

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
VITERBO**

**Dipartimento di Produzione Vegetale
Dottorato in Ortoflorofrutticoltura - XXIV Ciclo**

**Sviluppo di nuove varietà di *Limonium*:
messa a punto di protocolli di moltiplicazione e radicazione *in vitro*,
di ambientamento e di caratterizzazione molecolare
di ibridi intra- ed interspecifici
AGR/04**

**Coordinatore
Chiar.mo Prof. Alberto Graifenberg**

**Tutor:
Gianluca Burchi**

**Dottorando:
Maurizio Antonetti**

INDICE

RIASSUNTO.....	pag.4
ABSTRACT.....	pag. 5
Capitolo 1 – INTRODUZIONE.....	pag. 6
1.1. Premessa.....	pag. 6
1.2. Il Genere <i>Limonium</i>	pag.8
1.2.1. <i>Cenni botanici</i>	pag. 8
1.2.2. <i>Interesse ornamentale</i>	pag. 9
1.3. Coltivazione, caratteristiche agronomiche e principali avversità.....	pag. 14
1.4. Tecniche di propagazione.....	pag. 18
1.5. Tecniche di <i>fingerprinting</i>	pag. 25
Capitolo 2 - SCOPO DEL LAVORO.....	pag. 28
Capitolo 3 - MATERIALI E METODI.....	pag. 29
3.1. Materiale vegetale.....	pag. 29
3.2. Impostazione generale della ricerca.....	pag. 30
3.3. Messa a punto dei protocolli di micropropagazione.....	pag. 33
3.3.1. <i>Tipologie di espianto e tecniche di sterilizzazione</i>	pag. 33
3.3.2. <i>Stabilizzazione in vitro</i>	pag. 34
3.3.3. <i>Test iniziali di moltiplicazione e di radicazione in vitro</i>	pag. 35
3.3.4. <i>Prove preliminari di propagazione in vitro</i>	pag. 36
3.3.5. <i>Selezione delle linee clonali</i>	pag. 38
3.3.6. <i>Messa a punto dei protocolli di moltiplicazione e radicazione in vitro</i>	pag. 40
3.3.7. <i>Prove preliminari di radicazione in vitro in presenza di ABA</i>	pag. 42
3.4. Fase di ambientamento.....	pag. 43
3.4.1. <i>Messa a punto dell'ambiente di acclimatazione</i>	pag. 43
3.4.2. <i>Prove di ambientamento</i>	pag. 46
3.5. Prove agronomiche.....	pag. 47
3.6. Caratterizzazione molecolare.....	pag. 50
3.6.1. <i>Estrazione e quantificazione del DNA</i>	pag. 52
3.6.2. <i>Restrizione con gli enzimi EcoRI e MseI e ligazione</i>	pag. 54
3.6.3. <i>Preamplificazione</i>	pag. 55

3.6.4. Amplificazione.....	pag. 56
3.6.5. Allestimento della corsa elettroforetica su vetro verticale.....	pag. 57
3.6.6. Assemblaggio dei vetri e preparazione del gel di poliacrilammide.....	pag. 58
3.6.7. Corsa elettroforetica	pag. 58
3.6.8. Colorazione “Silver Staining”	pag. 59
3.7. Elaborazione statistica dei dati.....	pag. 60
Capitolo 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE...	pag. 62
4.1. Protocolli di micropropagazione.....	pag. 62
4.1.1. Messa in coltura e prove preliminari di micropropagazione.....	pag. 62
4.1.2. Prove di moltiplicazione in vitro: valutazione degli effetti ormonali.....	pag. 63
4.1.3. Prove di moltiplicazione in vitro: valutazione degli effetti vitaminici.....	pag. 70
4.1.4. Prove di radicazione in vitro: valutazione degli effetti ormonali	pag. 71
4.1.5. Prove di radicazione in vitro: valutazione degli effetti vitaminici.....	pag. 77
4.1.6. Prove preliminari di radicazione in vitro con aggiunta di ABA al substrato...	pag. 78
4.2. Prove di ambientamento	pag. 81
4.3. Prove agronomiche.....	pag. 84
4.4. Caratterizzazione molecolare.....	pag. 93
Capitolo 5 – CONCLUSIONI.....	pag. 109
Capitolo 6 - ATTIVITA' COLLATERALI.....	pag. 112
Capitolo 7 – DIVULGAZIONE.....	pag. 113
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	pag. 115
RINGRAZIAMENTI.....	pag. 122

RIASSUNTO

Nell'ambito del progetto "NewVarItaly" finanziato dal MiPAAF, 6 linee clonali di *Limonium*, selezionate all'interno di una collezione di 48 nuove costituzioni conservate presso il CRA-VIV (Pescia), sono state fatte oggetto di una ricerca finalizzata all'individuazione di efficienti protocolli di micropropagazione ed alla realizzazione di un affidabile *fingerprinting* per ciascuna di esse. Sono stati valutati più di 20 substrati di moltiplicazione e di radicazione *in vitro*, con diversa composizione ormonale e vitaminica. Per la valutazione dell'efficienza dei substrati di coltura, sono stati presi in considerazione i tassi di moltiplicazione e le percentuali di radicazione, l'incremento giornaliero medio di biomassa, l'incidenza di eventuali fenomeni necrotici e di vitrescenza, le dimensioni e l'aspetto generale dei germogli. Per le prove di acclimatazione in serra sono state valutate 3 diverse miscele di terricci, di cui una, composta da residui fermentati della lavorazione dell'orzo, da clinoptinolite e da agriperlite, a elevata valenza ecologica, in quanto priva di torba. Sebbene la percentuale di sopravvivenza sia risultata ottimale su tutte le miscele, quest'ultima ha fornito i migliori risultati in termini di peso fresco e secco degli apparati fogliari e radicali, area fogliare, analisi colorimetrica delle foglie e concentrazione di clorofilla "a" e "b". Durante il periodo di fioritura, le linee clonali selezionate sono state sottoposte a prove agronomiche insieme a altrettante varietà commerciali dalle caratteristiche simili. Le prove hanno fornito risultati incoraggianti per un immediato sviluppo commerciale delle nuove costituzioni. Per ciascuna delle suddette linee selezionate sono stati sviluppati protocolli di caratterizzazione molecolare mediante marcatori AFLP, come supporto alla documentazione richiesta dal CPVO (Ufficio Comunitario delle varietà vegetali) per la domanda di privativa e per la tutela contro eventuali contraffazioni.

ABSTRACT

Within the project "NewVarItaly" funded by MiPAAF, 6 clonal lines of *Limonium*, selected among 48 new hybrids preserved at the CRA-VIV (Pescia), were made the subject of a research aimed at identifying efficient micropropagation protocols and a reliable genetic fingerprinting for each of them. Over 20 media for *in vitro* multiplication and rooting, with different hormonal and vitamin composition were evaluated.

For the evaluation of the efficiency of the substrates, have been taken into account the multiplication rates and rooting percentages, the average daily increase of biomass, the impact of any necrotic and vitrification phenomena, the size and the general appearance of the shoots. About the acclimatization trials were evaluated 3 different mixtures of potting soil, one of which consisting of fermented residues of the barley processing, added with clinoptinolite and perlite, with a high ecological importance, since it is peat-free. Although the survival rate was optimal for of all mixtures, the latter gave the best results in terms of fresh and dry weight of leave and root systems, leaf area, colorimetric analysis of the leaves and their concentration of chlorophyll "a" and "b". All the selected clones were tested for agronomic trials during their flowering period, along with commercial varieties with similar features. The trials have provided encouraging results for an immediate commercial exploitation of the new clones. Protocols for the molecular characterization by AFLP markers have been developed, as supporting documentation required by the European Community Plant Variety Office to obtain plant variety rights and for the protection against possible counterfeiting.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1. 1. Premessa

A partire dagli anni '90 il MiPAAF ha finanziato alcuni programmi di miglioramento genetico su piante da fiore reciso, condotti dall'ex Istituto Sperimentale per la Floricoltura, Sezione di Miglioramento Genetico di Sanremo (oggi CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e Piante Ornamentali) e dalla Sezione di Pescia (oggi CRA-VIV Unità di Ricerca per il Vivaismo e la Gestione del Verde Ambientale ed Ornamentale).

Su *Limonium* spp., in particolare, sono state svolte attività di *breeding* dal 1997 al 2002 nell'ambito del Progetto Finalizzato “*Prodotti e tecnologie innovative su piante ornamentali*” (Mi.P.A.F. - DM n.286/7240/97 del 31/7/97, DM n. 8/7240/99 del 3/2/99, DM n.356/7240/99 del 7/7/99, DM n.383/7303/2000 del 16/10/2000, DM n..428/7303/2001 del 21/11/2001).

Tali attività hanno portato alla costituzione di 48 linee clonali selezionate (ibridi intra/interspecifici) di *Limonium* caratterizzate da:

- elevata produzione;
- originali architetture delle infiorescenze;
- notevole rusticità, resistenza alle malattie e basso input energetico grazie all'inserimento nel piano di incroci di specie botaniche di origine mediterranea (Burchi *et al.*, 2000; 2003; 2006) (Fig. 1).

Più recentemente è stato finanziato il progetto “NewVarItaly” - “*Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana*” (MiPAAF - Bando Imprese Florovivaistiche, D.M. 186 del 1° agosto 2007, G. U. n° 208 del 7/09/2007), della durata di 3 anni (settembre 2009 - settembre 2012). Il progetto, a cui si fanno riferimento le attività di ricerca svolte per il presente dottorato, è stato presentato dall'Azienda Florovivaistica Bindi Sirio di Bindi Maurizio, di Pescia (PT), ed è coordinato da Gianluca Burchi, del CRA-VIV di Pescia (PT).



Figura 1 – Panoramica di una parte del campo catalogo di *Limonium* conservato presso il CRA-VIV (Pescia, PT).

L'obiettivo dell'azienda proponente è rappresentato dallo sviluppo commerciale di varietà da fiore reciso e/o da vaso già costituite, tra cui le suddette linee selezionate di *Limonium*, ottenute da precedenti collaborazione con il CRA-VIV ed il CRA-FSO. Negli ultimi decenni, infatti, il settore florovivaistico ha manifestato la necessità di continue innovazioni, sia di prodotto che di processo, non solo per poter competere sui mercati internazionali ma anche per garantire la sua stessa sopravvivenza. Il mercato delle piante ornamentali può oggi essere distinto in base a due diverse tipologie di offerta: prodotti percepiti come “*commodities*”, a costo contenuto, con un livello qualitativo ritenuto sufficiente a soddisfare una domanda senza particolari esigenze; prodotti percepiti come “*specialities*”, disponibili a prezzi molto più elevati a fronte di requisiti di novità e originalità, di una qualità impeccabile, e di servizi aggiuntivi. Il primo segmento mantiene a tutt'oggi una netta prevalenza, tuttavia, in prospettiva futura, il secondo segmento ha probabilmente maggiori margini di espansione (dallo stato dell'arte del Progetto “NewVarItaly”).

Sulla scorta di tali considerazioni, gli obiettivi del progetto saranno perseguiti attraverso alla messa a punto di efficienti sistemi di propagazione *in vitro* per le varietà di *Limonium* selezionate e di un affidabile *fingerprinting* genetico per la protezione da eventuali contraffazioni sul mercato nazionale ed internazionale, a supporto della documentazione

richiesta per l'ottenimento di privative comunitarie per i ritrovati vegetali.

1.2. Il Genere *Limonium*

1.2.1. Cenni botanici

Appartenente alla famiglia delle *Plumbaginaceae* (sottofamiglia *Statioideae*) il Genere *Limonium* (dal greco *λειμων* 'leimón' = prato) Tourn. ex Mill. (Index Kewensis) è stato a lungo ripartito in 3 sottogeneri (*Goniolimon*, *Verilimonium* e *Siphonantha*), a loro volta suddivisi in numerose sezioni e sottosezioni, comprendenti all'incirca 300 specie, di cui almeno 250 endemiche del bacino mediterraneo (Scordo, 1997). L'area mediterranea ne rappresenta infatti uno dei principali centri di differenziazione, in particolare per le specie che vegetano negli ambienti salmastri delle zone costiere (Fig. 2).

Altri importanti areali del *Limonium* sono rappresentati dalle steppe aperte ed asciutte delle regioni caucasiche, asiatiche e sud-africane (Cappelletti, 1976; Arrigoni e Diana, 1999).

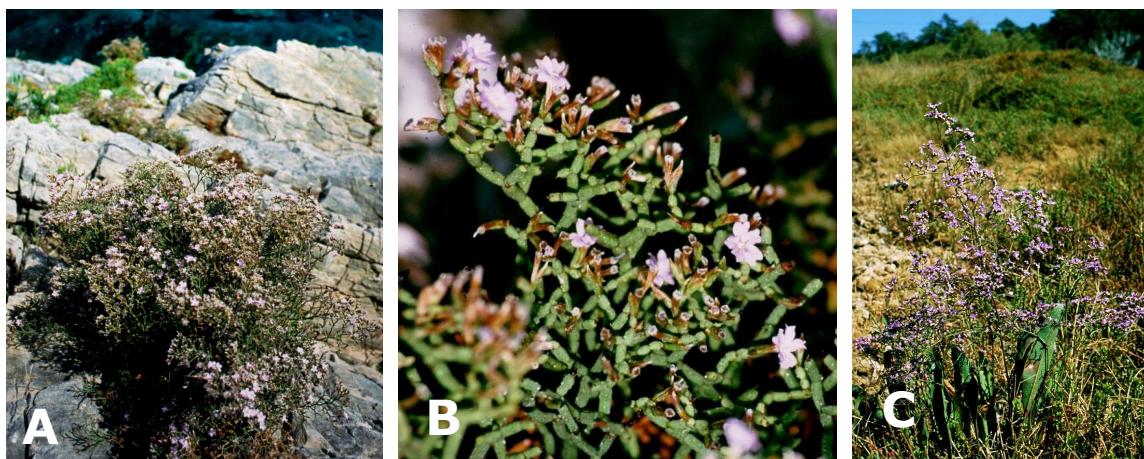


Figura 2 – Alcune specie di *Limonium* degli ambienti costieri mediterranei: A) *Limonium cordatum* (L.) Miller (Liguria); B) *Limonium articulatum* (Loisel.) Kuntze (Corsica); C) *Limonium serotinum* (Rchb.) Pign. (Toscana).

Al Genere *Limonium* appartengono specie annuali, biennali e perenni, di tipo erbaceo o sub-cespuglioso, con fusto legnoso alla base (Scordo, 1997). Le foglie possono essere intere, da ellittiche a obovate, oppure pinnato-lobate, raccolte in rosette basali o distribuite su rami suffruticosi. I fiori, pentameri, dialipetali (o con petali saldati solo alla base), ermafroditi e attinomorfi presentano corolle di colore generalmente blu-violetto (ma non mancano specie con altri colori, specialmente tra quelle di interesse ornamentale); sono piccoli, numerosi, raccolti in spighe formate da spighette terminali strettamente addossate l'una all'altra ("dense") o distanziate tra loro ("dissitiflore") (Pignatti, 1982; Syngé *et al.*, 1956).

Dal punto di vista tassonomico, il Genere è stato fatto oggetto di frequenti revisioni, esclusioni ed integrazioni dovute alle peculiarità della sua biologia riproduttiva, che comprende

fenomeni di apomissia, dimorfismo polline-stigma, eterostilia, ibridazione interspecifica e poliploidia (Diana, 1992). Da un punto di vista carilogico i livelli di ploidia del *Limonium* possono variare da 2 a 6, con svariati numeri base, di cui i più frequenti sono $x=8$ e $x=9$. Poiché tutti cariotipi a base $x=8$ includono un grosso cromosoma metacentrico che non si riscontra nelle combinazioni a base $x=9$, è stato ipotizzato che il suddetto cromosoma metacentrico derivi dalla fusione di 2 piccoli cromosomi acrocentrici presenti nei cariotipi a base $x=9$, che quindi sarebbero primitivi. Sulla scorta di tali considerazioni Erben ha ipotizzato che, nel caso del *Limonium*, i frequenti casi di triploidia derivino dalla fusione di un gamete aploide, con $n=8$ o 9, con un diplogamete con $n=16$ o 18, piuttosto che dall'incrocio di individui diploidi e tetraploidi (Erben, 1978, 1979). Tali fenomeni rappresentano dei fattori chiave nell'insediamento in particolari nicchie ecologiche e nella strategia evolutiva del Genere, che si è quindi frammentato in un gran numero di microspecie, ecotipi ed endemismi che ne rendono particolarmente difficile l'inquadramento sistematico (Cowan *et al.*, 1998).

Grazie allo sviluppo di analisi filogenetiche basate sulle sequenze di DNA plastidiale, il Genere è stato recentemente riclassificato e ridotto a 2 soli Sottogeneri *Pteroclados* e *Limonium*, mentre alcune delle vecchie Sezioni e Sottogeneri sono stati elevati al rango di Generi a sé stanti (Lledo *et al.*, 1998, 2005). Tra questi *Goniolimon*, *Psylliostachys* ed *Afrolimon*, ai quali appartengono alcune delle 48 linee clonali selezionate presso il CRA-VIV, riferibili rispettivamente alle specie *Goniolimon tataricum* (L.) Boiss., *Psylliostachys suworowii* (Regel) Roshk. e *Afrolimon peregrinum* (Berg.) Lincz.. Nel presente lavoro, per tali genotipi, si è scelto di mantenere la vecchia denominazione dal momento che ancora oggi, sul mercato globale del fiore reciso, essi vengono inclusi tra i *Limonium*.

1.2.2. Interesse ornamentale

Il *Limonium* è un genere a fioritura tipicamente estiva, e figura tra i dieci “summer flower” più venduti in Europa (CBI Market Information Database, 2009). In particolare, durante l'estate, sono molto richieste le infiorescenze da utilizzare come riempimento per le composizioni floreali (fresche ed essiccate) e per gli addobbi destinati ai matrimoni, in chiesa, nei ristoranti o nel bouquet della sposa (Castello, 2000; Harada, 1992) (Fig.3).



Figura 3 – Esempi di addobbi floreali realizzati con *Limonium*: A) spiga fiorale di *Limonium sinuatum* (L.) Miller di colore bianco, la tipologia maggiormente utilizzata nelle cerimonie e nei bouquet nuziali. B) Bouquet di fiori freschi realizzato con varie specie di *Limonium*. C) Festone nuziale realizzato con spighe intrecciate di *Limonium sinuatum* (L.) Miller, sulla facciata una chiesa dello stato di Veracruz (Messico).

Il successo commerciale del *Limonium* scaturisce da una serie di caratteristiche botaniche, agronomiche, estetiche e riproduttive così riassumibili:

- Esiste in natura una grande variabilità genetica che si traduce in una disponibilità di forme, colori e tipologie di prodotto tale da favorire le attività di miglioramento genetico;
- Fenomeni di ibridazione naturale anche interspecifica sono frequenti (Erben, 1979), ampliando ulteriormente la gamma delle risorse disponibili per le attività di *breeding*.
- La quasi totalità delle specie di interesse ornamentale è a “basso input energetico”, coltivabile in serra fredda o anche in pieno campo nelle condizioni pedoclimatiche mediterranee, con particolare riferimento alle zone marginali. Molte specie risultano infatti tolleranti a elevati livelli di salinità ed di stress idrici, in virtù delle estreme condizioni ambientali tipiche degli habitat di origine;
- Il calice, di consistenza cartacea, persiste anche dopo la caduta della corolla e, in alcune specie, presenta un’ampia gamma di colorazioni che si mantengono inalterate nel fiore essiccato.
- La maggior parte delle varietà ornamentali ben si adatta alla propagazione *in vitro* (Bruna *et al.* 2002).

Delle circa 300 specie di *Limonium* attualmente note, almeno una ventina sono state introdotte sul mercato per la produzione di fiori recisi (Barbieri *et al.*, 2000). Le principali tipologie commerciali di *Limonium*, tuttavia, fanno riferimento a ibridi o selezioni appartenenti a 5 gruppi di specie:

1) gruppo “*statice*”, riferito a cultivar e ibridi di *L. sinuatum* (L.) Miller, specie di origine nordafricana e mediterranea appartenente al sottogenere *Verilimonium*, sezione *Pteroclados*,

sottosezione *Odontolepideae* (secondo la precedente nomenclatura, riportata da Scordo, 1997) per lo più coltivata come annuale, anche se in realtà si tratta di specie perenne (Pignatti, 1982).

2) Gruppo “*gmellini-altaica*”, riferito alla specie *Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze (sottogenere *Verilimonium*, sezione *Eulimonium*, sottosezione *Genuinae*) di origine Caucasico-Siberiana, incluse alcune sue sottospecie, come la subsp. *hungaricum* (Klokov) Soó. Il *Limonium* “altaica”, sebbene da alcuni Autori sia considerato specie a sé stante (Harada, 1998), presenta numerose similarità sia fenotipiche che genetiche con *L. gmelinii sensu latu* (come comprovato da analisi molecolari mediante marcatori RAPD, Bruna *et al.*, 2002) di cui rappresenta probabilmente una selezione.

3) Gruppo “*otolepis x latifolium*” (o “*caspia x latifolium*”), ibridi di specie perenni (sottogenere *Verilimonium*, sezione *Eulimonium*, sottosezione *Hylalolepidae*), originarie dell’Iran e regioni centrali dell’Asia [*Limonium otolepis* (Schrenk) Kuntze] e della Russia meridionale, Bulgaria e regioni caucasiche [*Limonium latifolium* (Sm.) Kuntze].

4) Gruppo “*sinensis*”: ibridi, anche interspecifici, di *Limonium sinense* (Girard) Kuntze e specie affini, il cui areale si estende dalla Cina alla Mongolia. Si tratta nella maggior parte dei casi di piante perenni (sottogenere *Verilimonium*, sezione *Plathymenium*, sottosezione *Chrysantae*).

5) Gruppo “*tataricum*”, *Goniolimon tataricum* (L.) Boiss., presente sul mercato con le varietà perenni ‘*angustifolium*’, ‘*coccineum*’ e ‘*nanum*’. La specie è distribuita dal Sud Europa al Caucaso, alla Siberia (Scordo, 1997; Antonetti *et al.*, 2009).

Tra le specie di origine mediterranea, lo statice (dal greco στατικός ‘*staticós*’ = astringente) è certamente la più nota, tanto che, in passato, è stata a lungo utilizzata come sinonimo di *Limonium*. Gli ibridi presenti sul mercato sono caratterizzati da un ricco assortimento di colori, dovuti essenzialmente al calice, e possono essere commercializzati come fiore reciso sia fresco che essiccato. La maggior parte delle varietà in commercio sono state costituite da società olandesi, israeliane e giapponesi che controllano il mercato imponendo *royalties* sulle piantine in coltivazione. Sebbene le privative si riferiscano a varietà di *L. sinuatum*, la maggior parte delle cultivar presentano caratteristiche che, in natura, non si riscontrano nella specie di origine, bensì in *L. bonduellei* (Lestib) O. Kuntze, a essa affine (tanto che alcuni Autori le considerano entrambe sottospecie di *L. sinuatum*, Karis, 2004). *L. bonduellei* si distingue per lo stelo glabro con ali assenti o quasi nulle (mentre in *L. sinuatum* lo stelo si presenta alato ed irsuto), per una maggiore esilità delle infiorescenze e per il ciclo biologico annuale (mentre *L. sinuatum* è perenne, Pignatti, 1982). Inoltre, *L. bonduellei* presenta corolle e calici unicamente di color giallo-citrino, mentre *L. sinuatum* presenta il calice violetto e la corolla bianca. Essendo di origine mediterranea, anche *L. bonduellei* è una specie a bassa energia che ben si adatta a

coltivazioni negli ambienti italiani ma, a differenza di *L. sinuatum*, essa risulta tuttora libera da privative (Antonetti *et al.*, 2009). Sulla scorta di tali considerazioni, nel 1998, l'Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Sanremo (oggi CRA-FSO) ha intrapreso un programma di *breeding* per lo statiche a partire da *L. bonduelli*, anziché da *L. sinuatum*, migliorando alcune caratteristiche negative proprie del *L. bonduellei*, al fine di raggiungere uno standard qualitativo confrontabile con le varietà commerciali presenti sul mercato. In particolare, si è cercato di incrementare la gamma di colori del calice e della corolla, l'altezza e la robustezza dello stelo, la rusticità e la produttività, incrociando *L. bonduellei* con genotipi selezionati di *L. sinuatum* (Burchi *et al.*, 2000). Ben 11 dei nuovi ibridi di statiche ottenuti presso il CRA-FSO ed il CRA-VIV mediante impollinazione manuale o libera impollinazione di *L. bonduellei* e successivamente selezionati presso il CRA-VIV fanno parte della collezione di 48 linee clonali che costituisce il materiale vegetale di partenza per le attività di valorizzazione del *Limonium* nell'ambito del progetto "NewVarItaly".

Oltre agli statici, la collezione del CRA-VIV comprende 19 cloni del gruppo "gmelinii-altaica" (tra genotipi selezionati e ibridi), che diventano 21 se si aggiungono gli ibridi di *L. serotinum* (Rchb.) Pign., una specie Eurimediterranea tipica degli ambienti lagunari e degli stagni costieri, geneticamente compatibile con *L. gmelinii* e con caratteristiche agronomiche analoghe. Numerose varietà commerciali di successo ('Tall Emille', 'Safora', 'Ohio', 'Topian Blue', 'BlueRock', 'Danlisadablue' 'Olympic 2000'), sono riferibili al gruppo "gmelinii-altaica-serotinum", caratterizzato da fiori relativamente piccoli, con corolla blu-violetta più grande del calice, che si presenta campanulato e generalmente poco appariscente, a differenza degli statici. L'infiorescenza è densa, di tipo IV, secondo la classificazione utilizzata dal CPVO (UPOV, 1999), e può essere più o meno compatta. Gli steli sono relativamente rigidi e molto ramificati, talvolta con presenza di rami sterili alla base (specialmente negli ibridi di *L. serotinum*). Gli ibridi del gruppo "*L. otolepis* x *latifolium*", che producono piante perenni molto produttive, sono caratterizzati da steli particolarmente lunghi (i più lunghi tra le varietà presenti sul mercato), con fiori relativamente piccoli ma molto numerosi, tanto da conferire all'infiorescenza un aspetto "vaporoso", simile alle infiorescenze di *Gypsophila*. Sul mercato esistono numerose varietà a fiori blu-violetto ('Beltlaard', 'Ocean Blue', 'Misty Blue'), rosa ('Misty Pink') e bianchi ('Misty White'). Tre cloni riferibili a questo gruppo, con fiori blu-violetto, fanno parte della collezione del CRA-VIV.

Il gruppo "*sinensis*" presenta, come gli statici, una gamma cromatica piuttosto estesa che va dal giallo, al bianco, al rosa intenso. Tale variabilità è dovuta prevalentemente al colore del calice, di forma "a imbuto" (o tipo II, "*funnel shape*", secondo le "linee guida per la conduzione dei test DUS" relativi al *Limonium*, UPOV, 1999), persistente anche nel secco e più

vistoso rispetto alla corolla, che è invece caduca, di colore giallo e di dimensioni più ridotte. Oltre al *Limonium sinense* s.s., che presenta calice relativamente piccolo e stretto di colore bianco, altre specie hanno probabilmente contribuito alla realizzazione dell'ampia gamma di ibridi commerciali inclusi nella categoria "sinensis" ('Super Lady', 'Lemon star', 'Diamond', 'Joy', 'Eva', etc.) come le specie affini *Limonium bicolor* (Bge.) Kuntze (calice aperto di colore rosa) e *Limonium aureum* (L.) Hill ex Kuntze (calice aperto di colore giallo oro). Tre genotipi di tipo "sinensis" (con calice di colore bianco, rosa e giallo, rispettivamente) fanno parte della collezione di cloni selezionati del CRA-VIV.

Una quota minoritaria di mercato, di interesse soprattutto per collezionisti ed amatori, è rappresentata da specie, generalmente propagate per seme, che non fanno parte dei suddetti 5 gruppi. Tra queste, le più diffuse sono rappresentate da:

Limonium perezii (Stapf.) F. T. Hubbard, una specie perenne endemica delle Isole Canarie che, a differenza delle precedenti, necessita di condizionamento termico nei mesi invernali, fatta eccezione per le aree caratterizzate da inverni particolarmente miti, come per esempio le zone a vocazione floricola di Sanremo (IM) e Vittoria (RG). L'interesse per questa specie, oltre che per le appariscenti infiorescenze di forma globosa, con fiori bianco-crema e calici imbutiformi blu-viola, è dovuta all'elevata produttività durante l'intero arco dell'anno, in condizioni climatiche favorevoli (Scordo, 1997). Negli altri casi può essere coltivata come specie annuale, sebbene il pieno regime produttivo venga raggiunto a partire dal secondo anno di coltivazione.

Psylliostachys suworowii (Regel) Roshkova [ex *Limonium suworowii* (Regel) Kuntze], specie annuale endemica del Turkestan occidentale, apprezzata per l'originale architettura delle infiorescenze (unica del tipo VI, secondo le "linee guida per la conduzione dei test DUS" relativi al *Limonium*, UPOV, 1999) e per la notevole durata post-raccolta degli steli (Schiva, 1998). In commercio è nota la varietà 'Pink Pokers'.

Afrolimon peregrinum (P. J. Bergius) Lincz. [ex *Limonium peregrinum* (P. J. Bergius) R. A. Dyer], specie perenne endemica del Sud Africa, apprezzata soprattutto per i fiori di grandi dimensioni con corolla rosso brillante e calice rosa, molto aperto. In commercio esistono alcuni ibridi ('Ballerina Rose' e 'Chorus magenta').

Tra le suddette specie, un genotipo di *Psylliostachys suworowii* e uno di *Afrolimon peregrinum* sono stati inclusi nel gruppo iniziale di 48 linee clonali selezionate dal CRA-VIV per il progetto "NewVarItaly".

1.3. Coltivazione, caratteristiche agronomiche e principali avversità

Considerata la grande variabilità genetica all'interno del Genere, le caratteristiche agronomiche e le tecniche di coltivazione possono variare da specie a specie. In generale, tuttavia, si tratta di piante rustiche, ben adattabili alla coltivazione sia in pien'aria che in serra fredda, nelle condizioni climatiche tipiche dell'area mediterranea. A causa delle caratteristiche pedoclimatiche dei principali areali di origine (sabbie marine, zone palustri e litorali rocciosi del bacino mediterraneo e steppe desertiche dell'Asia centrale), le esigenze pedologiche e nutrizionali del *Limonium* sono particolarmente ridotte: sebbene i terreni sabbiosi o argillo-sabbiosi con pH compreso tra 6.5 e 7.5 e conducibilità intorno a 0.5 dS m^{-1} rappresentino le condizioni ottimali, la maggior parte delle specie è in grado di tollerare quasi tutti i tipi di terreno, anche con pH e livelli di salinità elevati, purché ben drenati (Barbieri *et al.*, 2000). Il *Limonium*, infatti, non tollera il ristagno idrico, soprattutto nel caso di coltivazioni pluriennali, mentre il mantenimento in serra di un clima relativamente asciutto migliora la qualità degli steli (Scordo, 1997). Gli eccessi idrici possono facilitare l'insorgenza di marciumi del colletto ed una carenza di ossigeno agli apparati radicali, con conseguente riduzione dell'accrescimento e, in caso di ristagni prolungati, necrosi. Anche gli eccessi di fertilizzazione sono da evitare, in quanto non solo rappresentano un costo inutile per il floricoltore, ma possono addirittura peggiorare la qualità delle produzioni (steli eccessivamente lunghi, deboli, aborti fiorali).

Da un punto di vista colturale, le varietà commerciali di *Limonium* possono essere ripartite in 2 grandi gruppi: specie a fioritura stagionale (Tipo 1) e specie a fioritura libera o continua (Tipo 2) (Harada, 1992). Il tipo 1 è caratterizzato da fioriture prevalentemente estive e necessità di un periodo di freddo (naturale o tramite vernalizzazione artificiale) per l'induzione fiorale. In presenza di temperature elevate la pianta continuerà a svilupparsi vegetativamente. In *Limonium gmelinii*, per esempio, sono necessarie 5 settimane a temperature non superiori a 6°C per ottenere fioriture soddisfacenti. Trattamenti con GA_3 500 ppm possono migliorare ulteriormente la produzione, sia in termini qualitativi che quantitativi o anticipare la fioritura. Le specie a fioritura concentrata nella stagione estiva generalmente necessitano di una fertilizzazione primaverile di 30-40 t/ha di concime naturale e di una concimazione successiva a lenta cessione con 120 Kg/ha dei 3 principali macroelementi eventualmente integrata con somministrazione di solfato di potassio prima della fioritura, trattandosi di specie potassiofile.

I *Limonium* del tipo a fioritura libera (tipo 2) possono fiorire durante l'intero arco dell'anno a condizione che le condizioni di temperatura ed illuminazione siano appropriate. Dal punto di vista nutrizionale, per il *Limonium* del tipo 2 sono consigliate concimazioni secondo la formula N:P:K: di 1:0,8:1,5, ottenute tramite somministrazione di concimi a formula 14:12:9 con

l'aggiunta di 200kg/ha di solfato di potassio (Barbieri *et al.*, 2000) o di corrispondenti quantità di concimi granulari contenenti il magnesio associato al potassio, al fine di migliorare la qualità della fioritura. Appartengono al tipo a fioritura libera le principali varietà di *Limonium* ibridi dei gruppi “*otolepis x latifolium*” , “*sinensis*”, ed “*altaica*” , e le specie *L. perezii* e *L. peregrinum*, mentre varietà di *L. latifolium*, *L. gmelinii* e *L. dumosum* (= *Goniolimon tataricum*) sono a fioritura stagionale (Harada, 1992). Le varietà di statice (*L. sinuatum*) mostrano comportamenti intermedi, variabili a seconda del genotipo. In generale, una temperatura moderata facilita l'induzione a fiore e influenza significativamente sia la crescita che l'intensità della fioritura. Per esempio, nelle cultivar di statice a fiore blu ‘Dunkelblau’ e ‘Midnight Blue’ una temperatura di 11°C-13°C nelle giovani piante ottenute da seme è un prerequisito indispensabile per l'induzione fiorale (Shillo, 1976). Nella prime 2-3 settimane dal trapianto è generalmente consigliabile mantenere la temperatura intorno a 16-17°C, mentre in seguito le temperature massime possono scendere a 12°C e le minime anche fino a 3-4°C senza recare danno alla produzione. Una volta avvenuta l'induzione a fiore, tuttavia, per ottenere produzioni qualitativamente e quantitativamente ottimali la temperatura dovrebbe mantenersi intorno ai 24°C di giorno e ai 16°C di notte, con una illuminazione elevata (Borrelli, 2011). In generale, tutte le specie di *Limonium* sono eliofile e necessitano di esposizione da 44000 a 88000 lux, sebbene, talvolta, condizioni di sotto-illuminazione possano determinare un miglioramento della qualità (soprattutto per quanto riguarda la lunghezza ed il peso degli steli, in varietà con infiorescenze relativamente piccole).

Dal punto di vista nutrizionale, è consigliabile somministrare 15 Kg di superfosfato e 10 Kg di solfato di potassio per 100 mq di terreno prima dell'impianto, e successivamente effettuare interventi periodici (o cicli di fertirrigazione) con 15-20 Kg/mq di concime complesso a titoli equilibrati, integrato con magnesio (Von Henting *et al.*, 2001).

