stato ottenuto per evaporazione di Et-OH da PE. L'attività antimicrobica rispetto agli isolati batterici Sp, Bc, Kk e A17 è stata saggiata mediante lo 'spot agar test' (Fleming *et al.*, 1985) in Plate Count Agar (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) dopo 24-48 h d'incubazione a 30 °C in

*grazia.marino@unibo.it

aerobiosi. In ogni Petri (92 mm; due repliche per ceppo batterico) sono stati posti tre campioni di ogni estratto (20 µl) non diluito e un controllo: acqua distillata con pH 4,5 (per FA) o pH 6 (per PA, PEE e SA) oppure soluzione di Et-OH al 50% con pH 5.5 (per PE ed SE).

L'acido carnosico (AC) è stato estratto da *Salvia somalensis* (Paris *et al.*, 2003), disciolto in Et-OH (1 g/100 ml) e aggiunto al mezzo liquido PGA (AC 50, 100, 200, 400 mg/l; 3 repliche per ceppo batterico e trattamento). La crescita delle sospensioni batteriche di Xc e Rg è stata valutata con un turbidimetro, ed espressa come percentuale rispetto ad un controllo non trattato (100% di crescita).

Alcuni estratti di *Melia* risultati attivi sui batteri sono stati aggiunti a ZP (0, 1, 5, 10 e 20 ml/100 ml) per valutarne l'effetto sui germogli. Peso (FW), lunghezza e proliferazione (PR) dei germogli sono stati misurati (6 germogli in provetta per dose) dopo 3-4 settimane di coltura. Nel caso di AC (0, 100, 200 e 400 mg/l ZP) sono stati valutati senescenza, altezza e percentuale di radicazione (3 vasi con 5 piante ciascuno).

L'attività antimicrobica di PEE (10 ml/100 ml ZP) è stata inoltre saggiata sui germogli contaminati. Campioni di tessuto provenienti da colture apparentemente prive di batteri dopo il trattamento (tre repliche per ceppo batterico) sono stati omogeneizzati in soluzione MS (1g FW/10 ml) ed il numero di 'colony forming units' (cfu g⁻¹ FW di tessuto) è stato determinato dopo 24-48 h a 30 °C (Marino *et al.*, 2009).

I dati relativi alla crescita dei germogli trattati con estratti di *Melia* e all'attività antimicrobica di AC sono stati sottoposti ad analisi della varianza in un disegno sperimentale completamente randomizzato e le medie sono state separate mediante il test di Duncan ($P \leq 0,05$). Il numero di cfu g⁻¹ ed i dati di accrescimento dei germogli trattati con AC sono invece riportati come medie \pm errore standard (ES).

Risultati e discussione

Gli estratti acquosi hanno avuto solo in certi casi un'attività batteriostatica. SE è risultato battericida verso tutti i ceppi. PE era battericida verso Kk e batteriostatico per Bc e A17. PEE è risultato battericida per gli stessi ceppi (tab. 1; fig.1a, b), probabilmente a causa della doppia concentrazione rispetto a PE, dopo evaporazione di Et-OH. AC ha inibito la crescita batterica di Xc in modo direttamente proporzionale all'incremento della concentrazione, mentre una spiccata inibizione di Rg si è avuta già a 50 mg/l (fig. 1c).

Gli estratti FA a 10 ml/100 ml, PE e PEE a 1 ml/100 ml hanno favorito la crescita dei germogli

(tab. 2). PE tuttavia ne ha causato l'ingiallimento a 10 ml/100 ml e la morte a 20 ml/100 ml, probabilmente a causa dell'Et-OH nell'estratto. Infatti PEE, ottenuto a seguito dell'evaporazione dell'etanolo, ha solo ridotto la crescita dei germogli (fig. 2a). D'altronde, anche la soluzione di Et-OH a 1 ml/100 ml ne ha migliorato la crescita, probabilmente a causa di un aumento di permeabilità delle membrane cellulari (Grunwald, 1968). AC ha indotto senescenza e inibizione della crescita dei germogli e delle radici all'aumentare della concentrazione, con una riduzione del 50% della percentuale di radicazione a 400 mg/l (fig. 2b).

Il trattamento con PEE ai germogli ha mostrato inoltre un chiaro effetto batteriostatico su Kk e Bc, mentre è risultato inefficace rispetto ad A17 (tab. 3).

Tab. 1 - Effetto dell'estratto acquoso di foglia (FA), estratti acquosi ed etanolic di seme (rispettivamente SA e SE) e di frutto (PA e PE) di *Melia azedarach*, e di PEE (ottenuto per evaporazione di Et-OH da PE) su differenti isolati batterici.

Tab. 1 - The effect of aqueous leaf extract (FA), aqueous and ethanolic seed (SA and SE, respectively) and fruit (PA and PE) extracts of *Melia azedarach*, and of PEE (obtained through Et-OH evaporation from PE) on different bacterial isolates.

Ceppi batterici	Estratti						Controlli	
	FA	SA	SE	PA	PE	PEE	Acqua	Et-OH
<i>K. kristinae</i>	- ^x	-	+	-	+	+	-	-
<i>S. paucimobilis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i>	+/-	-	+	-	+/-	+	-	-
A 17	-	-	+	+/-	+/-	+	-	-

^xAttività: +, battericida; +/-, batteriostatica; -, nessuna attività.

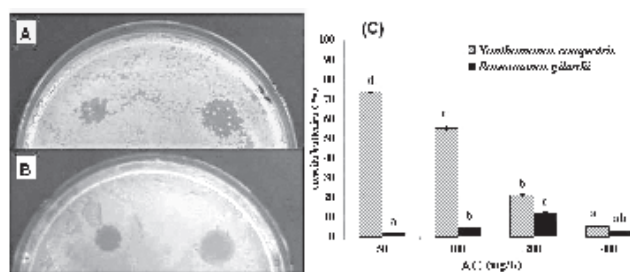


Fig. 1 - Attività antimicrobica degli estratti di frutto di *Melia azedarach*: A) la crescita di alcune colonie all'interno della zona d'inibizione mostra l'effetto batteriostatico di PE su *Bacillus circulans*; B) attività battericida di PEE rispetto a *Kocuria kristinae*. C) Attività batteriostatica dell'acido carnosico (AC) rispetto a *Xanthomonas campestris* e *Roseomonas gilardii* (per ogni ceppo batterico, separazione delle medie mediante test di Duncan, $P \leq 0,05$; le barre rappresentano gli ES).

Fig. 1 - Antimicrobial activity of fruit extracts of *Melia azedarach*: A) the growth of a few colonies inside the inhibition zone shows a bacteriostatic effect of PE against *B. circulans*; B) PEE bactericidal activity against *K. kristinae*. C) Bacteriostatic activity of carnosic acid (AC) against *Xanthomonas campestris* and *Roseomonas gilardii* (within each bacterial strain, mean separation by Duncan's test, $P \leq 0.05$; bars are SE).

Tab. 2 - Effetto dell'estratto acquoso di foglia (FA), dell'estratto etanolic di frutto (PE) di *Melia azedarach*, di PEE (ottenuto per evaporazione di Et-OH da PE) e della soluzione di Et-OH su peso (FW), lunghezza (LG) e proliferazione (PR) dei germogli di calla allevati su ZP (BA 3 mg/l).

Tab. 2 - The effect of the aqueous leaf extract (FA) and the ethanolic fruit extract (PE) of *Melia azedarach*, of PEE (obtained through Et-OH evaporation from PE) and of Et-OH solution on shoot fresh weight (FW), length (LG) and proliferation (PR) of calla lily grown in ZP medium (BA 3 mg/l).

Estratto (ml/100 ml)	FA ^X		PE ^X		PEE ^X			Et-OH sol. ^X	
	FW (g)	LG (mm)	FW (g)	LG (mm)	FW (g)	LG (mm)	PR	FW (g)	LG (mm)
0	0,29 b	28,7	0,29	26,5 b ^Y	0,72 ab	62,7 ab	2,0 b	0,56 b	50,7 bc
1	0,34 ab	41,0	0,58	48,0 a	0,88 a	68,2 a	3,0 a	0,82 a	77,2 a
5	0,30 b	28,5	0,48	41,7 ab	0,84 ab	58,5 ab	2,3 b	0,58 b	53,2 b
10	0,56 a	38,0	0,23	26,7 b	0,67 b	49,0 b	1,3 c	0,26 c	34,5 c
20	0,40 ab	29,7	morti	morti	0,43 c	34,5 c	1,0 c	morti	morti
P	≤0,05	ns	ns	≤0,05	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001

^XDati relativi a 6 germogli per tesi, allevati singolarmente in tubi da 26 mm, dopo 3 (FA e PE) e 4 (PEE ed Et-OH) settimane di coltura (PR per FA, PE ed Et-OH: non influenzata dalle concentrazioni). ^YSeparazione delle medie mediante test di Duncan ($P \leq 0,05$).

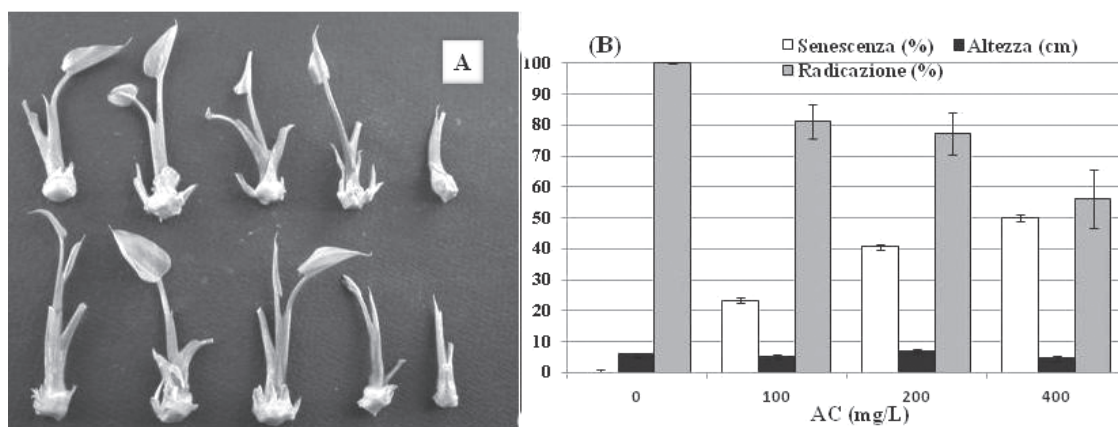


Fig. 2 - Effetto sulla crescita di germogli di *Zantedeschia aethiopica* di: A) estratto di frutto di *Melia azedarach* (da sinistra, 0, 1, 5, 10 e 20 ml/100 ml di mezzo ZP); B) di concentrazioni crescenti di acido carnosico (AC) estratto da *Salvia somalensis* (le barre rappresentano gli ES).
Fig. 2 - Effect on shoot growth of *Zantedeschia aethiopica* of: A) PEE fruit extract of *Melia azedarach* (from the left, 0, 1, 5, 10 e 20 mL/100 mL ZP medium); B) increasing concentrations of carnosic acid (AC) from *Salvia somalensis* (bars are SE).

Tab. 3 - Sviluppo delle colonie batteriche (cfu g⁻¹ FW) in tessuti di germogli contaminati di calla a fine terza subcoltura dopo trattamento con l'estratto PEE (10 mL/100 mL ZP) di frutti di *Melia azedarach*, a confronto con germogli contaminati, non trattati.

Tab. -. Colony forming units (cfu g⁻¹ fresh tissue) of contaminated shoots of calla lily at the end of the 3rd subculture after treatment with PEE extract (10 mL/100 mL ZP) of fruit of *Melia azedarach*, compared to contaminated, untreated shoots.

Ceppo batterico	Germogli non trattati	Germogli trattati con PEE
<i>K. kristinae</i>	70 ± 2,0 x 10E4 ^Y	4,6 ± 6,2 x 10E4
<i>B. circulans</i>	27 ± 2,1 x 10E4	7,0 ± 0,8 x 10E4
A17	34 ± 2,3 x 10E4	ND ^Z

^ZND, non determinato. I germogli visibilmente contaminati sono stati scartati.

Conclusioni

Il presente lavoro suggerisce un possibile utilizzo di estratti di *Melia azedarach* e dell'acido carnosico per il controllo delle batteriosi nella micropropagazione della calla. Sebbene debbano essere determinate le dosi ottimali dei trattamenti per le differenti specie

batteriche e le fasi di coltura dei germogli, vanno sottolineati il ridotto costo, il contenuto impatto ambientale e la limitata fitotossicità di questi composti.

Riassunto

L'attività antimicrobica di estratti di *Melia azedarach* e dell'acido carnosico (AC) è stata valutata su isolati batterici e su germogli di calla (*Zantedeschia aethiopica*) contaminati. Gli estratti etanolic di frutto (polpa più buccia, PE) e di semi (SE) di *M. azedarach* hanno mostrato attività battericida su diversi isolati batterici, tuttavia PE (20 ml/100 ml di mezzo) è risultato fitotossico. PEE (10 ml/100 ml, ottenuto per evaporazione dell'etanolo da PE) ha ridotto drasticamente lo sviluppo dei batteri nei germogli, mostrando ridotta tossicità. AC ha inibito efficacemente la crescita di sospensioni batteriche e, a concentrazioni elevate (400 mg/l), ha indotto parziale senescenza e inibizione dello sviluppo radicale.

Parole chiave: acido carnosico, attività antimicrobica, *Melia azedarach*, *Zantedeschia aethiopica*.

La ricerca è stata svolta nell'ambito del progetto VITROFLOR finanziato dal Mipaaf.

Bibliografia

- CASSELS A.C., 1997. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation - an overview*. In (Cassells, Ed.): *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers: 1-13.
- FLEMING H. P., ETCHELLS J. L., COSTILOW R. L., 1985. *Microbial inhibition by an isolate of Pediococcus from cucumber brines*. *Appl. Microbiol.*, 30: 1040-1042.
- GRUNWALD, G., 1968. *Effect of sterols on the permeability of alcohol-treated red beet tissue*. *Plant Physiol.*, 43: 484-488.
- KHAN, A.V., KHAN, A.A., SHUKLA, I. 2008. *In vitro antibacterial potential of Melia azedarach crude leaf extracts against some human pathogenic bacterial strains*. *Ethnobot. Leaf.*, 12: 439-445.
- MARINO G., GAGGIA F., SAIANO F., BIAVATI B., MARANGONI, B., 2009. *Elimination of bacterial contaminants in shoot cultures of 'MRS 2/5' plum hybrid by the use of Melia azedarach extracts*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 123: 195-205.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- PARIS A.B., RENKO M., TURK V., PUKI M., UMEK A., KORANT B.D., 1993. *Inhibitory effect of carnosic Acid on HIV1 protease in cell-free assays*. *J. Natural Products*, 56: 1426-1430.
- RUFFONI B., SAVONA M., PAMATO M., BREA M. 2009. *Il sistema ad immersione temporanea per la propagazione di gladiolo e zantedeschia*. *Italus Hortus*, 16 (2): 286-290.
- ULUBELEN A., OKSÜZ S., TOPCU G., GÖREN A.C., VOELTER W., 2001. *Antibacterial diterpenes from the roots of Salvia blepharochlaena*. *J. Natural Products*, 64 (4): 4: 549-551.

