UNIONE EUROPEA

REPUBBLICA ITALIANA

REGIONE LIGURIA

Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020 Regione Liguria

Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Mis. 16.1 "Aiuti per la costituzione e l'operatività dei gruppi operativi del PEI Attuazione del progetto dei Gruppi Operativi – 2^ fase "Settore Agricolo"

PROGETTO DI COOPERAZIONE

"Crisantemo da fiore reciso: interventi di miglioramento varietale" – CRIREC

Domanda di aiuto n. 12834

Partner del progetto

Coordinatore del Progetto
Gianluca Vinci

Responsabile tecnico scientifico
Pasquale Restuccia

Responsabile scientifico - CNR-IPSP TORINO
Dott.ssa Anna Maria Vaira

Responsabile scientifico CREA SANREMO
Dr. Andrea Copetta

Tecnici coinvolti

Dott.ssa Laura Miozzi
Daniele Marian
Manuela Pamato
Paolo Vinotti
Stefano Maritano
Andrea Di Muro
Marco Capello
Alessandro Gazzano
Sandro Boldrini
Michele Ricci
Matteo Bassi

Relazione finale sui due anni di attività (2021-2022)

1. Introduzione al progetto

Il crisantemo da fiore reciso è tutt'ora una coltura ancora interessante per il mercato italiano dove le varietà uniflora a stelo singolo vengono commercializzate per la commemorazione dei defunti. In Liguria la superficie investita a questa coltura ha subito un notevole tracollo in questi ultimi dieci anni, ma ciò che rimane e che quindi si produce è di ottima qualità e molto richiesto e commercializzato in Liguria e nelle regioni limitrofe. Il crisantemo è suscettibile all'infezione di numerosi virus ed almeno due viroidi trasmessi da insetti, pratiche colturali, contatto con piante infette, continua propagazione agamica. Obbiettivo di questo progetto è di recuperare, risanare e rendere disponibili per i coltivatori liguri varietà di crisantemo da fiore reciso molto appetibili dal punto di vista commerciale ma ormai scomparse dai cataloghi di costitutori sia olandesi che danesi. Ne sono un esempio le varietà di crisantemo Dilana, Snowdon e Turner, le quali sono tuttora richieste dal mercato nazionale ma hanno perso le caratteristiche positive intrinseche della varietà a causa delle malattie virali diffuse dalla continua propagazione agamica.

La propagazione vegetativa, nel crisantemo, causa la trasmissione dell'infezione alle nuove talee e porta all'accumulo di patogeni, riduzione della vigoria della pianta e presenza di gravi sintomatologie cloro-necrotiche e conseguente danno alle piante, foglie e fiori. In Italia sono molto diffuse le infezioni da: a) Chrysanthemum carlavirus B, i sintomi sono mosaico o schiaritura nervale delle foglie e scarsa qualità dei capolini fiorali; b) tomato aspermy cucumovirus che induce nanismo della pianta, deformazione e screziature

dei capolini; c) tomato spotted wilt tospovirus che causa gravi necrosi su foglie, steli, fiori, riduzione di sviluppo delle piante e scalarità nella fioritura. Un ulteriore tospovirus, Chrysanthemum stem necrosis virus, trasmesso da tripidi provoca necrosi molto gravi, non è stato descritto in Italia ed è nella lista EPPO A 1 della quarantena riguardante i virus. Chrysanthemum stunt pospiviroid è un viroide molto infettivo nella lista EPPO A 2 e un patogeno grave del crisantemo che causa nanismo, maculatura clorotica sulle foglie e sintomi di decolorazione e deformazione sui fiori. In condizioni di infezione da virus le piante diventano anche più suscettibili all'attacco di tracheoverticilliosi.

Per risanare le varietà di crisantemo (Dilana, Snowdon e Turner) sono stati effettuati campionamenti per: 1) la diagnosi di virus e viroidi con tecniche di Next Generation Sequencing, riconoscere forme virali note e nuove con saggi diagnostici molecolari per il controllo delle piante risanate, 2) prelevare materiale vegetale per il risanamento. Le piante sono state poste *in vitro*, risanate con trattamenti termici e successivo prelievo dei meristemi che sono stati micropropagati in vitro. Le piante risanate sono state ambientate in una serra con rete "insect-proof" per avere un pool di piante madri controllate per l'assenza di virus e per la produzione di materiale agamico che soddisfi il fabbisogno territoriale.