Durante la fase di fioritura è buona pratica ridurre gli apporti idrici, al fine di irrobustire gli steli e di ridurre il rischio di insorgenza di patologie fungine. Soltanto alcune varietà del gruppo ‘altaica-gmelinii’ sembrano necessitare di più acqua durante l'antesi (Barbieri *et al.*, 2000). Dall'emissione del primo germoglio alla raccolta degli steli, a seconda delle condizioni climatiche, possono trascorrere da uno a tre mesi. Sia per lo statice che per le altre tipologie di *Limonium*, il raccolto viene effettuato quando le infiorescenze presentano dal 70 all'85% dei fiori aperti, a seconda della tipologia. Per il tutoraggio degli steli fiorali è necessario l'impiego di almeno due reti a maglie quadrate di lato 40 o 50 cm. Nella maggior parte dei casi le piante vengono coltivate a terra in prode rialzate a fila singola, con distanza minima di 30 cm lungo le file, e di 1 m tra le file (Borrelli, 2011), con o senza il ricorso a pacciamatura in materiale plastico.

Per quanto riguarda le caratteristiche estetiche e biometriche rilevanti per la valorizzazione commerciale del *Limonium*, è necessario distinguere tra statiche (*Limonium sinuatum* e relativi ibridi), *Limonium* propriamente detto (comprendenti le specie e gli ibridi dei gruppi 2,3 e 4 descritti nel paragrafo precedente) e specie di minore rilevanza (gruppo 5, nel paragrafo precedente). Le selezioni di statiche normalmente vengono raccolte dopo 90 giorni dal trapianto, quando le infiorescenze presentano l'80-85% di fiori completamente aperti, con steli generalmente lunghi 70-80 cm e produzioni dipendenti dalla varietà, mediamente tra 25 e 35 steli al primo anno che, in coltivazioni pluriennali, può raggiungere i 40 steli, di qualità inferiore (Borrelli, 2011), o anche i 50 steli, per le produzioni da meristema. In alcuni casi sono apprezzati anche steli di lunghezza inferiore, come nella varietà 'Compindi' (50 cm), o nella cultivar 'Petit Bouquet', con steli di 30 cm, particolarmente indicata per produzioni da vaso. Gli steli di statiche sono tipicamente caratterizzati dalla presenza di alatura, più o meno estesa, e da infiorescenze a spighe ramificate e compresse (tipo II, secondo la classificazione UPOV, 1999) divise su 3-5 ali con spighette terminali a loro volta formate da 3-5 fiori (Von Henting *et al.*, 2001). Gli steli vengono confezionati in pacchi da 25, composti da 5 mazzi di 5 steli ciascuno del medesimo colore. Un mazzo su 5 viene invece assemblato con steli di colore assortito (confezioni "Arlecchino") già pronti al consumo (Borrelli, 2011), mentre i mazzi di colore bianco possono essere colorati artificialmente. La qualità complessiva delle produzioni di statiche può dipendere da molti fattori, alcuni di tipo quantitativo (numero di steli prodotti per pianta, lunghezza e peso degli steli), altri più legati a caratteristiche di natura estetica: assortimento del colore del calice (di tipo 2, secondo la classificazione UPOV, Fig. 4b, preponderante sulla corolla, il cui colore può essere rilevante solo in alcuni ibridi con *L. bonduellei*); ampiezza dell'alatura e rigidità dello stelo; numero e distribuzione delle spighe fiorali all'interno dell'infiorescenza; conformazione e densità della spiga fiorale (Antonetti *et al.*, 2009). Il prezzo finale sul mercato è stabilito dalla varietà e dall'epoca di raccolta. A parità di queste condizioni, la I e la II categoria vengono decise in base al peso dei mazzi. Per le altre specie di *Limonium* valgono, in generale, gli stessi criteri di confezionamento e di valutazione di tipo quantitativo dello statiche (numero di steli prodotti per pianta, lunghezza e peso degli steli; Barbieri *et al.*, 2000). Per quanto riguarda le valutazioni di tipo estetico e qualitativo sussistono delle differenze a seconda dei gruppi di specie: in generale, gli steli fiorali sono privi della caratteristica alatura, che rappresenta una peculiarità esclusiva dello statiche, mentre assume una maggiore importanza il diametro basale e il numero di ramificazioni primarie del peduncolo (Farina *et al.*, 2000). Per quanto riguarda le specie e gli ibridi appartenenti ai gruppi 2, 3 e 4 ed alcune delle specie minori, la corolla è prevalente sul calice (tipo 1 secondo la classificazione UPOV, Fig. 4b), e pertanto la sua permanenza sugli steli recisi rappresenta una

caratteristica importante. La colorazione della corolla, inoltre, presenta un assortimento minore, rispetto allo statiche, variando da diverse sfumature di blu-violetto, nella maggior parte delle varietà, al bianco, al rosa; anche il profumo dei fiori (generalmente considerato sgradevole) può risultare qualitativamente rilevante. Le infiorescenze sono per lo più di tipo IV (secondo la classificazione UPOV, 1999, Fig.4a) e, anziché la conformazione della spiga fiorale, assume importanza la lunghezza del peduncolo al primo nodo e la presenza più o meno abbondante di ramificazioni sterili (dati ricavati dai floricoltori dell'area floricola pesciatina *in verbis*).

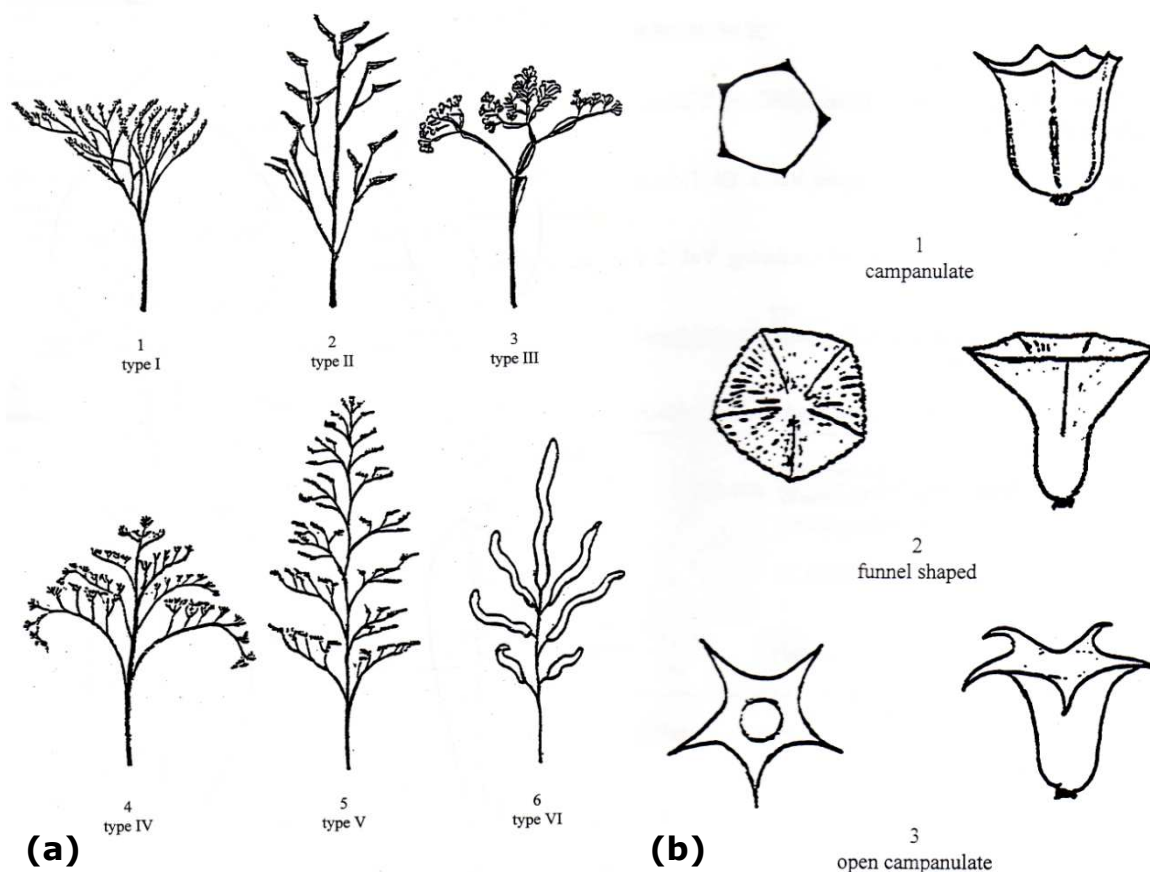


Figura 4 – Tipologie di infiorescenze (a) e di calici (b) in *Limonium*, secondo le “Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformità and stability” in *Statice* (UPOV, 1999).

Anche la possibilità di programmare la produzione con trattamenti ormonali o di vernalizzazione (Wilfret e Raulston, 1975; Scordo, 1997; Barbieri et al., 2000; Borrelli, 2011), la durata post-raccolta degli steli recisi (De Vecchi, 2000) ed il grado di suscettibilità ai patogeni possono rappresentare parametri importanti nella valutazione delle varietà di interesse ornamentale. Riguardo quest'ultimo aspetto, le principali avversità del *Limonium* sono rappresentate dalle crittogame muffa grigia (*Botrytis cinerea*), peronospora (*Peronospora statice*), ruggine (*Uromyces limonii* e *U. savulescui*) oidio o “mal bianco” (*Erysiphe polygoni*), *Rhizoctonia* spp. e *Sclerotinia* spp., responsabili di avvizzimenti basali e marciumi (Pasini e Del Bene, 2000), e da *Colletotrichum gloeosporioides*, una delle più distruttive patologie del

Limonium responsabile di antracnosi su foglie, steli e fiori, che può provocare perdite fino a al 100% del raccolto (Maymon *et al.*, 2006), sebbene i dati circa la sua reale diffusione nel nostro Paese siano tuttora scarsi. Tra i principali parassiti animali sono noti afidi, acari, nottue e tripidi (Borrelli, 2011) pericolosi, oltre che per i danni diretti (limitabili con opportuni trattamenti antiparassitari) per la possibile trasmissione di virus come il TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*) (Pasini e Del Bene, 2000). Batteriosi (Borrelli, 2011) e micoplasmi (Chang *et al.*, 1994), pur segnalati, sembrano avere una diffusione più limitata.

1.4. Tecniche di propagazione

In passato il *Limonium*, ed in particolare le varietà di statiche e di *L. tataricum* (= *Goniolimon tataricum*) veniva propagato quasi esclusivamente da seme. Il seme di *Limonium*, infatti, viene facilmente raccolto insieme ai residui del frutto e del calice e presenta generalmente una buona germinabilità, pur con differenze significative tra specie e specie (Ruffoni e Mascarello, 2000). Sono tuttavia note anche esperienze di propagazione vegetativa per divisione di cespi (operazione molto delicata a causa del rischio di danneggiamento dell'apparato radicale) o per talea da radice. Tali tecniche, tuttavia, sono applicabili solo a un numero molto circoscritto di specie, come *L. altaica*, e per produzioni limitate, in quanto a basso rendimento (Armitage, 1993). In alcune specie, come *L. otolepis* e alcuni ibridi di *L. sinense*, durante il periodo invernale (o tardo-autunnale) è stata osservata la formazione di gemme avventizie a forma di rosetta sugli steli fiorali. Tali rosette, definite "propaguli" (Dalla Guda *et al.*, 2000), possono essere indotte artificialmente con irrorazioni ormonali a base di benziladenina (BA) o mediante interventi radicali di potatura, e tuttavia non sono in grado di emettere radici *in vivo* con nessun tipo di trattamento finora sperimentato, risultando non idonei come materiale di propagazione (Dalla Guda *et al.*, 2000; Ruffoni e Mascarello, 2000).

A partire dagli anni '80 sono stati sviluppati protocolli di propagazione *in vitro* per alcune selezioni di statiche (*L. sinuatum*) (Leshem e Cohen, 1983; Harazy, 1985) e per specie a rischio di estinzione, come il *Limonium estevei* Fdez. Casas. (Martín e Pérez, 1992) o endemiche, come *L. dufourei*, *L. calaminare*, *L. gibertii*, *L. dichotomum* e *L. catalaunicum* (Martín e Pérez, 1995). Nel decennio successivo, sono state messe a punto tecniche di coltura *in vitro* sia con finalità di *breeding* per l'ottenimento di ibridi interspecifici (*L. perezii* x *sinuatum*; *L. peregrinum* x *purpuratum*) mediante tecniche di recupero *in vitro* di ovuli fecondati *in vivo* (embryo-rescue, Morgan *et al.*, 1998; 1995), per la rigenerazione da protoplasti di piante di *L. perezii* (Kunitake e Mii, 1990) e per l'ottenimento di nuove architetture delle infiorescenze mediante trasformazione genetica (Mercuri *et al.*, 1999, 2000), sia con finalità commerciali, a

seguito dello sviluppo e dell'immissione sul mercato di nuovi ibridi, da parte di compagnie private soprattutto olandesi, israeliane ed italiane (Harada, 1992; Antonetti e Pasqualetto, 2000).

Un discorso a parte merita la scelta del materiale di propagazione per le varietà commerciali di statiche (*L. sinuatum*). Attualmente, infatti, esistono varietà (principalmente spagnole ed olandesi) propagate sia per seme che per via meristemica. La ragione di tale diversificazione è da ricercarsi soprattutto nella programmazione, da parte del floricultore, dell'epoca di raccolta: le piante prodotte da seme vengono generalmente raccolte da maggio a luglio, mentre le varietà spagnole prodotte da meristema, trapiantate in agosto-settembre, sono adatte per produzioni invernali. Le varietà olandesi prodotte *in vitro* (con trapianti da effettuare in settembre-ottobre), infine, vengono raccolte in primavera/inizio estate, già a partire già da marzo. Dal punto di vista della qualità, tuttavia, le piante propagate per seme non sempre garantiscono livelli di eccellenza, in particolare nella rimonta, che spesso non viene neppure raccolta (Borrelli, 2011). A titolo di esempio, in Fig. 5 è mostrata la distribuzione percentuale in classi di qualità a seconda della provenienza del materiale di propagazione di *L. gmelinii* (De Pascale e Paradiso, 2000).

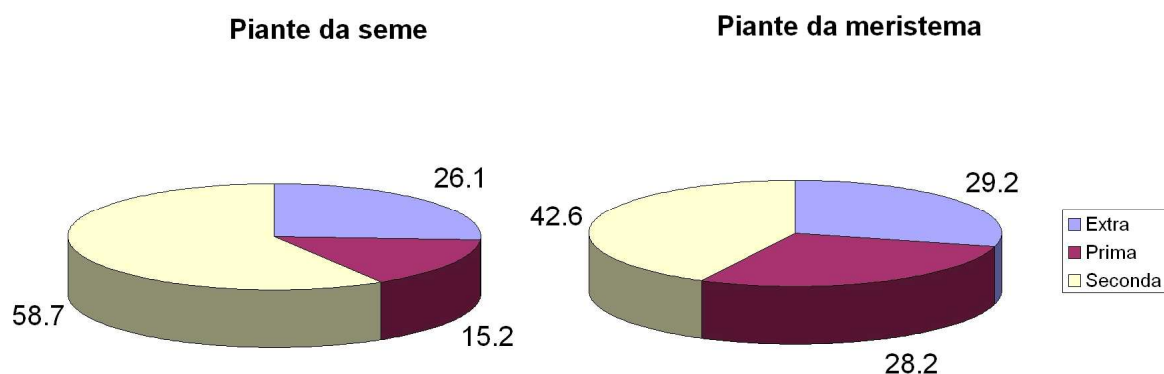


Figura 5 – Distribuzione percentuale in classi di qualità di steli recisi di *L. gmelinii* a seconda dell'origine del materiale di propagazione (Fonte: De Pascale e Paradiso, 2000).

La maggiore economicità delle produzioni da seme, inizialmente, ha ritardato l'affermarsi sul mercato delle varietà micropropagate rispetto a altre tipologie di *Limonium*. Negli ultimi anni, tuttavia, il divario tra il prezzo finale degli statici da meristema e quelli prodotti da seme si è ridotto progressivamente fino a attestarsi su una differenza intorno al 20-30%. Le produzioni da seme, infatti, riguardano per lo più varietà a fiore bianco che poi devono essere colorate artificialmente, al fine di conferire omogeneità ai mazzi, con conseguente aumento dei costi (Moschini L., comunicazione personale). L'incidenza della manodopera nelle produzioni da seme è sensibilmente più alta anche durante le fasi di raccolta ed ammassamento, a causa della disomogeneità tra gli steli ed di una conformazione meno regolare, con un'elevata

percentuale di materiale di scarto, soprattutto nelle rimonte. Per contro, le piante riprodotte *in vitro* sono nettamente più produttive, presentano una più ampia gamma e qualità di colori ed una maggiore omogeneità, risultando alla fine più redditizie, anche a fronte di un costo iniziale medio per stelo più alto (Borrelli, 2011).

Tra i requisiti richiesti dal mercato del fiore reciso per i prodotti di qualità (definiti “*specialities*”) l’attitudine alla moltiplicazione *in vitro* è pertanto da considerarsi altrettanto essenziale di caratteristiche come la novità, la bellezza, la durata in vaso e la resistenza a fattori biotici e abiotici. La messa a punto di sistemi di propagazione *in vitro* adatte a produzioni su larga scala, rappresenta una premessa indispensabile allo sviluppo commerciale delle nuove costituzioni, tanto più che molte delle nuove varietà immesse sul mercato, principalmente da gruppi olandesi ed israeliani, sono rappresentate da ibridi interspecifici sterili che non è possibile propagare per seme.

I protocolli di propagazione con finalità commerciale devono essere tali da garantire produzioni esenti da patogeni ed in grado di assicurare l’uniformità delle caratteristiche selezionate della pianta madre, senza alterazioni fenotipiche causate da mutazioni o fenomeni di variabilità somaclonale. In tal senso, gli obiettivi della propagazione *in vitro* su larga scala si possono considerare diametralmente opposti da quelli perseguiti per le attività di *breeding*, finalizzati all’induzione di nuova variabilità. Per quanto numerose specie e cultivar di *Limonium* abbiano dimostrato una buona attitudine alla rigenerazione a partire da tessuti somatici (Mercuri *et al.*, 1999; Ruffoni *et al.*, 2000), la messa in coltura mediante morfogenesi diretta (da tessuto fogliare) o indiretta (da callo) è sconsigliabile a fini produttivi a causa della possibile incidenza di fenomeni di variabilità somaclonale (De Paoli *et al.*, 1994). Per le stesse ragioni, non è opportuno inserire nei protocolli di propagazione commerciale substrati e formulazioni ormonali attive nel promuovere rigenerazione a partire da tessuti fogliari o da cellule indifferenziate. Per assicurare l’asepsi e la stabilità *in vitro* del clone da micropropagare è fondamentale la scelta del tipo di espianto da utilizzare per la messa in coltura. Esperienze effettuate sia su specie botaniche (Amo-Marco e Ibañez, 1998) che su specie ornamentali di *Limonium* (Ruffoni *et al.*, 2000) hanno dimostrato che espianti prelevati da porzioni dello stelo florale immaturo contenenti gemme o nodi (Fig. 6) possono dare origine a colture stabilizzate con assenza di variabilità somaclonale e di contaminazione, anche a concentrazioni relativamente basse di ipoclorito di sodio. In alcune specie, come *L. otolepis*, i “propaguli” avventizi formati sugli steli possono rappresentare una valida alternativa alle micro talee prelevate dalle infiorescenze, come materiale di partenza per la messa in coltura (Dalla Guda *et al.*, 2000). Tuttavia, dato che i propaguli si formano solo in uno scarsissimo numero di specie ed in limitati periodi dell’anno, l’applicazione di tale metodologia non sembra generalizzabile.

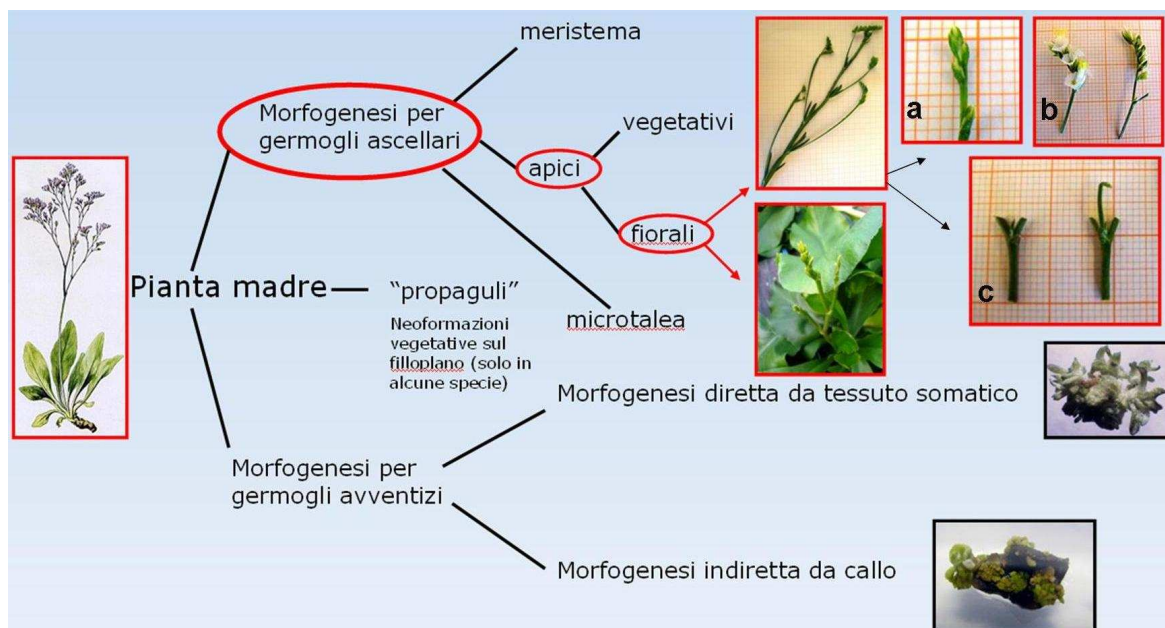


Figura 6 – Tipologie di espianti per la messa in coltura di *Limonium*.

Per quanto riguarda la fase di moltiplicazione *in vitro*, da prove effettuate presso il CRA-FSO di Sanremo è risultato che substrati a base MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionati con Benzyladenina (BA) a concentrazioni variabili da 0.125 a 1 mg/l rappresentano validi mezzi colturali per numerose specie di *Limonium*, con tassi di moltiplicazione variabili da 5 fino a 12 germogli al mese (Ruffoni e Mascarello, 2000; Vitti *et al.*, 2000). Concentrazioni troppo elevate di citochinine, ed in particolare di BA, possano tuttavia produrre alterazioni nella qualità dei germogli, con inibizione parziale o totale della successiva fase di radicazione *in vitro* o iperproduzione dell'apparato fogliare. Tali alterazioni, una volta raggiunta la fase di coltivazione, possono anche comportare la mancata formazione o la sterilità degli steli fiorali.

Su *Limonium cavanillesii* Erben, una specie minacciata endemica della regione di Valencia (Spagna), sono stati ottenuti tassi medi di moltiplicazione *in vitro* superiori a 9 germogli per cluster aggiungendo al substrato 2 o 5 mg/l di N⁶-furfuriladenina (kinetina) o, in alternativa, 5 mg/l di N-(2-isopentenil) adenina (2 ip), due citochinine con azione più blanda rispetto alla BA, di cui, infatti è sufficiente una concentrazione pari a 0.1 mg/l per ottenere tassi di proliferazione senza differenze significative (Amo-Marco e Ibañez, 1998). Una concentrazione di BA di poco superiore (0.2 mg/l), sempre su terreni di coltura a base MS, ha permesso di moltiplicare con successo espianti rigenerati di 12 diverse accessioni di *Limonium*, tra cui 8 ibridi commerciali appartenenti alle tipologie più diffuse sul mercato. Per le medesime accessioni, dopo il raggiungimento delle dimensioni appropriate (3-4 cm) dei germogli in fase di moltiplicazione, la fase di radicazione è stata effettuata con successo previa singolarizzazione e trasferimento dei germogli su terreni sempre a base MS addizionati di 0.5 mg/l di acido α -naftalen-acetico (NAA) o acido indol-3-butilirrico (IBA) (Mercuri *et al.*, 1999). Altre specie di *Limonium* (*L.*

dufourii, *L. calaminare*, *L. gibertii*, *L. dichotomum* e *L. catalaunicum* sono state radicate efficientemente *in vitro* utilizzando substrati a base MS privi di auxine o altri fitoregolatori (Martín e Pérez, 1995), mentre con l'aggiunta di 0,5 mg/l di IBA ed acido indol-3-acetico (IAA) è stato possibile ottenere una radicazione completa (100%) nella maggior parte delle specie conservate presso il CRA-FSO di Sanremo (Ruffoni e Mascarello, 2000). La qualità delle piantine radicate, tuttavia, presentava differenze significative a seconda della composizione del mezzo, sia come vigore generale delle piantine prodotte, sia come numero e lunghezza delle radici.

A differenza della maggior parte delle specie di *Limonium*, per le varietà di statiche (*L. sinuatum* e relativi ibridi), la letteratura riporta protocolli di propagazione *in vitro* basati su terreni a formulazione LS (Linsmaier e Skoog, 1965), che si distingue dal “MS medium” per una presenza delle componenti vitaminiche limitata al mio-inositolo ed alla tiamina cloridrato (quest'ultima con una concentrazione ridotta al 40%, rispetto ai terreni MS). Con terreni a base LS, concentrazioni di BA di 0.6 mg/l si sono rivelate efficaci nell'ottenere una buona proliferazione *in vitro* di statiche, mentre germogli singoli o doppi sono stati radicati con successo utilizzando substrati a formulazione LS con concentrazione dimezzata e l'aggiunta di 0.5 mg/l di NAA (Leshem e Cohen, 1983; Harazy *et al.*, 1985).

Normalmente, il germogli di *Limonium* radicati *in vitro* necessitano di periodi di ambientamento da 30 a 60 giorni in tunnel con umidità e temperatura controllata. Germogli di numerose specie trattati con soluzioni acquose di un fungicida a base di propamocarb, mantenuti per le prime due settimane a una umidità relativa di 95%, ridotta al 65% nelle due settimane successive, hanno mostrato percentuali di ambientamento dal 75% all'86% (Ruffoni e Mascarello, 2000). Per la fase di acclimatazione del *Limonium* vengono generalmente utilizzati contenitori alveolari in materiale plastico contenenti miscele di torba ed agriperlite nelle proporzioni di 1:1 (v/v) (Mercuri *et al.*, 1999; Ruffoni e Mascarello, 2000); per lo statiche vengono utilizzate miscele di torba, sabbia quarzifera e vermiculite in eguali proporzioni, per ottenere un più elevato potere drenante. Può inoltre essere effettuata una fertirrigazione con soluzioni all'1% a base di 20N-20P-20K (Harazy *et al.*, 1985). La stessa miscela, ma senza fertirrigazione, è stata utilizzata con successo anche per l'acclimatazione di specie endemiche di ambiente mediterraneo, con finalità di ripopolamento delle stazioni naturali (Martín e Pérez, 1992; 1995).

Nonostante sia possibile effettuare la fase di ambientamento *ex-vitro* di molte specie di *Limonium* con miscele tradizionali a base di torba mista a agriperlite o a vermiculite, considerazioni di natura ecologica ed economica suggeriscono di ricercare materiali alternativi ma altrettanto idonei nel favorire il delicato passaggio dalle condizioni *in vitro* alla coltivazione

in serra o in pieno campo. E' universalmente noto, infatti, che la torba è una risorsa non rinnovabile, estratta da habitat naturali (torbiere) che sono parte integrante di biotopi delicatissimi, la cui alterazione o distruzione minaccia seriamente la sopravvivenza di specie animali e vegetali protette, oltre a rivestire, in alcuni casi, un interesse di natura archeologica (Holmes e Lightfoot-Brown, 2000; Armstrong, 2004). Proprio a causa del valore naturalistico delle torbiere, nel 2001 la Comunità Europea ha escluso dal rilascio del marchio comunitario di qualità ecologica (*Ecolabel*) i substrati di coltivazione che contengono torba o prodotti derivati (Prisa *et al.*, 2009; 2011). Per le stesse ragioni, il Regno Unito attraverso il DEFRA (Department for Environment Food and Rural Affairs) ha recentemente sviluppato un progetto per eliminare la torba dai lavori pubblici entro il 2015, dal mercato amatoriale entro il 2020 e dal mercato professionale entro il 2030 (DEFRA, 2010).

Il progressivo estendersi dei vincoli di protezione ecologica alle aree naturali di estrazione si è inoltre tradotto in un aumento del prezzo della torba (spesso associato a una minor qualità ed omogeneità del prodotto) dovuto all'incremento dei costi dell'energia per l'estrazione ed il trasporto dalle poche aree di produzione rimaste, situate in Nordeuropa e Canada (Rea, 2005).

Tra i substrati di origine organica utilizzabili per l'ambientamento in sostituzione della torba, oltre a quelli già diffusamente impiegati nel florovivasimo (fibra di cocco, corteccia di pino, lolla di riso, *etc.*), possono essere presi in considerazione i compost ottenuti da residui colturali di specie da pieno campo, che già hanno fornito buoni risultati in coltivazioni orticole e floricole. L'utilizzo di un substrato denominato "Biomax", ottenuto dal biocompostaggio di residui della coltivazione dell'orzo, ha determinato, su fragola e su pomodoro, un aumento della produttività del 30%, mentre in *Liatris spicata*, *Lilium* sp. e tulipano è stato osservato un aumento significativo del calibro e del peso dei bulbi (Prisa *et al.*, 2009), rispetto alla coltivazione con terricci tradizionali a base di torba.

Tra i materiali inorganici integrabili ai *compost* di qualità nella formulazione di terricci innovativi, minerali di origine vulcanica appartenenti alla famiglia delle zeoliti (come la clinoptinolite, la cabasite e la litonita), caratterizzati da una struttura cristallina regolare e microporosa, presentano un'elevata CSC (Capacità di Scambio Cationico) associata a una spiccata idrofilia che li rendono particolarmente interessanti come substrati di ambientamento. In floricoltura, l'utilizzo di zeoliti arricchite con NH_4^+ e NPK ha determinato un aumento del numero totale di infiorescenze, di boccioli e di fiori ed una maggiore precocità di fioritura in geranio (Passaglia *et al.*, 2005), mentre in cultivar di *Lilium* Asiatico e di *Lilium* Orientale ha determinato un significativo aumento del calibro dei bulbi e del numero di micro-radici sviluppatesi in prossimità della presenza del minerale, rispetto al substrato di controllo a base di torba (Prisa *et al.*, 2008).

E' noto che durante le fasi di acclimatazione alle condizioni *ex-vitro* il germoglio, radicato in condizioni di sterilità ed umidità prossime al 100%, subisce una delicata serie di trasformazioni fisiologiche, come l'incremento dello spessore fogliare, la formazione della cuticola e delle cere epicutcolari, la progressiva differenziazione del mesofillo in cellule a palizzata e parenchima spugnoso, la riduzione della densità degli stomi e la progressiva trasformazione della loro forma da circolare (aperti) a ellittica (chiusi), che si traduce in una più efficiente regolazione della traspirazione. E' stato altresì osservato un incremento del contenuto di clorofilla "a" e "b" in dipendenza delle condizioni ambientali durante l'acclimatazione (Pospíšilová *et al.*, 1999). In considerazione di tali trasformazioni fisiologiche, sono state proposte strategie per migliorare o ridurre la durata della fase di acclimatazione intervenendo sui meccanismi che regolano la traspirazione, *in vitro* o durante la fase di ambientamento, oppure incrementando l'attività fotosintetica tramite somministrazione di CO₂. Un esempio di quest'ultima strategia è rappresentato dalle colture foto-autotrofe e foto-mixotrofiche, con eliminazione totale o parziale di fonti di carbonio nel substrato, grazie all'incremento della radiazione luminosa e della CO₂ disponibile (Kozai, 1991). In tal modo è possibile ottenere una radicazione migliore e una più efficiente fase di ambientamento. I costi elevati di tali modelli, tuttavia, hanno finora ostacolato le applicazioni commerciali del sistema proposto da Kozai. Recentemente sono stati proposti modelli miniaturizzati simili a costi più contenuti grazie all'utilizzo di filtri ventilati (ventilazione passiva), di pompe da acquario filtranti a flusso costante applicate ai vasi di coltura (ventilazione forzata) e di substrati di ancoraggio non agarizzati (Mensuali-Sodi *et al.*, 2009). Tali modelli, tuttavia, pur interessanti in prospettiva futura, non sono mai stati applicati a produzioni su larga scala.

Più facilmente perseguibili, ai fini della micropropagazione commerciale, sembrano essere le strategie tese a intervenire sui meccanismi che regolano la traspirazione, anche in virtù di una maggiore semplicità di applicazione. Più che all'assenza della cuticola, infatti, la principale difficoltà nel controllo della traspirazione durante la coltivazione *in vitro* sembra essere dovuta alla scarsa funzionalità degli stomi (Santamaría *et al.*, 1994), a causa dell'elevata umidità relativa, prossima al 100%, presente nei vasi di coltura. Le piante, infatti, necessitano di una minima esposizione a stress idrici affinché possa avvenire la sintesi endogena di ABA (Aguilar *et al.*, 2000; Santamaría *et al.*, 1993). In *Nicotiana tabacum* L., la somministrazione di ABA immediatamente dopo il passaggio alla fase di ambientamento si è rivelata efficace nel ridurre lo shock da trapianto (Pospíšilová *et al.*, 1999). Ancora più efficace, allo scopo di migliorare la risposta dei germogli allo stress idrico durante l'acclimatazione, sembra essere la somministrazione di ABA direttamente nel mezzo di radicazione *in vitro*. Esperimenti condotti su *Tagetes erecta* L. dimostrano che concentrazioni pari a 10⁻⁴ M di ABA disciolto nel mezzo

di radicazione sortiscono un effetto analogo a quello di contenitori ventilati nel migliorare la morfologia (incremento dell'area fogliare, riduzione della lunghezza di stelo e radici avventizie), il tasso di perdita fogliare di acqua (LWL, *Leaf Water Loss*) e il tasso di sopravvivenza delle piante durante l'ambientamento (Aguilar *et al.*, 2000).

1.5 Tecniche di *fingerprinting*

Sebbene a tutt'oggi non siano ufficialmente richieste, le tecniche di biologia molecolare forniscono un importante supporto alla descrizione morfologica necessaria per l'iscrizione nel registro delle varietà presso l'ufficio comunitario per le nuove varietà vegetali (CPVO), secondo i protocolli ed i manuali tecnici messi a punto dall'UPOV (Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà Vegetali). La recente applicazione delle norme UPOV (revisione 1991), ratificata dal Governo Italiano con decreto legislativo del 3 novembre 1998 n. 455, inoltre, introduce il principio di *varietà derivata* che rende essenziale una caratterizzazione del genotipo su base molecolare, da affiancare ai metodi tradizionali. La caratterizzazione molecolare rappresenta infatti lo strumento più potente tra quelli oggi conosciuti per la discriminazione tra cultivar ed ibridi (Agarwal *et al.*, 2008), e può risultare cruciale per la difesa dei diritti offerti dalle vigenti normative in materia di privativa vegetale internazionale (CE Regolamento del Consiglio, 1994).