Marcatori di qualità del polline in cultivar commerciali pregiate di *Rosa hybrida* L.

Anca Macovei¹, Alberto Valassi¹, Annalisa Giovannini², Fulvio Dente², Daniela Carbonera¹ e Alma Balestrazzi^{1*}

¹ Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Pavia

² CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

Markers of pollen quality in valuable commercial cultivars of *Rosa hybrida* L.

Abstract. From the economical point of view, the roses (*Rosa* spp.) are one of the most important ornamental flowers due to their beauty, attractiveness and various uses. Although roses have been cultivated for thousands of years, the breeding programs aim at developing new desirable modern cultivars. Roses breeding programs are mostly focused on the quality of pollen from valuable cultivars. It is well documented the fact that pollen vitality and vigor varies from species to species and is dependent on the conditions used for conservation. In this study, 14 different rose cultivars, kindly provided by NIRP International, were used for identifying proper markers for pollen vigor in order to implement conservation protocols.

Key words: pollen, conservation, ROS, *Rosa hybrida*.

Introduzione

La rosa costituisce sicuramente il più importante prodotto nell'ambito del mercato del fiore reciso, su scala globale. Nel 2008 questo prodotto ha rappresentato, nel sistema delle aste olandesi, un valore pari a 728.647.000 €, corrispondente al 30,35 % del valore economico totale del fiore reciso. Per quanto riguarda la costituzione varietale, l'Italia risulta essere al quinto posto con 82 private comunitarie per nuove varietà, dopo la Danimarca (334), la Germania (288), l'Olanda (252), la Francia (189) e la Gran Bretagna (132) (Gudin, 2000). Le rose attualmente coltivate, essendo il frutto di una serie molto complessa di ibridazioni interspecifiche tra individui provenienti da centri di differenziamento anche molto lontani, sono caratterizzate da un alto livello di eterozigosi. Le principali pratiche per la creazione varietale, derivate essenzialmente dall'ibridazione (incrocio intervarietale

e interspecifico), si basano sulla propagazione per seme. Esistono tuttavia problemi legati alla germinazione non omogenea a cui si associano i bassi livelli di successo tra specie e cultivar, limitando così l'utilizzo della propagazione per seme (Alp *et al.*, 2009).

L'interesse dei breeders che operano sulle rose è rivolto al polline delle varietà più pregiate che può essere raccolto, conservato e poi opportunamente utilizzato. I granuli di polline devono essere quindi conservati per lunghi periodi di tempo senza che si verifichi un calo significativo di vitalità ed è noto che la longevità del polline varia a seconda della specie e delle condizioni di conservazione (Dafni e Firmage, 2000; Pipino *et al.*, 2011). Numerosi studi indicano che durante la germinazione, il granulo pollinico produce specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e ossido nitrico (NO), che svolgono un ruolo noto come molecole segnale (Speranza *et al.*, 2011; Smirnova *et al.*, 2009; Bright *et al.*, 2009). È stato dimostrato che il perossido di idrogeno (H₂O₂) è coinvolto nell'interazione tra polline e stigma (McInnis *et al.*, 2006), mentre l'ossido nitrico svolge un ruolo importante nella crescita del tubetto pollinico (Prado *et al.*, 2011). Tuttavia, il livello e il ruolo di ROS ed NO nel granulo di polline inattivo non sono ancora stati elucidati.

L'obiettivo di questo lavoro è stata l'identificazione di marcatori di qualità del polline di rosa allo scopo di definire un protocollo ottimizzato per la conservazione del polline.

Materiali e metodi

Il materiale vegetale, costituito da fiori di 14 cultivar pregiate di *Rosa hybrida* L. (Alba, Aubade, Clipper, Dolphin, Encanto, Green Fashion, Golden Fashion, Marvelle, New Fashion, Peach Aubade, Swan, Touch of Class, Variance, Whisper), è stato fornito dalla Ditta N.I.R.P. International (Bevera di Ventimiglia, IM).

Il test di vitalità è stato effettuato incubando 1 mg di polline di ciascun genotipo con una soluzione con-

* alma.balestrazzi@unipv.it

tenente il colorante 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TCC) all'1% (Sigma-Aldrich) al buio a temperatura ambiente per 12 ore (Koti *et al.*, 2005). La capacità di germinazione del polline è stata valutata *in vitro* su terreno PGM (15% saccarosio, 1,2% agarosio, 0,01% H₃BO₃, 0,01% Ca(NO₃)₂, pH 5,6) (Ercisli, 2007). Le analisi sono state effettuate in triplicato e 100 granuli di polline sono stati contati per ciascuna replica. La vitalità assoluta del polline è stata calcolata utilizzando la seguente formula (Visser *et al.*, 1977):

$$APV = \frac{(\% \text{ polline vitale} \times \% \text{ polline germinato})}{100}$$

La produzione di H₂O₂ e NO nei granuli pollinici di rosa è stata monitorata utilizzando i fluorocromi DCHF-DA (diclorofluoresceina diacetato) e DAF-DA (diaminofluoresceina diacetato) (Sigma-Aldrich). Aliquote (1 mg) di polline fresco sono state incubate con DCHF-DA (10 µM) e DAF-DA (10 µM) al buio a temperatura ambiente per 30 min. I valori sono stati misurati utilizzando il canale fluorimetrico a lunghezza d'onda $\lambda = 517$ nm con un Rotor-Gene 6000 PCR apparatus (Corbett Robotics, Brisbane, Australia). I dati numerici sono stati sottoposti ad analisi statistica con l'approccio Student's *t*-test.

Risultati e discussione

Vitalità e germinabilità del polline di cultivar pregiate di Rosa hybrida

Sono state valutate la vitalità e la capacità di germinazione del polline fresco raccolto da 14 cultivar pregiate di *Rosa hybrida* L. Nella tabella 1 sono riportati i risultati dei test di vitalità e germinabilità, insieme ad una analisi quantitativa relativa del polline dei 14 genotipi di rosa. In base alla quantità di polline prodotto dalle singole cultivar, si sono differenziate 3 classi: genotipi a bassa quantità di polline (Aubade, Clipper, Marvelle), con quantità media di polline (Alba, Green Fashion, Peach Aubade, Variance, Whisper) e ad alta quantità di polline (Dolphin, Encanto, Golden Fashion, New Fashion, Swan, Touch of Class). Nei 14 genotipi analizzati, il livello di vitalità varia tra 30,2% (Clipper) e 83,3% (Dolphin), mentre la percentuale di germinabilità varia tra 7,3% (Clipper) e 49% (Dolphin). Inoltre, combinando i dati di vitalità e germinabilità, è stata calcolata la vitalità assoluta del polline, compresa tra un valore minimo di 2,1% (Clipper) ed un valore massimo di 40,6% (Dolphin). Le analisi effettuate hanno permesso di individuare genotipi caratterizzati da polline ad alta vitalità (Dolphin 40,6%, Swan 37,1%, Golden Fashion 33,9%, Alba 32,2%) e genotipi con polline a

bassa vitalità (Clipper 2,1%, Marvelle 3,9%, Peach Aubade 7,0%, Variance 9,0%).

Produzione di perossido di idrogeno e ossido nitrico nel polline di Rosa hybrida L.

Il ruolo di H₂O₂ e NO nella crescita del tubetto pollinico è stata già dimostrata, tuttavia la presenza di queste molecole nel granulo di polline inattivo è tuttora poco esplorata. In questo studio si è valutata la possibilità di utilizzare H₂O₂ e NO come marcatori di vitalità del polline di rosa. Nella figura 1 sono riportati i risultati di queste analisi. Per quanto riguarda il livello di H₂O₂ si osserva una distribuzione pressochè uniforme nei 14 genotipi di rosa analizzati. Il genotipo Aubade, caratterizzato da una bassa vitalità del polline, presenta un livello più elevato di H₂O₂, mentre il genotipo Green Fashion, caratterizzato da un'elevata vitalità del polline, presenta un livello inferiore di H₂O₂. In questo caso, si potrebbe ipotizzare una correlazione negativa tra i livelli di H₂O₂ e la vitalità del polline. L'analisi dei livelli di NO ha rivelato un pattern differente. In questo caso, i genotipi caratterizzati da un'alta vitalità del polline (Dolphin, Swan) presentano un basso contenuto di NO, mentre quelli caratterizzati da una bassa vitalità del polline (Variance, Marvelle) mostrano un alto contenuto di NO. Risulta dunque evidente una correlazione negativa tra la vitalità del polline e l'accumulo di NO. Questi risultati sembrano in accordo con quanto riportato in letteratura, essendo stato ipotizzato da alcuni autori che livelli troppo ele-

Tab. 1 - Risultati dei test di vitalità e germinabilità del polline dei 14 genotipi di *Rosa hybrida*; analisi effettuate in triplicato e 100 granuli di polline sono stati contati per ciascuna replica.

Tab. 1 - Results of viability and germination tests in pollen of 14 genotypes of *Rosa hybrida*; analyses were performed in triplicate and 100 pollen grains were counted for each replicate.

Genotipo	Quantità	Vitalità (%)	Germinabilità (%)	AP (%)*
Alba	Media	72,2 ± 6,2	44,1 ± 9,4	32,2 ± 8,0
Aubade	Bassa	80,3 ± 8,8	14,5 ± 2,3	11,7 ± 2,3
Clipper	Bassa	30,2 ± 4,4	7,3 ± 2,9	2,1 ± 0,7
Dolphin	Alta	83,3 ± 7,6	49,0 ± 3,7	40,6 ± 0,6
Encanto	Alta	77,1 ± 11,8	26,5 ± 10,5	21,3 ± 11,6
Green Fashion	Media	70,5 ± 4,8	44,6 ± 8,0	31,2 ± 3,5
Golden Fashion	Alta	72,3 ± 5,7	47,0 ± 2,0	33,9 ± 1,3
Marvelle	Bassa	42,7 ± 3,2	9,2 ± 1,3	3,9 ± 0,5
New Fashion	Alta	75,4 ± 10,1	26,8 ± 2,2	20,0 ± 1,3
Peach Aubade	Media	47,0 ± 6,1	14,8 ± 3,1	7,0 ± 2,0
Swan	Alta	81,2 ± 8,5	46,4 ± 11,2	37,1 ± 5,7
Touch of Class	Alta	76,5 ± 10,0	27,1 ± 9,8	21,4 ± 10,5
Variance	Media	63,1 ± 8,2	14,1 ± 2,5	9,0 ± 2,6
Whisper	Media	81,7 ± 2,9	27,3 ± 2,4	22,3 ± 2,2

* Vitalità assoluta del polline (APV) = (% polline vitale x % polline germinato)/100.

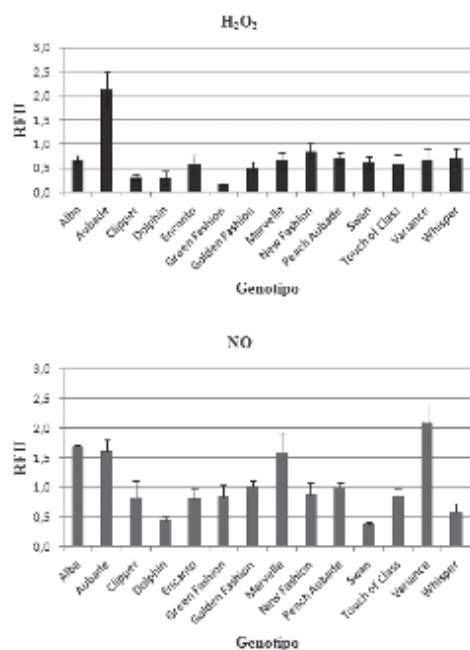


Fig. 1 - Livelli di H₂O₂ e NO nei granuli pollinici di 14 cultivar di *Rosa hybrida*. Le analisi sono state effettuate in triplicato. RFU – Relative Fluorescence Units.

Fig. 1 - Levels of H₂O₂ and NO in pollen grains of 14 cultivars of *Rosa hybrida*. Analyses were performed in triplicate. RFU – Relative Fluorescence Units.

vati di H₂O₂ e NO possono inibire la germinazione del polline (Prado et al., 2004; He et al., 2006).

Conclusioni

Nel presente studio è stato possibile individuare genotipi di *Rosa hybrida* L. caratterizzati da polline ad alta vitalità (Dolphin, Swan, Alba, Golden Fashion) e genotipi dotati di polline a bassa vitalità (Clipper, Marvella, Peach Aubade, Variance). L'analisi dei livelli di ROS e NO hanno dimostrato che queste molecole possono essere utilizzate come marcatori della vitalità del polline di rosa. Sulla base di queste informazioni, ROS e NO saranno monitorati nel polline di rosa per periodi di tempo prolungati, allo scopo di definire protocolli ottimizzati per la conservazione del polline, progettati *ad hoc* per i singoli genotipi. I marcatori di qualità del polline analizzati in questo studio potranno essere utilizzati per applicazioni pratiche nell'ambito dei programmi di *breeding*.

Riassunto

Tra le colture di interesse ornamentale, la Rosa ha una grande importanza da punto di vista economico e produttivo, sia al livello internazionale, sia locale. Sebbene la rosa sia stata coltivata per migliaia di anni, le attività per il miglioramento genetico proseguono

per sviluppare nuove cultivar di interesse commerciale. L'interesse dei breeders che operano sulle rose è rivolto al polline delle varietà più pregiate, che deve essere raccolto, conservato e opportunamente utilizzato. Poiché la longevità del polline varia a seconda della specie e delle condizioni di conservazione, sono necessari studi *ad hoc* per ottimizzare i protocolli per la conservazione. In questo studio si è proceduto all'analisi del polline di 14 cultivar pregiate di *Rosa hybrida* L. fornite dalla Ditta N.I.R.P. International (Ventimiglia, IM), allo scopo di individuare marcatori adatti a monitorare la qualità del polline e utili per la messa punto dei protocolli di conservazione.