La tecnica del NGS utilizzata in questo progetto è estremamente innovativa, valida e potente nell'identificare virus e viroidi presenti in campioni vegetali ed è correntemente utilizzata con successo per risolvere molte problematiche del mondo vegetale. Molti altri virus e viroidi sono stati descritti nel crisantemo e l'ottenimento del suo ''viroma'' attraverso l'analisi NGS dei campioni raccolti ha l'importante significato di conoscere la reale situazione attuale delle varietà di crisantemi oggetto del risanamento, attraverso una metodologia in grado di evidenziare infezioni di virus noti e non ancora descritti e di permettere una corretta convalida del risanamento effettuato sulle varietà di interesse.

2. Attività e Risultati

Campionamenti (FlorCoop - IPSP-CNR - CREA)

Sono state organizzate due campagne di raccolta di campioni in Liguria nel 2017 e nel 2021.

Nel 2017 sono stati raccolti campioni di foglie di crisantemo appartenenti alle varietà Snowdon (bianco e giallo) e Dilana (giallo e rosa) presso l'azienda Di Felice a Riva Ligure (IM).

Nel 2021 sono stati raccolti campioni di foglie di crisantemo appartenenti alle varietà Snowdon (bianco e giallo), Dilana (giallo e rosa) e Turner (bianco, giallo e viola) presso l'azienda Lorenzi a Ventimiglia (IM), l'azienda Castagna a Santo Stefano al Mare (IM) e l'azienda Foschini a Coldirodi (IM).

A questi, sono stati aggiunti campioni prelevati dal dott. Copetta per valutare la situazione pre- e post-risanamento *in vitro*.

Tutti i campioni sono stati suddivisi in 3 campioni equivalenti e conservati a -80°C in attesa di procedere con l'estrazione dell'RNA totale.

Estrazione RNA dai campioni e sequenziamento con tecnica high-throughput (IPSP-CNR)

Dai campioni conservati è stato estratto l'RNA totale. Controllata la qualità mediante nanodrop, i campioni sono stati raggruppati in pool (Tabella 1) per poter essere sequenziati.

CI	Turner 2021	3 campioni
CII	Snowdon 2017 e 2021	10 campioni
CIII	Dilana 2017 e 2021	12 campioni
CIV	*In vitro* pre	12 campioni
CV	*In vitro* post	5 campioni

Tabella 1. Composizione dei pool per i sequenziamenti.

In dettaglio i 5 pool mandati a sequenziare erano così costituiti.

Pool I: comprende 3 campioni di crisantemo, varietà Turner bianco, giallo e viola, raccolti nel 2021 a Ventimiglia, provincia di Imperia. I campioni presentavano clorosi e arrossature.

Pool II: costituito da 10 campioni di crisantemo appartenenti alle varietà Snowdon bianco e giallo, raccolti nel 2017 e 2021 a Santo Stefano al Mare e a Riva Ligure, entrambe in provincia di Imperia. I campioni presentavano importanti arrossamenti internervali, clorosi, deformazione, striature necrotiche sui fiori, prezzemolatura, mosaico e necrosi, rossore sui fiori.

Pool III: costituito da 12 campioni di crisantemo appartenenti alle varietà Dilana rosa e giallo, raccolti nel 2017 e 2021 nelle zone di Coldirodi e Riva Ligure, entrambe in provincia di Imperia. I campioni presentavano striature biancastre internervali, rossori, clorosi, arrossamenti, necrosi, foglie a cucchiaio.

Pool IV: comprendente 12 campioni di crisantemo delle varietà Snowdon bianco e giallo e Dilana giallo e rosa, raccolti a Riva Ligure, provincia d'Imperia, selezionati per il risanamento *in vitro* in quanto presentavano pochi sintomi potenzialmente virali.

Pool V: costituito da 5 piante di crisantemo, varietà Snowdon giallo, Turner bianco e giallo e Dilana rosa, dopo il trattamento di risanamento in vitro. Quest'ultimo pool è servito a verificare l'efficacia della procedura di risanamento.

I campioni sono stati spediti presso l'azienda NovoGene, dove in seguito ad un passaggio di rimozione delle sequenze ribosomali, sono state costruite le *library* per il sequenziamento dell'RNA totale 2x150 bp con sequenziatore Illumina NovaSeq6000.

Analisi bioinformatica (IPSP-CNR)

Una volta ottenuti e trasferiti i file fastq, è iniziata la fase di analisi bioinformatica al fine di ottenere le informazioni su eventuali virus e viroidi presenti nei campioni.

