

*Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020 Regione Liguria*

*Mis. 16.1 "Aiuti per la costituzione e l'operatività dei gruppi operativi del PEI Attuazione del progetto dei Gruppi Operativi – 2<sup>a</sup> fase "Settore Agricolo"*

**PROGETTO PRELIMINARE DI COOPERAZIONE**

**«Crisantemo da fiore reciso: interventi di miglioramento varietale»**

**CRIREC**

**Strategie per il risanamento delle varietà di  
crisantemo infettate da virus**

**29 luglio 2022**

**Andrea Copetta**

*CREA Research Centre for Vegetable and Ornamental Crops -  
Sanremo*

- Le malattie virali rappresentano un grave problema per le piante coltivate. Esse infatti possono arrecare gravi danni alla pianta e pregiudicare anche gravemente la produzione.
- La presenza di virus può infatti comportare danni a fotosintesi, respirazione, trasporto floematico, modificazioni del metabolismo dei carboidrati. Queste alterazioni spesso comportano dei sintomi visibili (alterazioni delle foglie, rami, fiori o frutti).
- Molte volte la diagnosi del virus presente in un vegetale è difficoltosa e può richiedere complesse analisi di laboratorio.
- Trattamenti in campo risultano inefficaci.

🌿 Gli unici mezzi di controllo sono:

- ❖ impiego di materiale di propagazione sano,
- ❖ lotta alle infestanti → ospiti di molti virus che attaccano anche le piante coltivate
- ❖ lotta ai vettori → insetticidi, pacciamatura con fogli di carta d'alluminio o di poliestere metallizzato, (forme alate degli afidi sono attratte dal giallo e respinte dalla luce solare), fogli adesivi gialli ubicati al di fuori dei campi o delle serre, reti anti-insetto alle serre, doppie porte.
- ❖ utilizzo di varietà resistenti

**PREVENZIONE**

- ❖ termoterapia
- ❖ coltura di meristemi apicali
- ❖ crioterapia/crioconservazione
- ❖ chemioterapia
- ❖ embriogenesi somatica

**RISANAMENTO**

## ❖ Termoterapia

Consiste nel sottoporre materiale vegetale all'azione del calore al fine di inattivare i virus in esso presenti.

Può essere utilizzata acqua o aria calda.

Le temperature utilizzate, sono comprese tra i 35 e i 40°C.

I tempi del trattamento termico possono variare da settimane a mesi in funzione della cultivar e dello specifico virus.

## ❖ Termoterapia

Alle alte temperature la moltiplicazione dei virus viene in qualche modo ostacolata

❖ poiché c'è minore affinità tra RNA virali e ribosomi dell'ospite

❖ inibizione delle replicasi virali (proteine che permettono la proliferazione del virus).

❖ nelle piante s'innescano la reazione di difesa con sintesi delle heat shock proteins ed un precoce invecchiamento (ostacola la diffusione dei virus da cellula a cellula).

Inconveniente: mortalità delle piante (ridotta da atmosfera impoverita di  $O_2$  od arricchita di  $CO_2$ )

**Scarsa efficienza in piante in toto**

## ❖ Coltura di meristemi apicali

Eliminazione dei virus da piante colpite attraverso il prelievo dei meristemi apicali

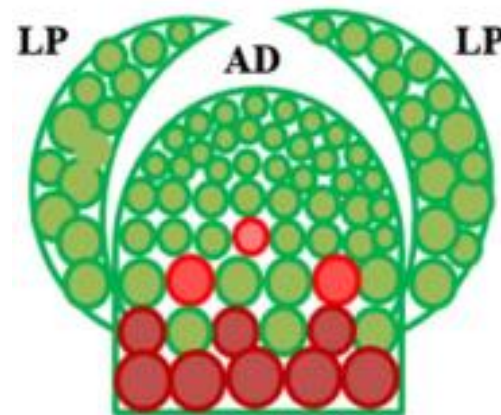
La distribuzione dei virus nei tessuti delle piante non è uniforme



I virus sono poco presenti negli apici meristematici



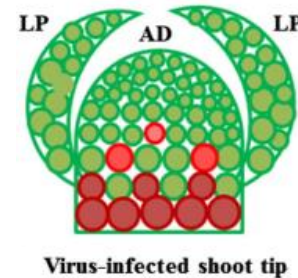
- ✓ scarsa vascolarizzazione
- ✓ assenza di plasmodesmi funzionali
- ✓ trauma della dissezione genera sostanze antivirali



**Virus-infected shoot tip**

Wang et al. Plant Methods (2018) 14:87

## ❖ Coltura di meristemi apicali



Wang et al.  
Plant Methods  
(2018) 14:87

Il meristema apicale è composto da poche cellule totipotenti programmate a formare un germoglio.