Parole chiave: polline, conservazione, ROS, *Rosa hybrida*.

Bibliografia

- ALP S., CELIK F., TÜRKÖĞLU N., KARAGÖZ S., 2009. *The effects of different warm stratification periods on the seed germination of some Rosa taxa*. Afr. J. Biotechnol. 8 (21): 5838-5841.
- BRIGHT J., HISCOCK S.J., JAMES P.E., HANCOCK J.T., 2009. *Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses*. Plant Phys. Biochem. 47: 49-55.
- DAFNI A., FIRMAGE G., 2000. *Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications*. Plant Syst. Evol. 222: 113-132.
- ERCISLI S., 2007. *Determination of pollen viability and in vitro pollen germination of Rosa dumalis and Rosa villosa*. Bangladesh J. Bot. 36 (2): 185-187.
- GUDIN S., 2000. *Rose: genetics and breeding*. Plant Breeding 17: 159-189.
- HE J.M., LIU Z.H., XU H., SHE X.P., HUANG C., 2006. *The involvement of hydrogen peroxide in UV-B inhibited pollen germination and tube growth of Paeonia suffruticosa and Paulownia tomentosa in vitro*. Plant Growth Regul. 49: 199-208.
- KOTI S., REDDY K.R., REDDY V.R., KAKANI V.G., ZHAO D., 2005. *Interactive effects of carbon dioxide, temperature and ultraviolet-B radiation on soybean (Glycine max L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination and tube lengths*. J. Exp. Bot. 56 (412): 725-736.
- MCINNIS S.M., DESIKAN R., HANCOCK J.T., HISCOCK S.J., 2006. *Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signaling crosstalk?*. New Phytol. 172: 221-228.
- PIPINO L., VAN LABEKE M.C., MANSUINO A., SCARIOT V., GIOVANNINI A., LEUS L., 2011. *Pollen morphology as fertility predictor in hybrid tea roses*. Euphytica 178: 203-214.
- PRADO A.M., COLAÇO R., MORENO N., SILVA A.C., FEIJÓ J.A., 2011. *Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling*. Mol. Plant 1 (4): 703-714.
- PRADO A.M., POTERFIELD M.D., FEIJÓ J.A., 2004. *Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes*. Development 131: 2707-2714.
- SMIRNOVA A.V., MATVEYEVA N.P., POLESSKAYA O.G., YERMAKOV I.P., 2009. *Generation of reactive oxygen species during pollen grain germination*. Russ. J. Dev. Biol. 40 (6): 345-353.
- SPERANZA A., CRINELLI R., SCOCCIANTI V., GEITMANN A., 2011. *Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit*. Plant Biol. doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00479.x
- VISSER T., DE VRIES D.P., SCHEURINK J.A.M., WELLES G.W., 1977. *A hybrid tea rose pollen. II. Inheritance of pollen viability*. Euphytica 26: 721-728.

Rilevamento di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* durante la micropropagazione di actinidia modificando la composizione del substrato di crescita

Oriano Navacchi^{1*}, Giuseppe Zuccherelli¹ e Umberto Mazzucchi²

¹ Vitroplant Italia, Cesena

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* during actinidia micropropagation following modification of the growing medium composition

Abstract. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) is the causal agent of bacterial cancer of actinidia. This bacterial disease is a great cause of concern for growers, traders and Plant Protection Services, in Italy and abroad. Infections of Psa can be localized or systemic. In systemic infections the pathogen can asymptotically colonize the parenchyma and vascular tissues of shoots, branches and trunks. Bacterial cells, present in systemically infected tissues removed from asymptomatic mother plants, may be transferred with explants to *in vitro* cultures of actinidia. If the growing medium is unsuitable for bacterial growth, the presence of Psa may not be visible. In this study ambivalent media were developed to promote the growth of bacteria and plantlets. Yeast extract (0.02 %) and different concentrations of peptone or casamino acids or proteose peptone 3 were added to a modified Murashige and Skoog's medium to promote bacterial growth. The best results were obtained with intermediate concentrations of ambivalent media. The highest concentrations had unfavorable effects. After 20 days the plantlets grown on media containing casamino acids and proteose peptone 3, with 0.05 % concentration, were indistinguishable from those grown on the control medium without bacterial growth promoters. The use of appropriate ambivalent media makes it possible to select the plantlet jars, with visual inspection, and thus prevent spreading of Psa. At the end of the cycle, during greenhouse acclimatization, the absence of Psa in plants must be checked with visual inspections and bacteriological analyses.

Key words: tissue culture, Psa, bacterial canker.

Introduzione

Focolai e scoppi epidemici di cancro batterico della actinidia causato da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) sono stati segnalati in Lazio, Emilia Romagna, Piemonte e Veneto su varietà di *Actinidia deliciosa* Pl. (Kiwi verde) e *A. chinensis* (Kiwi giallo) (Antoniacci, 2011). La batteriosi è oggetto di grande attenzione da parte di frutticoltori, commercianti e Servizi Fitosanitari (Contini, 2011).

Nel ciclo di Psa si distinguono una fase epifita e una fase endofita. In fase epifita si ammette che il batterio possa moltiplicarsi e sopravvivere nella fillosfera e gemmisfera di piante asintomatiche. La fase endofita è conseguente ad inoculazioni attraverso stomi, lenticelle, micro- e macro-ferite, incluse quelle di raccolta dei frutti e caduta delle foglie. La fase endofita è associata ad infezioni localizzate e a infezioni sistemiche. Le infezioni localizzate danno luogo a maculature fogliari e/o a cancri corticali. L'evidenza sperimentale indica che dalle maculature e dai cancri i batteri possono colonizzare progressivamente parenchimi e/o tessuti conduttori, traslocando a distanza entro l'ospite, dando luogo ad infezioni sistemiche.

Le infezioni sistemiche possono essere sintomatiche o asintomatiche. Le infezioni sistemiche gravi possono causare avvizzimenti di branche o di intere piante, più spesso poco dopo la ripresa vegetativa o nelle settimane successive, associati a vistosi flussi rossastri. L'evoluzione sintomatica delle infezioni sistemiche pare condizionata da temperature autunno-invernali favorevoli da un lato alla moltiplicazione dei germi endofiti di Psa, dall'altro lato dalla inefficacia temporanea delle risposte di difesa della pianta. Come per altre popolazioni di *P. syringae* patogene per ospiti arborei, si ammette che Psa possa albergare come endofita in piante asintomatiche in pieno campo anche per apprezzabili periodi di tempo (Agrios, 2005; Minardi, com. pers.); nel caso dell'actinidia si ammette che piante alberganti germi di Psa in varie parti possano non esprimere la malattia e rimanere asintomatiche.

* info@vitroplant.it

che; d'altra parte *P. syringae* è stato trovato come endofita in plantule di *Prunus* allevate *in vitro* (Kamoun *et al.*, 1998). Infezioni sistemiche di piante madri espongono i vivaisti al grave rischio di disseminare il patogeno prelevando loro tessuti da usare come espianti nella propagazione *in vitro*, in particolare gemme e tratti apicali di germogli. Le plantule cresciute *in vitro* da espianti alberganti il batterio possono pertanto fungere da sorgenti di inoculo e mezzi di disseminazione. A metà del secolo scorso per prevenire la disseminazione di *Pseudomonas caryophylli* agente del cancro del garofano, il danese Hellmers (1958) applicò con successo la strategia di immergere la base dei getti laterali asportati dalle piante madri in tubi di brodo favorevole alla crescita del batterio e di selezionare per la propagazione i getti mostranti assenza di crescita batterica. Analoga strategia è applicabile per la selezione di espianti o di plantule di actinidia all'inizio o durante la propagazione *in vitro* in modo da produrre plantule verosimilmente esenti da Psa.

In questo lavoro si è cercato di mettere a punto un substrato ambivalente favorevole sia alla normale crescita delle plantule di actinidia che di Psa in modo da poter selezionare plantule esenti da Psa (e da altri batteri) mediante semplici controlli visivi dei vasi d'allevamento.

Materiali e metodi

Colture batteriche

È stato usato il ceppo virulento P19 di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolato nel 2010 da *A. deliciosa* a Marzeno (RA) in Emilia-Romagna, allevato di routine su strisci di YDC-agar per 24 ore a 27 °C. Il ceppo è crioconservato nella collezione del laboratorio di fitobatteriologia del DiSTA alla Università di Bologna.

Substrato ambivalente di crescita

Come substrato di base è stato usato quello di Murashige e Skoog (MS) (1962) per quanto riguarda macroelementi, microelementi e vitamine addizionato con: IAA (Indol Acetic Acid) 0,2 mg/l, BA (Benzyl adenine) 2,5 mg/l, saccarosio 25 g/l, glucosio 5g/l, agar-agar (S 1000 B&V Parma) 15 g/litro. Il pH è stato regolato a 5,8 prima della sterilizzazione in autoclave. Il substrato base (K15) è stato usato come controllo e per creare una serie di varianti con l'aggiunta di stimolatori di crescita batterica. A tutte le varianti è stato aggiunto estratto di lievito (Biolife) allo 0,020% (p/v). Per ottenere i differenti substrati sperimentali al substrato di base addizionato di estratto di lievito sono state aggiunte (p/v) singole sorgenti di amminoacidi

(BDWorldwide, Usa, www.bd.com) a concentrazioni crescenti:

- Bacto Peptone: K2 0,01%, K3 0,05%, K4 0,10%, K5 0,50 %.
- Casamino Acids: K6 0,01%, K7 0,05%, K8 0,10%, K9 0,15% (p/v).
- Proteose Peptone 3: K10 0,01%, K11 0,05%, K12 0,50%, K13 1 %.

La sterilizzazione dei substrati è stata fatta a 121°C per 20 min. in bottiglie da 500 ml. I diversi substrati sterilizzati sono stati versati in capsule Petri aventi 140 mm di diametro (circa 50 ml cadauna).

Conteggio e misura delle colonie batteriche

Cellule di 24 h di Psa sono state sospese in acqua distillata sterile fino ad ottenere tre sospensioni aventi una A_{660} di 0,105 misurata allo spettrofotometro. Di ogni sospensione è stata fatta una serie di diluizioni decimali in acqua distillata sterile. Per inseminare le piastre dei quattro substrati con aggiunta della stessa sorgente di amminoacidi sono state usate le diluizioni della stessa sospensione iniziale.

Aliquote di 20µl di ogni diluizione sono state insemminate su punti predefiniti del substrato agarizzato nelle Petri. Dopo l'inseminazione le piastre sono state incubate a 25 °C per 7 giorni. Il conteggio delle colonie (Unità Formanti Colonia; UFC) è stato fatto dopo sei giorni. Dopo 7 giorni è stato misurato (mm) il diametro. La misura è stata fatta su colonie singole, cresciute ben separate dalle altre dalla inseminazione della diluizione 10^{-5} , la stessa usata per il conteggio.

Allevamento *in vitro* delle plantule

Plantule di *A. deliciosa* var. Hayward, clone K5 Vitroplant, a crescita stabilizzata *in vitro*, sono state allevate sui substrati K5, K7, K8, K11, K12 e K15, già usati per la crescita batterica, riducendo la concentrazione di agar a 6 g/l (substrati semisolidi). Il substrato K15 senza attivatori di crescita batterica è stato usato come controllo. L'allevamento è stato fatto entro vasi di vetro da 500 ml, avvolti da pellicola pvc trasparente di 12 µm di spessore, a 25 °C con fotoperiodo di 16 h a 3.000 Lux.

Dalle plantule nel corso dell'allevamento e dopo 20 giorni sono stati valutati visivamente le intensità di tre caratteri: grado di proliferazione, numerosità degli apici vegetativi e presenza di giallumi. Per le classi di intensità si è fatto riferimento a una scala da 0 a 3, attribuendo alla classe 3 lo stato ottimale delle plantule sul substrato K15 (abbondante proliferazione e sviluppo di apici vegetativi in assenza di giallumi) e a 0 rispettivamente assenza di proliferazione e di sviluppo di apici vegetativi e presenza di giallumi marcati.

Crescita sui substrati K7 e K11

Dopo due settimane di allevamento sui substrati K7 e K11, al colletto delle plantule di ogni vaso sono stati aggiunti 20µl di una sospensione acquosa del ceppo P19 contenente circa 100 UFC. Dopo 7 giorni a 25 °C la crescita del batterio osservata visivamente è stata confermata mediante re-isolamento e identificazione (Rees-George *et al.*, 2010).

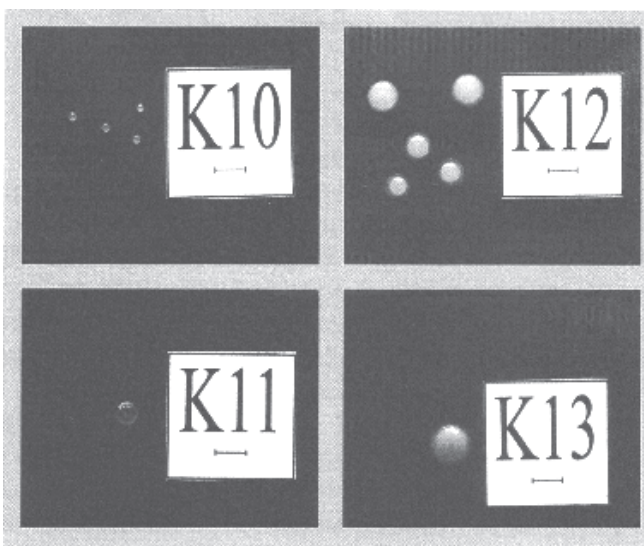
Statistica

Per le misure dei diametri delle colonie di ogni substrato è stata eseguita l'analisi della varianza e l'elaborazione grafica usando il programma Statgraphic Plus 2.1.

Risultati

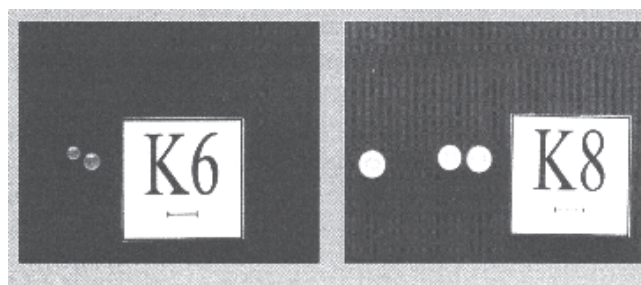
Nel substrato di controllo senza stimolatori di crescita batterica (K15) non c'è stata alcuna crescita del ceppo P19 di Psa. Il substrato di base è stato usato per preparare 12 varianti (K2-K13), quattro per ognuna delle tre sorgenti di amminoacidi. La crescita è risultata lenta in tutti i substrati (figg. 1, 2).