Il primo passaggio consiste nel valutare la qualità delle "*reads",* ossia le sequenze ottenute*,* e rimuovere eventuali sequenze di adattatori utilizzati durante il processo di sequenziamento ancora presenti. Si passa, quindi, alla rimozione delle sequenze ribosomali, sequenze abbondanti che costituiscono un rumore di fondo per i successivi passaggi. Si ottengono, così, delle *reads* pulite che vengono mappate contro il genoma del crisantemo. Si procede con l'assemblaggio delle *reads* che non mappano sul genoma in sequenze più lunghe, definite *scaffolds*. Si ricercano ancora eventuali sequenze di origine vegetale da scartare e si raggruppano in *contigs* usati come input per la ricerca delle sequenze virali (Tabella 2).

Pool	Raw reads	Preprocessed reads	Ribosomal reads	Clean reads	Unmapped reads	Scaffolds	Unaligned scaffolds	Contigs
CI	90.341.388	87.787.674	6.220.020	81.567.654	72.884.768	346.925	16.014	13.432
CII	51.270.026	49.596.754	4.349.712	45.247.042	43.861.152	180.532	10.055	8.462
CIII	84.539.722	83.153.028	7.312.506	75.840.522	71.800.246	251.024	13.272	11.246
CIV	89.672.554	88.355.952	9.307.696	79.048.256	72.438.264	289.505	12.084	10.176
CV	102.702.518	100.034.418	12.108.932	87.925.486	84.343.612	417.477	24.744	21.130

Tabella 2. Numero di reads, scaffolds e contigs ottenuti nei diversi passaggi dell'analisi bioinformatica.

Pool CI

Nel pool di campioni di crisantemo varietà Turner, sono stati rilevati due virus noti per infettare il crisantemo, cioè chrysanthemum virus B e tomato spotted wilt virus. In più sono state identificate delle sequenze con un certo livello di similitudine con virus delle famiglie *Virgaviridae* e *Caulimoviridae*, per cui la validazione tramite RT-PCR è ancora in corso.

Pool CII

Per quanto riguarda il pool composto dalla varietà Snowdon, sono stati individuati 3 virus noti in crisantemo, ossia chrysanthemum virus B, carnation mottle virus e tomato spotted wilt virus. Sono state inoltre ritrovate delle sequenze riconducibili alla famiglia *Virgaviridae*. La validazione RT-PCR di queste sequenze, effettuata sui singoli campioni che costituiscono il pool, ha permesso di individuare la loro presenza in una sola pianta su dieci che costituivano il pool (Figura 1).

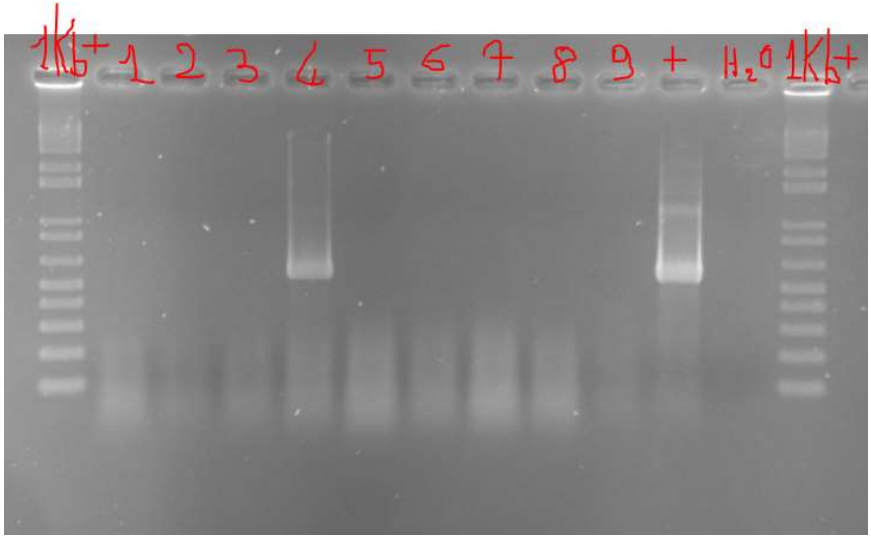

Figura 1. Gel di elettroforesi per la validazione di sequenze della famiglia Virgaviridae all'interno del pool CII. DNA ladder 1kb+. Il campione 4 presenta la banda attesa.

Grazie a questo, si è risaliti alla pianta positiva, raccolta e catalogata come pianta C15, una pianta di Snowdon bianco raccolto nel 2017, che presentava sintomi di mosaico e necrosi (Figura 2).

