

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^a fase "Settore Agricolo"

PROGETTO PRELIMINARE DI COOPERAZIONE

«Crisantemo da fiore reciso: interventi di miglioramento varietale»

CRIREC

Risanamento delle varietà di crisantemo
infettate da virus

4 novembre 2022

Andrea Copetta

CREA Research Centre for Vegetable and Ornamental Crops -
Sanremo

RISANAMENTO

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

❖ 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

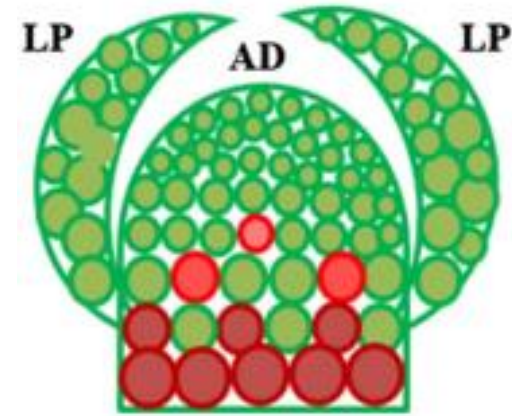
La distribuzione dei virus nei tessuti delle piante non è uniforme



I virus sono poco presenti negli apici meristematici



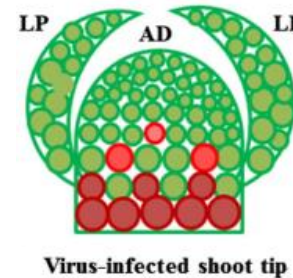
- ✓ scarsa vascolarizzazione
- ✓ assenza di plasmodesmi funzionali
- ✓ trauma della dissezione genera sostanze antivirali



Virus-infected shoot tip

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

❖ Coltura di meristemi apicali



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

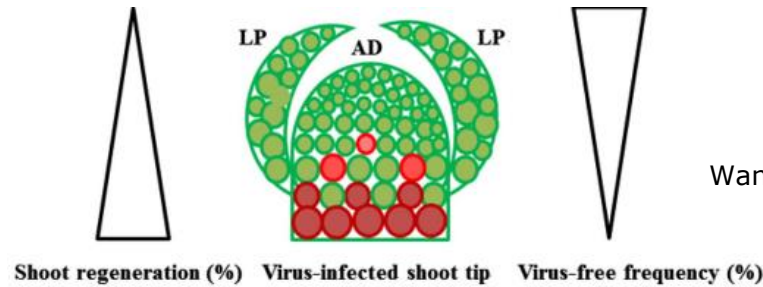
Il meristema apicale è composto da poche cellule totipotenti programmate a formare un germoglio.

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 minore è la
 dimensione del
 dell'espianto si meristema apicale
 riducono le sue prelevato, maggiori
 probabilità di saranno le possibilità
 sopravvivenza in di escludere il virus.
 coltura di tessuti.

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

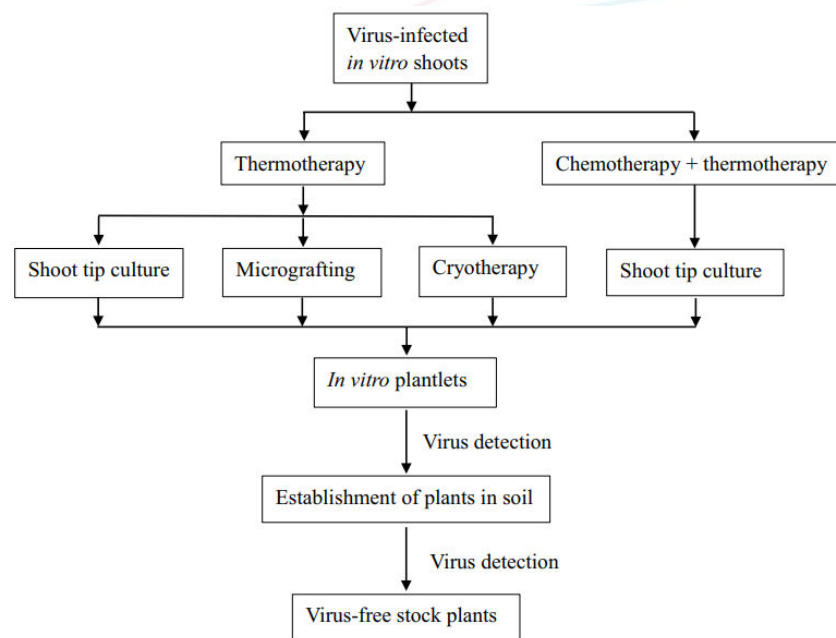


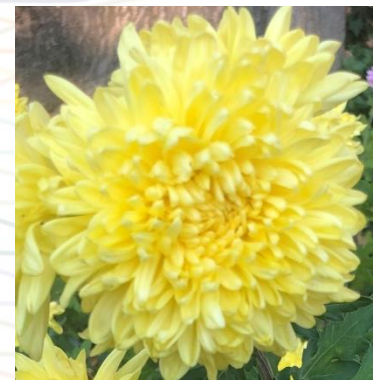


Fig. 1 *In vitro* thermotherapy-based methods for production of virus-free plants