Per il Peptone la media dei conteggi di UFC è risultata $5,22 \times 10^7$ UFC/ml. Poche occasionali colonie si sono sviluppate dalla diluizione 10^{-6} , in media 1,5 UFC per 20 µl. Le medie dei diametri sono mostrate negli istogrammi di figura 3A. Le tre concentrazioni



Proteose Peptone 3

Fig. 1 - Colonie singole di Psa cresciute a 25 °C per 7 giorni sul substrato MS modificato con aggiunta di estratto di lievito e quattro concentrazioni crescenti di Proteose Peptone 3. Si noti la elevazione umbonata delle colonie. Segmento di scala = 5mm.
Fig. 1 - Single colonies of Psa grown at 25° C for 7 days on the MS modified medium with the addition of yeast extract and four increasing concentrations of Proteose Peptone 3. Note the umbonate elevation of the colonies. Scale bar = 5mm.



Casamino Acids

Fig. 2 - Colonie singole di Psa cresciute a 25° C per 7 giorni sul substrato modificato di Murashige e Skoog con aggiunta di estratto di lievito e due concentrazioni crescenti di Casamino Acids.

Segmento di scala = 5mm

Fig. 2 - Single colonies of Psa grown at 25° C for 7 days on the modified Murashige and Skoog's medium with the addition of yeast extract and two increasing concentrations of Casamino Acids. Scale bar = 5mm.

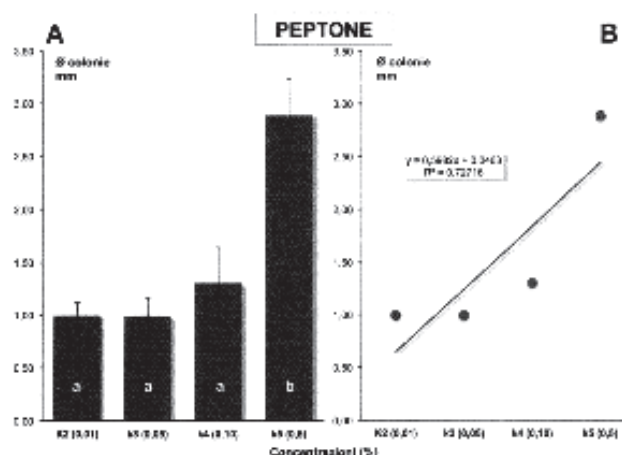


Fig. 3 - Diametro medio delle colonie cresciute a 25° C per 7 giorni sul substrato MS modificato con aggiunta di estratto di lievito e quattro concentrazioni crescenti di peptone (A). Incremento di diametro medio delle colonie all'aumentare della concentrazione di peptone (B).

Fig. 3 - Average diameter of the colonies grown at 25° C for 7 days on the modified MS medium with the addition of yeast extract and four increasing concentrations of Peptone (A). Increase in average diameter of the colonies in relation to the increase in Peptone concentration (B).

più basse (0,01; 0,15 e 0,1%) hanno dato luogo a colonie di diametro non differenti tra loro, ma significativamente inferiore solo a quello della concentrazione più alta (0,5%). L'incremento dei diametri in funzione delle concentrazioni è mostrato nel grafico di figura 3B. L'incremento è risultato crescente all'aumentare della concentrazione con andamento più che lineare in prossimità della concentrazione più alta.

Per il Casamino Acids la media dei conteggi delle UFC è risultata $10,3 \times 10^7$ UFC/ml. Poche le colonie sviluppate dalla diluizione 10^{-6} , in media 2,5 UFC per 20 µl. Le medie dei diametri sono mostrate negli istogrammi di figura 4A. Le differenze tra le medie sono risultate significative tra le concentrazioni 0,1 e

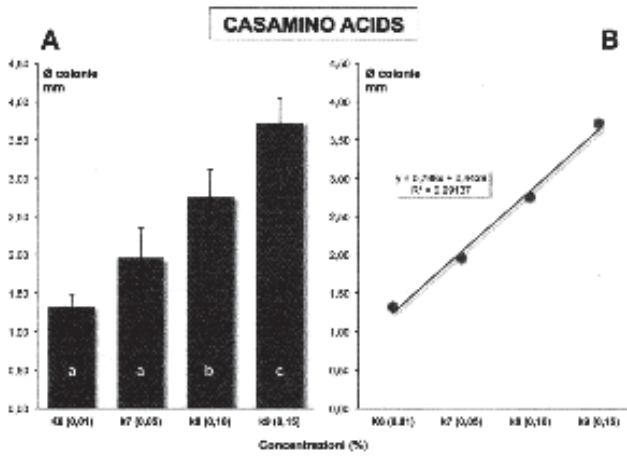


Fig. 4 - Diametro medio delle colonie cresciute a 25° C per 7 giorni sul substrato MS modificato con aggiunta di estratto di lievito e quattro concentrazioni crescenti di Casamino Acids (A). Incremento di diametro medio delle colonie all'aumentare della concentrazione di Casamino Acids (B).

Fig. 4. Average diameter of the colonies grown at 25° C for 7 days on the modified MS medium with the addition of yeast extract and four increasing concentrations of Casamino Acids (A). Increase in average diameter of the colonies in relation to the increase in Casamino Acids concentration (B).

0,15%, ma non tra 0,01 e 0,05%. Le due concentrazioni 0,01 e 0,05% hanno dato luogo a colonie di diametro significativamente inferiore alle concentrazioni 0,1 e 0,15%. L'incremento dei diametri delle colonie in funzione delle concentrazioni è mostrato nel grafico di figura 4B. L'incremento è stato crescente in modo lineare.

Per il Proteose Peptone 3 la media dei conteggi delle UFC è risultata $4,15 \times 10^7$. Rare le colonie sviluppate dalla diluizione 10^{-6} , in media 1,4 UFC per 20 µl. Le medie dei diametri sono mostrate negli istogrammi di figura 5A. Le differenze tra le medie sono risultate significative tra la coppia di concentrazioni più basse (0,01 e 0,05%) e la coppia delle più alte (0,5 e 1,0%), ma non entro le coppie. L'incremento dei diametri in funzione delle concentrazioni è mostrato nel grafico di figura 5B. L'incremento è risultato crescente in modo lineare.

Dopo avere comparato la crescita di Psa nelle 12 varianti del substrato di base, cinque sono state scelte per svolgere prove di crescita di plantule di actinidia *in vitro*. I risultati delle valutazioni del comportamento delle plantule sui 5 substrati nel corso dell'allevamento e dopo 20 giorni sono mostrati in tabella 1. Le plantule hanno mostrato sviluppo ottimale associato a buon grado di proliferazione, numerosi apici vegetativi e assenza di giallumi sul substrato K15 di controllo. Nei substrati K7 e K11 il comportamento delle plantule è risultato indistinguibile da quello sul substrato di controllo per tutti tre i caratteri. Il grado di proliferazione è stato inferiore nei substrati K5, K8 e K12,

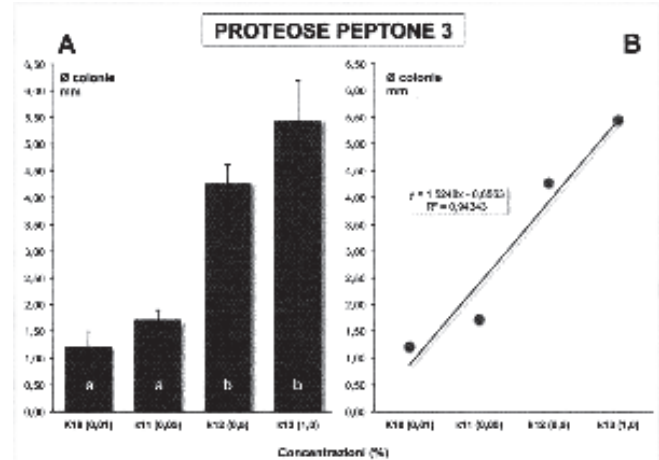


Fig. 5 - Diametro medio delle colonie cresciute a 25° C per 7 giorni sul substrato MS modificato con aggiunta di estratto di lievito e quattro concentrazioni crescenti di Proteose Peptone 3 (A). Incremento di diametro medio delle colonie all'aumentare della concentrazione di Proteose Peptone 3 (B).

Fig. 5 - Average diameter of the colonies grown at 25°C for 7 days on the modified MS medium with the addition of yeast extract and four increasing concentrations of Proteose Peptone 3 (A). Increase in average diameter of the colonies in relation to the increase in Proteose Peptone 3 concentration (B).

marcatamente su K5. La numerosità dei germogli, incluso il substrato K5, è stata assai simile nei 5 substrati. Giallumi delle foglie sono stati assai evidenti sui substrati K5 e K12, poco evidenti sul substrato K8.

Sui substrati semisolidi K7 e K11 dopo 7 giorni la crescita del batterio aggiunto a piccola dose ha avuto luogo in associazione con le plantule in allevamento.

Tab. 1 - Valutazione del comportamento delle plantule di *A. deliciosa* var. Hayward, clone K5 Vitroplant, allevate in vaso su 5 varianti del substrato modificato MS, con aggiunta di stimolatori di crescita batterica. Il comportamento delle plantule sul substrato K15 senza stimolatori è stato usato come controllo di riferimento. Classi di intensità dei 3 caratteri da 0 a 3: 0 = Mancata proliferazione o assenza di sviluppo di apici; Giallumi marcati. 3 = Proliferazione e sviluppo di apici ottimali; assenza di giallumi; Plantule indistinguibili da quelle sul substrato K15.

Tab. 1 - Assessment of the development of *A. deliciosa* plantlets var. Hayward, Vitroplant clone K5, grown in jars on 5 variants of the modified Murashige and Skoog's medium with the addition of bacterial growth promoters. The development of plantlets on the K15 substrate without bacterial growth promoters was used as a control reference. Intensity of the 3 characters ranged from 0 to 3: 0 = Non-proliferation or lack of root development; Presence of marked yellows. 3 = Proliferation and optimal root development; Yellows absent; Plantlets indistinguishable from those on the K15 substrate.

Substrato	Proliferazione	Apici germogli	Giallumi
K5	1	2	1
K7	3	3	3
K8	2	3	2
K11	3	3	3
K12	2	3	1
K15	3	3	3

Discussione

L'aggiunta di stimolatori di crescita batterica al substrato di base modificato MS a concentrazioni inferiori al grammo per litro oltre a favorire la crescita di *Psa* non ha avuto effetti particolarmente sfavorevoli sullo sviluppo delle plantule *in vitro*. Alla concentrazione di 0,5% solo peptone e proteose peptone 3 hanno condizionato sfavorevolmente alla osservazione visiva la proliferazione delle plantule e la colorazione delle foglie. L'effetto delle concentrazioni più alte era atteso ed ha motivato la scelta dei 5 substrati a concentrazioni intermedie di stimolatori per le prove comparative di allevamento *in vitro*. Evidentemente l'eccesso di sorgente di amminoacidi nel substrato costituisce stress per le plantule di *A. deliciosa*.

I nostri risultati indicano che il substrato modificato MS con aggiunta di estratto di lievito (a 0,020%) e di Casamino Acids o di Proteose Peptone 3 (entrambi a 0,05%) favorisce sia la crescita di *Psa* che il normale comportamento della plantule di *A. deliciosa* allevate *in vitro*. Questi substrati possono pertanto fungere da substrati ambivalenti al fine di rilevare visivamente nei vasi di allevamento industriale la presenza di *Psa*. L'impiego di basse concentrazioni è economicamente sopportabile tenuto conto dei costi elevati di questi stimolatori.

L'uso di stimolanti la crescita batterica può evidenziare contaminazioni che nei normali substrati di allevamento non si renderebbero visibili. Ogni pianta vive in associazione con procarioti, distinguibili in casuali o residenti (Leben, 1965). Per la propagazione *in vitro*, i procarioti residenti epifiti e soprattutto endofiti sono quelli di maggior interesse. Anche le piante sane o per lo meno in assenza di qualsiasi sintomo visibile di malattia albergano alla superficie o all'interno dei loro tessuti procarioti residenti (Hayward, 1974). Il problema è cruciale per le piante madri da cui si prelevano tessuti per la propagazione *in vitro* (Leifert e Cassells, 2001; Thomas, 2004; Thomas *et al.*, 2008). Mentre i procarioti casuali e residenti epifiti possono essere in gran parte eliminati con trattamenti mirati di sterilizzazione superficiale delle parti asportate per la propagazione, la eliminazione dei residenti endofiti è problematica e a nostro parere è poco probabile abbia pieno successo per la grande capacità di adattamento dei procarioti a qualsiasi nicchia. Di fatto i procarioti endofiti delle piante possono essere: procarioti coltivabili nei comuni substrati di laboratorio, comprendenti forme fitopatogene e non fitopatogene; procarioti non coltivabili, naturalmente incapaci di crescita nei comuni substrati di laboratorio (tra questi i fitoplasmii e certi batteri fastidiosi); proca-

rioti divenuti non coltivabili a seguito di stress causati dalle risposte immunitarie della pianta ospite o da trattamenti fisici o chimici (es. aggiunta di antibiotici) fatti dall'uomo sui tessuti della pianta (le cosiddette forme vitali, ma non coltivabili ovvero forme VBNC). Le colture *in vitro* delle piante costituiscono una nuova nicchia per eventuali batteri endofiti che, sopravvissuti al trattamento iniziale di sterilizzazione superficiale, siano stati trasferiti in coltura associati agli espianti. Oltre che dalla composizione iniziale del substrato, la nuova nicchia ha una umidità relativa costantemente prossima al 100%, presenza nel substrato di essudati delle plantule in crescita e composizione della atmosfera verosimilmente anomala per concentrazioni di O₂, CO₂, etilene e altre sostanze volatili liberate dalle plantule e dagli stessi procarioti (Jackson, 2005). Questi fattori esercitano una pressione selettiva sulle popolazioni dei procarioti endofiti (o epifiti) delle plantule micropropagate, inducono loro adattamenti alla nicchia favoriti dai lunghi tempi di selezione. Non dovrebbe meravigliare pertanto il ritrovamento di procarioti viventi associati per anni anche in forma asintomatica a colture micropropagate (Thomas e Prakash, 2004).