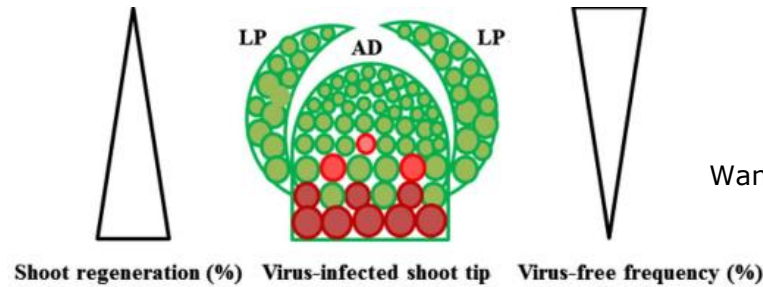
le cellule molto piccole, con piccoli vacuoli e hanno un alto rapporto nucleo-citoplasma

il meristema è protetto dalle foglie del germoglio, non è mai a contatto con l'aria, è sterile e si assume che sia virus-free.

Alcuni virus e viroidi, riescono a colonizzare il meristema quindi il risanamento dipende dall'antagonismo tra virus vs. cellule meristematiche



## ❖ Coltura di meristemi apicali



Wang et al. Plant Methods (2018) 14:87

al diminuire della dimensione dell'espianto si riducono le sue probabilità di sopravvivenza in coltura di tessuti.

minore è la dimensione del meristema apicale prelevato, maggiori saranno le possibilità di escludere il virus.

l'espianto varia da 0,2 a 0,5 mm a seconda della specie da risanare e del virus da eliminare.

## ❖ Crioterapia/crioconservazione

La termoterapia può non funzionare contro i viroidi.

Il risanamento dei meristemi apicali viene ottenuto con la permanenza a basse temperature per diversi mesi a 4-5°C) o per periodi più brevi in azoto liquido, seguita da coltura di meristemi apicali.

Valido strumento alternativo di grandi potenzialità "sanitarie", sebbene non di semplice applicazione.

Abbinamento coltura *in vitro* / termoterapia / crioterapia

vincoli: i tempi lunghi

## ❖ Chemioterapia

Tecnica di risanamento che utilizza composti chimici da applicare a meristemi o piante allevate *in vitro*.

- aciclovir -> inattivatore delle polimerasi virali
- ribavirina -> inibitore ad ampio spettro virus a RNA/DNA
- amantadina -> inibitore del rilascio di RNA virale nella cellula
- 2-thiouracile -> Ram *et al.*, 2005 (*Chrysanthemum morifolium* cv. Regol Time)
- 5-bromouracile -> intercalare del genoma

svantaggi: elevata fitotossicità; effetto negativo su crescita e sviluppo dei meristemi; saggiare differenti concentrazioni (20-50 mg/L) e tempi di trattamento (2-3 mesi)

## ❖ Embriogenesi somatica

Consiste nella differenziazione di embrioni da tessuti di diversa origine, quali foglie, parti del fiore immaturo, internodi, ecc.

Embrioni somatici possono altresì essere usati come espianti da sottoporre a crioconservazione.

svantaggi: i tempi lunghi, la forte dipendenza dal genotipo, potenziale fonte di variabilità somaclonale