Tra le tecniche note di *fingerprinting*, gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms* (Vos *et al.*, 1995) risultano particolarmente efficaci nella caratterizzazione di nuove varietà vegetali. Questa tecnica, infatti, possiede un'elevata sensibilità a fronte di costi relativamente contenuti, sebbene preveda un protocollo di realizzazione piuttosto complesso.

I *fingerprinting* ottenuti mediante AFLP si basano sull'amplificazione selettiva di frammenti di restrizione ottenuti dalla digestione dell'intero genoma, e non necessitano di una precedente conoscenza delle sequenze da amplificare. La tecnica è in grado di produrre un elevato numero di polimorfismi con set limitati di coppie di *primer*, richiede modici quantitativi di DNA e vanta una buona riproducibilità, rispetto a altri tipi di polimorfismi basati sulla PCR, come a esempio i RAPD (Karp *et al.*, 1996; Hodkinson *et al.*, 2002).

Come suggerito dalla sigla AFLP, i polimorfismi consistono nella presenza / assenza di determinati frammenti di restrizione, e in variazioni nella lunghezza dei frammenti individuati, espressa in paia di basi. Il numero e la lunghezza dei frammenti ottenibili varia a seconda del set di *primer* utilizzati. Dopo gli opportuni cicli di amplificazione nel termociclatore, i frammenti possono essere visualizzati e analizzati ricavandone i profili elettroforetici su gel di poliacrilammide colorati chimicamente (per esempio con la tecnica del "*Silver Staining*"). La

buona riproducibilità ed affidabilità degli AFLP *fingerprinting* è dovuta a condizioni di reazione particolarmente stringenti per l' *annealing* dei *primer*, contrariamente a altre tecniche basate su PCR, come a esempio le RAPD, in cui le temperature di *annealing* sono più basse.

La tecnica prevede una fase di restrizione del genoma mediante l'azione combinata di due enzimi:

1) MseI che, avendo una sequenza di riconoscimento di sole 4 bp (5'-TTAA-3'), effettua in media un taglio ogni 4^4 (= 256) bp;

2) EcoRI, che, avendo una sequenza di riconoscimento più lunga (5'-GAATTC-3'), effettua tagli molto meno frequenti: in media uno ogni 4^6 (=4096) bp.

Nella fase successiva i frammenti così generati vengono "legati" a adattatori specifici per i siti di restrizione. I "ristretti/legati" vengono poi sottoposti a PCR con *primer* specifici per gli adattatori, addizionati di una base preselettiva (in genere Adenina per Eco e Citosina per Mse. Questo passaggio permette di selezionare il sottogruppo di frammenti che verranno successivamente amplificati. Seguirà una ulteriore PCR selettiva, con *primer* specifici per EcoA e MseC addizionati di due nuove basi selettive (variabili) per ogni *primer*. La fase di amplificazione finale permette di ottenere una serie di frammenti visualizzabili mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide. Il risultato della corsa elettroforetica, opportunamente analizzato, fornirà il *fingerprinting* dei campioni sottoposti a AFLP (Teani, 2011).

Trattandosi di marcatori *multi-locus*, di tipo dominante (mono-allelico), gli AFLP non consentono di distinguere tra mutazioni a carico di un singolo allele o di entrambi, ma in compenso permettono l'analisi simultanea di porzioni di DNA provenienti da loci dispersi all'interno dell'intero genoma nucleare, risultando altamente informativi (Ridout e Donini, 1999). E' stato osservato, a esempio, che in *Oryza sativa* L. (Mackill *et al.*, 1996) e in *Hordeum vulgare* L. (Waugh *et al.*, 1997) i marcatori AFLP sono distribuiti rispettivamente all'interno di quasi tutti o di tutti i cromosomi, con una buona correlazione, nel caso dell'orzo, tra la lunghezza del cromosoma e il numero dei *marker* per cromosoma (Hodkinson *et al.*, 2002).

Oltre che per la realizzazione di mappe genomiche, la tecnica basata sui marcatori AFLP è stata utilizzata con successo sia con finalità di analisi filogenetica per stabilire i rapporti di parentela tra specie differenti (Bruna *et al.*, 2007; Braglia *et al.*, 2010), sia per l'identificazione varietale in specie ornamentali, come le salvie (Braglia *et al.*, 2011), o ibridi di *Alstroemeria* (Mercuri *et al.*, 2012). La capacità di individuare qualsiasi riarrangiamento, anche all'interno del DNA di genotipi relativamente omogenei, come negli individui ibridi appartenenti alla stessa generazione F1 di un determinato incrocio, rende questa tecnica particolarmente appropriata per la realizzazione di *fingerprinting* univoci, ripetibili ed altamente sensibili allo scopo di proteggere le nuove varietà da sottoporre a privativa comunitaria per i ritrovati

vegetali (Mercuri *et al.*, 2012).

La letteratura scientifica riporta diversi casi di applicazione dei marcatori molecolari al *Limonium* per quanto concerne la caratterizzazione di ibridi commerciali mediante analisi RAPD (Bruna *et al.*, 2002) e per la verifica della natura ibrida in progenie derivanti da incroci interspecifici (Bruna *et al.*, 2002, mediante RAPD; Teani *et al.*, 2010, mediante RAPD e SSR).

Lo sviluppo di marcatori SSR, codominanti ed a singolo *locus*, effettuato su popolazioni naturali di *L. narbonense* ha consentito di estenderne l'applicazione a altre specie a diffusione mediterranea per approfondite indagini sui rapporti filitici all'interno del Genere (Palop *et al.*, 2000).

Analisi mediante marcatori RAPD sulla variabilità genetica di popolazioni relative a specie minacciate di *Limonium*, quali l'endemismo spagnolo *L. estevei* Fdez. Casas, sono state effettuate con finalità di conservazione e di indagine sull'incidenza della variabilità somaclonale nelle piantine propagate *in vitro* (Martín e Pérez, 1994). La struttura e la variabilità genetica all'interno di e tra popolazioni di *L. dufourii* (Girard) Kuntze sono state invece analizzate mediante marcatori AFLP (Palacios *et al.*, 1999). Quest'ultimo lavoro riveste un particolare interesse in quanto vengono effettuate indagini comparative sugli stessi individui in precedenza analizzati mediante marcatori RAPD (Palacios *et al.*, 1997), allo scopo di confrontare l'efficienza e l'affidabilità delle due tecniche. I risultati, pur sostanzialmente simili per quanto riguarda la valutazione delle distanze filogenetiche, confermano la superiorità dei *fingerprinting* AFLP in virtù della loro alta riproducibilità, dell'elevato numero di marcatori analizzabili contemporaneamente e della possibilità di ottenere accurate stime delle divergenze nucleotidiche anche all'interno di collezioni di germoplasma conservate *ex-situ*.

Capitolo 2

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della presente ricerca consiste nella valorizzazione con finalità commerciali delle nuove costituzioni di *Limonium* ottenute nell'ambito di programmi di *breeding*, finanziati dal MiPAAF, oggi conclusi (cfr. Cap. 1). La valorizzazione, come enunciato dal progetto di riferimento per il presente dottorato (Progetto “NewVarItaly” - “Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana” finanziato dal MiPAAF nell'ambito del Bando Imprese Florovivaistiche, D.M. 186 del 1° agosto 2007, G. U. n° 208 del 7/09/2007), è stata attuata attraverso il conseguimento di due distinti obiettivi:

- Obiettivo n. 1: individuazione delle specifiche condizioni di laboratorio e di ambientamento in grado di garantire tutte le fasi della micropropagazione delle nuove costituzioni di *Limonium* con una resa economicamente soddisfacente. L'attitudine alla propagazione *in vitro* rappresenta infatti un carattere determinante per il successo commerciale di una nuova cultivar destinata all'industria florovivaistica (alla stregua delle caratteristiche estetiche, o della durata in vaso).
- Obiettivo n. 2: sviluppo di un protocollo di *fingerprinting* mediante marcatori AFLP sulle varietà oggetto di studio, ai fini della caratterizzazione varietale, come supporto alla descrizione richiesta dalle vigenti normative comunitarie in materia di privativa per i ritrovati vegetali.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1. Materiale vegetale

Il materiale vegetale di partenza è costituito da 48 linee clonali di *Limonium* selezionate presso il CRA-VIV, frutto di precedenti attività di *breeding*. Le piante madre, in numero di 14 per ciascun clone, sono collocate a terra, in serra fredda, con disposizione alternata in file binate, con distanze di cm 45 sulla fila, cm 40 tra le file e cm 90 tra le bine, su terreno concimato con Multicote 12 Extra (composizione: 0,5 Kg di N, sotto forma di azoto nitrico e ammoniacale; 0,5 di K; 0,25 Kg di P₂O₅).

Le 48 linee clonali sono riconducibili a 8 gruppi distinti sulla base della/e specie di origine (Fig. 7):

- Gruppo “*L. gmelinii*” (8 cloni).
- Gruppo “*L. gmelinii* tipo ‘*altaica*’” (11 cloni).
- Gruppo “*L. latifolium*” (6 cloni).
- Gruppo ibridi “*L. otolepis*” (3 cloni).
- Gruppo ibridi “*L. serotinum*” (2 cloni).
- Gruppo ibridi “*L. sinense*” (3 cloni”).
- Gruppo ibridi di statiche “*L. bonduellei x sinuatum*” (11 cloni).
- Gruppo “altri” (*L. suworowii*, *L. peregrinum*, *L. tataricum*, *L. ibrido*).

Le caratteristiche botaniche e l’interesse ornamentale delle principali specie appartenenti ai gruppi sopra elencati sono state discusse all’interno dei paragrafi 1.2.1 e 1.2.2.

cloneSPECIE O IBRIDO		cloneSPECIE O IBRIDO	
Gruppo "gmelinii" (8)		Gruppo ibridi "otolepis" (3)	
LG1		LIO26	
LG2			
LG3			
LG4			
LG5			
LG6			
LG7			
LG8			
Gruppo "latifolium" (6)		Gruppo ibridi "serotinum" (2)	
LL9		LIS29	
LL10			
LL11			
LL12			
LL13			
LL14			
Gruppo ibridi "gmelinii-altaica" (11)		Gruppo ibridi "sinuatum x bonduelli" (11)	
LIG15		LSB34	
LIG16			
LIG17			
LIG18			
LIG19			
LIG20			
LIG21			
LIG22			
LIG23			
LIG24			
LIG25			
		Gruppo "altri" (4)	
		L45	
		L46	
		L47	
		L48	

Figura 7 – Linee clonali di *Limonium* costituite presso il CRA-VIV (Pescia) e il CRA-FSO (Sanremo), raggruppate per specie.

3.2. Impostazione generale della ricerca

Il materiale vegetale presente in serra (48 cloni, Fig. 7) è stato interamente rimesso in coltura durante i rispettivi periodi di fioritura, al fine di valutare le tipologie di espanto e le tecniche di sterilizzazione (descritte nel paragrafo 3.3.1). Una volta stabilizzate, le colture sono state trasferite in camera di crescita su un substrato di moltiplicazione standard per il *Limonium* (descritto nel paragrafo 3.3.2). Successivamente le attività sono state ripartite secondo i due obiettivi principali del progetto di riferimento per il dottorato (MIPAAF, 2007, Fig. 8):

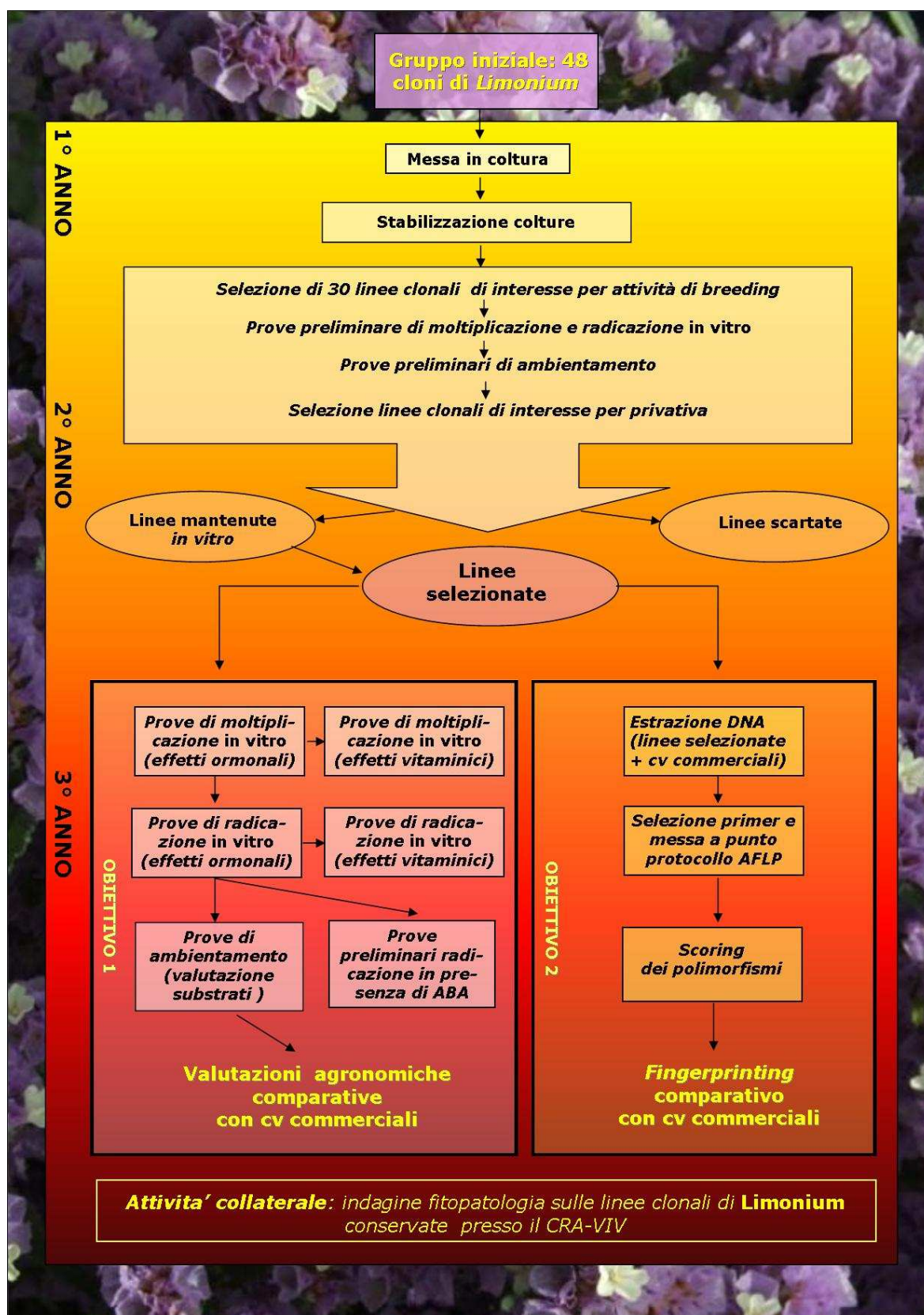


Figura 8 – Schema generale delle attività di ricerca effettuate, in base agli obiettivi definiti dal Progetto “NewVarItaly”.

- *Obiettivo n. 1: messa a punto di protocolli di micropropagazione per produzioni su larga scala:*
 - Valutazione preliminare dell'attitudine alla moltiplicazione *in vitro* delle linee clonali selezionate.
 - Prove preliminari di radicazione *in vitro* e di ambientamento su linee clonali con diversa attitudine alla micropropagazione.
 - Selezione delle linee clonali più idonee per produzioni su larga scala e per eventuali richieste di privativa comunitaria.
 - Selezione delle linee clonali da mantenere in collezione per futuri programmi di *breeding*.
 - Messa a punto di protocolli di moltiplicazione e radicazione *in vitro*, su ciascuna delle linee clonali selezionate per la produzione, con valutazione separata degli effetti di differenti formulazioni ormonali e vitaminiche.
 - Messa a punto di protocolli di ambientamento, con valutazione di 3 diverse miscele di terricci, una delle quali "*peat free*".
 - Prove preliminari di radicazione *in vitro* in presenza di ABA nel mezzo di coltura, allo scopo di ridurre o eliminare la fase di ambientamento.
 - Individuazione di cultivar (testimoni) con caratteristiche simili alle linee clonali selezionate per la produzione ed allestimento di prove agronomiche comparative presso un'azienda produttrice di *Limonium*.

- *Obiettivo n. 2: messa a punto di un fingerprinting genetico basato su marcatori AFLP per le linee clonali, attraverso le seguenti fasi:*
 - Estrazione di DNA dalle linee clonali selezionate per la produzione e delle cultivar utilizzate come testimoni.
 - Quantificazione del DNA estratto.
 - Impostazione dei cicli di restrizione con *EcoRI* e *MseI*.
 - Preparazione degli adattatori e ligazione.
 - Controllo dei ristretti legati mediante elettroforesi su gel di agarosio.
 - Impostazione dei cicli di preamplificazione.
 - Controllo dei preamplificati mediante elettroforesi su gel di agarosio.
 - Impostazione dei cicli di amplificazione con differenti coppie di *primer* AFLP selettivi.
 - Separazione dei frammenti amplificati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (colorato mediante la tecnica del "*silver staining*").

- Acquisizione dei gel tramite scanner e conversione in immagini digitali.
- Analisi dei polimorfismi riscontrati con le diverse coppie di *primer* tra ciascuna linea clonale selezionata e la cultivar di riferimento utilizzata come testimone.

3.3. Messa a punto dei protocolli di micropropagazione

3.3.1. Tipologie di espianto e tecniche di sterilizzazione

Per quanto sia possibile iniziare con successo una coltura *in vitro* di *Limonium* attraverso la morfogenesi diretta o indiretta rispettivamente da tessuto somatico o da callo (Mercuri *et al.*, 1999), al fine di evitare l'insorgere di fenomeni di variabilità somaclonale, si è ritenuto opportuno procedere attraverso l'espianto di germogli ascellari, in particolare di apici fiorali immaturi (Fig. 6) che, in *Limonium*, rappresentano un materiale vegetale a rapida ed elevata proliferazione a fronte di scarsi livelli di contaminazione (Amo-Marco e Ibañez, 1998; Ruffoni e Mascarello, 2000).

Circa 2 settimane prima dell'antesi, dalle infiorescenze immature delle piante madre di ciascuno dei 48 cloni coltivati nelle serre del CRA-VIV in perfette condizioni fitosanitarie, sono stati raccolti 20 porzioni apicali o uninodali della lunghezza di circa 2 cm (Fig. 6 a,c). Dagli steli in fase di fioritura più avanzata (Fig. 6 b) non sono stati prelevati espienti al fine di limitare i rischi di contaminazione dovuti alla possibile concentrazione di spore fungine e/o batteri all'interno delle strutture fiorali. Le tecniche adottate per il lavaggio e la sterilizzazione degli espienti sono riassunte in Tab. 1.

Lavaggio	H ₂ O + tensioattivo generico (10') + 1 passaggio in etanolo 70% (30'')
Sterilizzazione	A) Sol. acquosa di HgCl ₂ 1 mg/l + NaClO·5 H ₂ O 1% + tween [®] 20 (15') + 3 risciacqui in H ₂ O sterile (complessivamente 15')
	B) Sol. acquosa di NaClO·5 H ₂ O 1,25% + tween [®] 20 (20') + 3 risciacqui in H ₂ O sterile (complessivamente 15')

Tabella 1 – Tecniche di lavaggio e di sterilizzazione degli espienti.

Al fine di rimuovere polveri ed altri materiali contaminanti, gli espienti sono stati sottoposti a un energico lavaggio con un tensioattivo generico, seguito da un rapido passaggio in etanolo al 70% allo scopo di eliminare i residui acquosi del bagno precedente.

Una volta effettuato il lavaggio, gli espienti sono stati divisi in 2 gruppi di 10 per saggiare la risposta a 2 diversi trattamenti di sterilizzazione a base di cloruro di mercurio

(HgCl₂) e / o ipoclorito di sodio (NaClO·5 H₂O), due prodotti chimici tra i più utilizzati per la sterilizzazione di espianti in ortoflorofrutticoltura (De Paoli *et al.*, 1994). Il primo gruppo è stato sottoposto a un bagno in agitazione a temperatura ambiente di 15' in soluzione acquosa (con acqua deionizzata¹ sterile) di HgCl₂ (1 mg/l), con l'aggiunta di una soluzione commerciale di NaClO·5 H₂O, diluita all'1% di cloro attivo, e di poche gocce di tensioattivo non ionico Tween 20[®] Sigma (Tab. 1, soluzione A).

Il secondo gruppo è stato sottoposto a un bagno in agitazione a temperatura ambiente di 20' in una soluzione commerciale di NaClO·5 H₂O, diluita all'1,25% di cloro attivo, in acqua deionizzata sterile sempre con l'aggiunta di poche gocce di tensioattivo non ionico Tween 20[®] Sigma (Tab. 1, soluzione B).

Successivamente gli espianti sono stati trasferiti, sotto cappa a flusso laminare orizzontale, in 3 bagni successivi, rispettivamente della durata di 3, 5 e 7 minuti, in H₂O deionizzata sterile (sempre in agitazione a temperatura ambiente) allo scopo di rimuovere ogni traccia dei composti chimici utilizzati per la sterilizzazione.

3.3.2. Stabilizzazione *in vitro*

Al termine del processo di sterilizzazione, gli espianti sono stati suddivisi in 4 gruppi e trasferiti in provette sterili con 4 diversi substrati a formulazione MS² per la fase di stabilizzazione *in vitro* (Tab. 2).

1)MS + BA (0,8 mg/l), saccarosio (30 g./l), agar (6 g/l) - pH 5,90
2)MS + BA (0,8 mg/l), saccarosio (30 g./l), agar (6 g/l), PPM ^{TM3} (0,2%) - pH 5,90
3)MS + BA (1,5 mg/l), saccarosio (30 g./l), agar (6 g/l) - pH 5,90
4)MS + BA (1,5 mg/l), saccarosio (30 g./l), agar (6 g/l), PPM TM (0,2%) - pH 5,90

Tabella 2 – Substrati impiegati per la messa in coltura.

Per favorire lo sviluppo e la proliferazione degli espianti è stata impiegata la BA, una citochinina largamente utilizzata anche in *Limonium* (Ruffoni e Mascarello, 2000; Vitti *et al.* 2000). L'ormone è stato somministrato in 2 diverse concentrazioni (0,8 mg/l e 1,5 mg/l), entrambe più alte di quelle generalmente utilizzate in *Limonium* nella successiva fase di

¹ Mediante Deionizzatore Osmo Lab UPW 2 (Tecno-Lab s.r.l.).

² Murashige & Skoog Medium (Micro- e Macro elementi incluse vitamine) DUCHEFA.

³ PPM: Plant preservative mixture (Plant Cell Technology, Inc.).

moltiplicazione (cfr. paragrafo 1.4). In 2 dei 4 substrati è stata aggiunta anche la dose consigliata per la prevenzione di contaminazioni ambientali (0,2%) di PPM™ (Plant Preservative Mixture®), un biocida a ampio spettro che previene la germinazione delle spore e contribuisce a eliminare eventuali contaminazioni endogene da funghi e batteri.

Le provette sono state trasferite in camera di crescita, a una temperatura di 22°C con fotoperiodo di 16 ore, garantito da coppie di lampade fluorescenti compatte da 11W/840 con flusso luminoso di 900 lm, temperatura di colore 4000 K, resa cromatica Ra >80 ed efficienza luminosa lampada pari a 82 lm/W (dati forniti dal costruttore), poste a circa 40 cm dal materiale vegetale.

Dopo 4-8 settimane (a seconda del genotipo), i germogli in proliferazione sono stati trasferiti in vasi di vetro da 380 ml per colture *in vitro* con coperchio a vite in plastica autoclavabile semitrasparente, contenenti 67 ml di un substrato di moltiplicazione standard denominato “M3” (MS + BA 0,2 mg/l, saccarosio 30 g/l, Agar 5,5 g/l, pH 5,90, Tab. 4), già utilizzato con successo su numerose specie ed ibridi commerciali di *Limonium*, come descritto nel paragrafo 1.4 (Mercuri *et al.*, 1999).

3.3.3. Test iniziali di moltiplicazione e di radicazione *in vitro*

Al termine di due subcolture di circa 30 giorni per i cloni appartenenti al gruppo *L. bonduellei x sinuatum*, a più rapida proliferazione, e di 60 giorni per tutti gli altri, la fase iniziale di proliferazione sul substrato M3 ha consentito di ottenere alcune indicazioni sul comportamento *in vitro* dei cloni selezionati ed un adeguato numero di germogli per l’allestimento di un test iniziale di radicazione su substrato standard denominato “R4” (MS + IAA 1.0 mg/l + IBA 1.0 mg/l, saccarosio 30 g/l, Agar 5,5 g/l, pH 5,90, Tab. 5). Tre vasi (repliche) contenenti 6 germogli singoli per ciascun clone con caratteristiche idonee per la radicazione (lunghezza ≥ 2 cm, assenza di contaminazione, iperidricità e di fenomeni ossidativi o necrotici) sono stati posti a radicare in camera di crescita per 60 giorni. I rimanenti germogli sono stati nuovamente trasferiti sul substrato M3 per il mantenimento delle colture.

Sulla scorta delle indicazioni emerse dai test iniziali di moltiplicazione (risposta al trattamento con BA in termini di capacità di proliferazione, eventuali fenomeni di iperidricità e di imbrunimento, aspetto generale dei germogli) e di radicazione (formazione di radici, eventuali fenomeni di iperidricità o necrosi degli apici, aspetto generale dei germogli), descritti nel precedente paragrafo, e dei dati (non pubblicati) derivanti da precedenti attività di micropropagazione effettuate presso il CRA-VIV per il mantenimento della collezione, i genotipi della selezione iniziale sono stati suddivisi in 3 classi, in base alla loro attitudine alla moltiplicazione e radicazione *in vitro*:

- 1) genotipi con tasso di moltiplicazione *in vitro* alto e buona attitudine alla radicazione (*L. gmelinii*, *L. otolepis*, *L. latifolium*, *L. altaica*, *L. serotinum* ed ibridi tra queste specie);
- 2) genotipi con tasso di moltiplicazione *in vitro* medio-alto ma che possono manifestare difficoltà nella radicazione (*L. sinense*, *L. aureum*, *L. bonduelli*, alcuni genotipi di *L. sinuatum* ed ibridi tra queste specie);
- 3) genotipi parzialmente recalcitranti alla micropropagazione, con particolare riferimento alla fase di radicazione (*L. suworowii*, *L. perigrinum*, *L. tataricum*, alcuni genotipi di *L. sinuatum*).

3.3.4. Prove preliminari di propagazione *in vitro*

Valutazioni effettuate congiuntamente con l'Azienda proponente del progetto "NewVarItaly" sulle caratteristiche innovative, estetiche ed agronomiche delle piante madre di ciascuna linea clonale, coltivate in serra presso il CRA-VIV, hanno condotto all'eliminazione di 16 accessioni, in quanto ritenute non idonee né per valorizzazioni di tipo commerciale, né per finalità di *breeding*. E' stato inoltre eliminato il clone L 48 [*L. suworowii* = *Psylliostachys suworowii* (Regel) Roshk] in quanto, trattandosi di una specie annuale con scarsissima variabilità fenotipica ed un'elevata efficienza di propagazione per seme (a fronte di una notevole recalcitranza alla radicazione *in vitro*, come confermato dal test iniziale di radicazione effettuate), è stato ritenuto economicamente più vantaggioso perseguire la strada della propagazione gamica; considerazioni analoghe hanno condotto all'eliminazione del clone L 46 [*L. tataricum* = *Goniolimon tataricum* (L.) Boiss], sebbene in questo caso si tratti di una specie perenne. La selezione di linee clonali di partenza, dunque, è stata ridotta a 30 accessioni, ripartite in 3 gruppi, secondo la classificazione descritta nel paragrafo precedente (Tab. 3). Su ciascuna delle 30 linee clonali selezionate sono state effettuate prove preliminari di moltiplicazione e radicazione *in vitro*, valutando gli effetti di 5 substrati di moltiplicazione (Tab. 4) e di 5 substrati di radicazione (Tab. 5) su 3 vasi contenenti 6 germogli per vaso. Sono state utilizzate formulazioni di substrati a base MS (talvolta modificata) ricavate dalla letteratura (cfr. paragrafo 1.4) e da protocolli interni del CRA-VIV, frutto di precedenti esperienze di propagazione *in-vitro* di *Limonium* (dati non pubblicati).

Tutte le colture sono state poste in camera di crescita nelle condizioni descritte nel paragrafo 3.3.2. Dopo 2 subcolture (di circa 30 giorni per i cloni appartenenti al gruppo *L. bonduellei* x *sinuatum*, e di circa 60 giorni per tutti gli altri) in fase di moltiplicazione ed un periodo di circa 60 giorni in fase di radicazione, sono state effettuate valutazioni qualitative sul comportamento dei germogli in coltura, allo scopo di individuare i 3 substrati maggiormente performanti da testare nelle prove successive di moltiplicazione e radicazione *in vitro*. In

particolare, sono state valutate l'attitudine alla proliferazione / radicazione (a seconda della fase), l'incidenza di fenomeni di vitrescenza e/o necrosi e l'aspetto generale dei germogli.

Linee scartate	Linee mantenute in coltura			
LG4	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	
LG5	LG1	LSIN31	L46	
LG6	LG2	LSIN32	L47	
LG7	LG3	LSIN33	LSB41	
LL9	LG8	LSB34		
LL10	LL13	LSB35		
LL11	LIG15	LSB36		
LL12	LIG16	LSB38		
LL14	LIG17	LSB39		
LIG20	LIG18	LSB40		
LIG22	LIG19	LSB42		
LIG24	LIG21	LSB43		
LIG25	LIG23	LSB44		
LIO28	LIO26			
LIS29	LIO27			
L45	LIS30			
LSB37				
L48				

Tabella 3 – Linee clonali di *Limonium* selezionate per le prove preliminari di propagazione *in vitro*, ripartite in 3 gruppi base alla loro attitudine alla micropropagazione. A: LIG15; B: LSB43; C: L47; D: L46.

SUBSTRATI DI MOLTIPLICAZIONE*	
M1	MS (senza ormoni)
M2	MS + kinetina 1.0 mg/l
M3	MS + BA 0.2 mg/l
M4	MS + BA 0.5 mg/l
M5	MS macro / micro-elementi + MS FeNaEDTA (x2) + B5 vitamine + BA 0.6 mg /l + NAA 0.3 mg/l 1/3 saccarosio (10.0 g/l). Agar: 7.0g/l

Nota: *saccarosio: 30 g/l (eccetto: M5); Agar 5,5 g/l (eccetto: M5)

Tabella 4 – Substrati utilizzati per le prove preliminari di moltiplicazioni *in vitro*.

SUBSTRATI DI RADICAZIONE*		GRUPPO
R1	MS (senza ormoni)	1
R2	MS + IAA 1.0 mg/l	1,3
R3	MS + IBA 1.0 mg/l	1,3
R4	MS + IAA 1.0 mg/l + IBA 1.0 mg/l	1,2,3
R5	½ MS + IAA 1.0 mg/l + IBA 1.0 mg/l ½ saccarosio (15.0 g/l)	2
R6	½ MS + NAA 0.5 mg/l ½ saccarosio (15.0 g/l)	2,3
R7	MS + NAA 0.5 mg/l	1
R8	MS + NAA 1.0 mg/l	2,3
R9	MS + IAA 2.0 mg/l	2
R10	MS macro / micro-elementi + MS (x2) FeNaEDTA + B5 vitamine + IBA 12.0 mg/l 1/3 saccarosio (10.0 g/l) Agar: 7.0 g/l Dopo 24 h trasferimento su un mezzo con la stessa composizione ma privo di IBA.	3

Saccarosio: 30 g/l (eccetto: R5, R6, R10); Agar 5,5 g/l (eccetto: R10)

Tabella 5 – Substrati utilizzati per le prove preliminari di radicazione *in vitro* di *Limonium* a seconda del gruppo di appartenenza.

3.3.5. Selezione delle linee clonali

Dal momento che molti dei cloni selezionati in Tab. 3 appartengono alle stesse specie botaniche (o sono ibridi a esse riferibili) alcuni di essi differiscono tra loro in misura minima, rendendone poco vantaggiosa un'eventuale immissione sul mercato e/o una richiesta di privativa comunitaria per i ritrovati vegetali. Per ragioni analoghe, il comportamento *in vitro* emerso nelle prove preliminari è risultato in molti casi simile all'interno delle stesse specie o di gruppi di specie. Alla luce di tali considerazioni, al termine delle prove preliminari di moltiplicazione e radicazione *in vitro* e di ambientamento, l'Azienda Proponente, ha ritenuto opportuno effettuare una ulteriore selezione, all'interno del gruppo di 30 cloni precedentemente individuati, al fine di mettere a punto i protocolli di propagazione *in vitro* e le tecniche per l'ottenimento di un affidabile *fingerprinting* genetico soltanto per quei genotipi ritenuti sufficientemente originali e competitivi per una immediata immissione sul mercato del fiore reciso. I rimanenti 27 cloni, di interesse solo per alcuni caratteri, sono stati mantenuti *in vitro*

come germoplasma da utilizzare per eventuali attività future di *breeding*. Le linee clonali selezionate in base ai suddetti criteri sono 6 (Fig. 9), 3 di “statice” e 3 di “*Limonium*” propriamente detto, così ripartite nei 3 gruppi elencati in Tab. 3:

Gruppo 1: LIG15, LIG19 (ibridi *L. gmelinii* / *L. altaica*), LIS30 (ibrido di *L. serotinum*).

Gruppo 2: LSB40, LSB43 (ibridi *L. bonduellei* x *sinuatum*).

Gruppo 3: LSB41 (ibrido *L. bonduellei* x *sinuatum*).



Figura 9 – Linee clonali di *Limonium* selezionate per le prove di moltiplicazione e radicazione *in vitro*.

Alle 6 linee clonali di *Limonium* selezionate sono state associate altrettante cultivar appartenenti alle stesse categorie commerciali (3 di “statice” e 3 di del gruppo “*gmelinii/altaica*”, Tab. 6) e con caratteristiche fenotipiche simili, utilizzate come testimoni nelle prove agronomiche (cfr. Paragrafo 3.5 e nella messa a punto di *fingerprinting* con marcatori AFLP (cfr. Paragrafo 3.6).

CLONE CRA-VIV	TESTIMONE	PRODUTTORE
LIG15	SAFORA [®] PURPLE	DANZIGER
LIG19	SAFORA [®] BLUE	DANZIGER
LIS30	SAFORA [®] DARK BLUE	DANZIGER
LSB40	'BARBIE WINGS' [®]	HILVERDA
LSB41	'CHERRY WINGS' [®]	HILVERDA
LSB43	'LEMON WINGS' [®]	HILVERDA

Tabella 6 - Elenco dei genotipi di *Limonium* (6 cloni selezionati dal CRA-VIV e 6 varietà commerciali) utilizzate nelle prove agronomiche e per la caratterizzazione molecolare con marcatori AFLP.