Figura 2. Pianta di crisantemo, varietà Snowdon bianco, raccolta nel 2017 presso l'azienda Di Felice, presentante mosaico e necrosi.

All’interno del pool, è stato individuato anche un viroide, chrysanthemum chlorotic mottle viroid (famiglia *Avsunviroidae*, genere *Pelamoviroid*) (Figura 3). Per la conferma, si procederà con validazione in RT-PCR.

Figura 3. Campioni di crisantemo varietà Snowdon giallo, che presentano clorosi, compatibili con infezione da chrysanthemum chlorotic mottle viroid.

Pool CIII

L'analisi dei campioni di crisantemo varietà Dilana raccolti nel 2017 e 2021 ha evidenziato la presenza di tomato spotted wilt virus e di sequenze simil-virali riconducibili alla famiglia *Caulimoviridae*. Anche in questo caso la validazione tramite RT-PCR è in corso.

Pool CIV

Il pool CIV è stato formato da 12 piante di varietà Snowdon bianco e giallo, Dilana giallo e rosa, raccolte nel 2017, poco sintomatiche, che sono andate a costituire i campioni pre-trattamento *in vitro*. L'analisi ha individuato due virus noti, il chrysanthemum virus B e il tomato spotted wilt virus, e sequenze riconducibili alla famiglia *Bromoviridae.* Al momento è in corso la validazione mediante RT-PCR.

Pool CV

Il pool CV è costituito da 5 piante (Dilana rosa, Snowdon giallo, Turner bianco e giallo) post trattamento di risanamento. Nel confronto con il pool CIV, sopravvivono al primo trattamento *in vitro* sia il chrysanthemum virus B che il tomato spotted wilt virus. Si procederà quindi a ulteriori trattamenti per arrivare al risanamento di tutte le varietà.

Validazioni con RT-PCR su singoli campioni di crisantemo sottoposti a risanamento.

Sono state condotte validazioni in RT-PCR per quanto riguarda chrysanthemum virus B e tomato spotted wilt virus, le due specie virali più critiche per il crisantemo. Questi saggi hanno evidenziato che il campione CV1 (crisantemo varietà Dilana rosa) risulta essere esente da entrambi i virus (Figura 4).

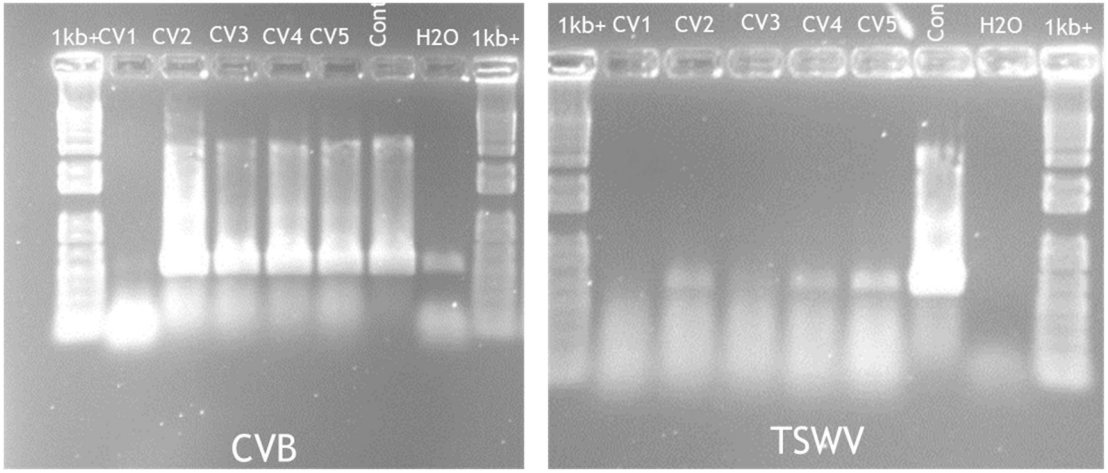

Figura 4. Gel di elettroforesi per validazione con RT-PCR dl chrysanthemum virus B (CVB) e tomato spotted wilt virus (TSWV). Il campione di controllo positivo è indicato come Con, DNA ladder 1kb+. Il campione CV1 non mostra la banda presente nel controllo positivo.