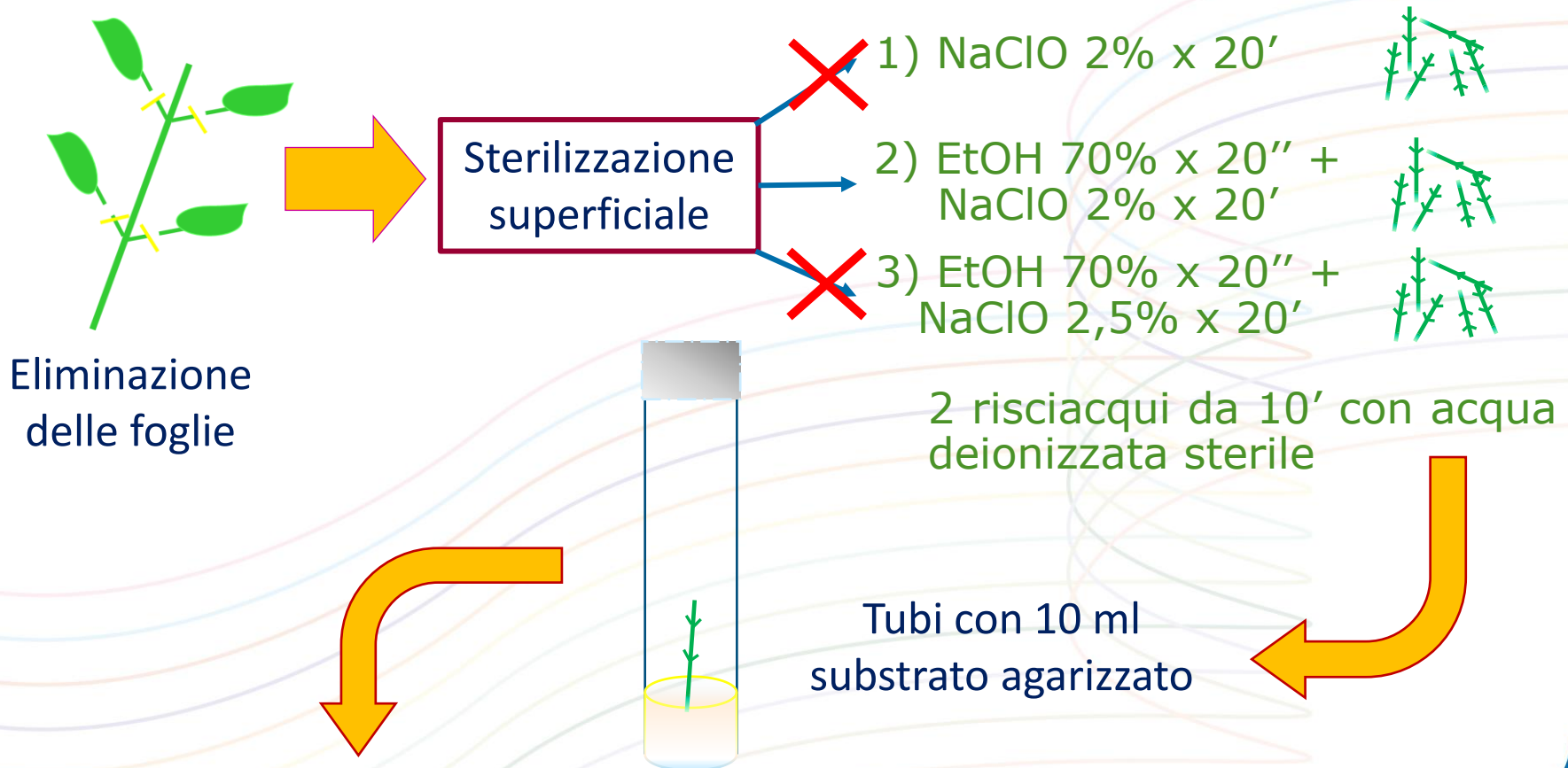
Varietà

- ❖ 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

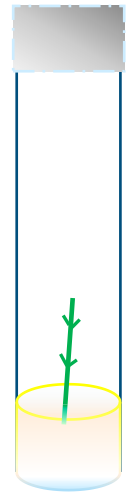
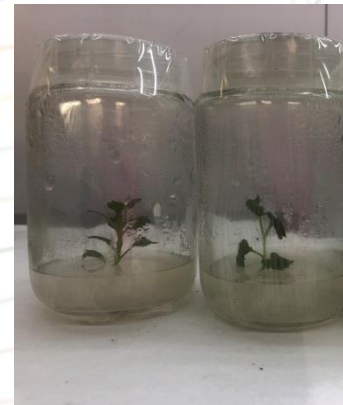
☐ BA 1 mg/l +
IAA 0,1 mg/l

Wassen et al., 2009

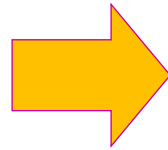
~~☐~~ kinetina 0,5 mg/l

Jeon et al., 2012

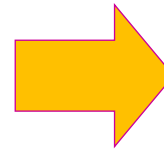
dopo 1-2
settimane



Termoterapia



BA 0,3 mg/l



Armadio
termostato
37°C



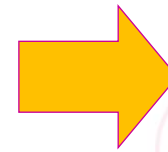
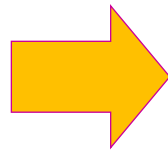
MS0



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**