3.3.6. Messa a punto dei protocolli di moltiplicazione e radicazione in vitro

Le prove sono state effettuate sui 6 cloni selezionati descritti nel paragrafo 3.3.5 (Fig. 9). Per ciascuno di essi sono stati saggiati i 3 substrati di moltiplicazione e di radicazione che hanno fornito i migliori risultati nelle prove preliminari.

Disegno sperimentale per le prove di moltiplicazione in vitro.

1a. Valutazione degli effetti ormonali:

Sono stati inseriti 6 germogli singoli per vaso, alla seconda subcoltura per ciascuno dei substrati a base MS saggiati, con 9 ripetizioni (vasi) per prova.

Per ciascuna prova sono stati valutati i seguenti parametri:

- a) tasso di moltiplicazione totale (numero medio di germogli ottenuti da un singolo germoglio iniziale);
- b) tasso di moltiplicazione al netto di eventuali germogli necrotici o vitrescenti;
- c) tasso di produzione di germogli ben conformati di lunghezza > 1.5 cm, già idonei per il passaggio alla fase di radicazione, senza bisogno di fasi di allungamento intermedie (Fig. 10);
- d) incremento giornaliero medio di biomassa (peso fresco);
- e) valutazione complessiva della qualità del germoglio, in particolare:
 - sviluppo e consistenza dell'apparato fogliare;
 - presenza/assenza di callo, vitrescenza, fenomeni di imbrunimento e necrosi.

Al fine di massimizzare gli effetti delle combinazioni ormonali allo studio, si è ritenuto opportuno mantenere il più a lungo possibile i germogli nei vari mezzi sperimentali. La durata delle subcolture, pertanto, è stata mantenuta tra le 4-5 settimane per i cloni appartenenti al gruppo *L. bonduellei* x *sinuatum* (LSB40, LSB41, LSB43), a più rapida proliferazione, e tra 8-9 settimane per gli altri cloni (LIG15, LIG19, LIS30).

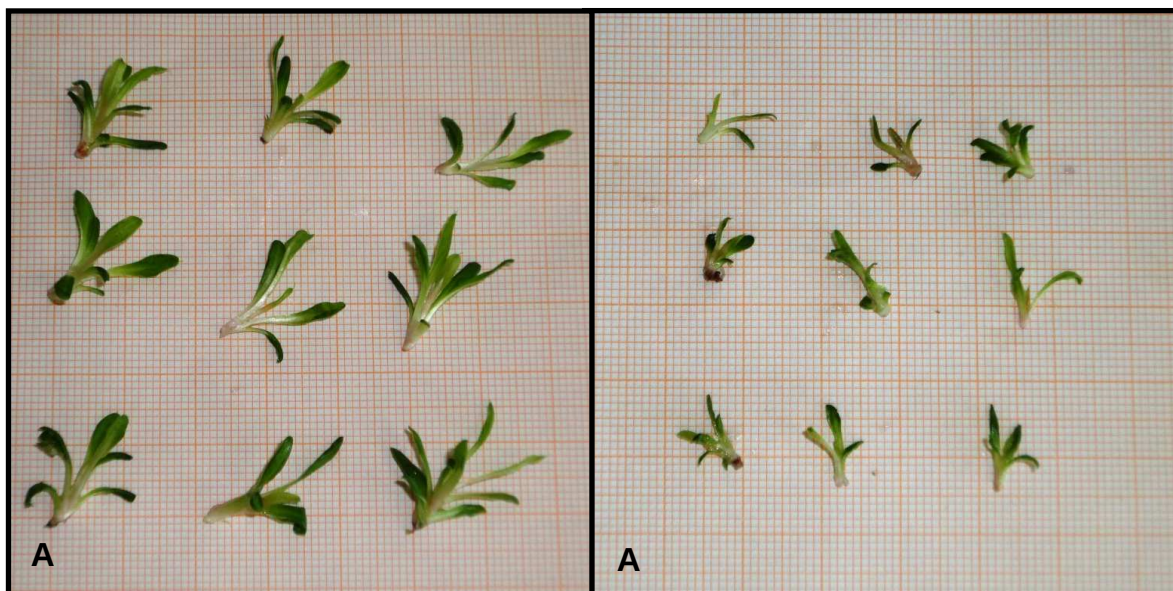


Figura 10 – Suddivisione in classi dei germogli ottenuti dalle prove di moltiplicazione *in vitro*: A) germogli grandi, ben conformati, pronti per la fase di radicazione; B) germogli piccoli, mantenuti in fase di moltiplicazione (Clone LIG15).

2a. Valutazione degli effetti vitaminici:

Una volta valutati i dati ottenuti con i suoi substrati a base MS, la formulazione ormonale risultata più efficiente, sia dal punto di vista dei tassi di moltiplicazione che della qualità complessiva del germoglio, è stata testata su un substrato a base LS⁴. La formula, messa a punto da Linsmaier e Skoog nel 1965 per studiare le reali necessità di sostanze organiche nella coltura *in vitro* di tabacco, oltre a risultare più economica e di più facile preparazione, in quanto priva di alcune vitamine rispetto al substrato MS (glicina, acido nicotinico e piridossina cloridrato, oltre a una ridotta concentrazione di tiamina cloridrato, cfr. paragrafo 1.4), ha fornito buoni risultati sia in fase di moltiplicazione che di radicazione su genotipi di statice (Leshem e Cohen, 1983; Harazy *et al.*, 1985).

Anche in questo caso sono stati valutati 6 germogli singoli per vaso, alla seconda subcoltura su substrato LS, con 9 ripetizioni per prova, utilizzando come controllo altrettanti vasi con identica formulazione ormonale su base MS. I parametri valutati sono gli stessi delle prove di valutazione degli effetti ormonali descritti al punto 1a.

Disegno sperimentale per le prove di radicazione in vitro:

1b. Valutazione degli effetti ormonali:

Sei cloni selezionati (gli stessi utilizzati nelle prove di moltiplicazione); 3 diversi substrati di moltiplicazione a base MS (formulati secondo le indicazioni ottenute dalle prove preliminari di radicazione); 6 germogli per vaso; 9 ripetizioni (vasi) per prova.

⁴ Linsmaier & Skoog Medium (Micro- e Macro elementi incluse vitamine) DUCHEFA.

Per ciascuna prova sono stati valutati i seguenti parametri:

- a. Percentuale di germogli radicati *in vitro*.
- b. Percentuale complessiva di germogli radicati e con callo rizogeno, ritenuti idonei per il passaggio in fase di acclimatazione (solo se in presenza di bassa percentuale di radicazione).
- c. Percentuale di di germogli vitrescenti e/o necrotici.
- d. Incremento giornaliero medio di biomassa (peso fresco).
- e. Valutazione complessiva di tipo qualitativo dei germogli radicati, in particolare:
 - sviluppo e consistenza dell'apparato radicale;
 - sviluppo e consistenza dell'apparato fogliare;
 - presenza/assenza di callo, vitrescenza, fenomeni di imbrunimento e necrosi.

2b. Valutazione degli effetti vitaminici:

Come per le prove di moltiplicazione, una volta valutati i dati ottenuti con i sui substrati a base MS, la formulazione ormonale risultata più efficiente, sia dal punto di vista dei tassi di moltiplicazione che della qualità complessiva del germoglio, è stata testata su un substrato a base LS, al fine di valutare gli effetti della componente vitaminica. Sono stati valutati 6 germogli singoli per vaso, con 9 ripetizioni per prova, utilizzando come controllo altrettanti vasi con identica formulazione ormonale su base MS. I parametri considerati sono gli stessi delle prove di valutazione degli effetti ormonali descritti al punto 1b.

3.3.7. Prove preliminari di radicazione *in vitro* in presenza di ABA

Nell'autunno 2011 sono state intraprese delle prove sperimentali di radicazione *in vitro* al fine di verificare su *Limonium* gli effetti dell'acido abscissico (ABA) aggiunto ai mezzo di coltura sui meccanismi di regolazione dell'apertura degli stomi già descritti su altre specie, come discusso nel paragrafo 1.4 (Pospíšilová *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2000). Lo scopo è quello di riuscire a “indurire” i germogli durante la fase di radicazione, in modo da ridurre o eliminare del tutto la durata della successiva fase di ambientamento. Ciascuno dei 6 cloni selezionati è stato radicato sul substrato a base MS risultato più efficiente durante le prove di radicazione descritte nel paragrafo precedente, a cui è stato aggiunto ABA alla concentrazione di 10^{-4} M, in accordo con le prove effettuate da Aguilar *et al.* (2000) su *Tagetes erecta*. In due casi, LSB43 (*Limonium* del gruppo “statice”) e LIG15 (*Limonium* del gruppo “*gmelinii/altaica*”), è stata saggiata anche una concentrazione di ABA nel mezzo 10 volte più bassa (Tab. 7).

CLONI	SUBSTRATI		
LSB40	R3	R3 + ABA 10 ⁻⁴ M	-
LSB41	R3	R3 + ABA 10 ⁻⁴ M	-
LSB43	R4	R4 + ABA 10 ⁻⁴ M	R4 + ABA 10 ⁻⁵ M
LIS30	R4	R4 + ABA 10 ⁻⁴ M	-
LIG19	R2	R2 + ABA 10 ⁻⁴ M	-
LIG15	R3	R3 + ABA 10 ⁻⁴ M	R3 + ABA 10 ⁻⁵ M

Tabella 7 – Prove preliminari di radicazione *in vitro* su substrati arricchiti con ABA.

Per ciascun clone sono state effettuate 3 ripetizioni (vasi) con 6 germogli ciascuna.

Dopo una subcoltura di circa 8 settimane, le pagine abassiali delle foglioline dei germogli radicati sono state osservate al microscopico ottico al fine di valutare il grado di apertura degli stomi. Sono stati inoltre valutati l'aspetto dei germogli e la proporzione gli apparati radicali e fogliari.

Al fine di verificare gli effetti della radicazione in presenza di ABA nella fase di acclimatazione, un terzo dei germogli radicati in presenza di ABA è stato posto a ambientare sotto il tunnel utilizzato per le prove di acclimatazione (cfr. paragrafo 3.4), un terzo su un bancale riscaldato con la stessa temperatura del tunnel di acclimatazione (14°C) e con la stessa frequenza di nebulizzazione, ed un terzo in serra non riscaldata, a regime irriguo normale. I 3 gruppi sono stati affiancati da un controllo formato dallo stesso numero di germogli radicati in assenza di ABA. Tutti i germogli sono stati posti a ambientare sulla miscela di terricci risultata più efficiente nelle prove preliminari di ambientamento descritte nel prossimo paragrafo.

3.4. Fase di ambientamento

3.4.1. Messa a punto dell'ambiente di acclimatazione

Tra febbraio e maggio 2010, sono state effettuate delle prove preliminari di ambientamento su 13 genotipi ripartiti nei 3 gruppi individuati dalla tabella 3, predisponendo le seguenti condizioni sperimentali:

Sono state valutate 3 diverse miscele di terricci, di cui una *environmental friendly* in quanto priva di torba. Per ciascuna miscela sono state allestite 3 ripetizioni, di 6 germogli ciascuna.

I contenitori alveolari con i germogli radicati *in vitro* sono stati disposti secondo una distribuzione randomizzata sopra un bancale con agriperlite sormontato da un tunnel di materiale plastico trasparente, in serra ombreggiata al 70% con riscaldamento basale (14 °C)

nei mesi freddi, e nebulizzazione temporizzata (da 3' x 3 volte/giorno nella stagione stiva a 2' x 1 volte/giorno nella stagione invernale) (Fig. 11). La temperatura e l'umidità relativa sono stati monitorati da un data-logger termico e da un termoigrografo. I germogli sono stati mantenuti per due settimane sotto tunnel completamente chiuso; nelle due settimane successive sotto tunnel parzialmente aperto (da 30 a 50%), e successivamente sullo stesso bancale, con tunnel completamente aperto.



Figura 11 – Tunnel di ambientamento su bancali riscaldati con letto di agriperlite.

Le miscele di terricci utilizzate sono le seguenti:

1) “TA”: Mix composto da: 2/3 v/v terriccio universale a base di torba (Brill); 1/3 v/v agriperlite in alveoli di torba pressata. Il terriccio universale, dai dati forniti dal produttore e da analisi effettuate presso il nostro laboratorio (Prisa *et al.*, 2009) risulta avere la seguente composizione chimica: carbonio organico 20%, azoto organico 0,4%, sostanza organica 40%; e le seguenti caratteristiche chimico-fisiche: pH 6,0, EC 180 $\mu\text{S}/\text{cm}$, volume di aria sul totale 20,9%, acqua facilmente disponibile 24,5%, acqua di riserva 4,2%. La miscela “TA” è stata impiegata come tesi di controllo, in quanto costituisce il substrato di ambientamento standard dell’Azienda Proponente per il *Limonium*. Essa differisce dai terricci di ambientamento riportati dalla letteratura [miscele di torba ed agriperlite nelle proporzioni di 1:1 (v/v), Mercuri *et al.*, 1999; Ruffoni e Mascarello, 2000], per una maggiore disponibilità di sostanza organica disponibile, in grado di favorire l’accrescimento del germoglio radicato anche al termine del periodo di acclimatazione vero e proprio, senza necessità di un trapianto immediato; inoltre, in sostituzione dei contenitori alveolari in materiale plastico, sono stati utilizzati vasetti “Jiffy-Pot[®]” 6 x 6 cm realizzati in torba pressata (Fig. 12), compostabile al 100%, che non producono materiale plastico di scarto, in quanto si dissolvono nel terreno dopo la messa a dimora,

facilitando inoltre lo sviluppo e l'estensione dell'apparato radicale (informazioni fornite dalla ditta fornitrice).



Figura 12 - Vasetti “Jiffy-Pot®” realizzati in torba pressata 6 x 6 cm (foto di sinistra) ed alveoli plastici da 54 fori rivestiti di polistirolo areato (Linea “PRESS”) prodotti dalla ditta ECOFABER di Modica (RG) (foto di destra).

2) “CT”: Cubetti di torbe brune e bionde pressate in alveoli plastici 100% riciclabili da 54 fori rivestiti di polistirolo areato (Linea “PRESS”, prodotta dalla ditta ECOFABER di Modica, RG, Fig. 12) con aggiunta di agriperlite negli interstizi. La particolare conformazione di questi alveolari, già utilizzati con successo per la semina di piante orticole, consente di ottenere radici più ramificate e più fibrose, di ridurre lo stress da trapianto, conferendo una maggiore robustezza ed una maggiore precocità di sviluppo alle piantine, grazie a un ottimale equilibrio termico ed idrico del microambiente in cui si sviluppa l'apparato radicale (informazioni fornite dalla ditta fornitrice).

3) “BCA”: Mix composto da: Biomax⁵ (50% v/v), Agriperlite (30% v/v), Clinoptinolite⁶ a granulometria 2,5-5,0 mm (20% v/v), in alveoli “Jiffy-Pot®” 6 x 6 cm. Il Biomax, dai dati forniti dal produttore e da analisi effettuate presso il nostro laboratorio (Prisa *et al.*, 2009) risulta avere la seguente composizione chimica: azoto totale 4,2%, K 0,3%, P 0,15%, Mg 432 mg/Kg, Ca 130 mg/Kg, Na 64 mg/Kg, sostanza organica 80%. Caratteristiche chimico-fisiche: pH 5,8, EC 200 µS/cm, volume di aria sul totale 25,2%, acqua facilmente disponibile 20,6%, acqua di riserva 2,5%.

La miscela “BCA” riveste una particolare valenza ecologica, in quanto priva di torba. Inoltre, la letteratura scientifica riporta gli effetti migliorativi, in termini di qualità e produttività, su piante orticole ed ornamentali coltivate su substrati a base di Biomax e zeoliti, rispetto alle comuni miscele di terricci utilizzati in floricoltura (Prisa *et al.*, 2008, 2009; Passaglia *et al.*, 2005).

⁵ BIOMAX: substrato a base di residui derivanti dalla lavorazione della granella di orzo, prodotto dall'Azienda Agricola Paladini di Rosignano Marittimo (LI).

⁶ CLINOPTINOLITE: ammendante minerale appartenente alla famiglia delle zeoliti.

La struttura cristallina regolare e microporosa delle zeoliti, tra cui la clinoptinolite, è caratterizzata da un'elevata CSC e da una spiccata idrofilia, che le rende particolarmente idonee all'impiego come ammendanti nei substrati di ambientamento.

Al fine di non stressare inutilmente i germogli radicati, non è stato effettuato alcun trattamento antifungino, considerate le ottimali condizioni sanitarie dell'ambiente di acclimatazione.

3.4.2. Prove di ambientamento

Le prove di ambientamento sono state realizzate secondo lo stesso disegno sperimentale descritto nel paragrafo precedente, applicato ai 6 cloni illustrati in Fig. 9. Per ciascun clone sono state valutate 3 diverse miscele di terricci (paragrafo 3.4.1, punti 1, 2 e 3; Fig. 12), con 3 ripetizioni per miscela, contenente 15 germogli ciascuna, distribuite in modo randomizzato sotto il tunnel di acclimatazione.

Per ciascuna miscela di substrati sono stati valutati i seguenti parametri, sulle piantine ambientate:

- a. Percentuale di sopravvivenza all'acclimatazione.
- b. Eventuale sviluppo di patologie fungine.
- c. Valutazione qualitativa complessiva delle piantine ambientate.
- d. Sviluppo e consistenza dell'apparato radicale (peso fresco, peso secco, misurato dopo 7 giorni in stufa a 70°C).
- e. Sviluppo e consistenza dell'apparato fogliare [peso fresco, peso secco, area fogliare determinata mediante areametro WinDIAS Image Analysis System (Delta-T Devices, U.K.)].
- f. Misurazioni colorimetriche effettuate su campioni fogliari, tramite lettura delle coordinate CIE Lab ricavate mediante spettro-colorimetro Xrite SP64, allo scopo di quantificare la differenza nell'intensità del verde della lamina fogliare osservata nelle prove preliminari di ambientamento tra le 3 tipologie di substrato utilizzate. Il sistema CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) "L*a*b*" (chiamato anche CIE 1976), è un sistema colorimetrico assoluto, che individua una frequenza univoca per ogni terna di coordinate (CIE, 1986): una coordinata (L) indica la luminosità in una scala da 0 (chiaro) a 100 (scuro), mentre le restanti due (A e B) indicano il colore, con A variabile da -60 (verde) a + 60 (rosso) e B variabile da -60 (blu) a + 60 (giallo) (Fig. 13).

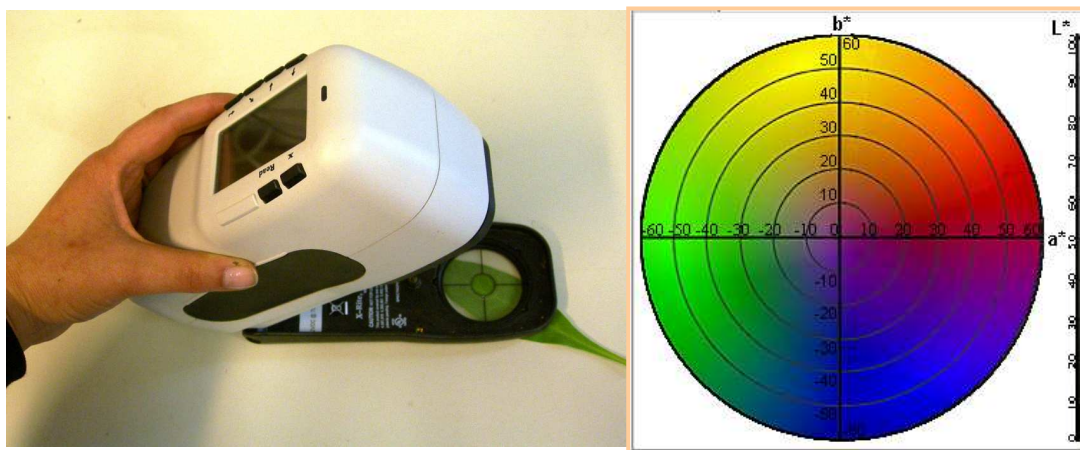


Figura 13 – Lettura delle coordinate CIE “L*a*b*” su foglia di *Limonium* (LIG19) mediante spettrocolorimetro Xrite SP64.

g. Quantificazione della clorofilla “a” e “b”, in quanto l’incremento del contenuto di clorofilla “a” e “b” risulta correlato con le condizioni del microambiente di acclimatazione *ex-vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999). L’estrazione della clorofilla è stata effettuata da dischetti fogliari immersi in metanolo al 99,99%. Il volume di metanolo aggiunto è pari al 10% del peso fresco del campione fogliare (mg/ml). I campioni sono stati posti al buio a una temperatura di 4°C. Dopo 24 ore è stata misurata l’assorbanza allo spettrofotometro (Thermo Evolution 300 UV-Visible) della soluzione ottenuta. Il contenuto in clorofilla è stato calcolato utilizzando le formule di Lichtenthaler (1987) con assorbanza pari a 665.2 nm per la clorofilla “a” e pari a 652.4 nm per la clorofilla “b”.

3.5. Prove agronomiche

Le prove agronomiche sono state effettuate tra aprile ed ottobre 2011, presso le strutture dell’Az. Agr. Moschini Lauro, di Ponte Buggianese (PT), specializzata nella produzione di *Limonium*.

Le prove sono state allestite ponendo a confronto le 6 linee clonali di *Limonium* selezionate presso il CRA-VIV (Fig. 9), con altrettante varietà commerciali dalle caratteristiche simili (Tab. 6), coltivate nelle medesime condizioni.

Le piante sono state poste a dimora in serra fredda, con pacciamatura in tessuto di polipropilene nero, ad aprile 2011. Per ogni clone sono state allestite 3 parcelle, disposte secondo una distribuzione randomizzata, di 6 piante ciascuna in fila singola, su 3 file, con una distanza di 40 cm lungo le file, e di 1 metro tra le file (Fig. 14).



Figura 14 – Parte della serra su cui sono state effettuate le prove agronomiche presso l’Az. Agr. Moschini Lauro di Ponte Buggianese (PT), a un mese dall’impianto (maggio 2011) e tra il primo ed il secondo raccolto (luglio 2011).

Fertilizzazione: è stata effettuata una concimazione organica di base arricchita con K_2O prima della fresatura, seguita da cicli settimanali di fertilizzazione a pioggia NPK 20:20:20, tra aprile ed agosto.

Trattamenti fitosanitari (da maggio ad agosto): Ridomil® Gold (Metalaxil) 0.1 ml/mq associato a zolfo bagnabile ogni 2 settimane (contro *Peronospora statices*); Rovral® (Iprodione) 300 ml/hl ogni 2 settimane, alternato al precedente (contro *Botrytis cinerea*); Laser® (Spinosad) 20 ml/hl, 2 trattamenti, in luglio ed in agosto (contro *Frankliniella occidentalis* ed altri parassiti).

La prima serie di valutazioni agronomiche è stata effettuata il 27 giugno 2011, quando tutte le piante dei 3 cloni di statici selezionati (LSB40, LSB41 e LSB3) e delle 3 cultivar utilizzate come testimoni (rispettivamente ‘Barbie Wings’®, ‘Cherry Wings’® e ‘Lemon Wings’®) erano in piena fioritura. Successivamente, sono state effettuate altre 2 prove agronomiche, all’epoca di fioritura delle rimonte successive (28 luglio 2011 e 21 settembre 2011).

Per quanto riguarda i genotipi di statiche sono stati raccolti gli steli fioriti di lunghezza idonea per la commercializzazione (> 40 cm), e su campioni di essi (6 per parcella per genotipo) sono stati valutati i seguenti parametri produttivi, estetici e biometrici:

- a. produzione media stagionale e produzione totale dell’anno;
- b. colore del calice;
- c. colore della corolla;
- d. alatura dello stelo (1: assente o molto stretta; 2: stretta; 3: media; 4: larga; 5: molto larga);
- e. rigidità dello stelo (1: 0-30° (poco rigido); 2: 30-60° (mediamente rigido); 3: 60-90° (rigido); 4: 90° (molto rigido)).

- f. distribuzione delle spighe fiorali sullo stelo (spighe distribuite ed orientate su: 1) molti piani diversi; 2) pochi piani diversi; 3) all'incirca sullo stesso piano;
- g. tipologia della spiga fiorale (1:corta e lassa; 2: corta e densa; 3: piccola e stretta; 4: grande, piatta e densa; 5: molto lassa e irregolare; 6: grande e molto allungata; 7: spiga piena, densa, allungata, Fig.15);
- h. lunghezza media degli steli;
- i. numero medio di rami fioriti per stelo;
- j. peso fresco medio degli steli.

Alcuni dei parametri biometrici ed estetici valutati (in particolare ai punti b, c, d, h, i) sono stati recepiti dai questionari tecnici UPOV relativi al *Limonium* (UPOV, 1999). Altri sono stati ricavati dall'esperienza di floricoltori ed operatori del mercato florovivaistico, e si riferiscono specificamente ad aspetti qualitativi dello statice (punti e, f, g), in particolare per quanto riguarda la classificazione della spiga fiorale (Fig. 15, Antonetti *et al.*, 2009).

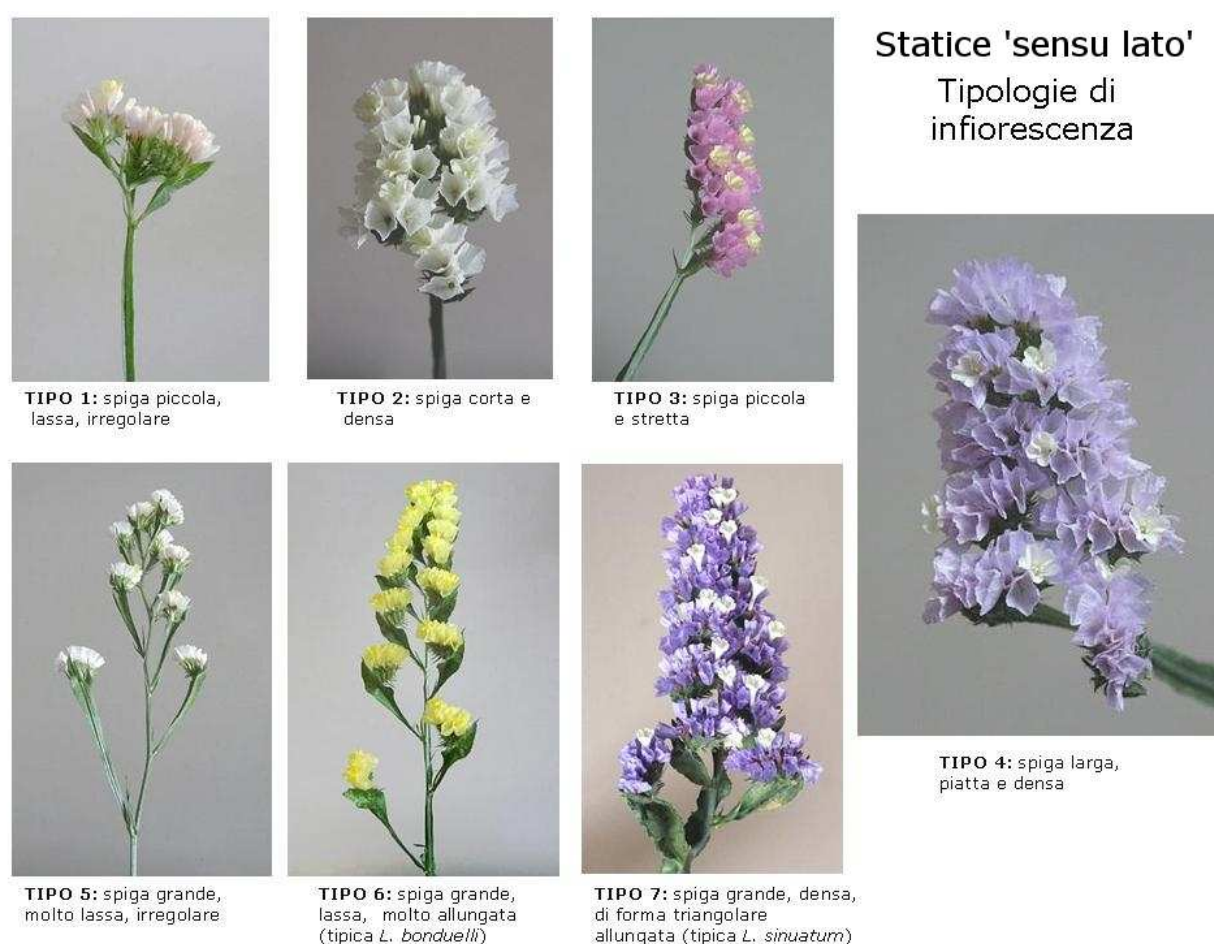


Figura 15 - Tipologie di spiga fiorale nello statice (Antonetti *et al.*, 2009). Secondo indicazioni raccolte da floricoltori dell'area pesciatina, la spiga del tipo 4 risulta la più ricercata dal mercato del fiore reciso.

I cloni selezionati ed i testimoni di *Limonium* appartenenti al gruppo “*L. gmelinii* / *altaica* / *serotinum*” (LIS30, LIG15, LIG19, ‘Safora[®] Blue’, ‘Safora[®] Purple’ e ‘Safora[®] Dark Blue’) in

condizioni normali, raggiungono la completa fioritura soltanto l'estate successiva al trapianto. I dati relativi alla produzione media stagionale ed annuale di tali cloni saranno pertanto valutati nell'estate 2012, quando le piante avranno raggiunto la necessaria maturità per esprimere i livelli standard di produttività.

Su campioni di steli (6 per parcella per genotipo) raccolti in ottobre (durante la prima, parziale fioritura), è stato tuttavia possibile effettuare i seguenti rilievi:

- a. colore del calice;
- b. colore della corolla;
- c. caducità dei fiori (al secondo giorno dopo la raccolta);
- d. profumo dei fiori;
- e. numero medio di fiori aperti (sul totale dei fiori presenti sugli ultimi 3 cm della spiga fiorale);
- f. diametro del calice;
- g. diametro della corolla;
- h. rigidità dello stelo;
- i. presenza /assenza di rami sterili;
- j. lunghezza media degli steli;
- k. numero medio di rami per stelo;
- l. lunghezza media del peduncolo;
- m. diametro medio del peduncolo alla base.

Anche in questo caso, alcuni dei parametri biometrici ed estetici (in particolare ai punti a, b, d, f, g, j, k, l, m) sono stati recepiti dai descrittori inseriti nei questionari tecnici UPOV, mentre gli altri sono stati ricavati dall'esperienza di floricoltori ed operatori del mercato florovivaistico, relativamente alle tipologie di *Limonium* in questione.

3.6. Caratterizzazione molecolare

La tecnica AFLP è stata inizialmente messa a punto ed applicata con finalità di riordino filogenetico della collezione di specie botaniche di *Limonium* conservata presso il CRA-VIV, in collaborazione con le attività di dottorato della Dr. Angela Teani del CRA-VIV (Teani, 2011). Tale ricerca ha condotto al perfezionamento dei protocolli di estrazione di DNA e di caratterizzazione molecolare di numerose specie di *Limonium* mediante marcatori AFLP con una serie coppie di *primer* selettivi. Le 6 coppie di *primer* (Tab. 8) che hanno generato il maggior numero di polimorfismi su specie botaniche di *Limonium* affini alle linee clonali oggetto della presente ricerca sono state testate su ciascuno dei 6 cloni ritenuti idonei per

eventuali richiesta di privativa da parte dell'Azienda Proponente (Fig. 9) e sulle stesse 6 cultivar con caratteristiche simili già utilizzate nelle prove agronomiche (Tab. 6).

Mix 1	MSE CAC 5' - GAT GAG TCC TGA GTA A CAC-3'
	ECO ACT 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C ACT-3'
Mix 2	MSE CTC 5' - GAT GAG TCC TGA GTA A CTC-3'
	ECO AGT 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C AGT-3'
Mix 3	MSE CTG 5' - GAT GAG TCC TGA GTA A CTG-3'
	ECO AGG 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C AGG-3'
Mix 4	MSE CTT 5' - GAT GAG TCC TGA GTA A CTT-3'
	ECO ACC 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C ACC-3'
Mix 5	MSE CTG 5' - GAT GAG TCC TGA GTA A CTG-3'
	ECO AAC 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C AAC-3'
Mix 6	MSE CAT 5' - GAT GAG TCC TGA GTA A CAT-3'
	ECO ACA 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C ACA-3'

Tabella 8 – Coppie di primer valutate nelle 6 master-mix allestiti per l'ottenimento degli amplificati AFLP.

I campioni di DNA sono stati estratti (secondo il protocollo descritto nel prossimo paragrafo) nell'agosto 2011 e, in replica, nel dicembre 2011, su piante diverse degli stessi 12 cloni (6 cloni selezionati più 6 cultivar di controllo).

Disegno sperimentale.

Nella fase di *screening* dei *primer* sono state effettuate 6 corse elettroforetiche, una per ciascuna coppia di *primer* da valutare (Tab. 8). Per ogni corsa sono stati caricati 12 campioni di amplificato (ottenuto dal DNA estratto nell'agosto 2011), più un mix di 2 *marker* prodotti da Fermentas (*Gene RulerTM 100bp DNA Ladder* e *Gene RulerTM Ultra Low Range DNA Ladder*) in grado di verificare il peso molecolare delle bande da 10 a 1000 bp (rispettivamente da 1000 a 100 e da 300 a 10, con sovrapposizione della bande corrispondenti a 300, 200 e 100 bp) diluiti secondo il protocollo fornito dalla ditta.

Una volta effettuato lo *scoring* delle bande, per ogni coppia di *primer* e di campioni i polimorfismi sono stati conteggiati e ordinati in tabella (suddivisi tra: n. di bande totali, n. di bande comuni alla coppia di genotipi a confronto, n. di bande presenti solo nel clone da analizzare, n. di bande presenti solo nella cultivar di riferimento).

Le 3 coppie di *primer* risultate più informative per il numero di polimorfismi individuato tra ciascun clone selezionato e la sua cultivar di riferimento, sono state applicate ad un nuovo set di analisi AFLP (dall'estrazione del DNA alle corse elettroforetiche verticali, in numero di 3, una per ciascuna coppia di *primer*, caricate con gli stessi criteri descritti per la fase di *screening*), effettuate sui campioni di DNA nuovamente estratti nel dicembre 2011, allo scopo di ottenere un *fingerprinting* chiaro e ripetibile per ciascuno di essi. I risultati ottenuti sono stati

raccolti in una matrice nella quale è stata indicata la presenza o assenza di bande, rispettivamente con le cifre 1 e 0, per la successiva analisi dei *cluster* (paragrafo 3.7).