## Abbinamento termoterapia e prelievo meristemi

Rilevamento dei virus



Piante poste *in vitro*



Termoterapia



Prelievo dei meristemi



Controllo diagnostico  
della presenza di virus

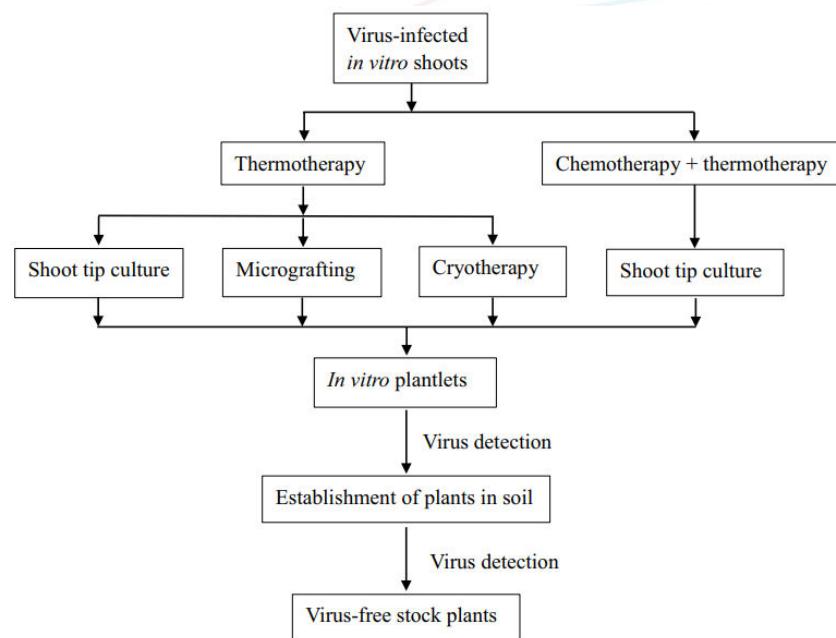


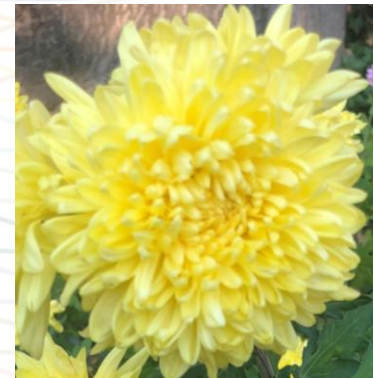


Fig. 1 *In vitro* thermotherapy-based methods for production of virus-free plants