Saggi diagnostici (CNR-IPSP-CREA)

Primers specifici da utilizzarsi nella diagnosi delle diverse specie virali rilevate nei saggi di RT-PCR sono stati già in parte sintetizzati, in base alle sequenze ottenute attraverso il saggio NGS, e sono stati utilizzati per la validazione dei singoli campioni *post vitro* indicando che il trattamento a cui sono state sottoposte le piante è risultato vincente sulla varietà Dilana rosa già al primo tentativo. Saggi sono in corso per la validazione dei restanti virus.

Risanamento (CREA)

Il metodo di risanamento da virosi più affidabile risulta nel prelievo del meristema da materiale in attiva crescita abbinato a trattamenti termici con alte temperature che consentono l'inattivazione virale/viroidale. Il prelievo del meristema permette, una volta esclusa la presenza di particelle virali nelle piante ottenute *in vitro*, di effettuare una clonazione per l'ottenimento di piante madri che opportunamente coltivate mantengono lo stato sanitario ottimale. Il materiale vegetale campionato era costituito da rami fiorali ed è stato conservato in frigorifero fino al processamento. I campioni sono stati suddivisi in microtalee (circa 1-1,5 cm con almeno una gemma ascellare), lavate con acqua saponata per 15' e utilizzate per la sterilizzazione superficiale necessaria per instaurare la coltura in vitro delle varietà di crisantemo oggetto di studio. Sono stati testati 3 differenti protocolli di sterilizzazione: ipoclorito di sodio al 2% per 20'; pretrattamento con etanolo al 70% per 20'' e ipoclorito di sodio al 2% per 20', pretrattamento con etanolo al 70% per 20'' e ipoclorito di sodio al 2,5% per 20'. Dopo la sterilizzazione superficiale, le microtalee sono state sciacquate due volte in sterilità con acqua deionizzata sterile per 10'. Le microtalee sono state poste in tubi di vetro

contenenti 10 ml di substrato agarizzato (7 g/l) con sali e vitamine Murashige and Skoog (MS) con 30g/l di saccarosio e pH 5.7 (MS0). Dopo 2 settimane di coltura in cella climatica a 23 °C sono stati valutati il numero di microtalee vitali e sane, vitali ma inquinate e il numero di microtalee morte. Il metodo di sterilizzazione è stato testato su quattro varietà (Dilana giallo e rosa - DG, DR; Snowdon bianco e giallo - SB, SG) e successivamente il metodo che ha dato i risultati migliori (etanolo al 70 % per 20'' e ipoclorito di sodio al 2% per 20') è stato applicato alle varietà Turner. I risultati del metodo di sterilizzazione sono riportati nella Tabella 3. In figura 5 sono presentati le microtalee dopo la sterilizzazione.

trattamento	varietà	sane %	inquinate %	morte %
NaClO 2%	DG	20,0 ± 5,8	66,7 ± 3,3	13,3 ± 6,7
	DR	13,3 ± 3,3	83,3 ± 3,3	3,3 ± 3,3
	SB	20,0 ± 1,0	76,7 ± 3,3	3,3 ± 3,3
	SG	16,7 ± 6,7	76,7 ± 3,3	6,7 ± 3,3
EtOH 70% + NaClO 2%	DG	66,7 ± 3,3	30,0 ± 1,0	3,3 ± 3,3
	DR	70,0 ± 5,8	23,3 ± 8,8	6,7 ± 3,3
	SB	73,3 ± 3,3	16,7 ± 3,3	10,0 ± 5,8
	SG	73,3 ± 6,7	16,7 ± 6,7	10,0 ± 1,0
EtOH 70% + NaClO 2,5%	DG	50,0 ± 5,8	23,3 ± 3,3	26,7± 8,8
	DR	43,3 ± 3,3	16,7 ± 3,3	40,0 ± 1,0
	SB	33,3 ± 3,3	20,0 ± 5,8	46,7 ± 8,8
	SG	60,0 ± 5,7	16,7 ± 3,3	23,3 ± 3,0

Tabella 3. Risultati delle prove di sterilizzazione delle microtalee. NaClO – ipoclorito di sodio, EtOH – etanolo; DG – Dilana giallo; DR Dilana rosa; SB – Snowdon bianco; SG – Snowdon giallo.

Figura 5. Microtalee di crisantemo sterilizzate superficialmente e poste in tubo dopo due settimane di coltivazione in vitro. A sinistra microtalea sana; a destra microtalea con inquinamento da microrganismi (batteri e lieviti).