Il protocollo applicato prevede le seguenti fasi:

3.6.1. Estrazione e quantificazione del DNA

Il DNA è stato estratto applicando il Protocollo di estrazione di DNA con il metodo *DNeasy[®] Plant Mini Kit*:

- a. Materiale vegetale: 100mg di tessuto fresco prelevato da foglioline giovani di *Limonium*.
- b. Omogeneizzazione (30") mediante Tissue Lyser (QiagenTM) in tubi da 2ml contenenti due sfere in lega di titanio.
- c. Aggiunta di 400µl di buffer "AP1", fornito dal kit, pre-riscaldato a 65°C.
- d. Aggiunta di 4µl di RNasi (100mg/ml, fornita dal kit) ed incubazione per 10' a 65°C, con capovolgimento dei tubi ogni 3' ca. per favorire l'azione dell'enzima.
- e. Aggiunta di 130µl di Buffer "AP2", fornito dal kit, ed incubazione per 5' in ghiaccio.
- f. Centrifugazione del lisato a freddo (4°C) per 30' a 14000rpm.
- g. Trasferimento del surnatante nelle apposite colonne (di colore viola) fornite dal kit. Centrifugazione per 2' a 14000rpm.
- h. Trasferimento dell'eluato in un nuovo tubo da 2ml.
- i. Dopo aver quantificato approssimativamente il volume del filtrato, aggiunta di 1,5 volumi corrispondenti di buffer "AP3/E", fornito dal kit, ed agitazione tramite pipetta.
- j. Trasferimento di 650µl della soluzione nelle apposite colonnine bianche fornite dal kit. Centrifugazione per 1' a 8000rpm. Questo passaggio può essere ripetuto per recuperare altro materiale.
- k. Trasferimento delle colonne in nuovi tubi da 2ml forniti dal kit. Aggiunta di 500µl di Buffer "AW", fornito dal kit, e centrifugazione per 1' a 8000rpm. Rimozione totale dell'eluato dalla colonna.
- l. Aggiunta di altri 500µl di Buffer "AW". Centrifugazione per 2' a 14000rpm. Centrifugazione "a vuoto" per 1'. Rimozione dell'eluato e trasferimento della colonna in un tubo nuovo da 1.5ml.
- m. Trasferire la colonnina in un tubo da 1,5 ml ed aggiunta di 100µl di Buffer "AE" pre-riscaldato a 65°C. Incubazione di 5-10' a temperatura ambiente e

centrifugazione per 1' a 8000 rpm affinché il DNA possa eluire all'interno del tubo (DNA di 1^a eluizione).

- n. Ripetizione di quest'ultimo passaggio al fine di raccogliere, in un tubo nuovo, la maggior quantità possibile di DNA presente sul filtro (DNA di 2^a eluizione).

Per una verifica della presenza e della qualità del DNA estratto e per una sua quantificazione di massima, viene allestita una corsa elettroforetica su gel di agarosio, secondo il seguente protocollo.

Preparazione del buffer TBE (Tris-borate-EDTA).

a) *Preparazione di una soluzione stock 0,5 M di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico):*

- 93,05 g EDTA
- 400 ml di acqua deionizzata
- pH regolato a 8,0 con NaOH 1M
- Portare a un volume di 500 ml

b) *Preparazione di una soluzione stock di TBE 5X:*

- 54 g Tris base e 27,5 g di acido borico in 900 ml di acqua deionizzata
- Aggiunta di 20 ml di EDTA 0,5 M
- Portare a un volume di 1000 ml

La corsa elettroforetica è stata eseguita su gel allo 0,5% , seguendo il seguente protocollo:

- 0,5 g di agarosio.
- 100 ml di TBE 0,5X.
- Agitazione e riscaldamento della soluzione per facilitare lo scioglimento dell'agarosio.
- Aggiunta di 2 µl di Bromuro di Etidio (EtBr) sotto cappa chimica.
- Preparazione del gel nell'apposito stampo.

Una volta solidificato, il gel di agarosio viene immerso in una cella elettroforetica orizzontale contenente TBE 1X, dove vengono caricati i campioni così preparati:

- 2 µl di acqua deionizzata nucleasi-free (H₂O BM)
- 2 µl di GelPilot DNALoading Dye 5X QIAGEN.
- 6 µl di campione.

Oltre ai campioni, in un pozzetto viene caricato il marker Gel Pilot Lambda HindIII QIAGEN, ed il "bianco", costituito dalla *master mix* completa con 5 µl di H₂O BM in sostituzione del template DNA. Successivamente i campioni vengono fatti correre a un voltaggio pari a 100 volt per 1 ora.

L'acquisizione dell'immagine viene eseguita attraverso transilluminatore UV "High Performance Ultraviolet Transilluminator" equipaggiato con fotocamera digitale "Canon PC 1089" e software di elaborazione dati "Zoom Browser EX" Canon.

Dopo la verifica su gel della presenza e della buona qualità del materiale genetico estratto, una quantificazione più accurata è stata effettuata tramite fluorometro (Qubit® 2.0 *Fluorometer*) secondo i protocolli forniti dalla ditta fornitrice. In base alla lettura dello strumento, sono state effettuate delle diluizioni differenziate con H₂O *nuclease-free* per biologia molecolare, al fine di ottenere un'opportuna concentrazione finale di DNA nei campioni da sottoporre a restrizione / ligazione.

3.6.2. Restrizione con gli enzimi *EcoRI* e *MseI* e ligazione

A restrizione sono stati sottoposti circa 100 ng di DNA. Mix di reazione (volume totale 20 ul):

1. NE Buffer 4 (NewEngland Biolabs) 1X 2 µl
2. BSA (NewEngland Biolabs)100X 0.4 µl
3. *EcoRI* (NewEngland Biolabs) 5U 0.25 µl
4. *MseI* (NewEngland Biolabs) 5U 0.5 µl
5. H₂O BM q.b a volume totale

Incubazione di 3h a 37°C in un fornello da ibridazione.

Durante l'incubazione si preparano gli adattori *Eco/Mse* per la successiva fase di ligazione. I *primer* liofilizzati vengono sottoposti a *spin* in centrifuga e portati alla concentrazione stock (100 µM) aggiungendo TE buffer 0.1X (Tab. 9). E' necessario miscelare il contenuto del tubo con pipetta e Vortex per sciogliere il *primer*.

	nM	TE 0.1X µl
MseA1	41.7	417
MseA2	56.7	567
EcoA1	41.7	417
EcoA2	34.5	345

Tabella 9 – Preparazione in stock (100 µM) degli adattatori *Eco/MSE*.

L'*annealing* viene effettuato incubando per 3' a 95°C e successivamente per 2 h a temperatura ambiente i 2 tubi con MseA e EcoA (Volume totale per ogni tubo: 200ul, Tab. 10).

	μM	$\mu\text{l STOCK}$	TE 0.1X μl
MseA1	25	50	100
MseA2	25	50	
EcoA1	2.5	5	190
EcoA2	2.5	5	

Tabella 10 – Mix per l'*annealing* degli adattatori Eco/MSE.

Successivamente viene preparata la Mix di ligazione (per un volume totale di 20 μl):

- H₂O BM 6 μl
- T4 Buffer 1X 4 μl
- EcoR1 A 10 pmoli 4 μl
- MseI A 100 pmoli 4 μl
- T4 DNA Ligasi 4U/ μl 2 μl

La miscela di ligazione viene aggiunta ai campioni ristretti e lasciata incubare overnight a una temperatura di circa 16°C.

Una volta completata questa fase è opportuno controllare la qualità dei ristretti legati mediante l'allestimento di una corsa su gel di agarosio, come descritto nel paragrafo 3.5.1.

3.6.3. Preamplificazione

Dopo aver effettuato una diluizione 1/5 dei campioni ristretti / legati con H₂O BM, si procede alla preparazione della mix di preamplificazione con un volume totale di 25 μl , utilizzando i *primer* liofilizzati previa diluizione con H₂O BM alla concentrazione stock di 100 μM :

- H₂O BM (q.b. a 25 μl): 5,7 μl
- EcoPriA (50 ng/ μl): 0,9 μl
- MsePriC (50 ng/ μl): 0,9 μl
- Qiagen “*Top Taq Master Mix*” (2X): 12,5 μl

Una volta distribuita la *master mix* nello strip di tubini in polipropilene da PCR, si aggiungono i 5 μl di DNA templatato (corrispondente a ca. 50 ng) di ciascun campione da analizzare (per un volume totale di 25 μl per tubo), e si procede con la PCR.

Programma di preamplificazione:

- 94°C x 1'

25 cicli:

- 94°C x 30"
- 56°C x 30"
- 72°C x 1'

Al termine della PCR, 6 µl di ciascun campione vengono sottoposti a elettroforesi di controllo su gel di agarosio 5%, secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.5.1.

3.6.4. Amplificazione

Generalmente lo *screening* delle coppie di *primer* più informative viene effettuato accoppiando un *primer* Mse-C fisso con un *primer* Eco-A variabile. Una volta esaurito il numero di *primer* Eco-A possibili, si procederà con un nuovo *primer* Mse-C. In questo caso, tuttavia, essendo state valutate in precedenza numerose coppie di *primer* su *Limonium* (Teani, 2011), lo *screening* è stato effettuato utilizzando le coppie di *primer* descritte in Tab. 8, che già avevano fornito buoni risultati su specie botaniche di *Limonium* affini alle linee clonali da analizzare.

Il DNA preamplificato viene diluito 1/20 con H₂O BM. Successivamente si prepara la mix di amplificazione, per un totale di 20 µl (cui andranno aggiunti i 5 µl del campione di DNA preamplificato e diluito) :

- H₂O BM (q.b. a 25 µl): 5,7 µl
- EcoPriA (50 ng/µl): 0,9 µl
- MsePriC (50 ng/µl): 0,9 µl
- Qiagen "Top Taq Master Mix" (2X): 12,5 µl

Dopo aver distribuito 20 µl di *master mix* per ogni tubo da PCR, si aggiunge il template DNA dei vari campioni (5 µl).

Il programma di amplificazione è il seguente:

- 90°C x 1'

13 cicli:

- 90°C x 30"
- 65°C>56,6°C (-0,7 ogni ciclo) x 30"
- 72°C x 1'

23 cicli:

- 90°C x 30"
- 56°C x 30"
- 72°C x 1'

Come per le fasi precedenti, al termine dell'amplificazione, 6ul di ogni campione vengono sottoposti a elettroforesi di controllo su gel di agarosio.

Una volta verificata l'avvenuta amplificazione, si diluisce il campione 1:1 v/v con "Blu AFLP" (Fromamide 98%, EDTA 0,5M pH8 10mM, Blu di bromofenolo 1mg/ml, Cilene cianolo 1mg/ml) e si conserva in *freezer* a -20°C.

La corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide viene effettuata utilizzando un apparato elettroforetico da sequenziamento su vetro verticale (Seqi-Gen GT System, BioRad). I vetri impiegati misurano cm 38 x 50.

3.6.5. Allestimento della corsa elettroforetica su vetro verticale

Soltanto al primo utilizzo i vetri su cui sarà applicato il gel devono essere trattati nel seguente modo:

- 1) lavaggio con acqua e detergente generico e asciugatura all'aria;
- 2) passaggio con detergente specifico per vetri distribuito con salviettine di carta tipo asciugamani su entrambe le superfici;
- 3) risciacquo in acqua ultrapura;
- 4) passaggio con salviettine imbevute di etanolo 70% su entrambe le superfici;
- 5) asciugatura sotto cappa aspirante.

A ogni corsa successiva, i trattamenti per il vetro libero, a cui deve restare adeso il gel di poliacrilammide, e per il vetro composto (apparato "IPC" del Seqi-Gen GT System), che deve risultare "repellente" al gel, si diversificano:

a) trattamento del "vetro libero".

Preparare la *binding solution* aggiungendo 4,5 µl di *Bind silane* (Promega) a 1,5 ml di soluzione composta da 1,33 ml di etanolo 95% +700 µl di acido acetico glaciale + H₂O BM q.b.

1) Prelevare 750 µl di *binding solution* con una micro pipetta e distribuirla in maniera quanto più possibile uniforme sul vetro con salvietta di carta assorbente. Far asciugare all'aria per 5'.

2) Ripetere il passaggio con i restanti 750 µl di *binding solution*, e far asciugare per altri 5'.

3) Rimuovere gli eccessi di prodotto passando sulla superficie del vetro una salvietta imbevuta di EtOH al 70%.

b) trattamento del vetro composto ("IPC").

Al fine di assicurare un perfetto distacco del gel, è opportuno sostituire i guanti per evitare qualsiasi contaminazione dell'IPC con la soluzione di adesione e viceversa.

4) Prelevare 750 μ l di “*Repeal Silane*” (soluzione già pronta per l’uso, prodotta da GE Healthcare) con una micro pipetta e distribuirla in maniera quanto più possibile uniforme sulla superficie con salvietta di carta assorbente. Far asciugare all’aria per 5’.

5) Ripetere il passaggio con altri 750 μ l di *Repeal Silane* e far asciugare per altri 5’.

6) Rimuovere gli eccessi di prodotto passando sulla superficie del vetro una salviettina asciutta.

In caso di contaminazione dei vetri è necessario effettuare un lavaggio tenendoli in immersione in una soluzione di NaOH al 10% per circa 30-60’.

3.6.6. Assemblaggio dei vetri e preparazione del gel di poliacrilammide

Appoggiare gli appositi spaziatori ai lati dell’IPC e porre sopra il vetro libero facendo combaciare i bordi. Assemblare i due vetri con i morsetti neri ed applicare su fondo il vassoio sigillante. Inserire il pettine dal lato non dentellato facendolo scivolare nell’intercapedine fra i due vetri. Porre i vetri in posizione orizzontale, con l’IPC rivolto verso l’alto, rialzando l’estremità alta di 3 cm circa.

Preparazione del gel (100 ml di soluzione).

In un becker da 100 ml posto su agitatore magnetico riscaldante aggiungere:

- Acrilammide, soluzione a 40%, 12 ml
- Bisacrilammide, soluzione al 2%, 12,5 ml
- TEMED 100 μ l
- APS, soluzione al 10%, 250 μ l
- Portare a volume con TBE1X + Urea 7M

Versare la soluzione nell’apposita siringa ed inserire il tubicino di gomma nel foro posto al di sotto del vassoio sigillante.

Immettere la soluzione premendo sul pistone in maniera decisa e costante prestando attenzione affinché l’iniezione sia costante e non si formino bolle. Continuare a immettere la soluzione fino a che non viene raggiunto il pettine. Una volta completata l’immissione appoggiare la siringa sopra l’IPC, senza togliere il tubicino dal foro fintanto che il gel non si sarà completamente solidificato. Generalmente l’apparato viene lasciato immobile *overnight*.

3.6.7. Corsa elettroforetica

Liberare i vetri dal vassoio sigillante, rimuovere il pettine ed i distanziatori ed assemblare l’apparato elettroforetico. Versare circa 300 ml di soluzione TBE 1X nella vasca inferiore e circa 1,5 L di soluzione nel serbatoio dell’IPC (riempire fino a 1 cm circa dal bordo superiore

del serbatoio). Pulire il fronte di corsa dall'urea e dai residui di acrilamide usando una siringa ed una pipetta da 1ml.

Precorrere a 75W per 2h circa, al fine di preriscaldare il gel.

Una volta raggiunta la temperatura di circa 50°C, interrompere la precorsa ed aggiungere 200 µl di "Blu AFLP" sul fronte di corsa per renderlo visibile. Inserire il pettine dalla parte dentellata, facendolo penetrare di circa mezzo millimetro sul fronte di corsa per creare i pozzetti.

Caricare i campioni (4,5µl) precedentemente denaturati a 95°C per 5' e conservati in ghiaccio.

Far correre inizialmente a 25 Watt, per circa 5', al fine di facilitare la penetrazione nel gel, e successivamente a 75 watt per circa 2,5 h fino a che la linea più chiara del colorante azzurro non arriverà a circa 23 cm dal bordo alto del vetro.

Svuotare i serbatoi, smontare l'apparato elettroforetico e separare i vetri con cautela, avendo cura che il gel rimanga completamente adeso al vetro libero.

3.6.8. Colorazione "Silver Staining"

Preparare le soluzioni fresche almeno un'ora prima di iniziare e conservare in frigo a 4°C per essere certi di utilizzarle alla temperatura giusta. Per le soluzioni servono 3 bottiglie da 2L.

- "FIX/STOP solution": 200 ml acido acetico glaciale+ 1800 ml UPW (acqua ultrapura);
- "SILVER STAINING solution": 2 g Silver nitrate⁷ + 3 ml Formaldeide 37%⁷ + 2000 ml UPW;
- "DEVELOPING solution": 60 g ACS reagent⁷ + 2000 ml UPW. Assicurarsi che si raffreddi almeno fino a 10°C e completare poco prima dell'uso con 3 ml di formaldeide 37% + 400 µl Tiosolfato di sodio⁷.

Per i bagni di sviluppo si utilizzano 3 vasche, numerate da 1 a 3, di larghezza sufficiente ad alloggiare il vetro con il gel. I bagni, in agitazione, vengono effettuati sotto cappa chimica.

- Versare 2 L di UPW nella vasca n. 1 e nella n. 3.
- Porre il vetro nella vasca n. 2, sotto cappa chimica, e versare 2 L di soluzione *fix/stop*. Mantenere in agitazione per 30', recuperare la soluzione e conservarla in frigo

⁷ Reagente fornito dal kit Silver Staining (Promega)

a 4°C. Risciacquare la vasca n.2 e riempirla con *Silver staining* (in alternativa si può lasciare *overnight* la vasca con la *fix/stop* ed il vetro sotto la cappa chimica senza agitazione).

- Trasferire il vetro nella vasca n. 1 e mantenerlo in agitazione per 5' (primo risciacquo). Far sgocciolare accuratamente e ripetere l'operazione trasferendo il vetro nella vasca n. 3 (secondo risciacquo). Svuotare entrambe le vasche e lavarle con UPW.

- Trasferire il vetro nella vasca n. 2 con 2L di *staining solution*, sotto cappa chimica. Far colorare in agitazione per 30'. Quando mancano 15' controllare la temperatura della *developing solution* e completarla aggiungendo formaldeide e tiosolfato, come da protocollo. Rimuovere il vetro, svuotare la soluzione in un contenitore di recupero, risciacquare la vasca e riempirla nuovamente con UPW.

- Sotto cappa chimica versare la *developing solution* nelle vasche n. 1 e n. 3 in parti uguali. Risciacquare molto velocemente (max. 4'') il vetro nella vasca n. 2, far sgocciolare e passarlo nella vasca n. 1, agitando manualmente la vasca fino alla comparsa delle prime bande. Trasferire rapidamente il vetro nella vasca n. 3 e quando il gel inizia ad imbrunire, aggiungere la soluzione *fix/stop* recuperata e conservata a 4°C. Mantenere il vetro in bagno, sempre in agitazione manuale, finché non si esaurisce la reazione di effervescenza. Risciacquare la vasca n.1 e la vasca n.3.

- Trasferire il vetro nella vasca n. 1 riempita con UPW e risciacquare per almeno 2'.

- Lasciar asciugare il gel in posizione quasi verticale.

Una volta asciutto, si può procedere all'acquisizione del vetro tramite scansione elettronica in formato A3 e conversione in formato JPEG con risoluzione 600 dpi. Su tali immagini è stato effettuato lo *scoring* delle bande, valutando le combinazioni di *primer* in grado di individuare il maggior numero di polimorfismi.

3.7. Elaborazione statistica dei dati

La significatività dei risultati ottenuti per i parametri relativi ai protocolli di moltiplicazione e di radicazione *in vitro* (tasso di moltiplicazione, vitrescenza, necrosi, percentuale di radicazione, incremento giornaliero di biomassa in relazione ai substrati utilizzati) e per i parametri utilizzati nelle prove agronomiche (descritti nel paragrafo 3.4) è stata valutata mediante il confronto delle medie e delle relative deviazioni standard. Per i dati espressi in percentuale, la deviazione standard è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti (*arcsen*).

La significatività dei risultati ottenuti per i parametri relativi alla valutazione dei germogli in fase di ambientamento (area fogliare, peso fresco e peso secco di apparati radicali e fogliari, rilievi colorimetrici, quantificazione della clorofilla “a” e “b”, in relazione sia ai substrati di radicazione che alle miscele di terricci utilizzate) è stata valutata mediante l’analisi della varianza a 2 vie (ANOVA – Test di Student-Newman-Keuls con significatività <0.05) mediante software CoStat 6.204 (CoHort Software).

I polimorfismi ottenuti dalle analisi AFLP con le combinazioni di *primer* selezionate (*fingerprinting*) sono stati conteggiati tramite *scoring* delle bande e trasformati in matrici binarie. Le matrici delle repliche effettuate sui singoli cloni sono state confrontate con quelle dei rispettivi testimoni (cultivar di riferimento) mediante la trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” del software *open source* “R” (versione 2.11.1). PVCLUST è un applicazione in grado di valutare il grado di incertezza in analisi *cluster* gerarchica. Per ogni *cluster*, quantità chiamate “*p-value*” sono calcolate tramite ricampionamento *bootstrap* multiscala. Il *p-value* di un gruppo è un valore compreso tra 0 e 1, che indica la misura in cui il *cluster* è supportato dai dati. PVCLUST fornisce due tipi di valori di *p-value*: AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*). AU, che viene calcolato dal ricampionamento *bootstrap* multiscala, rappresenta un’approssimazione migliore del *p-value* calcolato dal ricampionamento *bootstrap* normale (BP).

Capitolo 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Protocolli di micropropagazione

4.1.1. Messa in coltura e prove preliminari di micropropagazione

I 2 diversi trattamenti di sterilizzazione (A e B, in Tab. 1) a base rispettivamente di cloruro di mercurio (HgCl_2) e/o di ipoclorito di sodio ($\text{NaClO} \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$), si sono rivelati entrambi perfettamente efficienti, con assenza totale di contaminazione nei tubi di coltura. Il trattamento A ($\text{NaClO} \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ 1,25%) è pertanto da preferirsi in quanto più economico e molto meno tossico del trattamento con cloruro di mercurio.

Per quanto riguarda la fase di stabilizzazione *in vitro* all'interno di provette, con tutti i substrati, a 30-60 gg. dalla messa in coltura (a seconda dei genotipi), è stata riscontrata un'abbondante proliferazione (con tasso di moltiplicazione >5). Per alcuni genotipi appartenenti ai gruppi 2 e 3 (descritti nel paragrafo 3.3.4) si sono verificati fenomeni transitori di vitrescenza con i substrati 3 e 4, a più alta concentrazione di BA (Tab. 2). L'aggiunta di PPMTM ai substrati 2 e 4 non ha prodotto effetti significativi, in quanto non è stata osservata contaminazione fungina o batterica neppure nei tubi non trattati. Il substrato 1, a più bassa concentrazione di BA e senza PPMTM, risulta pertanto essere il più indicato per la messa in coltura di *Limonium*, almeno in presenza di espunti prelevati da piante in ottimo stato sanitario, come in questo caso. Più che la tecnica di sterilizzazione o la presenza o meno di PPMTM, nel caso di piante sane, sembra essere particolarmente importante la scelta del tipo di espunto (apici fiorali immaturi) e l'epoca di raccolta (inizio primavera, quando gli apici fiorali posseggono bassi livelli di contaminazione ambientale e una forte spinta "endogena" alla proliferazione).

Le valutazioni qualitative sul comportamento dei germogli in coltura nelle prove preliminari di moltiplicazione e radicazione, hanno consentito di individuare i 3 substrati più efficaci da testare nelle prove di moltiplicazione e radicazione *in vitro*, su ciascuno dei 6 genotipi selezionati. I risultati sono indicati in Tab. 11. Le composizioni dei vari substrati sono state descritte nelle tabelle 4 e 5.

LINEA CLONALE	SUBSTRATI A BASE MS	
	MOLTIPLICAZIONE	RADICAZIONE
LIG15	M2, M3, M4	R2,R3,R4
LIG19	M2, M3, M4	R2,R3,R4
LIS30	M2, M3, M4	R2,R3,R4
LSB40	M1, M2, M3	R3, R4, R7
LSB41	M1, M2, M3	R3, R4, R7
LSB43	M1, M2, M3	R3, R4, R6

Tabella 11 - Substrati a base MS selezionati per le prove di moltiplicazione e radicazione *in vitro* (effetti ormonali). Le composizioni sono state descritte nelle tabelle 4 e 5.

4.1.2. Prove di moltiplicazione *in vitro*: valutazione degli effetti ormonali

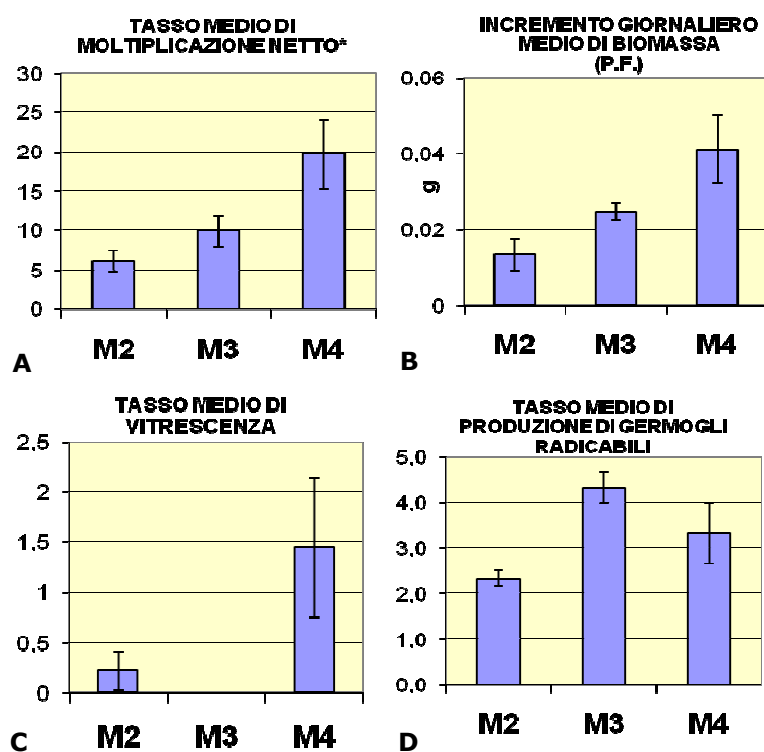
Clone LIG15.

Per quanto riguarda il tasso di moltiplicazione utile, al netto dei germogli vitrescenti (numero medio di germogli prodotti / numero iniziale di germogli, Fig. 16 A), il substrato M4 (Tab. 4) ha fornito risultati significativamente migliori (19.67 ± 4.38) rispetto ai substrati M2 ed M3. Superiore è risultato anche l'incremento giornaliero di peso fresco per germoglio (Fig. 16 B). Tuttavia, da una valutazione complessiva di tipo *qualitativo* dei germogli è risultata una conformazione migliore, senza traccia di vitrescenza, dei germogli cresciuti sul terreno M3, mentre, nei germogli cresciuti sul terreno M4, le foglioline si presentavano sottili e leggermente vitrescenti (Fig. 17). Ciò è confermato dal grafico C in Fig.16): il terreno M4 ha prodotto un gran numero di germogli totalmente vitrescenti, al contrario del terreno M3, su cui il suddetto tasso è pari a zero. Anche il grafico sulla produzione di germogli radicabili (Fig. 16 D) mostra una performance migliore del terreno M3 rispetto a M4 (4.33 ± 0.03 e 3.33 ± 0.67).

Da un'analisi complessiva dei dati, pertanto, tra i terreni a formulazione MS, M3 è stato considerato il più indicato per una produzione *in vitro* su larga scala, in virtù di una migliore qualità complessiva dei germogli, e della totale assenza di fenomeni di iperidricità (vitrescenza), importante soprattutto in caso di numerose subcolture.

Clone LIG19.

Nonostante i valori significativamente più alti, relativamente al tasso di moltiplicazione netto e all'incremento giornaliero di biomassa, ottenuti con il substrato M4 rispetto a M3 (Figura 18 A, C), la valutazione complessiva della qualità dei germogli è a favore del substrato M3: mentre i germogli moltiplicati su quest'ultimo terreno risultano vigorosi e ben sviluppati, infatti, il terreno M4 ha prodotto germogli con foglie filiformi e leggermente vitrescenti (pur senza livelli eclatanti di iperidricità), con presenza di un'abbondante massa callosa (Fig. 19).



* Dopo 61 gg di subcoltura, non conteggiando i germogli vitrescenti

Figura 16 – Clone LIG15: valutazione degli effetti ormonali di 3 differenti substrati di moltiplicazione a base MS.

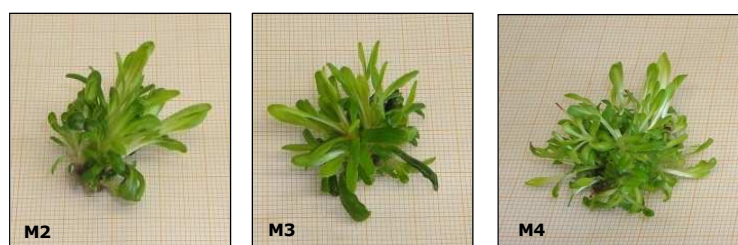
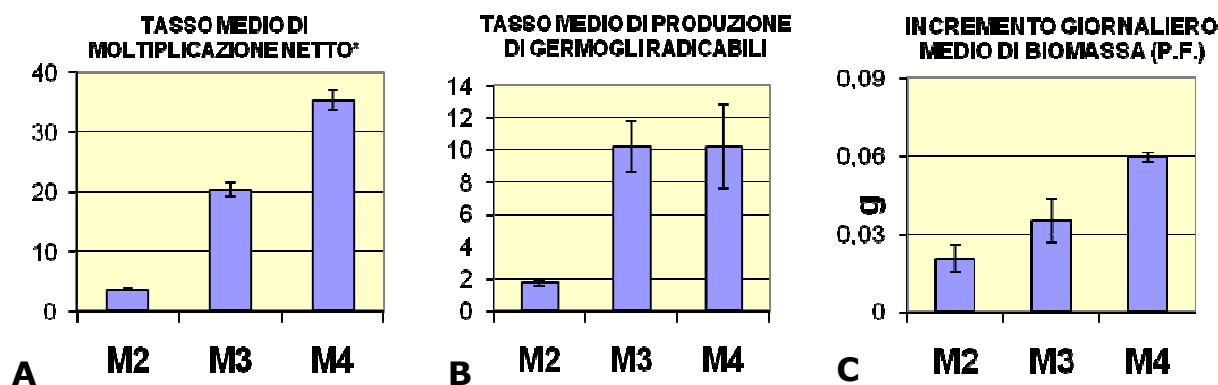


Figura 17 – Clone LIG15: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.

Inoltre il tasso di produzione di germogli robusti, pronti per il passaggio alla fase di radicazione (Fig. 18, B) non presenta differenze significative tra i terreni M3 ed M4, attestandosi in entrambi i casi su livelli molto alti (>10). Sebbene, in caso di necessità sia possibile “spingere” la coltura di questo clone moltiplicandolo su M4, in grado di produrre altissimi tassi di proliferazione (>30 , in 60 gg.), per un normale ciclo di produzione, specialmente in caso di numerose subcolture, nel complesso è da preferire il substrato M3, in grado comunque di garantire tassi di moltiplicazione elevati ($20,28 \pm 1,23$) a fronte di un’ottima qualità del germoglio (Fig. 19).



* Dopo 60 gg di subcoltura, non conteggiando i germogli vitrescenti

Figura 18 – Clone LIG19: valutazione degli effetti ormonali di 3 differenti substrati di moltiplicazione a base MS. I dati relativi alla produzione media di germogli totalmente vitrescenti non sono stati riportati in quanto pari a 0 su tutti i substrati.

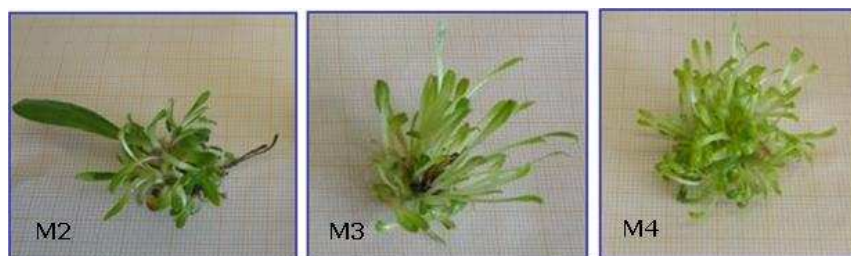
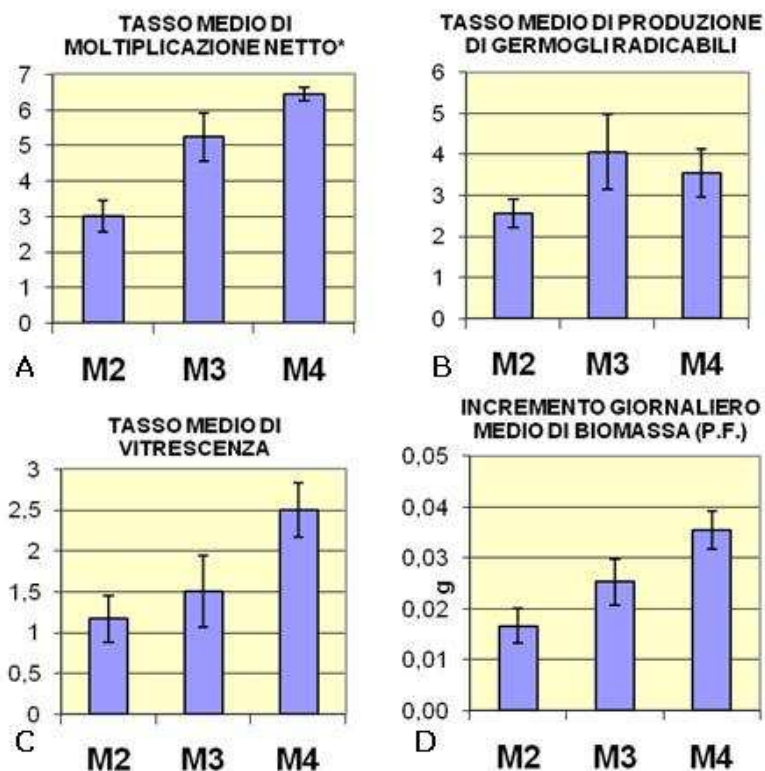


Figura 19 – Clone LIG19: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.

Clone LIS30.

Come per i due cloni precedenti, anche su LIS30 i terreni di moltiplicazione addizionati di BA (M3 ed M4) hanno prodotto risultati complessivamente migliori del terreno M2, il cui fitoregolatore è la kinetina (Tab. 4). Pur avendo riscontrato un più elevato tasso di germogli totalmente vitrescenti con il terreno M4 (Fig. 20, C) rispetto a M3, con quest'ultimo terreno il tasso di moltiplicazione netto (Fig. 20, A) e l'incremento giornaliero di biomassa (Fig. 20 D) risultano significativamente inferiori, a fronte di un tasso medio di germogli radicabili simile nei due terreni (Fig. 20 B). A differenza dei due cloni precedenti, tuttavia, da un punto di vista qualitativo i germogli subcolturati su M3 e su M4 non differivano significativamente quanto a fenomeni di iperidricità (assenti in entrambi i trattamenti) e aspetto delle foglioline (Fig. 21). Per il clone LIS30, pertanto, anche a fronte di tassi di moltiplicazione complessivamente più bassi rispetto a LIG15 e LIG19, si ritiene che M4, vale a dire il substrato a più elevata concentrazione di citochinina (BA 0,5 mg/l) rappresenti il substrato di moltiplicazione migliore per la propagazione su larga scala.



* Dopo 60 gg di subcoltura, non conteggiando i germogli vitrescenti

Figura 20 – Clone LIS30: valutazione degli effetti ormonali di 3 differenti substrati di moltiplicazione a base MS.