Nel caso particolare di *Psa* su actinidia è verosimile che espianti prelevati da piante madri affette da infezioni sistemiche asintomatiche possano albergare germi del patogeno e che per la plasticità del suo genoma il patogeno possa adattarsi alla nicchia delle plantule *in vitro*. I due substrati ambivalenti K7 e K11 da noi proposti potrebbero evidenziare nella fase iniziale di messa in coltura la presenza di *Psa* e offrire la opportunità di selezionare precocemente i materiali, prevenendo ogni ulteriore disseminazione del patogeno. Si conferma pertanto l'utilità di aggiungere stimolatori di crescita batterica al substrato di base MS per evidenziare contaminazioni dei materiali di propagazione (Tanprasert e Reed, 1998). L'uso di substrati stimolanti la crescita batterica espone tuttavia al rischio di eliminare anche materiali contaminati da batteri ubiquitari non fitopatogeni o addirittura da batteri commensali o simbiotici stimolanti la crescita delle plantule o la efficienza del loro sistema immunitario (Ulrich, Stauber e Ewald, 2008). Evidentemente per ridurre sprechi di materiali necessitano scrupoloso controllo delle piante madri ed accurati interventi di risanamento dei materiali prelevati dalle piante madri, dei laboratori e degli ambienti (Roggi *et al.*, 2000). Per garantire assenza di *Psa* nel materiale prodotto dalla propagazione *in vitro* durante la acclimatazione in serra saranno poi necessari ulteriori controlli visivi e analisi batteriologiche (Rees-George *et al.*, 2010) per campione anche sulle piante asintomatiche.

Riassunto

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa) è agente causale del cancro batterico della actinidia. La batteriosi è oggetto di grande attenzione da parte di frutticoltori, commercianti e Servizi Fitosanitari, in Italia e all'estero. Le infezioni di Psa possono essere localizzate o sistemiche. Nelle infezioni sistemiche il patogeno può colonizzare anche in modo asintomatico parenchimi e tessuti conduttori di germogli, rami, branche e tronco. Cellule del patogeno albergate in tessuti prelevati da piante madri asintomatiche infette in modo sistemico possono essere trasferite con gli espianti nelle colture *in vitro* di actinidia. Se il substrato di allevamento *in vitro* è inadatto alla crescita batterica, la presenza di Psa può non manifestarsi. In questo studio abbiamo messo a punto substrati ambivalenti favorevoli sia alla crescita dei batteri che delle plantule. Al substrato modificato di Murashige e Skoog sono stati aggiunti estratto di lievito (0,02%) e peptone o casamino acids o proteose peptone 3 a differenti concentrazioni come stimolatori di crescita batterica. I migliori substrati ambivalenti sono stati quelli a concentrazione intermedia. Le più alte concentrazioni hanno avuto effetti sfavorevoli. Le plantule cresciute su substrati contenenti casamino acids e proteose peptone 3 allo 0,05% dopo 20 giorni sono risultate indistinguibili da quelle cresciute sul substrato di controllo senza stimolatori di crescita batterica. L'uso di appropriati substrati ambivalenti permette di selezionare visivamente i vasi delle plantule e prevenire disseminazione di Psa. Al termine del ciclo, durante la acclimatazione in serra, l'assenza di Psa nelle piante dovrà essere accertata da controlli visivi e analisi batteriologiche.

Parole chiave: vitro, cancro batterico, Psa, batteriosi.

Bibliografia

- AGIOS G.N., 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, USA, 667-669.
- ANTONIACCI L., 2011. *Cancro batterico del kiwi: attenzione ai sintomi*. Agricoltura, Febbraio, 39(2): 84-86.
- CONTINI E., 2011. *Actinidia: come fronteggiare l'emergenza cancro batterico*. Agricoltura, Maggio, 39 (5): 10-11.
- HAYWARD A.C., 1974. *Latent infections by bacteria*. Ann.Rev. Phytopath., 12: 87-97.
- HELLMERS E., 1958. *Four wil diseases of the perpetual-flowering carnations in Denmark*. Munksgaard (Copenhagen), pp. 200.
- JACKSON M.B., 2005. *Aeration stress in plant tissue cultures*. In: A.K. Hvoslef-Eide e W. Preil ed.i, Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer (Olanda): 459-473.
- KAMOUN R., LEPOIVRE P., BOXUS P., 1998. *Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of Prunus cerasus cv. 'Montmorency'*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 57-59.
- LEBEN C., 1965. *Epiphytic microorganisms in relation to plant diseases*. Ann. Rev. Phytopath., 3: 209-230.
- LEIFERT C., CASSELS A.C., 2001. *Microbial hazards in plant tissue and cell cultures*. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 37: 133-138.
- MURASHIGE T., SKOOG, F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- REES-GEORGE J., VANNESTE J.L., CORNISH D.A., PUSHPARAJAH I.P.S., YU J., TEMPLETON M.D., EVERETT K.R., 2010. *Detection of Pseudomonas syringae pv. actinidiae using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions*. Plant Pathology, 59: 453-464.
- ROGGI C. *et al.*, 2000. *La sanizzazione*. Franco Angeli Editore, Milano, pp. 127.
- TANPRASERT P., REED B., 1998. *Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 53-55.
- THOMAS P., 2004. *In vitro decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77: 173-179.
- THOMAS P., PRAKASH G.S., 2004. *Sanitizing long-term micropropagated covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years gaps from in vitro*. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 40: 603-607.
- THOMAS P., SWARNA G.K., PATIL P., RAWAL R.D., 2008. *Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93: 39-54.
- ULRICH K., STAUBER T., EWALD D., 2008. *Paenibacillus, a predominant endophytic bacterium colonizing tissue cultures of woody plants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93: 347-351.

Caratterizzazione molecolare di passiflore ornamentali

Federica Nicoletti¹, Luca Braglia², Laura De Benedetti¹, Fulvio Dente¹, Marco Ballardini¹, Antonio Mercuri¹ e Annalisa Giovannini^{1*}

¹ CRA-FSO, Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

² CNR Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, Milano

Molecular analysis in ornamental passion flowers

Abstract. The genus *Passiflora* (Family of *Passifloraceae*) comprises more than 560 species of vines, lianas and small trees widespread in Central and South America; a few species have been found in Australia and New Zealand and about twenty live in Asia. Passion flowers are mostly known for their medicinal properties and for the sweet taste of their fruits (passion fruits). They exhibit unique flowers, with multiple series of corona filaments, coloured sepals and variegated leaves. Due to their exotic features and the wide inter and intraspecific variability, passion flowers are appreciated in the floriculture market, too. Interspecific hybridization has been used to produce new hybrids of ornamental value. In this work, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers were used to characterize 41 accessions from the "Passion flower collection" at CRA-FSO, Sanremo (Italy), established with the aim of collecting genetic resources available both for researchers and for flower growers. Seven primers, already used in *Passiflora edulis* and *P. alata*, were tested and one of them (5'-(CAG)₅RC-3') produced reproducible polymorphic bands. The ISSR fingerprinting allowed us to discriminate most of the species and all the interspecific hybrids of the collection.

Key words: *Passiflora*, ISSR markers, genetic resources, interspecific hybrids.

Introduzione

Il genere *Passiflora* (*Passifloraceae*) comprende oltre 560 specie, quasi tutte con portamento rampicante e lianoso, anche se esistono cespugli, alberi e piante erbacee perenni ed annuali. La maggior parte delle specie sono originarie del continente Americano, principalmente Centro e Sud America, mentre solo una piccola parte sono quelle provenienti da Australia,

Nuova Zelanda ed Asia. Il genere, poco conosciuto nella sua complessità e varietà di specie, alcune delle quali scoperte solo di recente (Vanderplank e Zappi, 2011), è stato sottoposto a classificazioni basate su criteri morfologici (Killip, 1938) e su marcatori molecolari ribosomiali, nucleari e plastidici (Muschner *et al.*, 2003, Yockteng e Nadot, 2004). Comparsa in Europa solo dopo la scoperta dell'America, le passiflore sono state oggetto di un'intensa attività di breeding che ha portato alla costituzione di numerose varietà ed ibridi, grazie soprattutto alla loro elevata attitudine all'incrocio interspecifico. In questo modo, sono state ottenute piante dall'elevato valore ornamentale, con fiori vistosi e foglie dalle forme più disparate. Alcune specie sono utilizzate nell'industria degli alimenti per il sapore dolce dei frutti (*P. edulis* 'granadilla' o 'maracuja' o 'yellow passionfruit'; *P. alata* 'sweet passionfruit'; *P. mollissima* 'banana passion flower'), altre invece sono conosciute per le proprietà medicinali, sedative ed antidepressive (*P. incarnata* 'passion vine'; *P. caerulea* 'blue passionflower').

Le passiflore presentano caratteristiche fiorali uniche: la corolla, costituita da 5 petali alternati a 5 sepali, è arricchita da una vistosa corona formata da centinaia di filamenti, in molti casi disposti in più serie concentriche o addirittura fusi a formare un tubo. Anche le foglie mostrano elevata variabilità per forma, dimensione e colore. Numerose specie risultano quindi di particolare interesse per un utilizzo ornamentale, sia come prodotti da vaso fiorito che da giardino.

Presso il CRA-FSO di Sanremo, a partire dal 2007 è stata allestita una collezione comprendente specie, varietà ed ibridi interspecifici di *Passiflora*, provenienti da diverse aree geografiche e da collezionisti privati (Vecchia, 2011). Uno degli scopi della collezione è quello di costituire un *pool* di germoplasma sfruttabile nel miglioramento genetico a fini ornamentali (Giovannini e Vecchia, 2011). Per la caratterizzazione del germoplasma vegetale, oltre all'analisi del fenotipo mediante parametri morfologici e fisiologici, è possibile associare ad ogni genotipo un'impronta genetica mediante l'analisi del DNA. Si tratta di uti-

* annalisa.giovannini@entecra.it

lizzare descrittori (marcatori) in grado di fornire un profilo molecolare specifico e che siano caratterizzati da un elevato grado di polimorfismo, facilità d'uso, ripetibilità del sistema ed economicità dello stesso (Powell *et al.*, 1996).

Nel presente lavoro, è stata verificata l'efficacia della tecnica ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) per la caratterizzazione molecolare delle accessioni di passiflore presenti nella collezione del CRA-FSO. L'applicazione dei marcatori ISSR consiste nell'amplificazione di regioni genomiche comprese tra sequenze di DNA microsatellite ripetute e invertite, mediante l'uso di un singolo primer (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Essi presentano diversi vantaggi rispetto ad altri tipi di analisi molecolare: non sono richieste informazioni sulla sequenza del genoma in esame; i prodotti ottenuti mostrano solitamente profili elettroforetici multilocus polimorfici; la tecnica è abbastanza semplice e dai costi contenuti. Gli ISSR si sono già mostrati efficaci per la risoluzione di problemi di sistematica e di ibridazione in numerose specie, nonché per la determinazione delle distanze genetiche in *P. edulis* e *P. alata* (dos Santos *et al.*, 2011).

Materiali e metodi

Il DNA genomico totale è stato estratto da 100 mg di giovani foglie, utilizzando il DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). La qualità dei DNA estratti è stata valutata con corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% in TAE 1X (Tris acetato 40mM, EDTA pH 8,0 1 mM). Le concentrazioni sono state determinate mediante esame fluorimetrico con apparecchio Qubit™ Fluorometer (Life Technologies).

Sono stati analizzati in totale 41 campioni comprendenti specie (tab. 1), varietà ed ibridi interspecifici, alcuni dei quali provenienti da piante coltivate *in vitro* e successivamente ambientate in serra (tab. 2 e fig. 1). I protocolli di rigenerazione e micropropagazione relativi a quest'ultimi sono stati messi a punto in precedenti lavori (Pipino *et al.*, 2008; Braglia *et al.*, 2010). Tutti i campioni erano già stati caratterizzati fenotipicamente utilizzando 19 descrittori morfologici e fisiologici specifici (De Benedetti *et al.*, 2011).

Le amplificazioni sono state effettuate impiegando 7 diversi primer ISSR (DiCA3'G, DiGA3'C, DiGA3'YC, DiGA5'CY, DiGT3'YG, TriAGC3'RC, TriCAG3'RC), utilizzati da dos Santos *et al.*, (2011), secondo il protocollo riportato dagli autori.

I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% in tampone TAE 1X e colorati con etidio bromuro. Le immagini dei gel sono state acquisite mediante il sistema di fotodocumentazione FireReader (UVitec Limited), lo scoring dei frammenti ottenuti è stato effettuato manualmente.

Risultati e discussione

Dei 7 oligonucleotidi utilizzati, solo il primer TriCAG3'RC (sequenza 5'-3': (CAG)₅RC) ha prodotto un bandeggio chiaro e riproducibile (fig. 2). Sono stati identificati 17 differenti frammenti polimorfici, con dimensioni variabili da 300 a 1800 paia di basi. I marcatori ottenuti hanno permesso di discriminare 23 delle 26 specie analizzate. *Passiflora coccinea* non ha fornito alcun prodotto di amplificazione, mentre per le specie *P. luzmarina* e *P. manicata* è stata ottenuta

Tab. 1 - Specie di *Passiflora* utilizzate nel lavoro di caratterizzazione molecolare, con l'indicazione del numero di accessione dei campioni presenti nella collezione al CRA-FSO e del paese di origine.

Tab. 1 - List of *Passiflora* species analyzed with ISSR markers. The "Passion flower collection" at CRA-FSO accession number and the country of origin are indicated.

Specie	Accessione	Origine	Specie	Accessione	Origine
<i>P. alata</i> Curtis	PASS015	Perù	<i>P. incarnata</i> L.	PASS030	USA
<i>P. amethystina</i> J.C. Mikan	PASS021	Bolivia	<i>P. laurifolia</i> L.	PASS039	Colombia
<i>P. boenderi</i> J.M. Mac Dougal	PASS022	Costa Rica	<i>P. lutea</i> L.	PASS032	USA
<i>P. caerulea</i> Lour.	PASS041	Argentina	<i>P. luzmarina</i> P. Jørgensen	PASS040	Ecuador
<i>P. ciliata</i> Aiton	PASS024	Messico	<i>P. manicata</i> (Juss.) Pers.	PASS033	Ecuador
<i>P. cinnabarina</i> Lindley	PASS025	Australia	<i>P. mayarum</i> J.M. Mac Dougal	PASS034	Belize
<i>P. citrina</i> Mac Dougal	PASS003	Honduras	<i>P. mucronata</i> Lam.	PASS012	Brasile
<i>P. coccinea</i> Aubl	PASS004	Brasile	<i>P. murucuja</i> L.	PASS013	Rep. Dominicana
<i>P. coriacea</i> Juss.	PASS027	Colombia	<i>P. subanceolata</i> Killip	PASS014	Messico
<i>P. costaricensis</i> Killip	PASS006	Costa Rica	<i>P. tarmaniana</i> Coppens & V.E. Barney	PASS038	Ecuador
<i>P. elegans</i> Masters	PASS007	Argentina	<i>P. trifasciata</i> Lemaire	PASS017	Perù
<i>P. edmundoi</i> Sacco	PASS028	Brasile	<i>P. tulae</i> Urban	PASS018	Porto Rico
<i>P. foetida</i> var. <i>hastata</i> L.	PASS008	Rep. Dominicana	<i>P. watsoniana</i> Masters	PASS020	Brasile

Tab. 2 - Varietà ed ibridi analizzati nel lavoro di caratterizzazione molecolare. I genitori utilizzati nell'incrocio sono indicati con "nome della madre" x "nome del padre" (gli ibridi provenienti da coltura *in vitro* sono contrassegnati da asterisco).