Per propagare il materiale sano ottenuto *in vitro*, sono stati saggiati due substrati (MS0) arricchiti con ormoni vegetali utilizzati su differenti varietà di crisantemo e già presenti in bibliografia: benzilammino purina 1mg/l e acido indolacetico 0,1 mg/l (BA1+IAA0,1) (Wassen et al., 2009) e kinetina 0,5 mg/l (KIN0,5) (Jeon et al., 2012). Dopo un mese è stato valutato quale dei due metodi avesse prodotto un maggior numero di espianti. Come evidenziato in tabella 4, il substrato BA1+IAA0,1 è risultato essere il migliore per la propagazione di tutte le varietà considerate.

varietà	BA1+IAA0,1	KIN0,5
DG	8 ± 1	3 ± 1
DR	8 ± 1	2 ± 1
SB	7 ± 1	3 ± 1
SG	8 ± 1	3 ± 1
TB	5 ± 1	2 ± 1
TG	5 ± 1	2 ± 1

Tabella 4. Risultati delle prove di moltiplicazione degli espianti in vitro su due differenti substrati di coltivazione in vitro. BA1+IAA0,1 – MS0 arricchito con benzilammino purina 1mg/l e acido indolacetico 0,1 mg/l; KIN0,5 – etanolo; DG – MS0 arricchito con kinetina 0,5 mg/l; DG – Dilana giallo; DR Dilana rosa; SB – Snowdon bianco; SG – Snowdon giallo; TB – Turner bianco; TG – Turner giallo.

Gli espianti ottenuti sono stati posti singolarmente in substrato MS arricchito con BA 0,3 mg/l e dopo un mese di sviluppo a 23°C in cella climatica sono stati trasferiti in armadio termostatato a 37 °C per la termoterapia. A distanza di due settimane i meristemi vegetativi (apicali ed ascellari) sono stati prelevati posti in piastra Petri su substrato MS0 per la rigenerazione. Meno del 30% dei meristemi prelevati hanno dato origine a nuove piante nelle varietà Dilana e Snowdon mentre per le varietà di Turner meno del 15% dei meristemi prelevati hanno dato origine ad una pianta. Le piante originate da meristemi sono state propagate utilizzando il substrato BA1+IAA0,1.

In attesa della valutazione dello stato sanitario delle piante ottenute da termoterapia, sono state effettuate prove di radicazione in vitro e successivo ambientamento. Per la radicazione abbiamo testato che tutte le varietà radicano in substrato MS0 (vedi figure 6 e 7) e dopo due settimane di coltura le piante possono essere trasferite in vaso con una bassa mortalità e coltivate in ambiente controllato per successive propagazioni agamiche idonee a soddisfare le necessità dei produttori.

Poiché non tutte le varietà risultano risanate da tutti i virus, si procederà ad effettuare prove di chemioterapia su meristemi in vitro con acyclovir, ribavirina e altre miscele di composti dalle capacità antivirali per ottenere piante virus-free anche per le altre varietà.

Figura 6. Prova di radicazione in vitro. Tutte le varietà radicano su substrato MS senza ormoni.

Figura 7. Pianta di crinsatemo Dilana giallo dopo due settimane di ambientamento in cella climatica.

3. Conclusioni

Per quanto riguarda l'ottenimento dell'informazione sul "viroma" del crisantemo nella zona dell'Imperiese, i sequenziamenti NGS hanno permesso di individuare tre specie virali e un viroide già descritti tra i patogeni del crisantemo, quali **chrysanthemum virus B**, **carnation mottle virus**, **tomato spotted wilt virus** e **chrysanthemum chlorotic mottle viroid**. Sono state inoltre ricostruite sequenze riconducibili alle famiglie Caulimoviridae, Bromoviridae e Virgaviridae, per cui sono in corso validazioni in RT-PCR e ulteriori analisi. Questi dati sono e saranno cruciali per il controllo del risanamento delle varietà, poiché da questi dati è stato possibile, e lo sarà in futuro, ottenere **saggi diagnostici molecolari specifici** per il controllo delle piante sottoposte a risanamento. Numerosissimi esperimenti sono stati fatti, e sono tuttora in corso, per ottenere il risanamento di tutte le varietà in studio, **mettendo a punto protocolli di sterilizzazione e di coltura *in vitro*** e protocolli per potenziare la **radicazione *in vitro* ed il successivo ambientamento delle piantine risanate**. In seguito al primo ciclo di risanamento attraverso il prelievo del meristema *in vitro***, si è ottenuto il risanamento della varietà Dilana rosa**, che è attualmente in propagazione. Si stanno inoltre attualmente saggiando **sostanze antivirali di diversa tipologia** sulle restanti varietà, per ottenerne il risanamento.