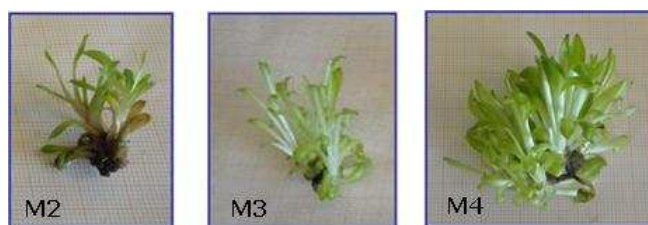


Figura 21 – Clone LIS30: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.

Clone LSB40

Come per gli altri cloni di statiche, appartenenti alle classi di attitudine alla micropropagazione 2 e 3 descritte nel paragrafo 3.3.4, la maggiore rapidità di “invecchiamento” delle colture, rispetto ai genotipi della classe 1, riduce notevolmente sia la durata massima della subcoltura, sia il tasso di moltiplicazione risultante. Anche nel caso di LSB40, tuttavia, la BA si è dimostrata più efficiente della kinetina nel promuovere la proliferazione dei germogli, alla concentrazione di 0,2 mg/l. Il tasso di moltiplicazione più elevato al netto dei germogli vitrescenti è stato infatti ottenuto sul substrato M2 ($3,50 \pm 0,44$, Fig. 23 A). Lo stesso substrato ha fornito valori significativamente più alti anche per quanto riguarda il tasso di produzione di germogli radicabili ($3,28 \pm 0,09$, Fig. 23 B), mentre per quanto

riguarda l'incremento giornaliero di biomassa (Fig 23 D) non sono state osservate differenze significative con il substrato M2 (addizionato di kinetina 1,0 mg/l). La valutazione qualitativa dei germogli non ha rilevato fenomeni di iperidricità o altre malformazioni nei germogli moltiplicati su M3, che quindi apparivano ben sviluppati e di dimensioni relativamente più grandi, rispetto ai terreni M1 ed M2 (Fig.22).

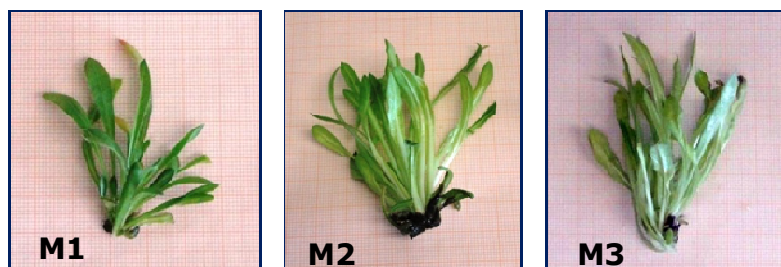
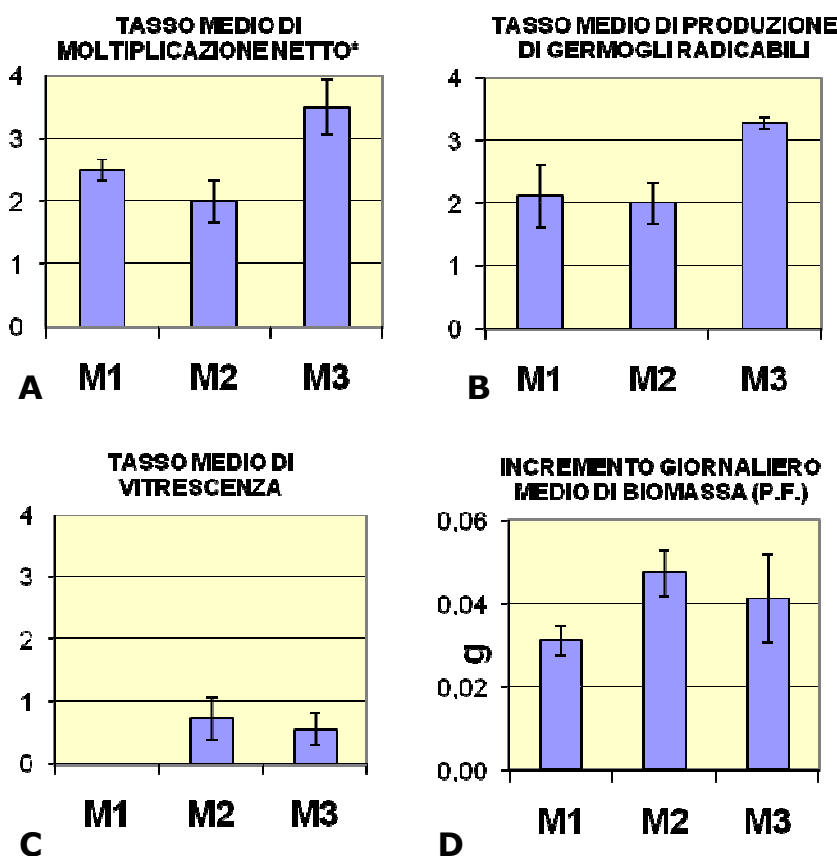


Figura 22 – Clone LSB40: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.



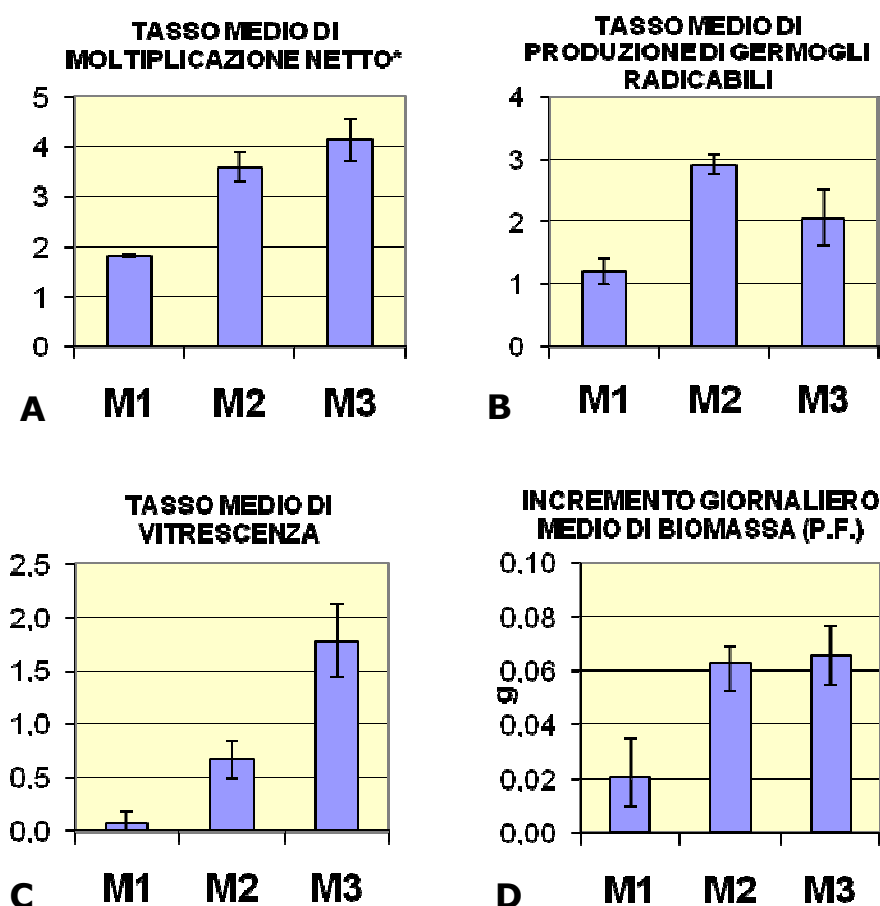
* Dopo 42 gg di subcoltura, non conteggiando i germogli vitrescenti

Figura 23 – Clone LSB40: valutazione degli effetti ormonali di 3 differenti substrati di moltiplicazione a base MS.

Clone LSB41

Nel caso del clone LSB421, pur senza differenze significative tra i tassi di moltiplicazione al netto dei germogli vitrescenti ottenuti con i substrati M2 ed M3 (rispettivamente $3,58 \pm 0,3$ e

4,13 $\pm$ 0,4, Fig 24 A), il substrato addizionato di 1 mg/l di kinetina (M2) ha permesso di ottenere un tasso di produzione di germogli radicabili più alto (2,92 $\pm$ 0,14 contro 2,06 $\pm$ 0,45, Fig. 24 B), a fronte di un minor tasso di vitescenza rispetto a M3 (Fig. 24 C) e a un incremento giornaliero di biomassa confrontabile (Fig. 24 D). Dal punto di vista qualitativo, i germogli moltiplicati sul terreno M2 risultano perfettamente sviluppati, senza fenomeni di iperidricità o assottigliamenti fogliari, a differenza di quelli moltiplicati su M3, leggermente vitrescenti (Fig. 25).



* Dopo 35 gg di subcoltura, non conteggiando i germogli vitrescenti

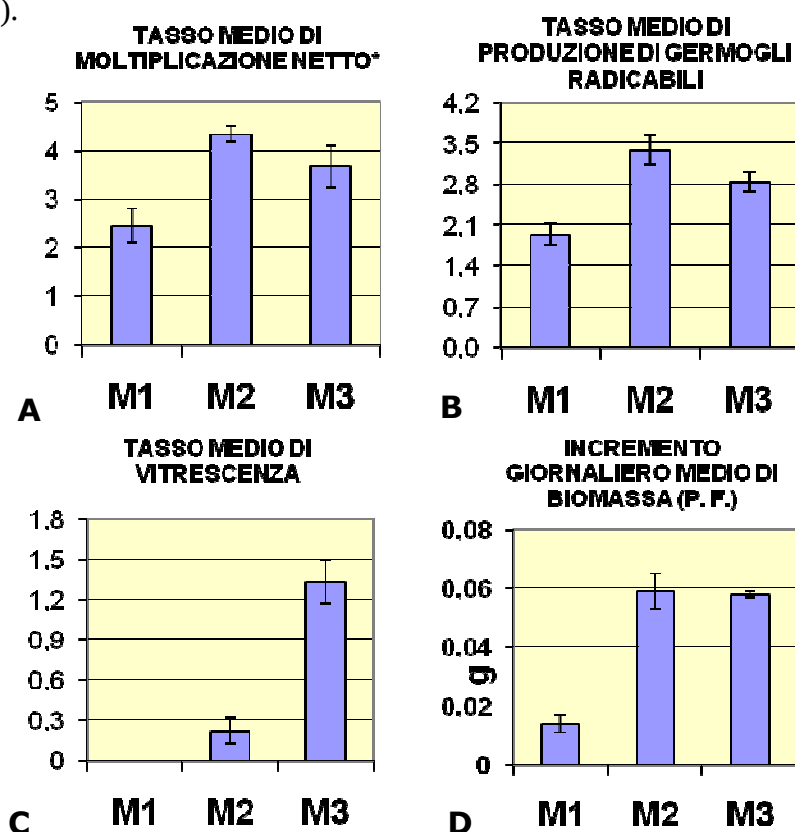
Figura 24 – Clone LSB41: valutazione degli effetti ormonali di 3 differenti substrati di moltiplicazione a base MS.



Figura 25 – Clone LSB41: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.

Clone LSB43

Anche per il clone LSB43 il substrato M2 (con 1,0 mg/l di kinetina, come fitoregolatore) ha fornito i risultati migliori sia come tasso di moltiplicazione al netto dei germogli vitrescenti ($4,33 \pm 0,17$ contro $3,67 \pm 0,44$ ottenuto su M3, Fig.26 A), sia come tasso di produzione di germogli radicabili ($3,39 \pm 0,25$ contro $2,83 \pm 0,17$ ottenuto su M3, Fig. 26 B), a parità di incremento giornaliero di biomassa (Fig. 26 D). Anche il tasso di vitrescenza è risultato nettamente più basso, rispetto al terreno M2 (Fig. 26 C). Come per il clone precedente, l'analisi qualitativa ha confermato la migliore conformazione e vigorosità dei germogli moltiplicati su M2, rispetto a quelli moltiplicati sul mezzo M3, con leggeri sintomi di iperidricità fogliare (Fig. 27).



* Dopo 28 gg di subcoltura, non conteggiando i germogli vitrescenti

Figura 26 – Clone LSB43: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.



Figura 27 – Clone LSB43: valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli moltiplicati su 3 diversi substrati a base MS.

4.1.3. Prove di moltiplicazione in vitro: valutazione degli effetti vitaminici

Le formulazioni ormonali dei substrati a base MS che hanno fornito i migliori risultati nelle prove di moltiplicazione *in vitro* M2 (kinetina 1 mg/l), M3 (BA 0.2 mg/l) ed M4 (BA 0.5 mg/l) (Tab. 4), sono state riprodotte in terreni a formulazione LS (siglati rispettivamente L2, L3, L4), priva di alcune vitamine (glicina, acido nicotinico, piridossina) e, da alcuni autori (Harazy *et al.*, 1985), suggerita per la micropropagazione di statice (*L. sinuatum*), come già riferito nell'introduzione. La durata della subcoltura, in questa seconda serie di esperimenti, è stata ridotta a circa 30 giorni e, conseguentemente, in alcuni casi, i tassi medi di moltiplicazione e di produzione di germogli radicabili sono risultati più bassi rispetto alle prove precedenti sulla valutazione degli effetti ormonali.

Complessivamente, i dati ricavati delle prove di moltiplicazione sui terreni a base LS (alla seconda subcoltura), posti a confronto con terreni MS a identica composizione ormonale, non mostrano differenze significative né per quanto riguarda l'aspetto generale dei germogli (Fig. 28, riferita, a titolo di esempio, al clone LSB40), né per tasso di produzione di germogli vitrescenti (Tab 12). I dati relativi al tasso di moltiplicazione netto non hanno evidenziato differenze significative o sono risultati migliori nei substrati a base LS (cloni LIG19, LSB41, LSB43, in Tab. 12). Anche per quanto riguarda il tasso di produzione di germogli radicabili, i terreni a base LS hanno fornito risultati senza differenze significative, rispetto ai terreni MS, o addirittura migliori nei cloni LSB41, LSB43, in Tab. 12). Analoghe considerazioni valgono per l'incremento giornaliero di biomassa, che è risultato significativamente superiore con i terreni a base LS nei cloni LIS30 e LSB41 (Tab. 12).

Possiamo dunque concludere che la ridotta concentrazione di tiamina HCl e l'assenza delle vitamine glicina, acido nicotinico, piridossina non hanno influito negativamente sull'efficienza di nessuno dei substrati di moltiplicazione testati, mentre, in alcuni casi, ha addirittura prodotto effetti migliorativi sulla qualità e sui tassi di moltiplicazione dei germogli. I substrati più idonei per la moltiplicazione *in vitro* su larga scala dei 6 cloni selezionati sono quindi quelli a formulazione LS, evidenziati in grassetto in Tab.12

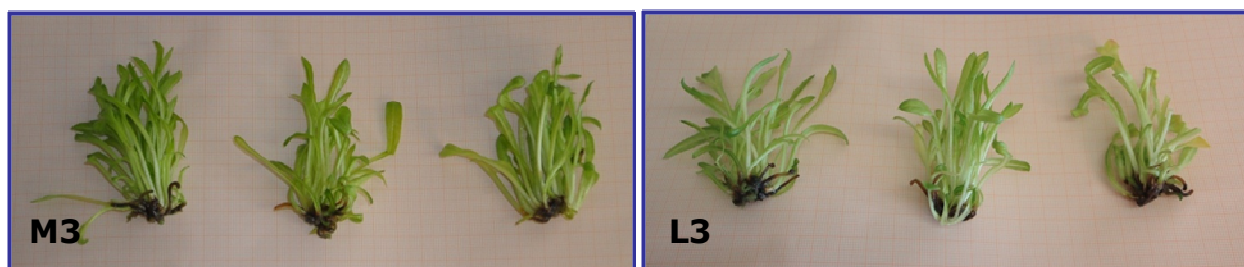


Figura 28 - Clone LSB40. Valutazione degli effetti vitaminici: aspetto dei germogli moltiplicati su M3 (a base MS) e L3 (a base LS).

CLONE	SUBSTR.	T.M. NETTO	G. VITRESCENTI	G. RADICABILI	INCR.G.BIOM. (mg)
LIG15	M3	4,72 ± 0,84	-	1,89 ± 0,35	21,1 ± 6,96
	L3	5,61 ± 0,92	-	2,11 ± 0,25	20,79 ± 2,13
LIG19	M3	5,5 ± 0,58	-	2,28 ± 0,35	28,21 ± 3,1
	L3	6,89 ± 0,35	-	2,78 ± 0,51	29,11 ± 4,38
LIS30	M4	10,06 ± 1,46	-	4,67 ± 0,5	47,08 ± 1,02
	L4	10 ± 1	-	4,06 ± 0,84	52,77 ± 1,57
LSB40	M3	2,06 ± 0,26	1,22 ± 0,35	2,06 ± 0,26	76,57 ± 8,56
	L3	1,94 ± 0,26	1,39 ± 0,34	1,94 ± 0,26	65,41 ± 20,02
LSB41	M2	1,94 ± 0,26	0,61 ± 0,25	0,94 ± 0,26	29,19 ± 4,23
	L2	3,44 ± 0,96	0,28 ± 0,1	1,89 ± 0,42	60,02 ± 13,91
LSB43	M2	2,67 ± 0,44	1,06 ± 0,1	1,61 ± 0,35	39,44 ± 10,14
	L2	5,28 ± 0,51	0,17 ± 0,05	3,94 ± 0,19	43,96 ± 6,03

Tabella 12 - Sinossi degli effetti della composizione vitaminica di 3 coppie di substrati di moltiplicazione a identica composizione ormonale (cfr. Tab. 4), su 6 cloni di *Limonium*: M2, M3 M4 (a base MS) ed L2, L3, L4 (a base LS). Sono stati valutati i seguenti parametri: tasso di moltiplicazione al netto dei germogli vitrescenti; tasso di germogli totalmente vitrescenti; tasso di produzione di germogli grandi, adatti per la radicazione; incremento giornaliero di biomassa (peso fresco espresso in mg). Subcoltura: circa 30gg.

4.1.4. Prove di radicazione in vitro: valutazione degli effetti ormonali

LIG15

I dati ottenuti dalle prove di radicazione di LIG15 sui terreni R2, R3 ed R4 a formulazione MS (subcoltura: 59 gg) non mostrano tra loro differenze significative (Fig. 29), attestandosi su livelli eccellenti per tutti i substrati testati (100% di radicazione, assenza di germogli vitrescenti e/o necrotici in fase di radicazione). Ciò conferma l'ottima attitudine alla radicazione *in vitro* dei genotipi appartenenti alla classe 1 (paragrafo 3.3.4), come già osservato nelle prove preliminari di micropropagazione.

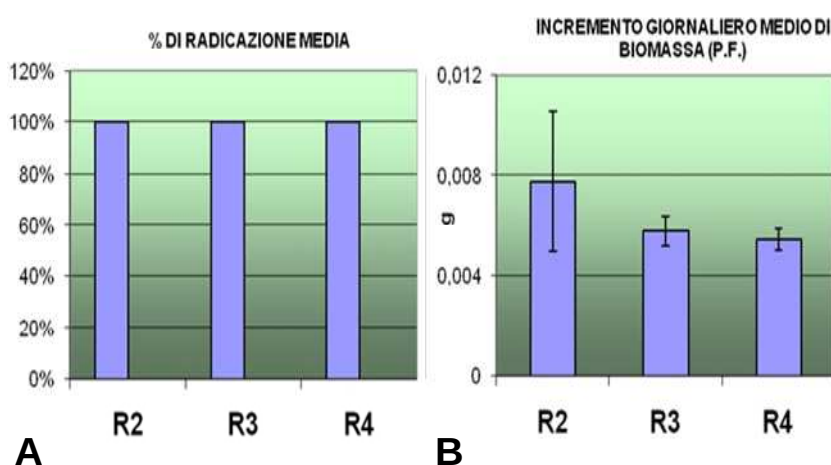


Figura 29 - Clone LIG15. Valutazione degli effetti ormonali su 3 diversi substrati di radicazione a base MS. La percentuale di germogli vitrescenti o necrotici non è stata mostrata in quanto risultata nulla su tutti i substrati.

Dalla valutazione complessiva di tipo qualitativo, tuttavia, il terreno R3 è risultato produrre germogli radicati migliori sia per il vigore vegetativo che per lo sviluppo dell'apparato radicale (radici corte, numerose e ben formate, Fig. 30).

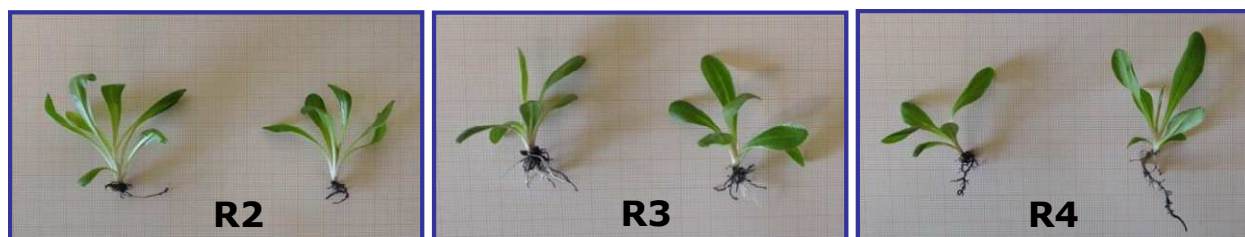


Figura 30 - Clone LIG15. Valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli radicati sui substrati a base MS R2, R3 e R4 (dopo 59 gg. di subcoltura).

LIG19

I dati relativi alle prove di radicazione di LIG19 sui terreni R2, R3 ed R4 a formulazione MS (subcoltura: 60 gg) mostrano una percentuale di radicazione del 100% solo sul terreno R2, significativamente superiore, tuttavia, solo al dato ottenuto con il terreno R4 ($66,7 \pm 0.21$, Fig. 31). Per quanto concerne l'incremento giornaliero di biomassa e la percentuale di germogli necrotici e/o vitrescenti, non sono state osservate differenze significative tra i trattamenti, tuttavia, dalla valutazione complessiva di tipo qualitativo, il terreno R2 è risultato produrre germogli radicati migliori sia per il vigore vegetativo che per lo sviluppo dell'apparato radicale (radici numerose e ben conformate, Fig. 32).

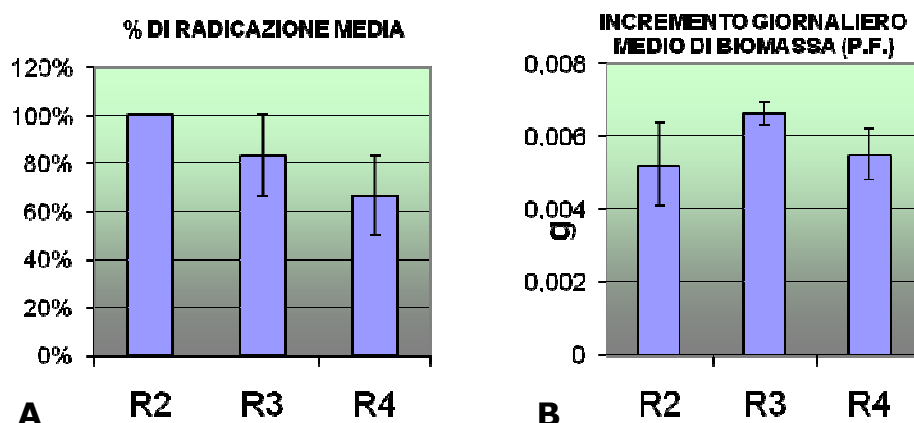


Figura 31 - Clone LIG19. Valutazione degli effetti ormonali su 3 diversi substrati di radicazione a base MS. La percentuale di germogli vitrescenti o necrotici non è stata mostrata in quanto risultata nulla su tutti i substrati. La deviazione standard dei valori percentuali è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti (*arcsen*).

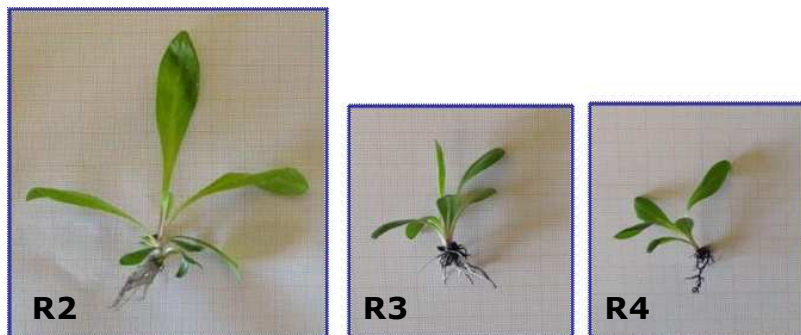


Figura 32 - Clone LIG19. Valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli radicati sui substrati a base MS R2, R3 e R4 (dopo 60 gg. di subcultura).

LIS30

Nel caso di LIS30, le percentuali di radicazione e gli incrementi giornalieri di biomassa più alti sono stati ottenuti con i substrati R2 ed R4, senza differenze significative tra loro (Fig. 33 A). Con il terreno R2, tuttavia, la percentuale di germogli necrotici e/o vitrescenti è risultata significativamente più bassa, rispetto a R4 (Fig. 33 B).

Anche la qualità complessiva del germoglio, sia per il vigore vegetativo che per lo sviluppo dell'apparato radicale, è risultata migliore con il terreno R2 rispetto a R3 e a R4, Fig. 34).

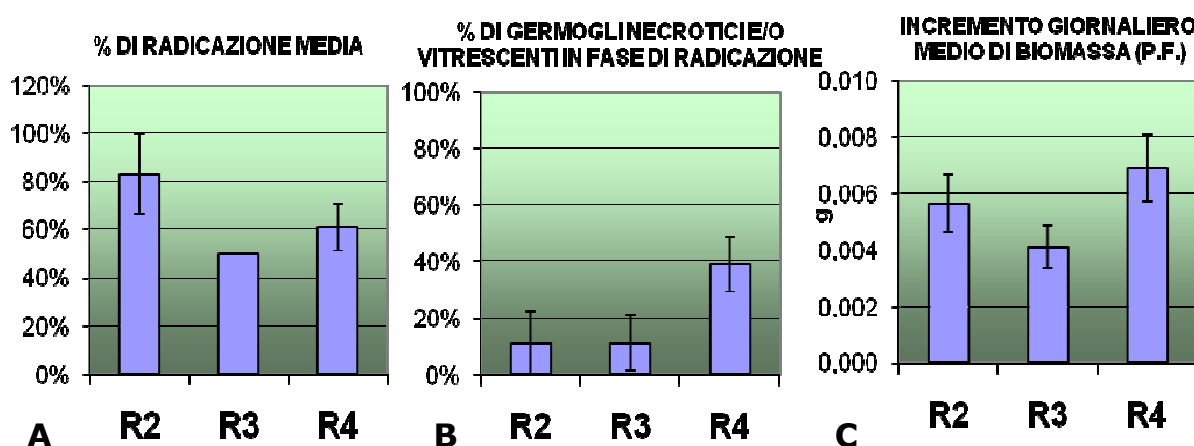


Figura 33 - Clone LIS30. Valutazione degli effetti ormonali su 3 diversi substrati di radicazione a base MS. La deviazione standard dei valori percentuali è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti (*arcsen*).

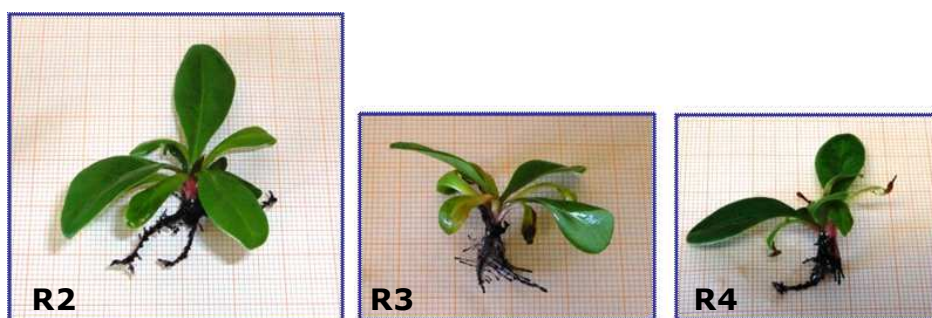


Figura 34 - Clone LIS30. Valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli radicati sui substrati a base MS R2, R3 e R4 (dopo 60 gg. di subcultura).

LSB40

Come già emerso dalle prove preliminari di propagazione, l'attitudine alla radicazione *in vitro* delle 3 linee clonali di statiche (attribuite alle classi 2 e 3, secondo la classificazione descritta nel paragrafo 3.3.4) risulta minore rispetto alle linee clonali LIG15, LIG19, LIS30, riferibili al gruppo di specie "*L. gmelinii /altaica/serotinum*".

Per il clone LSB40 la percentuale di radicazione media ha superato il 50% soltanto con il terreno R3 ($61,11\% \pm 6,7$, Fig. 35 A), sebbene, includendo anche i germogli non radicati ma con presenza di callo rizogeno, in grado di garantire una corretta radicazione *ex-vitro* durante la fase di acclimatazione, la percentuale salga all' $83,33\% \pm 5,5$ (Fig. 35 B).

Il substrato R3 ha fornito i migliori risultati anche per quanto riguarda la percentuale di germogli necrotici e/o vitrescenti (Fig. 35 C). L'incremento giornaliero medio di biomassa è risultato significativamente più alto con i substrati R3 ed R4, rispetto al substrato R7. R4, tuttavia, non ha prodotto alcun germoglio radicato (Fig. 35 A). Dal punto di vista qualitativo, infine, i germogli radicati su R3 sono risultati nettamente migliori rispetto a quelli radicati sugli altri terreni, sia per il vigore vegetativo che per lo sviluppo dell'apparato radicale (Fig. 36).

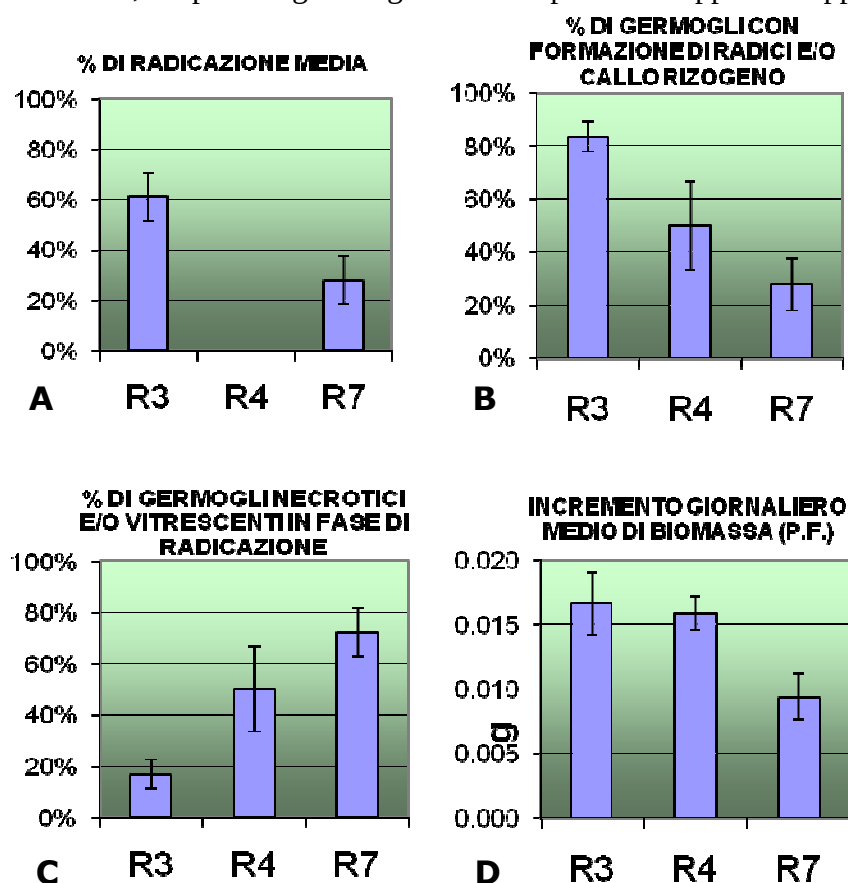


Figura 35 - Clone LSB40. Valutazione degli effetti ormonali su 3 diversi substrati di radicazione a base MS. La deviazione standard dei valori percentuali è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti (*arcsen*).



Figura 36 - Clone LSB40. Valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli radicati sui substrati a base MS R2, R3 e R4 (dopo 58 gg. di subcoltura).

LSB41

Per il clone di statice LSB41 valgono le stesse considerazioni fatte per il precedente: anche in questo caso, infatti, il terreno di radicazione R3 è risultato complessivamente il più efficiente per quanto riguarda la percentuale di radicazione netta (Fig. 37 A) o comprensiva dei germogli con callo rizogeno (che, in questo caso, raggiunge il 100%, Fig. 37 B); Il substrato R3 ha prodotto risultati migliori anche per quanto riguarda la percentuale di germogli necrotici e/o vitrescenti (nulla su R3, Fig. 37 C), l'incremento giornaliero di biomassa (Fig. 37 D) e la qualità complessiva dei germogli radicati (Fig. 38).

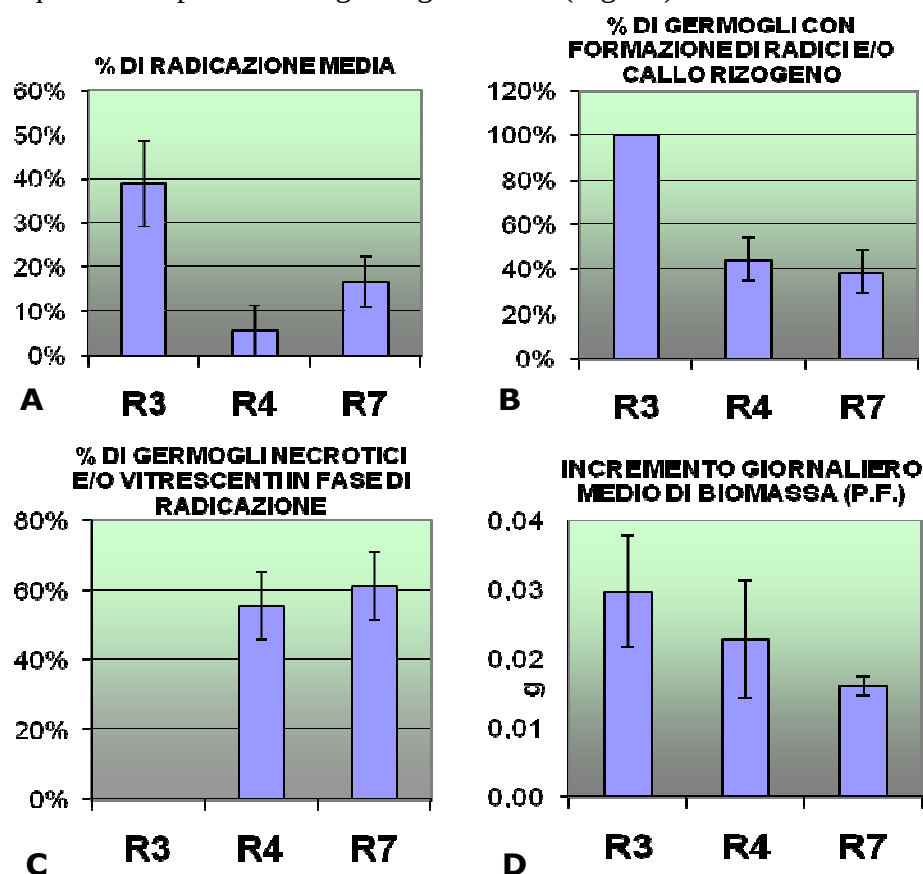


Figura 37 - Clone LSB41. Valutazione degli effetti ormonali su 3 diversi substrati di radicazione a base MS. La deviazione standard dei valori percentuali è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti (*arcsen*).