Tab. 2 - List of cultivar and interspecific passion flower hybrids analyzed with ISSR markers. The name of the parents used in the crossings are indicated as "mother plant" x "father plant" (the stars indicate hybrids that have been micropropagated).

Varietà	
<i>P. caerulea</i> 'Constance Elliott' (varietà di <i>P. caerulea</i> a fiori bianchi)	
Ibridi interspecifici	Genitori
<i>P.</i> 'Amethyst' autore sconosciuto	<i>P. caerulea</i> x <i>P. kermesina</i>
<i>P.</i> 'Caprice' M. Vecchia	<i>P. kermesina</i> x <i>P. tucumanensis</i>
<i>P.</i> 'Clara Luna' M. Vecchia	<i>P. caerulea</i> 'Constance Elliott' x <i>P. eichleriana</i>
<i>P.</i> 'Fata Confetto' M. Vecchia	<i>P.</i> 'Guglielmo Betto' x <i>P. incarnata</i> ?
<i>P.</i> 'Guglielmo Betto' M. Vecchia*	<i>P. incarnata</i> x <i>P. tucumanensis</i>
<i>P.</i> 'La Lucchese' M. Vecchia	<i>P.</i> 'Fata Confetto' x <i>P. kermesina</i>
<i>P.</i> 'La Venexiana' M. Vecchia	<i>P. edmundoi</i> x <i>P. caerulea</i> 'Pierre Pomié'
<i>P.</i> 'Manta' M. Vecchia*	<i>P. xitkozod</i> x <i>P. coriacea</i>
<i>P.</i> 'Thuraia' M. Peixoto	<i>P. kermesina</i> x <i>P. miersii</i>
<i>P.</i> 'Vivacemente' M. Vecchia	<i>P. incarnata</i> f. <i>alba</i> x <i>P. cincinnata</i> 'Dark Pollen'
<i>P. x allardii</i> Lynch*	<i>P. quadrangularis</i> x <i>P. caerulea</i> 'Constance Elliott'
<i>P. x belotii</i> Pèpin	<i>P. alata</i> x <i>P. caerulea</i>
<i>P. x colvilii</i> Sweet	<i>P. incarnata</i> x <i>P. caerulea</i>
<i>P. x colvilii</i> 'Clara' M. Vecchia	<i>P. incarnata</i> x <i>P. caerulea</i> 'Constance Elliott'

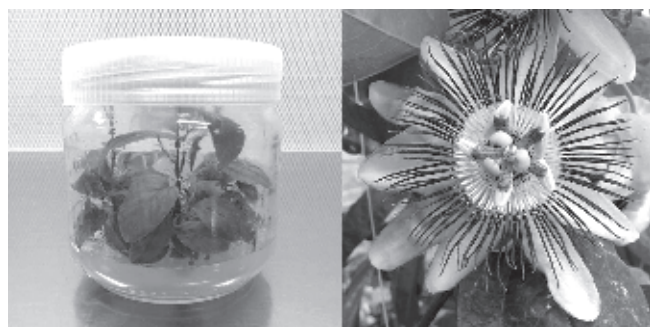


Fig. 1 - Coltura *in vitro* (sinistra) e particolare del fiore (destra) dell'ibrido interspecifico *P. x allardii* (*P. quadrangularis* x *P. caerulea* 'Constance Elliott').

Fig. 1 - In vitro culture (left) and the exotic flower (right) of the interspecific hybrid *P. x allardii* (*P. quadrangularis* x *P. caerulea* 'Constance Elliott').

un'unica banda di uguale peso molecolare. Per tutti i rimanenti campioni, il numero di bande conteggiate variava da 2 a 5. Bande differenti sono stati osservati tra la specie *P. caerulea* e la sua varietà *P. caerulea* 'Constance Elliott'. È stato inoltre possibile discriminare tutti i 14 ibridi interspecifici presi in esame. In particolare, per quanto riguarda i tre ibridi *P. x belotii*, *P. x colvilii* e *P. x colvilii* 'Clara', di cui è stato analizzato contemporaneamente il profilo ISSR dei genitori, è stato possibile confermare la condizione ibrida: essi hanno infatti mostrato bande caratteristiche di entrambi i genitori.

Conclusioni

L'amplificazione di sequenze ISSR, con uno dei primer utilizzati in *P. edulis* e *P. alata* (dos Santos et

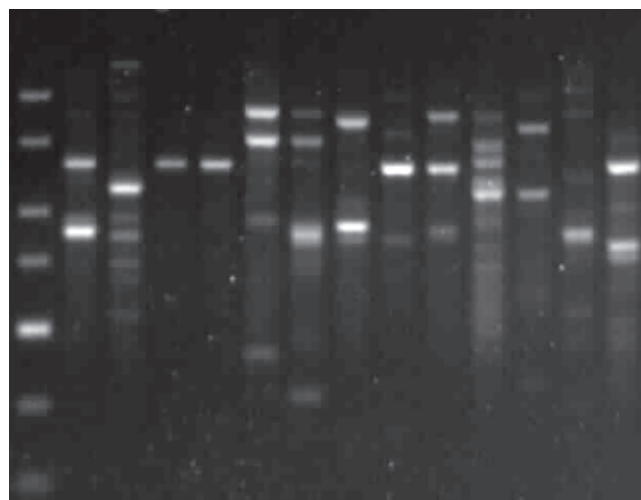


Fig.2 - Bandeggio ISSR ottenuto con il primer TriCAG3'RC in 13 passiflore analizzate. Da sinistra verso destra: marcatore di pesi molecolari (PCR marker, Sigma-Aldrich); *P.* 'Amethyst'; *P. mayarum*; *P. luzmarina*; *P. manicata*; *P. costaricensis*; *P. lutea*; *P. incarnata*; *P. mucronata*; *P. edmundoi*; *P. coriacea*; *P. cinnabarina*; *P. laurifolia*; *P. ciliata*.

Fig.2 - ISSR fingerprinting of 13 passion flowers generated with the primer TriCAG3'RC (5'-(CAG)₃RC-3'). From left to right: molecular weight marker (PCR marker, Sigma-Aldrich); *P.* 'Amethyst'; *P. mayarum*; *P. luzmarina*; *P. manicata*; *P. costaricensis*; *P. lutea*; *P. incarnata*; *P. mucronata*; *P. edmundoi*; *P. coriacea*; *P. cinnabarina*; *P. laurifolia*; *P. ciliata*.

al., 2011), ha consentito l'ottenimento di bande polimorfiche anche nella maggior parte delle specie di *Passiflora* da noi analizzate.

I risultati ottenuti possono essere utilizzati per una prima caratterizzazione molecolare della collezione di passiflore del CRA-FSO, a integrazione dei descrittori fenotipici e riferimento in programmi di

miglioramento genetico. La discriminazione di tutte le diverse accessioni di passiflora e degli eventuali nuovi ibridi potrà essere ottenuta saggiando ulteriori primer ISSR e/o avvalendosi di altri tipi di marcatori molecolari.

Riassunto

Il genere *Passiflora* comprende numerose specie con portamento rampicante e lianoso, prevalentemente originarie dell'America centro-meridionale, sfruttate per la raccolta dei frutti, per le proprietà medicinali e come piante ornamentali. Nel presente lavoro è stata verificata l'efficacia dei marcatori ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) per la caratterizzazione molecolare di 41 accessioni di *Passiflora* della collezione del CRA-FSO di Sanremo. Un unico primer ISSR ha permesso l'ottenimento di bande discriminanti la maggior parte delle specie analizzate e tutti gli ibridi interspecifici presi in esame. I risultati ottenuti potranno essere di ausilio per la valorizzazione delle risorse genetiche ed in programmi di *breeding*.

Parole chiave: fiore della passione, marcatori ISSR, risorse genetiche, *Passiflora*.

Lavoro svolto con finanziamento Mi.P.A.A.F. Progetto RGV-FAO. Si ringrazia il Dott. Maurizio Vecchia per il materiale vegetale fornito.

Bibliografia

- BRAGLIA L., DE BENEDETTI L., GIOVANNINI A., NICOLETTI F., BIANCHINI C., PIPINO L., MERCURI A., 2010. In vitro *Plant Regeneration as a Tool to Improve Ornamental Characters in Passiflora Species*. Acta Hort., 855:47-52.
- DE BENEDETTI L., NICOLETTI F., BALLARDINI M., MERCURI A., GIOVANNINI A. *Le passiflore: risorse genetiche e ricerca applicata*. Informatore Botanico Italiano, 43 (suppl. 1): 51-54.
- DOS SANTOS L.F., DE OLIVEIRA E.J., DOS SANTOS SILVA A., DE CARVALHO F.M., COSTA J.L., PADUA J.G., 2011. *ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora*. Biochem. Genet., 49(7-8):540-54.
- GIOVANNINI A., VECCHIA M., 2011. *Ornamental passion flowers*. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, 73:107.
- KILLIP E. P., 1938. *The American species of Passifloraceae*, Field Museum of Natural History, 19, Chicago (USA).
- MUSCHNER V.C., LORENZ A.P., CERVI A.C., BONATTO S.L., SOUZA-CHIES T.I., SALZANO F.M., FREITAS L.B., 2003. *A first molecular phylogenetic analysis of Passiflora (Passifloraceae)*. Am J Bot, 90: 1229-1238.
- PIPINO L., BRAGLIA L., GIOVANNINI A., FASCELLA G., MERCURI A., 2008. *In vitro regeneration of Passiflora species with ornamental value*. Prop Ornamental Plants, 8(1): 47-49.
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRE C., HANAFEY M., VOGEL J., TINGEY S.V., RAFALSKI A., 1996. *Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellites) markers for germplasm analysis*. Mol. Breed., 2:225-238.
- VANDERPLANK J., ZAPPI D., 2011. *Passiflora cristalina, a striking new species of Passiflora (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil*. Kew Bulletin, 66:1-5.
- VECCHIA M., 2011. www.passiflora.it; online access.
- YOCKTENG R., NADOT S., 2004. *Phylogenetic relationships among Passiflora species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (npsGS)*. Mol Phylogenet Ev, 31: 379-396.
- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D., 1994. *Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification*. Genomics, 20: 176-183.

Micropropagazione e risanamento di cultivar di carciofo tipiche della Val di Cornia (Livorno)

Francesco Bertozzi¹, Mariella Lucchesini¹, Domenico Rizzo², Anna Mensuali-Sodi³, Alberto Pardossi¹ e Alberto Graifenberg¹

¹ Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa

² CRA-VIV, Laboratorio di diagnostica fitopatologica e di biologia molecolare, Pescia (PT)

³ Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Micropropagation and virus elimination of typical artichoke cultivars of Val di Cornia (Livorno)

Abstract. The production of virus free propagating material is the requisite to obtain artichoke plantlets responding to qualitative and phytosanitary features requested in the frame of EU and Italian roles. This work defines a protocol of micropropagation for the cvs Terom and Tema, typical of the Val di Cornia (LI) Tuscan area; afterwards, meristem tip cultures allowed us to obtain virus-free mother plants. With the double step RT-PCR, were evaluated the presence of artichoke latent virus (ArLV). This virus was successfully eliminated by meristem tip culture in about 50% of artichoke plantlets. After further verifications by molecular diagnosis, these shoots can become a first stock of *in vivo* virus free mother plants for setting up a new artichoke cultivation.

Key words: ArLV, *Cynara scolymus* L., meristem tips culture, RT-PCR, virus.

Introduzione

Il carciofo (*Cynara scolymus* L.), appartenente alla famiglia delle Asteracee (Composite), è una pianta erbacea perenne tipica del bacino del Mediterraneo, utilizzata sia a scopo alimentare che farmaceutico. In Italia, la coltura di questa specie si inserisce al terzo posto tra le orticole, dopo pomodoro e patata (Siviero, 2002). In base all'epoca di produzione, si distinguono varietà di carciofo a produzione autunnale e varietà a produzione primaverile. La propagazione vegetativa, la più diffusa per il carciofo, può favorire la diffusione di piante non idonee ai trapianti successivi dal punto di vista sanitario. Per quanto riguarda le virosi, alcuni dei virus più dannosi sono latenti e non provo-

cano sintomi evidenti, rendendo ancora più difficoltosa la loro identificazione (Barba, 2001). I virus asintomatici più comunemente riscontrati in questa specie sono il virus *Artichoke Latent Virus* (ArLV) che provoca riduzione del numero e della pezzatura dei capolini (Camele *et al.*, 1999) e *Artichoke Italian Latent Virus* (AILV), che causa nanismo e consistente riduzione della produzione dei capolini (Brown *et al.*, 1997).

Recentemente è stato introdotto l'uso della propagazione *in vitro* non solo per incrementare il tasso di moltiplicazione, ma anche per costituire piante madri virus esenti da cui produrre il materiale di moltiplicazione da impiegare per l'impianto di nuove carciofaie. Il risanamento da virus mediante la tecnica del prelievo dell'apice meristemico è legato alla dimensione dei tessuti prelevati, che non dovrebbero essere superiori a 0,8 mm (Bianco, 1990; Pasquini *et al.*, 2003), e all'utilizzo di interventi aggiuntivi specifici quali la termoterapia *in vitro* (Temperini *et al.*, 2000; Papanice *et al.*, 2004).

Lo studio presente si è svolto nell'ambito di un progetto rivolto alla valorizzazione e tutela della coltivazione locale di carciofo per lo sviluppo di un'attività vivaistica finalizzata alla produzione di due cultivar appartenenti alla varietà primaverile 'Violetto di Toscana' tipiche della Val di Cornia (LI): cvs Terom e Tema2000. Queste cultivar non possiedono a tutt'oggi le caratteristiche fitosanitarie richieste dal D.M del 14.4.1997, che definisce i requisiti di identità varietale e fitosanitari del materiale di propagazione commercializzato nel nostro Paese.