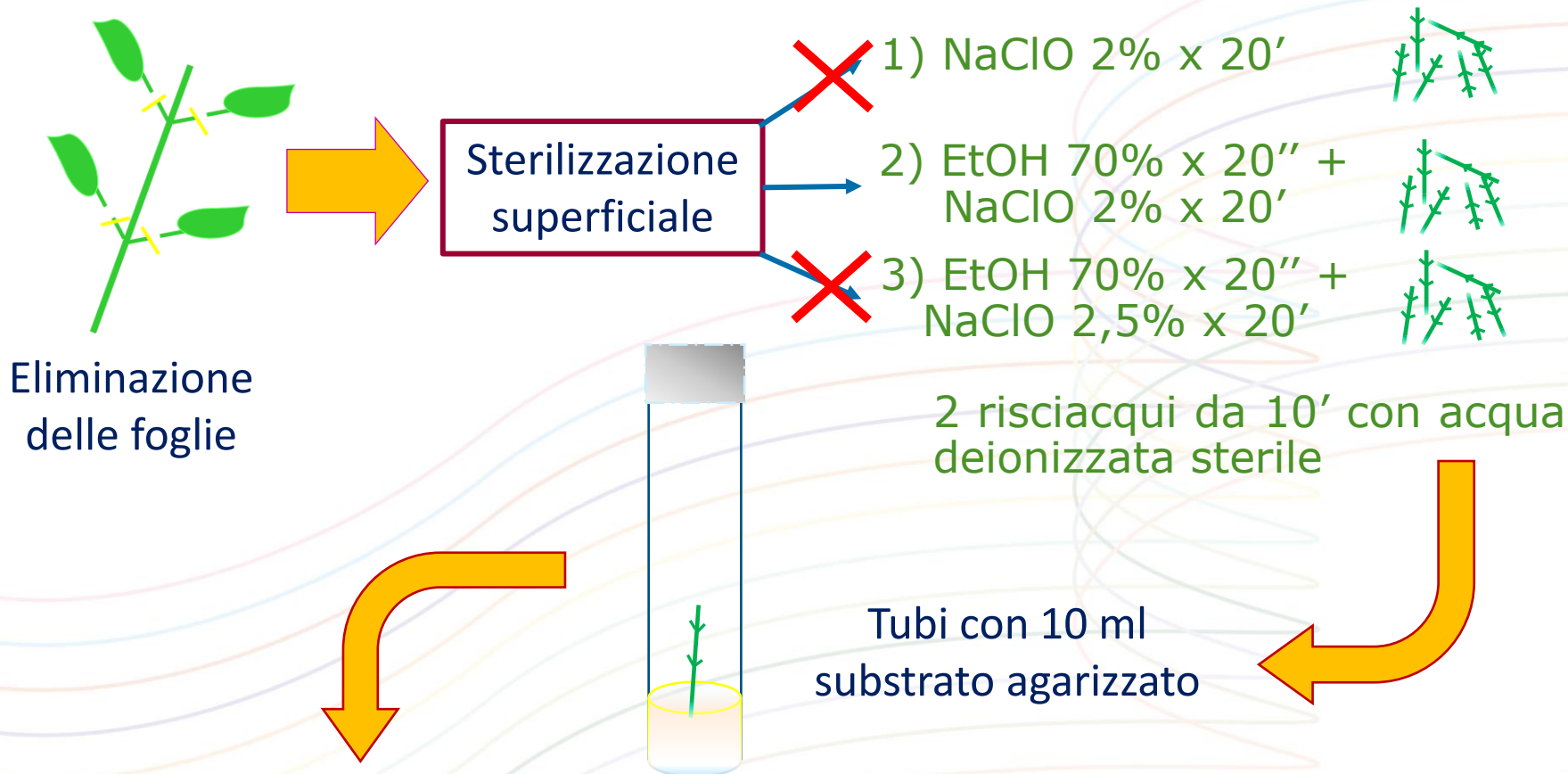
## Varietà

- ❖ Dilana (giallo e rosa)
- ❖ Snowdon (bianco e giallo)
- ❖ Turner (bianco e giallo)

-  Prelievo di porzione di fusto delle diverse varietà
-  I campioni sono stati posti a 4°C prima d'essere processati.



Il giorno successivo, i campioni sono stati suddivisi in microtalee di 3-5 cm con 1-3 gemme posti in acqua saponata per un primo lavaggio da 15'.



Prelievo e  
micropropagazione  
*in vitro*

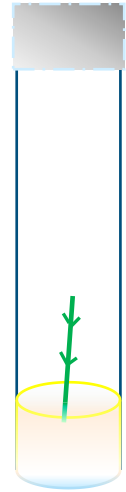
☐ BA 1 mg/l +  
IAA 0,1 mg/l

Wassen et al., 2009

~~☐~~ kinetina 0,5 mg/l

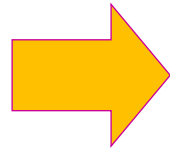
Jeon et al., 2012

dopo 1-2  
settimane

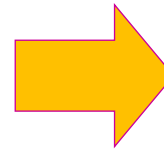




# Termoterapia



BA 0,3 mg/l



Armadio  
termostato  
37°C



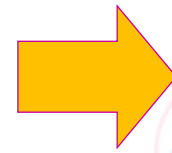
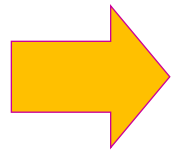
MS0



prelievo dei  
meristemi

Dopo 2 settimane di  
trattamento,  
aumenta la mortalità  
delle piante

# Termoterapia



Abbondante  
radicazione su  
substrato MS  
senza ormoni



Prova di  
radicazione



☛ Controllo diagnostico  
della presenza di virus



Prove di  
chemioterapia  
o crioterapia



controllo  
diagnostico

☛ Prove di ambientamento



Prove di ambientamento  
in serra (giugno 2022)



Morte  
Alte temperature

Prove di ambientamento  
in cella climatica (luglio  
2022)



☛ Dal controllo diagnostico  
(CNR-TO)



1 varietà è  
virus-free

## PROGRAMMA

- Prove di chemioterapia (es. acyclovir, ribavirin) sui meristemi apicali  
Concentrazioni 30, 40 e 50 mg/l per 20 - 30 giorni o più
- Controllo diagnostico su singole piante trattate
- Propagazione, radicazione e ambientamento delle piante virus free

**GRAZIE PER LA  
CORTESE ATTENZIONE**