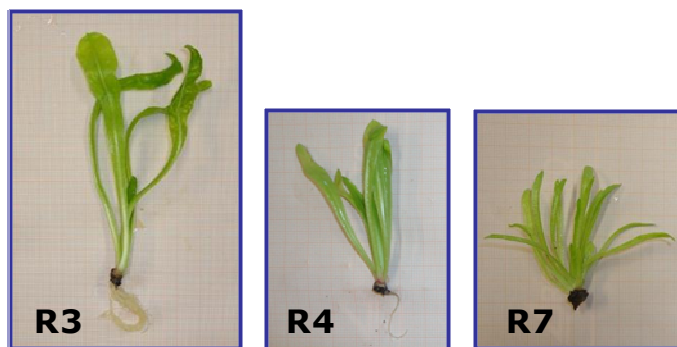


Figura 38 - Clone LSB41. Valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli radicati sui substrati a base MS R2, R3 e R4 (dopo 61 gg. di subcoltura).

LSB43

Il clone LSB43 è stato l'unico, tra i genotipi di *Limonium* in esame, a mostrare una risposta alla radicazione migliore sul substrato R4, sia per quanto riguarda la percentuale di radicazione (Fig. 39 A) che per la percentuale di germogli vitrescenti e/o necrotici (Fig. 39 B). Anche l'analisi delle caratteristiche qualitative del germoglio, ha evidenziato, in media, un migliore sviluppo sia dell'apparato fogliare che radicale nei germogli trattati con R4, rispetto a quelli radicati su R3 e R6 (Fig. 39). L'incremento giornaliero medio di biomassa non differisce significativamente tra R4 ed R6, mentre risulta più basso sul terreno R3 (Fig. 39 C).

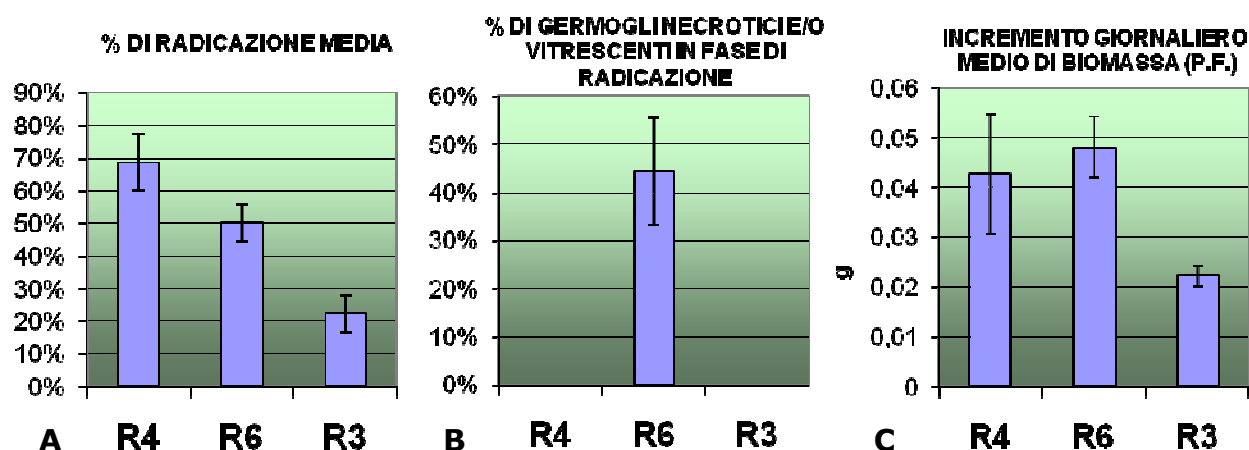


Figura 39 - Clone LSB43. Valutazione degli effetti ormonali su 3 diversi substrati di radicazione a base MS. La deviazione standard dei valori percentuali è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti ($\arcsen$).

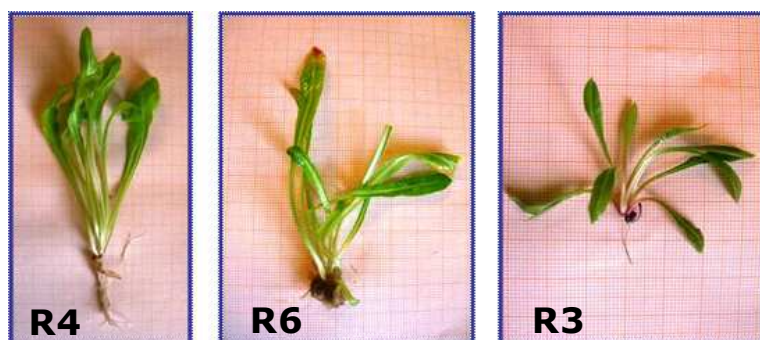


Figura 40 - Clone LSB43. Valutazione degli effetti ormonali: aspetto dei germogli radicati sui substrati a base MS R4, R6, R3 (dopo 60 gg. di subcoltura).

4.1.5. Prove di radicazione in vitro: valutazione degli effetti vitaminici

Analogamente a quanto già effettuato per le prove di moltiplicazione, le composizioni ormonali dei substrati a base MS risultati più efficienti nel promuovere la radicazione delle selezioni di *Limonium* (R2: 1 mg/l di IAA; R3: 1 mg/l di IBA; R4: 1mg/l di IAA + 1mg/l di IBA, Tab. 5) sono state riprodotte in terreni a formulazione LS (siglati rispettivamente LR2, LR3, LR4), al fine di valutare gli effetti della ridotta composizione vitaminica sulla radicazione.

Anche in questo caso i risultati relativi alla qualità complessiva del germoglio radicato (Fig. 41, relativa, a titolo di esempio, al clone LIG15), alle percentuali di radicazione e di necrosi e/o vitrescenza (Tab.13) non hanno mostrato differenze significative tra le formulazioni MS ed LS. Per quanto riguarda l'incremento giornaliero di biomassa, i substrati a base LS hanno addirittura fornito valori medi più alti nel caso di LIG19 e LSB41 (Tab. 13).

Come per quanto già osservato relativamente alla fase di moltiplicazione (paragrafo 4.1.2) possiamo concludere che la ridotta concentrazione vitaminica non influisce negativamente sull'efficienza di radicazione di nessuno dei substrati valutati, mentre, in alcuni casi (non limitati ai cloni di statiche), può addirittura produrre effetti migliorativi sullo sviluppo dei germogli radicati. I substrati più idonei per la radicazione *in vitro* su larga scala dei 6 cloni selezionati sono quindi quelli a formulazione LS, evidenziati in grassetto in tabella 13.



Figura 41 - Clone LIG15. Valutazione degli effetti vitaminici: aspetto dei germogli radicati su R3 (a base MS) e LR3 (a base LS), dopo 61 gg. di subcoltura.

CLONE	SUBSTR.	% RADICAZIONE	% G. VITRESCENTI	INCR.G.BIOM. (mg)
LIG15	R3	100 ± 0	0	5,77 ± 0,6
	LR3	100 ± 0	0	5,68 ± 0,83
LIG19	R2	100 ± 0	0	6,91 ± 0,57
	LR2	100 ± 0	0	10,37 ± 1,46
LIS30	R2	100 ± 0	0	5,26 ± 0,9
	LR2	100 ± 0	0	5,3 ± 0,64
LSB40	R3	83,33 ± 21,4	30,56 ± 9	30,28 ± 2,9
	LR3	66,67 ± 12,6	33,33 ± 10,7	26,5 ± 4,31
LSB41	R3	100 ± 0	0	18,06 ± 0,52
	LR3	100 ± 0	0	33,32 ± 5,51
LSB43	R4	88,89 ± 16,7	11,11 ± 0,96	37,23 ± 6,07
	LR4	83,33 ± 4,9	16,67 ± 0,27	37,81 ± 13,47

Tabella 13 - Sinossi degli effetti della composizione vitaminica di 3 coppie di substrati di radicazione a identica composizione ormonale (cfr. Tab. 5), su 6 cloni di *Limonium*: R2, R3 R4 (a base MS) ed LR2, LR3, LR4 (a base LS). Sono stati valutati i seguenti parametri: % di radicazione; % di germogli totalmente vitrescenti o necrotici; incremento giornaliero medio di biomassa (peso fresco espresso in mg). Nel caso degli statici (cloni LSB40, LSB41 e LSB43), la % di radicazione è comprensiva dei germogli con formazione di callo rizogeno in grado di radicare *ex-vitro* durante l'ambientamento. Subcoltura: circa 60gg. La deviazione standard dei valori percentuali è stata calcolata previa trasformazione dei dati di riferimento in radianti (*arcsen*).

4.1.6. Prove preliminari di radicazione in vitro con aggiunta di ABA al substrato

Dopo una subcoltura di circa 8 settimane, le pagine abassiali delle foglioline dei germogli radicati in presenza di ABA (sui substrati descritti in Tab. 7) sono state osservate al microscopico ottico a 20X e 100X in momenti successivi (cfr. paragrafo 3.3.9).

I risultati, illustrati a titolo di esempio per il clone LSB43 trattato con ABA 10^{-4} M (Fig. 42), hanno evidenziato un effetto più o meno marcato, a seconda dei cloni, nel regolare la chiusura degli stomi, indipendentemente dall'esposizione al buio o alla luce.

Nel clone LSB43, dopo 72 ore di mantenimento all'interno dei vasi di coltura aperti, in modo da bilanciare i valori di U.R. dell'ambiente *in vitro* con quelli della camera di crescita, i germogli non trattati apparivano sofferenti, con le foglie più esterne avvizzite, in particolare alle estremità distali (sofferenza riscontrata anche all'analisi microscopica, con la presenza di molte cellule ipotoniche o danneggiate, e la quasi totalità degli stomi ancora totalmente o parzialmente aperti). I germogli trattati con ABA 10^{-5} M, mostravano sintomi di leggero avvizzimento soltanto alle estremità distali delle foglie più grandi. Al contrario, i germogli trattati con ABA 10^{-4} M apparivano inalterati, senza alcun sintomo di perdita d'acqua fogliare; per questi ultimi campioni, l'analisi microscopica ha evidenziato una chiusura quasi totale nella maggior parte degli stomi.

Nel clone LIG15 non è stato possibile valutare i germogli trattati con ABA 10^{-4} M perché totalmente necrotici. Da un punto di vista morfologico, la differenza tra trattati con ABA 10^{-5} M e non trattati è risultata più evidente rispetto al clone LSB43, con particolare riferimento allo sviluppo fogliare e alle dimensioni dei germogli. Tuttavia, il colore delle foglie e la loro consistenza non differiva in maniera apprezzabile. La formazione dell'apparato radicale è risultata parzialmente inibita dal trattamento con ABA 10^{-5} M, mentre, in questo caso, la differenza tra il grado di apertura degli stomi tra trattati e controlli è risultata meno evidente.

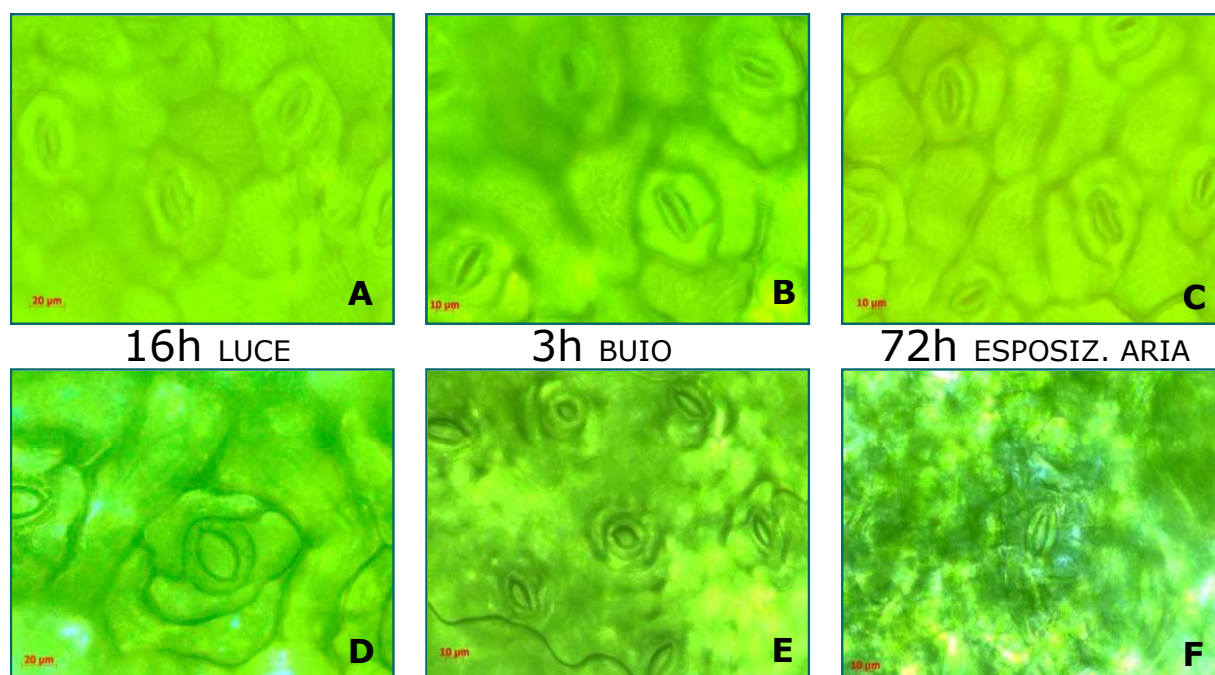


Figura 42. Aspetto degli stomi sulla pagina abassiale di germogli di LSB43 radicati in presenza di ABA 10^{-4} M disciolto nel substrato di radicazione R4 (foto A, B, C) a confronto con i germogli non trattati (foto D, E, F). (subcoltura: 8 settimane.). Gli stomi sono stati fotografati all'apertura del vaso (dopo 16h di luce e dopo 3h di buio) e dopo 72 h di esposizione all'aria, in camera di crescita.

In generale, l'aspetto dei germogli e la proporzione tra apparato radicale e fogliare hanno subito notevoli alterazioni nei germogli radicati in presenza di ABA (Fig. 43). I germogli trattati, infatti, hanno prodotto foglioline di aspetto più coriaceo, simili a quelle di piantine già acclimatate. Limitatamente ai cloni di statiche, su alcuni germogli è stato anche osservato un abbozzo di stelo fiorale, come risposta fisiologica allo stress indotto da ABA. Si vedano, a titolo di esempio, le foto E ed F in figura 43, relative al clone LSB43.

Per tutti i cloni di *Limonium* utilizzati cloni, tuttavia, la concentrazione 10^{-4} M è risultata troppo elevata, impedendo del tutto la formazione di radici (foto C ed F in figura 43, relative ai cloni LIG15 e LSB43) e, in alcuni casi, provocando necrosi dei germogli.

Con l'eccezione del clone LSB43 (l'unico ad aver prodotto germogli sufficientemente sviluppati in presenza di ABA 10^{-4} M) è stato possibile valutare in fase di acclimatazione soltanto i germogli trattati con ABA 10^{-5} M, vale a dire i cloni LSB43 e LIG15 (cfr. Tab. 8). I

germogli sono stati ambientati tra dicembre e febbraio, in contenitori alveolari “Jiffy-Pot®” 6 x 6 cm, riempiti con la miscela di substrato BCA, risultata la più efficiente nelle prove di ambientamento (paragrafo 4.2).

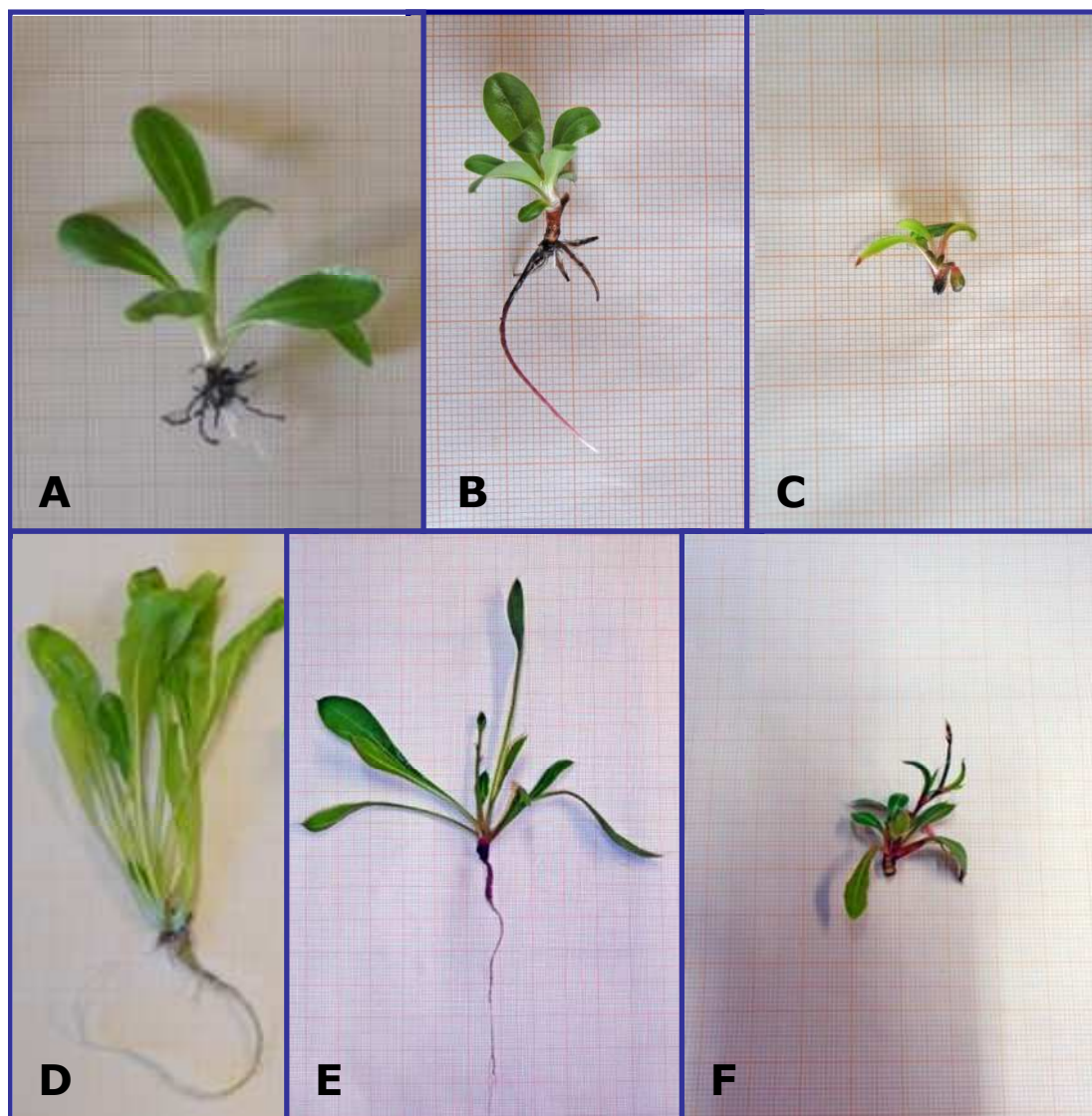


Figura 43. Aspetto dei germogli di LIG15 (foto A, B, C) e di LSB43 (foto D, E, F) radicati rispettivamente sui substrati R3 ed R4 in assenza di ABA (foto A, B), in presenza di ABA 10^{-5} M (foto B,C) ed in presenza di ABA 10^{-4} M (foto D, E) disciolto nel substrato di radicazione.

Nonostante gli effetti evidenti dell’ABA sulla regolazione stomatica e sulla struttura del germoglio in fase di radicazione, la prova di ambientamento non ha prodotto alcun miglioramento dell’adattabilità alle condizioni *ex-vitro* dei germogli trattati con ABA 10^{-5} M rispetto ai controlli in nessuna delle tre condizioni di acclimatazione testate.

Dopo 8 settimane, il gruppo posto ad ambientare sotto l’apposito tunnel ha mostrato una percentuale di sopravvivenza del 100%, senza differenze apprezzabili tra i trattati e non trattati né dal punto di vista qualitativo, né dal punto di vista della rapidità di sviluppo.

Nel gruppo sistemato fuori dal tunnel di ambientamento ma alla stessa temperatura basale (14°C) e con la stessa frequenza di nebulizzazione, la percentuale di sopravvivenza si è

abbassata a circa il 67% per il clone LIG15 e a circa il 60% per LSB43, senza differenze significative tra controlli e trattati.

Nel terzo gruppo, infine, posto ad ambientare in serra non riscaldata e a regime irriguo normale, sono sopravvissuti soltanto i germogli di LIG15, con una percentuale di sopravvivenza intorno all'80%, sia nei trattati che nei controlli. Ciò è probabilmente dovuto all'origine caucasico-siberiana (cfr. paragrafo 1.2.2) del gruppo di specie "*L. gmelinii/altaica*" cui appartiene il clone LIG15, con una più elevata resistenza alle basse temperature rispetto alle specie mediterranee "*L. sinuatum /bonduellei*" da cui trae origine l'ibrido LSB43.

Per quanto riguarda i germogli di LSB43 trattati con ABA 10^{-4} M, sono sopravvissuti soltanto quelli del gruppo ambientato sotto l'apposito tunnel, con una percentuale di sopravvivenza del 40% e con evidenti riduzioni ed alterazioni dello sviluppo fogliare, tali da non risultare idonei per la coltivazione neppure dopo 12 settimane dall'inizio dell'ambientamento (Fig. 44 C).



Figura 44. Aspetto di germogli di LSB43 radicati in presenza di ABA 10^{-5} (B) e di ABA 10^{-4} M (C) rispetto ai germogli non trattati (A), dopo 12 settimane dall'inizio dell'ambientamento (foto A, B, C).

4.2. Prove di ambientamento

La percentuale di sopravvivenza, nelle condizioni di ambientamento descritte nel paragrafo 3.4, è stata del 100% per tutte le linee clonali, su tutte le miscele di substrati impiegate (BCA, TA, CT). Tuttavia, i germogli acclimatati sulla miscela di terricci priva di torba (BCA) sono risultati generalmente più rigogliosi, con una più ampia superficie fogliare e di un verde più intenso (Figg. 45, 46).



Figura 45 – Aspetto dei germogli di LIG15 ambientati su tre differenti miscele di terricci (CT, CBA, TA).

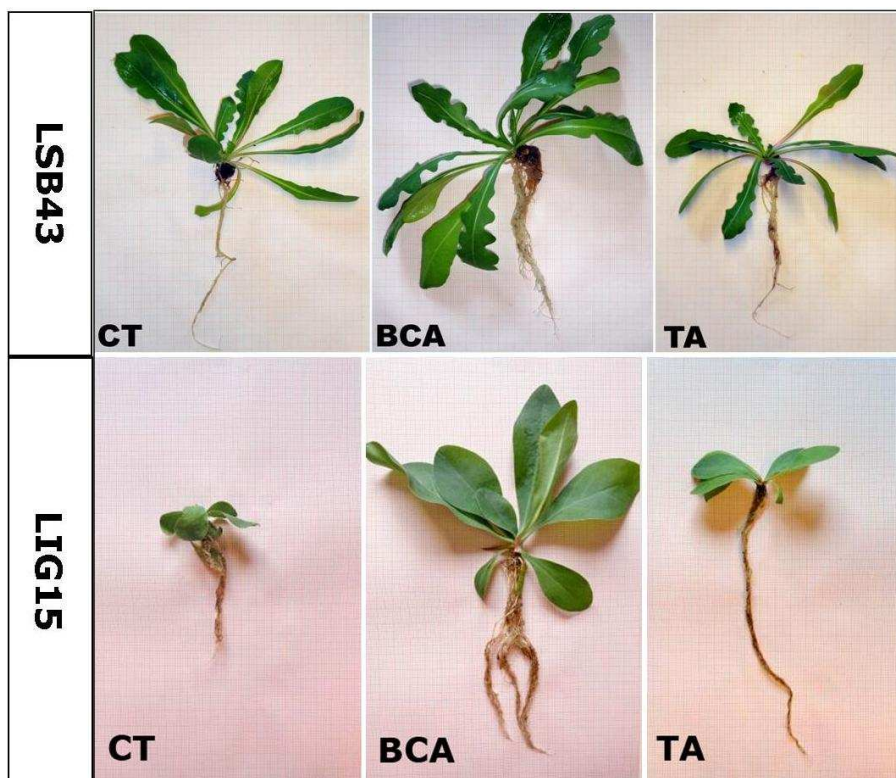


Figura 46 – Aspetto dei germogli dei cloni di *Limonium* LSB43 (in alto) e LIG15 (in basso) di ambientati su tre differenti miscele di terricci (CT, CBA, TA).

La percezione di una maggiore intensità del colore fogliare è stata confermata dalle misurazioni colorimetriche effettuate tramite lettura delle coordinate CieLab L*a*b* allo spettrocolorimetro. In tabella 14 sono mostrati i dati relativi alle medie delle letture effettuate su campioni fogliari dei cloni ambientati (2 letture per 3 foglie per 3 germogli di ciascun trattamento).

In tutti i campioni ambientati su BCA sono stati rilevati valori di “L” e di “b” significativamente più bassi rispetto alle altre tesi, corrispondenti a coordinate colorimetriche spostate rispettivamente verso toni più scuri (intensi) e meno “ingialliti” (Fig. 13). Le letture della terza coordinata “a” risultano di segno negativo in tutti i campioni, in quanto collocate nelle frequenze del verde.

Clone LIG15				Clone LIG19			
Mix	L*	a*	b*	Mix	L*	a*	b*
TA	43,762 a	-8,424 a	18,562 b	TA	47,603 b	-8,872 b	19,198 b
CT	45,193 b	-9,535 b	19,898 a	CT	51,001 a	-9,451 c	22,561 a
BCA	41,629 c	-8,359 a	14,613 c	BCA	41,096 c	-7,827 a	13,496 c

Clone LIS30				Clone LSB40			
Mix	L*	a*	b*	Mix	L*	a*	b*
TA	46,552 a	-9,069 b	19,936 a	TA	47,383 a	-8,880 b	22,418 a
CT	45,477 b	-9,496 c	18,831 b	CT	46,882 a	-9,709 c	21,161 a
BCA	40,160 c	-7,983 a	14,072 c	BCA	40,327 b	-7,056 a	12,267 b

Clone LSB41				Clone LSB43			
Mix	L*	a*	b*	Mix	L*	a*	b*
TA	46,990 a	-8,987 a	19,781 a	TA	51,045 a	-9,591 a	27,842 a
CT	47,138 a	-9,070 a	20,041 a	CT	49,542 b	-9,845 a	25,015 b
BCA	43,732 b	-8,938 a	16,811 b	BCA	47,944 c	-10,224 a	24,976 b

Tabella 14 - Coordinate CieLab L*a*b* rilevate su campioni fogliari di 6 cloni di *Limonium* ambientati su 3 diverse miscele di terricci (TA, CT, BCA). Significatività ricavata mediante ANOVA (Test di Student-Newman-Keuls, con $p < 0.05$).

Il colore più intenso e meno tendente al giallo dei germogli ambientati sulla miscela BCA può essere correlato a una maggiore concentrazione di clorofilla nei tessuti fogliari. Le misurazioni delle assorbanze di clorofilla “a” ed “a” + “b”, effettuate allo spettrofotometro, hanno infatti fornito valori significativamente più alti per la miscela priva di torba (BCA) rispetto alle altre tesi in 4 dei 6 cloni testati (Fig. 47). E’ noto che durante l’acclimatazione si verifica, nelle cellule mesofillo, un incremento del contenuto di clorofilla “a” e “b” (Pospíšilová *et al.*, 1999) correlato al progressivo sviluppo dell’attività fotosintetica.

La miscela di terricci “BCA”, in virtù della particolare struttura cristallina a elevata CSC della clinoptinolite e di una maggiore concentrazione di sostanza organica del compost “Biomax, associata a un corretto equilibrio tra aria e acqua (cfr. paragrafo 3.4), sembra infatti in grado di garantire una migliore disponibilità di principi nutritivi, limitando le perdite dei nutrienti per dilavamento e riducendo, al contempo, il rischio di stress idrici (Prisa *et al.*, 2009). Durante la delicata fase di acclimatazione ciò favorisce l’adattamento al substrato solido dell’apparato radicale, consentendo un più rapido sviluppo dell’intero germoglio, con conseguente incremento dell’attività fotosintetica.

Anche i dati relativi al peso fresco e secco degli apparati radicali e fogliari (Tab. 15) testimoniano, in generale, un maggiore sviluppo dei germogli ambientati su “BCA”, rispetto alle 2 miscele a base di torba, con le sole eccezioni del peso secco di foglie e radici nel clone LSB41 (in cui non sono state riscontrate differenze significative tra le medie relative alle 3 miscele di terricci) ed, in parte, dei pesi freschi e secchi degli apparati radicali di LSB43 (risultati significativamente maggiori soltanto rispetto alla miscela “CT”).

I dati relativi all’area fogliare confermano gli effetti positivi del Biomax associato a clinoptinolite (miscela “BCA”), rispetto alle 2 miscele a base di torba, nello sviluppo dell’apparato vegetativo per tutti cloni di *Limonium* ambientati (Tab. 16).

4.3. Prove agronomiche

I risultati delle prove agronomiche sono stati suddivisi in due gruppi: 1) cloni LSB40, LSB41, LSB43 e relative cultivar di riferimento; 2) cloni LIG15, LIG19, LIS30 e relative cultivar di riferimento (Tab. 6). Le caratteristiche produttive, estetiche e biometriche prese in considerazione, infatti, differiscono notevolmente tra le due tipologie di *Limonium*, al punto che ancora oggi i floricoltori continuano a riferirsi a essi rispettivamente con i nomi distinti di “statiche” e “limonium”, pur trattandosi di specie dello stesso genere.

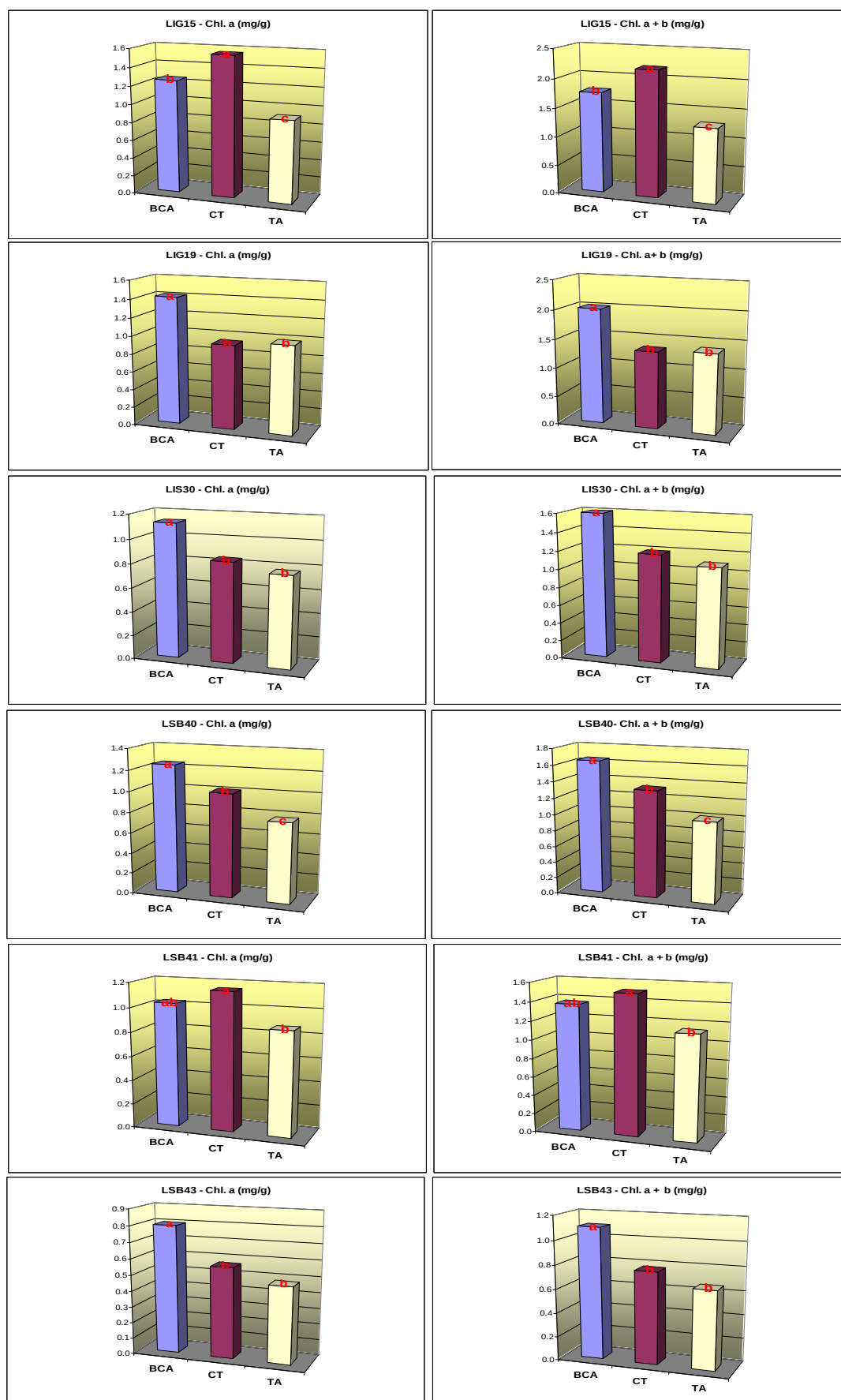


Figura 47 - Concentrazioni di clorofilla “a” (a sinistra) e “a” + “b” (a destra) in campioni fogliari estratti da 6 cloni di *Limonium* ambientati su 3 diverse miscele di terricci (BCA, CT, TA). Significatività ricavata mediante ANOVA (Test di Student-Newman-Keuls, con $p < 0.05$).

CLONE	MIX	P. F. FG.	P.S. FG.	P.F. RAD.	P.S. RAD.
LIG15	BCA	2.753 a	0.469 a	0.581 a	0.170 a
	CT	0.418 c	0.125 b	0.113 c	0.053 b
	TA	0.881 b	0.153 b	0.287 b	0.085 b
LIG19	BCA	3.235 a	0.490 a	0.705 a	0.137 a
	CT	0.427 b	0.094 b	0.144 b	0.042 b
	TA	0.427 b	0.117 b	0.221 b	0.052 b
LIS30	BCA	2.345 a	0.337 a	0.834 a	0.118 a
	CT	0.570 b	0.109 b	0.292 b	0.045 b
	TA	0.643 b	0.103 b	0.409 b	0.053 b
LSB40	BCA	2.356 a	0.223 a	0.152 a	0.029 a
	CT	0.364 b	0.060 b	0.056 b	0.011 b
	TA	0.205 b	0.035 b	0.046 b	0.007 b
LSB41	BCA	2.398 a	0.176 a	0.277 a	0.039 a
	CT	0.217 b	0.072 a	0.043 b	0.007 a
	TA	0.224 b	0.035 a	0.069 b	0.014 a
LSB43	BCA	4.382 a	0.383 a	1.151 a	0.135 a
	CT	1.635 b	0.195 b	0.575 b	0.057 b
	TA	1.855 b	0.231 b	0.841 ab	0.103 a

Tabella 15 - Peso fresco e peso secco di foglie di radici dei cloni LIS30, LIG19 e LSB43 ambientati su tre diverse miscele di terricci (TA, CT, BCA). Significatività ricavata mediante ANOVA (Test di Student-Newman-Keuls, con $p < 0.05$).