La propagazione *in vitro* del carciofo, iniziata negli anni '70 con De Leo e Greco (1976), è stata successivamente perfezionata negli anni '80 da Ancora (1981) e Debergh (1981) con protocolli che hanno consentito tassi di proliferazione più elevati rispetto a quelli ottenuti con i metodi tradizionali (carducci/ovoli). Tuttavia il processo della coltura *in vitro*, può presentare diversi ostacoli sia nella fase iniziale della

* mlucchesini@agr.unipi.it

coltura, sia durante la fase di radicazione. Quest'ultima fase può rappresentare il vero collo di bottiglia del procedimento per molte varietà di carciofo (Rossi e De Paoli, 1990). A causa di queste difficoltà è necessario mettere a punto protocolli sperimentali *ad hoc* mirati per ogni varietà di carciofo oggetto di studio.

Obiettivo del presente lavoro è quello di definire un idoneo protocollo di propagazione e risanamento *in vitro* delle cultivars di carciofo Terom e Tema 2000 che consenta, in tempi rapidi e a costi contenuti, di costituire un nucleo di germoplasma risanato sul quale basare gli impianti di piante madri da utilizzare come prodotto locale certificato.

Materiali e metodi

Il lavoro è stato eseguito in due fasi. La prima ha visto la messa a punto di un protocollo di micropropagazione adeguato per le cultivar Terom e Tema 2000. Successivamente le piantine *in vitro* di Terom e Tema sono state risanate mediante prelievo meristemico.

I carducci sono stati posti in serra in vasi contenenti una miscela di torba, perlite e vermiculite (50:30:20) e sistemati su bancali con un impianto goccia a goccia. Dopo un periodo di condizionamento delle piante madri, che consisteva nell'effettuare dei trattamenti a tempi regolari con antifungini sistemici, sono stati prelevati e introdotti *in vitro* gli apici vegetativi. La sterilizzazione dei tessuti è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Pacifici *et al.* (2007). Gli apici vegetativi sono stati posti in tubi monouso (30 ml) contenenti 5 ml di un terreno di crescita solido TL (Castiglione e Cavallaro, 2007) modificato denominato "TL MOD" (tab. 1). Per la fase di proliferazione sono stati alternati due tipi di mezzi (tab. 2) con ridotta concentrazione di azoto nitrico e 0.03 mg l⁻¹ BA (6-benzilaminopurina): "M4" con 0.05 mg l⁻¹ di GA₃ (acido gibberellico) e "M4 PBZ" con 1 mg l⁻¹ di paclobutrazolo (PBZ), inibitore della sintesi delle gibberelline (tab. 1). Nella seconda fase dello studio è stata diagnosticata l'eventuale infezione virale dello stock di piante madri per mezzo di analisi diagnostiche di tipo molecolare (*Double step* RT-PCR) e definita la strategia di risanamento per entrambe le cultivar. Il saggio virologico è stato effettuato per quattro tra i virus più comuni di carciofo ARLV, AILV, AMCV e CMV.

Per il risanamento è stata eseguita una coltura di apici meristemici, prelevando tessuti delle dimensioni di circa 0,3-0,5 mm. Per la coltura degli apici meristemici sono stati utilizzati per l'induzione il substrato "TL MOD" e poi "M4" e "M4 PBZ" per la

Tab. 1 - Composizione dei substrati di crescita utilizzati nel lavoro suddivisi secondo le fasi di micropropagazione.

Tab. 1 - Culture media used during different phases of *in vitro* culture.

Elementi	Induzione	Proliferazione	
	TL MOD	M4	M4 PBZ
Macroelementi			
NH ₄ NO ₃	160,1	825	825
KNO ₃	-	950	950
CaCl ₂ +2 H ₂ O	-	440	440
Ca(NO ₃) ₂ +4 H ₂ O	141,7	-	-
MgSO ₄ +7H ₂ O	123,3	370	370
KH ₂ PO ₄	104,4	170	170
KCl	81,7	-	-
K ₂ HPO ₄	7	-	-
Microelementi			
MnSO ₄ +4H ₂ O	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ +7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
KI	0,83	0,83	0,83
CuSO ₄ +5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ +2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ +6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Ferro			
FeNaEDTA	-	36,7	36,7
FeEDDHA	100	-	-
Vitamine			
Mioinositolo	100	200	200
Acido nicotinico	1	0,5	0,5
Tiamina HCl	0,4	1	1
Piridossina	1	0,5	0,5
Acido ascorbico	-	-	-
Glicina	-	-	-
Fitoregolatori			
2ip	1	-	-
meta-topolina	-	-	-
BA	-	0,03	0,03
IAA	1	-	-
NAA	-	-	-
IBA	-	-	-
GA ₃	0,025	0,05	-
Altri Componenti			
Saccarosio	30.000	30.000	30.000
MES	500	500	500
GSH (glutazione ridotto)	300	300	300
Agar	-	8.000	8.000
paclobutrazolo	-	-	1

Tab. 2 - Parametri qualitativi e quantitativi (medie \pm ES; n=15 espianti per contenitore; 3 repliche) registrati sulle cv Terom e Tema in quattro subcolture alternate sui mezzi di coltura "M4" e "M4+PBZ".

Tab. 2 - Quantitative and qualitative parameters (means \pm SE; n=15 explant/poi; 3 repetition) of cv Terom and cv Tema in four alternate subcultures on media "M4" and "M4+PBZ".

Subcoltura	1°	2°	3°	4°
Mezzi di coltura	M4+PBZ	M4	M4+PBZ	M4
Terom				
Numero germogli (n/contenitore)	18,5 \pm 0,50	25,0 \pm 1,00	21,4 \pm 1,95	27,6 \pm 2,10
Lungh. germogli (cm)	1,3 \pm 0,15	1,9 \pm 0,10	1,6 \pm 0,40	2,0 \pm 0,10
Iperidricità (%)	6,0 \pm 0,70	10,0 \pm 1,20	0,0	6,0 \pm 0,50
Necrosi (%)	50,0 \pm 4,0	0,0	0,0	0,0
Tema				
Numero germogli (n/contenitore)	15,8 \pm 1,4	19,4 \pm 2,82	17,0 \pm 1,30	23,0 \pm 2,00
Lungh. germogli (cm)	0,7 \pm 0,08	1,4 \pm 0,10	1,4 \pm 0,10	1,5 \pm 0,15
Iperidricità (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Necrosi (%)	8,6 \pm 0,45	2,0 \pm 0,36	3,6 \pm 0,20	0,0

proliferazione. Sul materiale fogliare delle piantule così ottenute, sono state ripetute le analisi diagnostiche (*Double step* RT-PCR) per verificare se era ancora presente ArLV e quindi valutare il grado di risanamento ottenuto sui campioni (piantule rigenerate da meristema). In questa fase di verifica sono stati saggiati anche alcuni campioni provenienti dalla propagazione da apice vegetativo di dimensione media di 1 cm. Questi sono stati considerati come termine di confronto rispetto ai campioni da apici meristemato.

Risultati e discussione

I protocolli di micropropagazione del carciofo sono fortemente influenzati dalla varietà che si intende propagare, infatti le diverse cultivar rispondono in modo diversificato sia alle procedure di sterilizzazione, sia a quelle di propagazione e radicazione (Pacifici *et al.* 2007). In questo lavoro si conferma che le cultivar di carciofo Terom e Tema hanno mostrato recalcitranza per la coltura *in vitro* come si è verificato con altre cultivar di carciofo (Tavazza *et al.*, 2004). Si sono osservati, infatti, frequenti fenomeni di iperidricità (cv Terom 10%) e necrosi (cv Terom 50%, cv Tema 8,6%). Tuttavia, l'uso alterno dei mezzi di coltura "M4" e "M4 PBZ" ha consentito di ottenere materiale vegetale di buona qualità e senza degenerazioni morfologiche per entrambe le cultivars (fig. 1). Il paclobutrazolo (PBZ), sostanza ritardante della crescita, ha conferito ai germogli un aspetto "rustico", con presenza di foglie ben seghettate e



Fig. 1 - Germogli di cv Terom su mezzo di coltura "M4", dopo passaggio su "M4+PBZ".

Fig. 1 - cv Terom shoots on medium "M4", after the "M4+PBZ" subculture.

tomentose, prerogativa importante per la successiva fase di radicazione (Dridi, 2003). Su questo mezzo i germogli di Terom e Tema hanno mostrato una completa regressione dell'iperidricità che tendeva a ricomparire se i germogli erano trasferiti su "M4". D'altra parte i fenomeni necrotici si presentavano con l'uso del "PBZ" da qui l'alternanza delle colture con il mezzo "M4" che, inoltre, ha favorito un numero di germogli più elevato rispetto agli altri mezzi di proliferazione (tab. 2).

Per quanto riguarda lo stato fitosanitario, la totalità dei campioni analizzati con *Double step* RT-PCR sono risultati positivi ad ArLV. Il risanamento da ArLV, effettuato per mezzo della coltura di apici meristemato, ha fatto ottenere una percentuale di piantine sane di circa il 50% confermando che la coltura di tessuti meristemato può rappresentare una tecnica idonea per produrre germoplasma di carciofo esente dal virus ArLV (Pasquini *et al.*, 2003). La figura 2 mostra alcuni campioni saggiati per la verifica del risanamento. Comunque, la grandezza dell'espianto e la buona manualità nell'effettuare il prelievo del meristema sono fattori determinanti che possono influire direttamente sul numero di campioni risanati. Un meristema di pochi millimetri infatti inizia lentamente a proliferare e spesso si osserva contemporaneamente una rapida formazione di callo sulla superficie di taglio dell'espianto e il conseguente deterioramento del germoglio iniziale (Grout, 1999). Il limitato numero di campioni rigenerati da meristemi prelevati può essere quindi riferito alle notevoli difficoltà di adattamento alla condizione della coltura

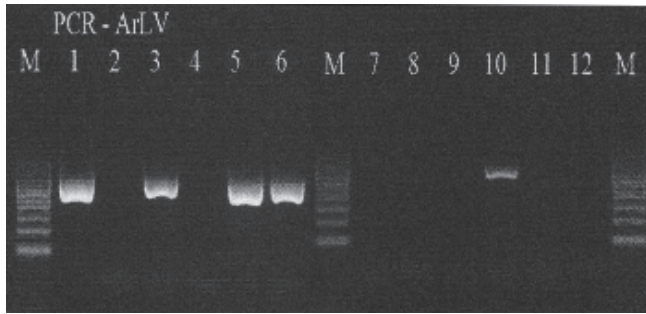


Fig. 2 - Gel d'agarosio al 2.0% dopo 20 minuti. Campioni delle cvs Terom e Tema rigenerati da apice meristemico e tre campioni rigenerati da apice vegetativo Terom saggianti per il virus ArLV. M= marker 50 bp; 1= #26 Terom (apice vegetativo); 2= #26/1 Terom da meristema; 3= #1 Tema; 4= #1 Tema da meristema; 5= #13 Terom(apice vegetativo); 6= #13 Terom da meristema; 7= #12 Terom da meristema; 8= #32 Terom da meristema; 9= #26/2 Terom da meristema; 10= C+; 11= Bianco; 12= Controllo negativo.

Fig. 2 - A 2.0% agarose gel after the 20 minutes run. Cvs Terom and Tema samples, regenerated from meristem tip culture and three cv Terom mother plant samples all tested for the ArLV. M= marker 50 bp; 1= #26 Terom; 2= #26/1 Terom from meristem; 3= #1 Tema; 4= #1 Tema from meristem; 5= #13 Terom; 6= #13 Terom from meristem; 7= #12 Terom from meristem; 8= #32 Terom from meristem; 9= #26/2 Terom from meristem; 10= C+; 11= blanc; 12= negative control

in vitro riscontrate dagli apici meristematici (George et al. 2008).

Conclusioni

Possiamo definire raggiunto in modo soddisfacente l'obiettivo di una messa a punto di un protocollo di micropropagazione delle cv Terom e Tema virus esenti, che fornisce uno strumento per migliorare le conoscenze sulla micropropagazione di queste due cultivar; ciò consente inoltre di mettere a disposizione piantine elite virus-esenti per la produzione di carducci sani da utilizzare per nuove carciofaie.

Riassunto

E' stato messo a punto un protocollo di micropropagazione per le cv di carciofo Terom e Tema, tipiche della zona della Val di Cornia (LI) e la successiva coltura meristemica ha permesso di costituire piante madri virus esenti. Con la tecnica molecolare della double step RT-PCR sono state individuate le piante esenti dal virus ArLV durante il loro allevamento *in vitro*. Attualmente si dispone di un consistente numero di espanti risanati ed allevati *in vitro*. Queste piante, se confermate idonee per le loro caratteristiche agronomiche, potranno essere utilizzate come stock di piante madri di carciofo virus esenti per la costituzione di un nuovo impianto.

Lavoro cofinanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Livorno nell'ambito del progetto (2009-2011) "Tecniche colturali innovative per il miglioramento del vivaismo del carciofo e la valorizzazione della produzione tipica della Val di Cornia: risanamento e propagazione agamica *in vitro* e *in vivo* di piantine virus esenti".

Parole chiave: apici meristematici, ArLV, *Cynara scolymus* L., RT-PCR, virus.

Bibliografia

- BARBA M., 2001. *Miglioramento sanitario del germoplasma di carciofo*. L'Inf. Agr., 20, 35-37.
- BIANCO V.V., 1990. *Carciofo (Cynara scolymus)*. In Bianco e Pimpini, *Orticoltura*, Patron Editore Bologna, 209-251.
- BRIAN W.W. GROUT, 1999. *Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination*. Plant cell and tissue culture, Methods in Molecular Biology, Vol. 111: 115-125.
- BROWN D.J.F., KYRIAKOPOULOU P.E. E ROBERTSON W.M., 1997. *Frequency of transmission of artichoke italian latent nepovirus by Longidorus fasciatus (Nematoda: Longidoridae) from artichoke fields in the Iria e Kandia areas of Agropolis in Northern Peloponnesus, Greece*. Eur. J. Plant Patol., 103: 501-506.
- CAMELE I., RANA G.L., 1999. *Rinvenimento di infezioni del Tospovirus della bronzatura del pomodoro (TAWV) in due composite coltivate in Basilicata*. In "Atti VII Conv. Naz. S. I. Pa. V." su "Aspetti epidemiologici di patogeni vegetali". Piacenza, 23-24 settembre (Abstract).
- CASTIGLIONE V., CAVALLARO V., DI SILVESTRO I., MELILLI M.G., 2007. *Influence of different transplant times and mycorrhizal symbiosi on micropropagated artichoke [Cynara cardunculus L. subsp. scolymus (L.) Hegi]* Acta Hort. 730: 107-112
- DRIDI B., 2003. *Un système integre de micropropagation de l'artichaut (Cynara scolymus L.)*. Tesi di Dottorato (PhD) anno accademico 2002-2003 in: Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées: Biotechnologie cellulaire et génétique, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Gent, Belgio.
- GEORGE E.F., HALL M.A., DE KLERK G.-J., 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Ed Springer, Dordrecht, Olanda.
- GROUT B.W.W., 1990. *Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination*. In: Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols, Pollard W. e Walker M. Ed., Humana Press Inc, Clifton, NJ, Vol 6, 81-91.
- PACIFICI S., LUCCHESINI M., CURADI M., GRAIFENBERG A., 2007. *Influence of medium composition and vessel ventilation during the micropropagation stages of Cynara scolymus L. cv. Grato I*. Adv. Hort. Sci., 200721(2), 83-88.
- PAPANICE M. A., CAMPANILE A., BOTTALICO G., SUMERANO P., GALLITELLI D., 2004. *Produzione di germoplasma risanato di carciofo brindisino*. Italus Hortus 11(5): 11-15.
- PASQUINI G., BARBA M., PAPANICE M., GALLITELLI D., 2003. *Produzione di germoplasma di carciofo virus-esente*. In: Atti Giornate Nazionali di Studi sul Carciofo, Vivaismo e strategie di sviluppo del Carciofo, Samassi (Cagliari) 2003, 60-63.
- ROSSI V., DE PAOLI G., 1990. *Micropropagazione per un carciofo di qualità*. Inf. Agr. 9: 207-209.
- SIVIERO P., 2002. *Il carciofo e la sua coltivazione*. Inf. Agr., 22: 33-51.
- TAVAZZA R., PAPACCHIOLI V., ANCORA G., 2004. *An Improved Medium for In Vitro Propagation of Globe Artichoke (Cynara scolymus L.) cv. "Spinoso sardo"*. Acta Hort. 660. 91-97.
- TEMPERINI O., MICOZZI F., MARIOTTI R., COLLA G., SACCARDO F., 2000. *Messa a punto di una nuova tecnica di moltiplicazione agamica del carciofo*. Inf. Agr., 26: 54-56.

Variazioni epigenetiche in piante propagate *in vitro*: metilazione, regolazione dell'espressione genica e manifestazione di caratteri morfologici

Rosario Muleo, Marco Cirilli, Alessandra Zega e Eleonora Frioni

Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Laboratorio di Ecofisiologia Molecolare delle Piante arboree, Università della Tuscia

Le piante nel periodo di permanenza *in vitro* soggiacciono a forti modifiche ambientali e biologiche, e per la loro sopravvivenza e sviluppo, attivano strategie di adattamento radicali e adeguate. In assenza dell'attivazione di queste strategie subentra la morte dell'espianto. E' noto che le piante rigenerano organi da tessuti adulti alle condizioni *in vivo*, e tale attitudine è impiegata ed esaltata dalle diverse tecnologie delle colture *in vitro*, rigenerando da una singola cellula una pianta intera. Se queste proprietà delle piante sono note da molto tempo con il termine *totipotenza* e se, sempre di più, si sono venute a chiarire i meccanismi fisiologici dell'adattamento, poco noti, ancora, appaiono i meccanismi molecolari che la controllano e la regolano ed i fattori endogeni ed esogeni che la evocano e la condizionano. Appaiono, inoltre, non completamente compresi i meccanismi che generano la variazione somaclonale *in vitro* determinando la comparsa di mutanti tra le piante propagate da un singolo espianto iniziale. Molte delle variazioni somaclonali osservate rievocano caratteri osservabili allo stato di giovanilità delle piante; tuttavia alcuni di questi caratteri sono transienti, destinati cioè a regredire con il passare del tempo alle condizioni *extra vitro*, mentre altri diventano solidi e si trasmettono stabilmente alle piante propagate agamicamente e gamicamente. Queste mutazioni sono di tipo genetico, anche se potrebbero essere preesistenti già alle condizioni di

pre-vitro, o di tipo epigenetico. In questa review è stata considerata l'origine epigenetica che sta alla base di molti dei caratteri osservabili nei varianti somaclonali: metilazione delle regioni di regolazione e degli esoni dei singoli geni, modellamento della struttura della cromatina, azione delle corte sequenze di RNA interferenziale e attivazione di elementi mobili, pertanto l'insieme di questi eventi possono essere indicati come i processi che regolano le variazioni epigenetiche. Nuove tecnologie di analisi, che permettono ampie indagini del genoma, possono essere impiegate nelle piante soggetti ai processi biotecnologici *in vitro* per individuare e valutare le variazioni epigenetiche. La conoscenza sistematica del meccanismo della regolazione dei pathways epigenetici e di quelli regolanti i diversi processi dello sviluppo permette di indagare le modifiche a livello di espressione dei geni coinvolti in ciascuno di questi pathways. Sono discusse esperienze scientifiche presenti in letteratura e esperienze condotte presso il nostro laboratorio, in particolare sarà valutato il meccanismo molecolare che regola il cambiamento di fase in piante di pesco propagate *in vitro*.

Si ringrazia la dott.ssa Emilia Caboni del CRA-Istituto Sperimentale per la Frutticoltura (ROMA) ed i suoi collaboratori per il materiale vegetale fornito per le prove sperimentali.

Ricerca in parte finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (FRU.MED. Sottoprogetto 1: PRO.VI.SUD)

Modelli di crescita *in vitro* per lo studio di una molecola ABA-antagonista

Tiziana Vigliarolo¹, Sara Barberini², Alessia Grozio¹, Enrico Millo¹, Lucrezia Guida¹, Annalisa Salis¹, Marta Bellotti¹, Antonio De Flora¹, Elena Zocchi¹ e Barbara Ruffoni²

¹ Dipartimento di Medicina Sperimentale, sezione Biochimica e Centro di Eccellenza per le Ricerche Biomediche CEBR, Università di Genova

² CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

Il ruolo dell'acido abscissico (ABA) come regolatore di crescita vegetale è stato ampiamente dimostrato: esso infatti è coinvolto nella risposta a stress abiotici (temperatura, luce, siccità), nella regolazione della dormienza dei semi, nella germinazione e nel controllo delle chiusure degli stomi. Nelle colture *in vitro*, poi, risulta di fondamentale importanza nella regolazione dei processi di embriogenesi somatica.

Recentemente è stato dimostrato che l'ABA, a concentrazioni comprese tra 0,1 e 10 µM, si comporta come una citochina endogena pro-infiammatoria in granulociti umani, inducendo un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), un aumento dell'attività di fagocitosi e della chemiotassi cellulare. L'ABA stimola anche l'attivazione funzionale dei monociti/macrofagi umani e murini. Effettuando uno screening di analoghi strutturali dell'ormone vegetale acido abscissico, è emerso che GV10 fra tutti presenta una maggiore capacità di agire da antagonista degli effetti pro-infiammatori dell'ABA su cellule umane. Inoltre GV10 risulta essere stabile in tampone fisiologico e plasma umano per 24 h a 37 °C ed ha una bassa citotossicità su più linee cellulari. A tal fine sono stati effettuati test biologici su granulociti e monociti umani.

Le risposte fisiologiche ottenute in ambito vegetale sono utili per studiare la trasduzione del segnale, fenomeno con tutta probabilità molto conservato.

Obiettivo del presente lavoro è mettere a punto sistemi modello *in vitro* su materiali vegetali che possano produrre risposte fisiologiche evidenti all'acido abscissico al fine di rendere ben visibile l'effetto antagonista di GV10.

Il primo sistema ha preso in considerazione germogli di *Salvia sinaloensis* in micropropagazione su mezzo di coltura standard (Murashige e Skoog, più BA 0,3 mg/l) addizionato di ABA o GV10 o entrambi (rapporto molare 2:1; 1:1; 1:2); mentre ABA a 5 µM induce senescenza, la presenza di analogo in quantità equimolare riduce gli effetti negativi.

Il secondo sistema modello ha analizzato la capacità germinativa di semi di *Solanum lycopersicum*; i test di germinazione sono stati condotti in camera di crescita utilizzando carta bibula in capsule Petri. Questo sistema modello veloce e di facile messa a punto mostra come la germinazione sia inibita dall'ABA già a partire dai primi giorni. La presenza di GV10 insieme all'ABA (in rapporto molare 1:2) ripristina il potenziale germinativo dei semi.

Coltura *in vitro* di *Cannabis sativa* L. per la conservazione del germoplasma ed il suo risanamento

Giulia Schibuola¹, Maria Grazia Arduini², Elisa D'Incà¹, Julieta Emilia Gergely³ e Gianpaolo Grassi²

¹ Dipartimento di Scienze MM. FF. NN., Università di Ferrara

² CRA-CIN Centro di Ricerca per le colture industriali, sede distaccata di Rovigo

³ Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze dell'Università di Oradea (Romania)

In questi ultimi 15 anni, *Cannabis sativa* L. è stata oggetto di nuove ricerche soprattutto nel settore medico, in seguito alla scoperta del sistema endocannabinoide. Le aziende farmaceutiche stanno prendendo in seria considerazione la possibilità di sviluppare preparazioni farmaceutiche (galeniche o tradizionali), per la cura sintomatologica o, in prospettiva, per la cura di importanti malattie come il cancro.

Cannabis s. ha pressoché l'esclusiva proprietà di sintetizzare una famiglia di molecole di primario interesse farmacologico che è quella dei cannabinoidi (circa 70 diverse molecole). Nella pianta di *Cannabis* un singolo cannabinoide può raggiungere la concentrazione eccezionale del 25% della sostanza secca. Normalmente questi genotipi sono ibridi e devono essere conservati e moltiplicati vegetativamente. Per questo, la conservazione di *Cannabis* pone problemi di ordine economico, logistico e sanitario. Le malattie più pericolose per questa pianta sono dovute a virus, che possono comprometterne la vitalità.

In questo lavoro preliminare sono state avviate attività di coltura *in vitro* di espianti di *Cannabis* derivati da diverse varietà e ibridi in corso di selezione per l'impiego nella produzione ad uso medicinale. Nelle prime fasi di coltivazione sono stati impiegati terreni addizionati con l'ormone sintetico Thidiazuron [1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea], suggerito da diversi autori perché garantisce uno dei rapporti di moltiplicazione più elevati tra quelli riportati. La pre-

senza di ormoni nel terreno di coltura ha però evidenziato l'induzione di processi di rapido invecchiamento e deterioramento degli espianti, specialmente quando questi sono sottoposti a trattamenti volti all'eradicazione di infezioni virali. In particolare, il fattore antivirale (Ribavirina), aggiunto al terreno in ragione di 1,5-2 µg/ml fa aumentare l'effetto tossico sulla *Cannabis* se è contemporaneamente presente nel mezzo di coltura un ormone. Per aumentare la probabilità di successo dell'eradicazione dei virus è stato utilizzato anche il trattamento con termoterapia.

Per le prove è stata utilizzata una linea ibrida dioica denominata G-170, la cui caratteristica è quella di produrre il tetraidrocannabinolo (THC) al livello del 98% dei cannabinoidi totali. Altra varietà di canapa monoica su cui si è lavorato è stata l'ERMO, caratterizzata per essere pressoché priva di cannabinoidi.

Il mezzo di coltura è stato il Murashige & Skoog addizionato con complesso vitaminico Gamborg. In previsione di non raggiungere la totale eliminazione delle possibili infezioni virali è stato applicato il processo di crioterapia, la cui funzione è quella sia di aumentare l'effetto di risanamento da virus sia di conservare per un tempo indefinito gli espianti di canapa. Con la linea G-170 si è arrivati a completare l'intero processo previsto per il risanamento ed ora si stanno verificando, attraverso innesti su piante indicatrici, le piante micropropagate e radicate.

Risposte morfologiche e fisiologiche a stress da NaCl in *Limonium cordatum* e *Helichrysum rupestre*

Marco Savona¹, Arianna Cassetti¹, Carlo Mascarello¹, Sara Barberini¹ e Gloria Salazar²

¹ CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

² Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería (Spagna)

La possibilità di avere un sistema sperimentale riproducibile *in vitro* riveste un ruolo estremamente importante per lo studio dei meccanismi fisiologici delle piante in risposta a stress biotici e soprattutto abiotici.

In questa ricerca è stato analizzato il meccanismo di tolleranza ed adattamento a stress salino in *Limonium cordatum* ed *Helichrysum rupestre*, due specie tipiche dell'areale mediterraneo caratteristiche delle rocce calcaree a picco sul mare.

Limonium cordatum è specie alofita endemica ligure; per questa specie è stato messo a punto il protocollo di micropropagazione utilizzando un substrato base secondo Murashige e Skoog + BA 0,2 mg/l e garantendo in breve tempo un cospicuo pool di plantule sane in grado di ambientarsi in maniera efficiente sia in serra sia nelle loro stazioni naturali originarie. Su questa specie sono state effettuate prove di crescita di micro talee con concentrazioni crescenti di NaCl (0 - 150 - 300 - 450 mM) aggiunto al substrato base senza ormoni oppure al substrato di moltiplicazione e

sono stati rilevati i principali parametri morfologici vitali quali e quantitativi. È stata condotta anche l'analisi microscopica dei tessuti trattati.

Helichrysum rupestre è una specie endemica siciliana; anche in questo caso il protocollo di moltiplicazione è stato messo a punto precedentemente. Il materiale in micropropagazione è stato sottoposto allo stesso esperimento con NaCl precedentemente descritto.

L'analisi istologica evidenzia in *Limonium* la presenza nel materiale micropropagato di ghiandole del sale, tipiche di specie alofite e non ancora descritte in materiali prodotti *in vitro*. Nelle due specie la risposta più evidente si ha a livello dell'apparato radicale: in presenza di concentrazioni elevate di NaCl, si assiste all'inibizione della crescita dell'abbozzo radicale nonostante siano presenti evidenti abbozzi radicali primari.

I caratteri quantitativi e qualitativi come il tasso di moltiplicazione, la sopravvivenza e l'altezza degli espianti diminuiscono in modo statisticamente significativo all'aumentare della concentrazione salina.