CLONE	MIX	AREA FOGLIARE
LIG15	BCA	123.837 a
	CT	23.846 b
	TA	41.024 b
LIG19	BCA	120.173 a
	CT	18.234 c
	TA	28.283 b
LIS30	BCA	81.311 a
	CT	22.263 b
	TA	24.825 b
LSB40	BCA	51.872 a
	CT	9.336 b
	TA	5.082 b
LSB41	BCA	54.526 a
	CT	9.023 b
	TA	5.999 b
LSB43	BCA	141.155 a
	CT	50.152 b
	TA	55.66 b

Tabella 16 - Area fogliare totale, espressa in cm^2 , di 6 cloni di *Limonium* ambientati su 3 diverse miscele di terricci (TA, CT, BCA). Significatività ricavata mediante ANOVA (Test di Student-Newman-Keuls, con $p < 0.05$).

1) Gruppo “statiche”.

Le piante sono state poste a dimora il 21 aprile 2011, e sono andate a fiore tra la prima e la terza settimana di giugno. Il clone LSB43, come la sua cultivar di riferimento ‘Lemon Wings’[®], nelle condizioni descritte nel paragrafo 3.5 è entrata in produzione dopo circa 6 settimane dal trapianto. I cloni LSB40 e LSB41, invece, hanno avuto bisogno di 8 settimane, 2 in più sia rispetto a LSB43 che alle rispettive cultivar impiegate come testimoni ‘Barbie Wings’[®] e ‘Cherry Wings’[®].

La prima prova agronomica è stata effettuata il 27 giugno 2100, quando tutti i cloni erano in piena fioritura, su steli di standard commerciale raccolti allo stesso stadio di maturazione. Altre due prove sono state effettuate alle rimonte successive, il 28 luglio ed il 21 settembre

I grafici A, C, E, in Fig. 49, mostrano i dati relativi alla produzione media annuale di steli ed ai principali parametri biometrici rilevati sui cloni LSB40, LSB41 e LSB43 (istogrammi in azzurro) a confronto con quelli ricavati dalle cultivar di riferimento ‘Barbie Wings’[®], ‘Cherry Wings’[®] e ‘Lemon Wings’[®] (istogrammi di colore violetto, rapportati a 100). I valori assoluti delle medie sono riportati alla base degli istogrammi. I grafici D,E,F mostrano in dettaglio i dati di produzione stagionale dei cloni selezionati LSB40, LSB41 e LSB43 a confronto con quelli ricavati dalle 3 cultivar di riferimento (numero medio di steli prodotti nella 1°, 2° e 3° raccolta.

Per quanto riguarda le rese produttive annuali, i cloni LSB40 e LSB43 hanno fornito dati significativamente superiori rispetto alle cultivar di riferimento ‘Barbie Wings’[®] e ‘Lemon Wings’[®] ($47,84 \pm 4,14$ steli/anno contro $32,44 \pm 5,87$ e $37,94 \pm 1,43$ steli/anno contro $22,67 \pm 2,03$, rispettivamente), con particolare riferimento ai dati relativi alla produzione estiva (28 luglio, grafici B e D, in Fig. 49). Tra i dati di produzione relativi al clone LSB41 e alla cultivar ‘Cherry Wings’[®] non sono emerse differenze significative.

Il clone LSB40 ha fornito risultati migliori, rispetto al testimone, anche per quanto riguarda i principali parametri biometrici (Fig. 49 A), con una lunghezza media dello stelo rispettivamente di $62,23 \pm 2,86$ cm contro $52,78 \pm 2,32$, un peso fresco medio per stelo di $37,06 \pm 6,24$ g contro $4,86 \pm 5,66$ ed un numero medio di ramificazioni fiorite per infiorescenza di $10,07 \pm 1,4$ contro $7,18 \pm 1$. Il numero medio di ramificazioni per infiorescenza è risultato maggiore rispetto alle cultivar di riferimento anche in LSB41 ed in LSB43, mentre per tutti gli altri parametri non sono state osservate differenze significative (Fig 49, C, E).

In tabella 17 sono riportati i dati relativi ad alcuni descrittori biometrici qualitativi ed estetici recepiti dai questionari tecnici UPOV per la richiesta di privativa varietale su *Limonium* (UPOV, 1999) e dall’esperienza di operatori del settore (cfr. paragrafo 3.5). In generale si può

osservare una certa omogeneità dei dati, ripartiti in classi, tra le 3 selezioni del CRA-VIV e le relative cultivar di riferimento. Per quanto si tratti in parte di valutazioni soggettive, collegate a tendenze del mercato a loro volta influenzate da azioni di marketing, le combinazioni cromatiche di calice e corolla dei cloni LSB40, LSB41 e LSB43 (Tab. 17, Fig. 48) risultano potenzialmente più appetibili per il mercato, quanto a originalità e valenza estetica, rispetto alle 3 cultivar di riferimento. Al contrario, la struttura dell'infiorescenza (Tab. 17 e Fig. 48) risulta di qualità superiore nelle cultivar 'Cherry Wings'® e 'Lemon Wings'® rispetto ai cloni LSB41 e LSB43, in quanto le spighe del tipo "4" soddisfano pienamente le esigenze del mercato del fiore reciso (cfr. Fig. 15).

	LSB43	LEMON WINGS®	LSB40	BARBIE WINGS®	LSB41	CHERRY WINGS®
Colore calice	Giallo chiaro	Giallo chiaro	Violetto chiaro	Lilla chiaro	Rosso amaranto	Fucsia
Colore corolla	Giallo oro	panna	bianco	bianco	Giallo chiaro	Bianco
Alatura	1	2	3	3	2	1 / 2
Rigidità di stelo	4	4	4	4	4	4
Distribuz. infioresc.	2	3	3	2	2	3
Struttura infioresc.	2	4	3 / 7	3 / 6	2	2 / 4

Legenda:

Alatura: 1: assente o molto stretta; 2: stretta; 3: media; 4: larga; 5: molto larga.

Rigidità di stelo: 1: 0-30° (poco rigido); 2: 30-60° (mediamente rigido); 3: 60-90° rigido); 4: 90° (molto rigido).

Distribuzione infiorescenze: spighe distribuite ed orientate su: 1) molti piani diversi; 2) pochi piani diversi; 3) circa sullo stesso piano.

Struttura infiorescenza: 1) corta e lassa; 2) corta e densa; 3) piccola e stretta; 4) grande, piatta e densa; 5) molto lassa e irregolare; 6) grande e molto allungata; 7) spiga piena, densa, allungata.

Tabella 17 – Parametri biometrici qualitativi, suddivisi in classi, impiegati nella valutazione agronomica dei cloni di statice LSB40, LSB41 e LSB43 a confronto con le 3 cv commerciali rispettivamente impiegate come testimoni (in grigio).

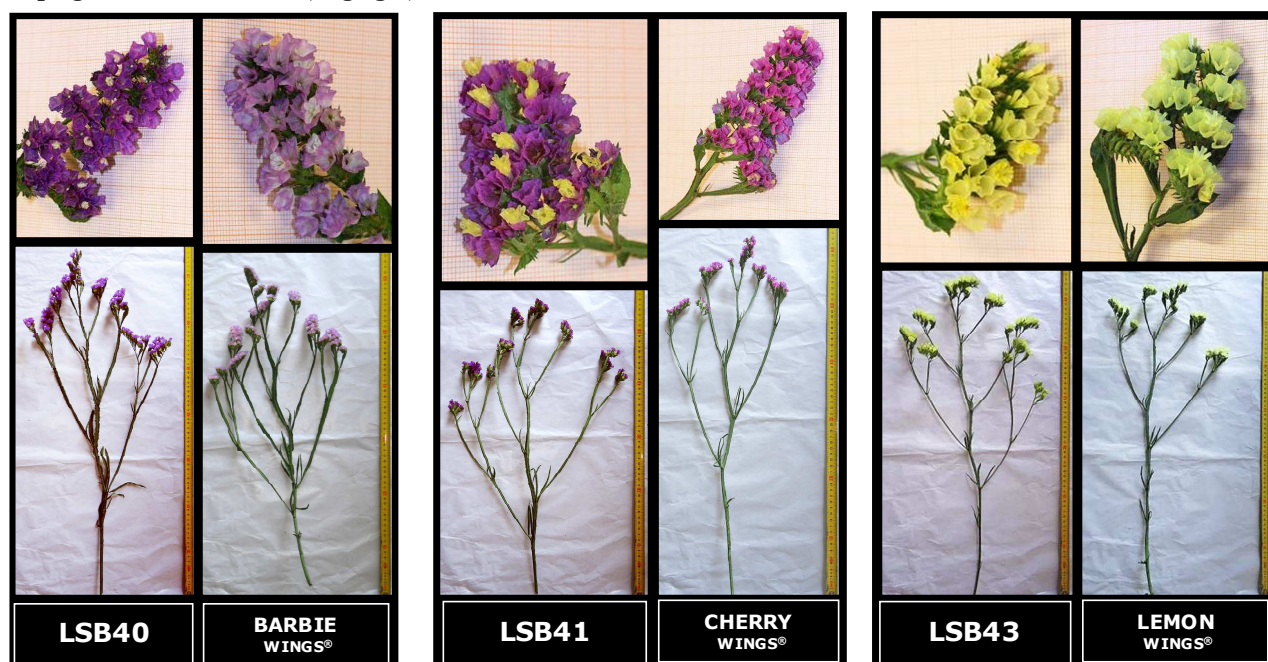


Figura 48 – Confronto tra la conformazione, le combinazioni cromatiche e le dimensioni di infiorescenza e spiga terminale nei cloni di statice LSB40, LSB41 e LSB43 rispetto alle cv di riferimento 'Barbie Wings'®, 'Cherry Wings'® e 'Lemon Wings'®.

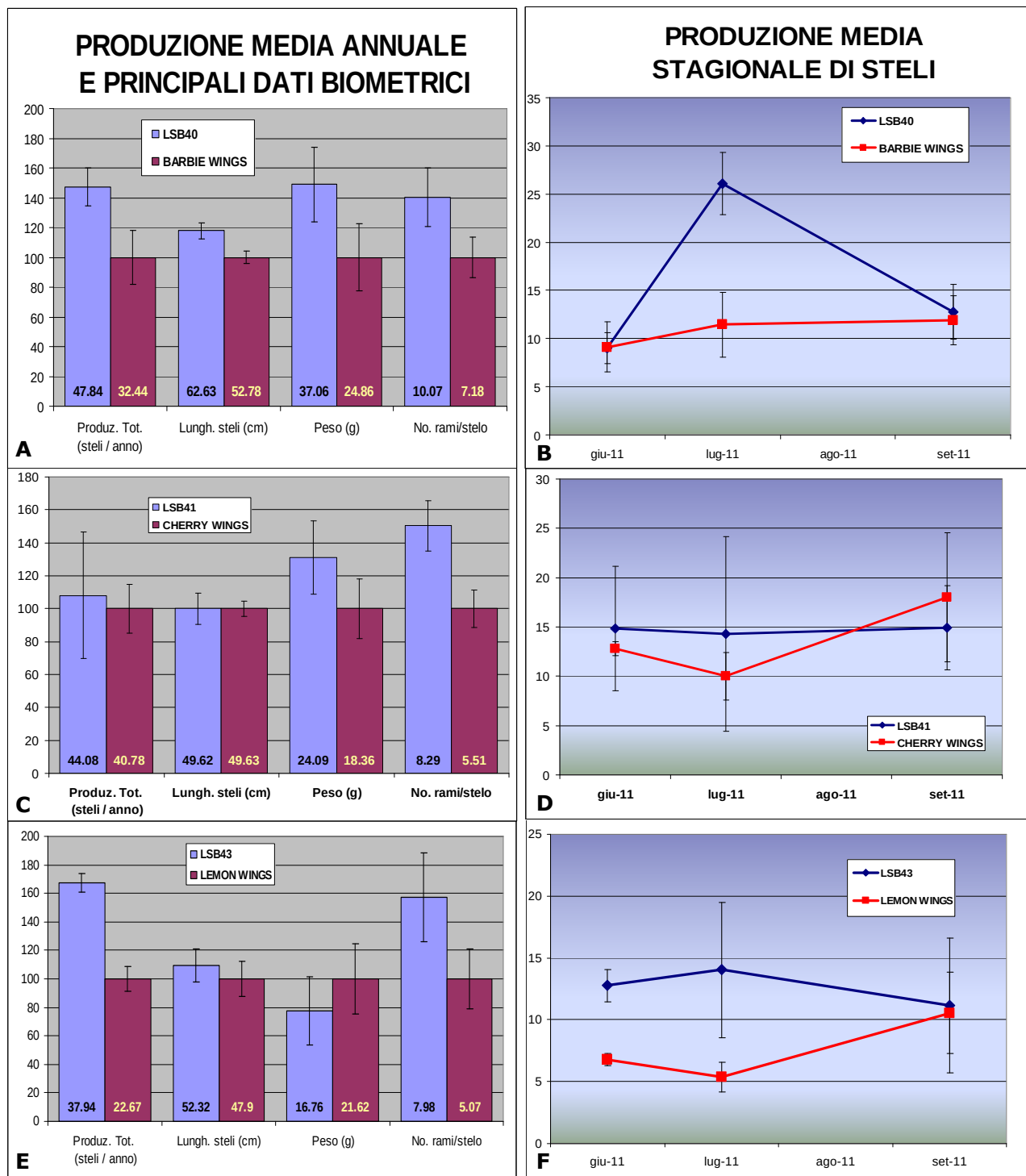


Figura 49 – A, C, E: Produzione media annuale di steli e dati relativi ai principali parametri biometrici a confronto tra i cloni di statiche LSB40, LSB41 e LSB43 e le cv di riferimento ‘Barbie Wings’[®], ‘Cherry Wings’[®] e ‘Lemon Wings’[®]. I dati relativi alle cv di riferimento sono rapportati a 100. I valori assoluti sono riportati alla base dei relativi istogrammi. B, D, F: Dati relativi alla produzione media di steli nella 1°, 2° e 3° raccolta a confronto tra le suddette linee di statiche.

1) Gruppo “limonium”.

Come nel caso degli statici, le piante appartenenti ai cloni LIG15, LIG19, LIS30 ed alle 3 cultivar impiegate come testimoni sono state poste a dimora il 21 aprile 2011. Poiché le specie

e gli ibridi di questo gruppo raggiungono la completa fioritura soltanto l'estate successiva al trapianto, i dati relativi alla produzione media stagionale ed annuale non sono stati valutati (la prova agronomica sarà completata nell'ultimo anno del progetto "NewVarItaly", durante estate 2012). Sui campioni di steli raccolti in ottobre (durante la prima, parziale fioritura di ogni clone), è stato tuttavia possibile raccogliere i dati biometrici e qualitativi illustrati in figura 50 e in tabella 18.

I grafici A, C, E (Fig. 51), mostrano i dati biometrici relativi all'intera infiorescenza (stelo), mentre i grafici D,E,F mostrano i dati relativi alle caratteristiche fiorali. Per facilitare il confronto, avendo a che fare con scale e unità di misura diversificate, i dati riferiti alle cultivar di riferimento 'Safora[®] purple', 'Safora[®] blue' e 'Safora[®] dark blue' sono stati rapportati a 100 (istogrammi di colore violetto). I valori assoluti delle medie e le relative unità di misura sono riportati alla base degli istogrammi.

Per quanto riguarda i rilievi biometrici effettuati sull'intero stelo, i cloni LIG15 e LIS30 hanno fornito risultati nettamente migliori, rispetto ai testimoni, per il peso fresco ($90,4 \pm 20,4$ g contro $20,38 \pm 3,9$ e $77,1 \pm 20,1$ g contro $20,6 \pm 5,8$, rispettivamente) e, in misura minore, per il numero di ramificazioni per stelo ($18,8 \pm 4,02$ contro $12,2 \pm 1,1$ e $16,4 \pm 1,5$ contro $13,2 \pm 1,1$, rispettivamente) e per il diametro del peduncolo alla base ($7,14 \pm 1,25$ contro $4,66 \pm 0,42$ e $6,9 \pm 0,8$ contro $4,0 \pm 0,7$, rispettivamente). L'altezza del peduncolo al primo nodo è invece risultata significativamente maggiore nelle 2 cultivar testimoni 'Safora[®] purple' e 'Safora[®] dark blue'. La cultivar 'Safora[®] purple' ha prodotto anche steli significativamente più lunghi ($75,7 \pm 3,1$ cm contro $62,8 \pm 3,9$) rispetto a LIG15. Dal confronto tra LIG19 e la rispettiva cultivar di riferimento 'Safora[®] blue', il clone selezionato dal CRA-VIV ha prodotto steli mediamente più lunghi e con il primo nodo collocato a un'altezza maggiore dal suolo, mentre per gli altri parametri non sono state riscontrate differenze significative.

Dai rilievi biometrici effettuati sui fiori emerge una netta superiorità del clone LIS30 rispetto alla cultivar di riferimento 'Safora[®] dark blue' per quanto riguarda la densità di fioritura (numero totale di fiori aperti sui 3 cm distali della spiga: $13,4 \pm 2,07$ contro $5,5 \pm 1,52$) ed il parametro assunto a indice di persistenza dell'antesi (rapporto tra il numero di fiori aperti e il numero totale di fiori sui 3 cm distali della spiga: $0,21 \pm 0,05$ contro $0,11 \pm 0,02$); anche il diametro della corolla è risultato leggermente maggiore ($5,66 \pm 0,15$ mm contro $4,84 \pm 0,05$), fornendo un ulteriore contributo alla "ricchezza" complessiva dell'infiorescenza. Al contrario, il clone LIG15 ha prodotto dati di minore qualità rispetto al testimone 'Safora[®] purple' per quanto riguarda la densità di fioritura della spiga ($5,2 \pm 0,84$ contro $9,4 \pm 1,14$), l'indice di persistenza dell'antesi ($0,09 \pm 0,01$ contro $0,23 \pm 0,04$) ed il diametro del calice ($1,86 \pm 0,09$ mm contro $2,9 \pm 0,22$), mentre, per quanto riguarda il diametro della corolla, il dato medio è risultato

migliore ($5,28 \pm 0,08$ mm contro $4,94 \pm 0,25$). In una visione d'insieme, tuttavia, la maggiore robustezza del peduncolo, il maggior numero di rami e le corolle più grandi, conferiscono all'infiorescenza di LIG15 un aspetto più florido e vigoroso rispetto al testimone (Fig. 50) nonostante una minore densità delle singole spighe fiorali. I parametri qualitativi (Tab. 18) non hanno evidenziato differenze di particolare rilievo tra i cloni selezionati dal CRA-VIV ed i rispettivi testimoni, fatta eccezione per una minore presenza di rami sterili nei primi e, limitatamente al clone LIG9, per il profumo meno sgradevole rispetto alla cv 'Safora® blue'.

	LIG19	SAFORA® BLUE	LIS30	SAFORA® DARK BLUE	LIG15	SAFORA® PURPLE
Colore calice	lilla chiaro	lilla	violetto	lilla chiaro	bianco venato	lilla ch. venato
Colore corolla	viola	viola acceso	blu/viola	viola scuro	violetto	viola / porpora
Caducità fiori	scarsissima	scarsissima	scarsa	scarsa	scarsissima	scarsissima
Profumo	molto leggero	sgradevole	Marcato, ma gradevole	leggero	leggero	leggero
Rigidità stelo	rigido	rigido	molto rigido	molto rigido	molto rigido	molto rigido
Rami sterili	quasi assenti	scarsi	quasi assenti	scarsi	quasi assenti	scarsi

Tabella 18 – Parametri biometrici qualitativi, suddivisi in classi, impiegati nella valutazione agronomica dei cloni di *Limonium* LIG19, LIS30 E LIG15 a confronto con le 3 cv rispettivamente impiegate come testimoni (in grigio).



Figura 50 – Confronto tra la conformazione, le combinazioni cromatiche e le dimensioni di infiorescenza e spiga terminale nei cloni di *Limonium* LIG15, LIG19 e LIS30 rispetto alle cv di riferimento 'Safora® purple', 'Safora® blue' e 'Safora® dark blue'.

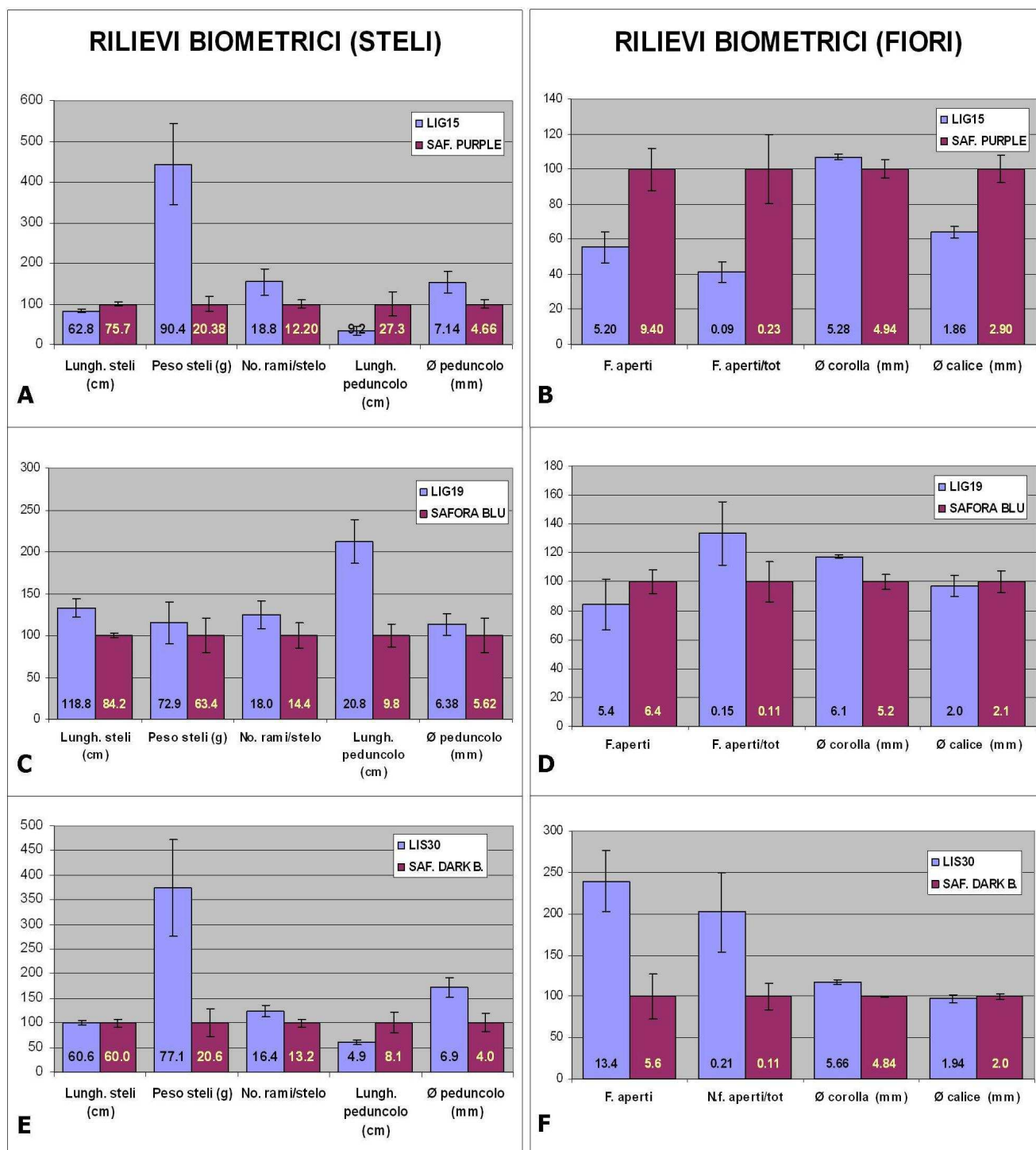


Figura 51 – A, C, E: dati relativi ai principali parametri biometrici rilevati sulle infiorescenze (steli) a confronto tra i cloni LIG15, LIG19 e LIS30 e le cv di riferimento ‘Safora® purple’, ‘Safora® blue’ e ‘Safora® dark blue’. I dati relativi alle cv di riferimento sono rapportati a 100. I valori assoluti sono riportati alla base dei relativi istogrammi. **B, D, F:** dati relativi ai principali parametri biometrici rilevati sui fiori.

4.4. Caratterizzazione molecolare

Un requisito fondamentale per la realizzazione di *fingerprinting* chiari ed affidabili è il livello di purezza ottenuto con l'estrazione del DNA. Sotto questo aspetto, le specie botaniche e, a maggior ragione, gli ibridi di *Limonium*, rappresentano un materiale vegetale di non facile caratterizzazione. La particolare complessità genetica del genere (cfr. paragrafo 1.2.1) in aggiunta alla notevole variabilità di fattori come la consistenza fogliare o la presenza di cere cuticolari, rendono generalmente il DNA di partenza molto eterogeneo, sia sotto il profilo della qualità (per la possibile contaminazione da parte di proteine e polisaccaridi) sia per le rese quantitative. Al fine di limitare al massimo il rischio di restrizioni parziali, con conseguente formazione di artefatti e bande aspecifiche in grado di compromettere l'affidabilità del *fingerprinting*, sono stati applicati protocolli già messi a punto su specie di *Limonium* (Teani, 2011), che hanno consentito di ottenere profili soddisfacenti in tutte le fasi delle analisi AFLP.

Sebbene la presenza di uno specifico passaggio di purificazione tramite colonnine "QIAshredder", comprese nel kit di estrazione, abbia limitato la contaminazione da parte di proteine, come indicato da una limitata presenza di *smear* nei profili elettroforetici ottenuti su gel di agarosio, si è reso necessario effettuare diluizioni differenziate del DNA da sottoporre a restrizione, in quanto le letture al fluorometro indicavano valori eccessivamente eterogenei (Tab. 19).

Per tutti i campioni di DNA i profili elettroforetici di verifica ottenuti dai ristretti/legati hanno mostrato chiaramente la presenza di una banda relativamente netta, con peso molecolare uniforme, che rappresenta i frammenti generati nella fase di restrizione (Fig. 52).

LINEE CLONALI	µg / ml	DILUIZIONE
LIG19	15.4	n.d.
SAFORA BLUE	23.7	1:2
LIG15	18.9	n.d.
SAFORA PURPLE	27.1	1:2
LIS30	39.4	1:3
SAFORA DARK BLUE	33.6	1:3
LSB40	53.9	1:5
'BARBIE WINGS'	58.5	1:5
LSB41	96.4	1:9
'CHERRY WINGS'	142	1:10
LSB43	153	1:10
'LEMON WINGS'	110	1:10

Tabella 19 – Concentrazioni del DNA nei campioni estratti nel dicembre 2011 (letture effettuate con Qubit® 2.0 Fluorometer) e diluizioni effettuate.

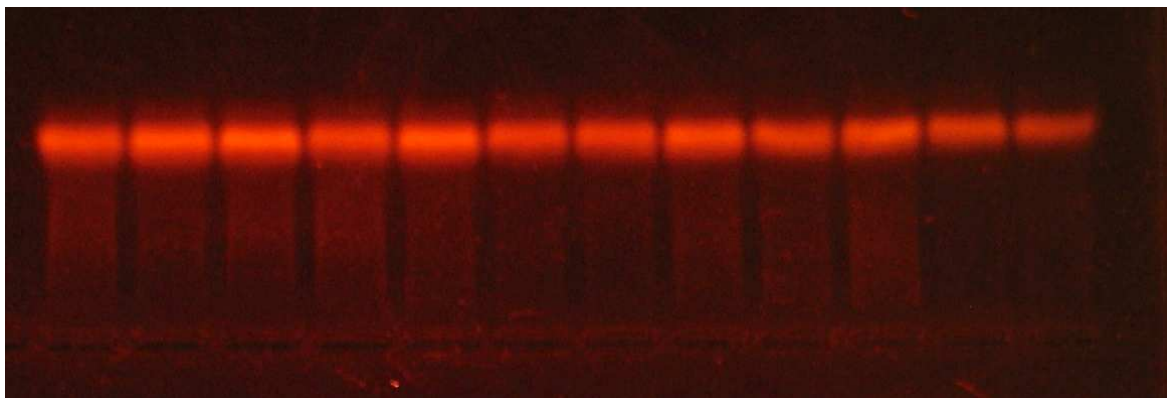


Figura 52 – Profilo elettroforetico di 12 campioni ristretti/legati di *Limonium* su gel di agarosio (0,5%).

Le miscele di preamplificazione e di amplificazione sono state preparate utilizzando una *master mix* già pronta, completa di TAq polimerasi (Qiagen “*Top Taq Master Mix*”), più rapida ed economica (non comportando alcun spreco di reagenti) e meno soggetta a errori in quanto, dovendo operare con singole micropipette, il numero di passaggi si riduce considerevolmente.

I profili elettroforetici di verifica, ottenuti sul gel di agarosio 0,5%, mostrano un *pattern* di bande omogeneo per tutti i campioni, confermando la corretta esecuzione dei cicli di preamplificazione e di amplificazione, senza evidenziare bande aspecifiche imputabili a possibili errori di restrizione (Figg. 53, 54).

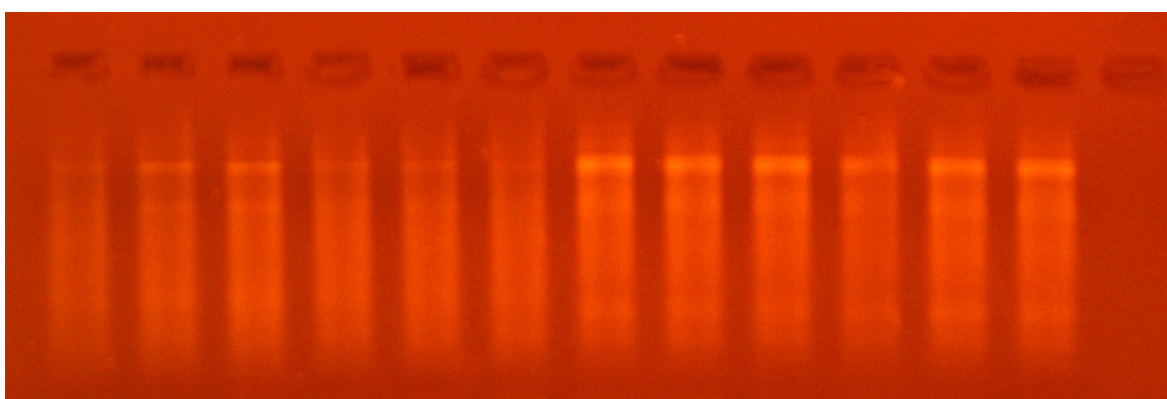


Figura 53 – Profilo elettroforetico dei preamplificati di *Limonium* su gel di agarosio (0,5%).

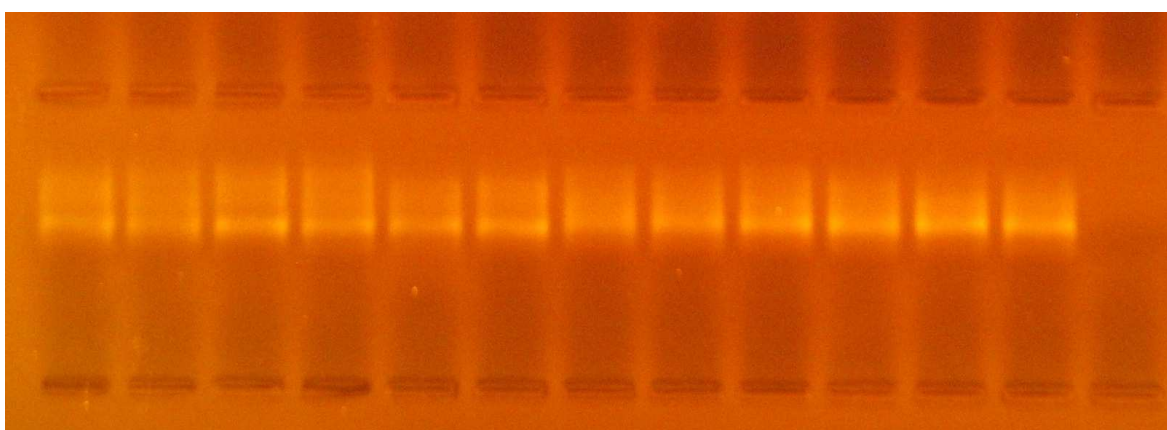


Figura 54 – Profilo elettroforetico degli amplificati di *Limonium* (mix n. 3b, con i campioni di DNA estratti in dicembre 2012) su gel di agarosio (0,5%).

Le corse elettroforetiche verticali su gel di poliacrilammide, colorate con la tecnica del *silver staining*, sono risultate di qualità elevata, con una risoluzione tale da permettere l'individuazione di bande comprese tra 15 e 1000 bp (Fig. 55 A). Tuttavia, per limitare il rischio di includere artefatti o bande aspecifiche nel conteggio delle bande polimorfiche, si è ritenuto opportuno effettuare lo *scoring* in un *range* di sicurezza compreso tra 75 e 500 bp, in accordo con esperienze di *fingerprinting* AFLP su *Limonium* riportate dalla letteratura (Palacios *et al.*, 1999), considerando la presenza comunque elevata di polimorfismi (Fig. 55 B).

Una volta effettuato lo *scoring* di tutti i profili elettroforetici ottenuti dai campioni di DNA estratti nell'agosto 2011, al fine di valutare il grado di informatività delle 6 combinazioni di *primer* testate (Tab. 8), per ogni coppia di genotipi a confronto (clone selezionato / cultivar di riferimento) sono stati conteggiati: il numero totale di bande rilevate; il numero totale di bande polimorfiche; il numero di bande comuni ai due genotipi; il numero di bande polimorfiche esclusive dell'uno o dell'altro genotipo; il rapporto tra il numero dei polimorfismi e il numero delle bande totali ed il relativo valore percentuale (Tab. 20).

Nel *range* preso in considerazione per lo *scoring* (75-500 bp), le 6 coppie di *primer* testate hanno fornito dei polimorfismi per ciascuna delle 6 coppie di genotipi di *Limonium* a cui sono state applicate, in numero variabile da 3 a 36 e con percentuali comprese tra il 5,36% ed 56,25% sul numero totale delle bande, a seconda delle combinazioni (Tab. 20). Complessivamente, le 3 coppie di *primer* risultate maggiormente informative sui 12 cloni analizzati (sia come qualità e numero totale di bande, sia come percentuale di polimorfismi sul totale delle bande) sono risultate la n. 1, la n. 3 e la n. 4 della tabella 8, i cui valori sono stati evidenziati in arancio in tabella 20.

Le suddette coppie di *primer* sono quindi state impiegate per una replica delle analisi AFLP, effettuata in dicembre 2011, su campioni di DNA estratti da piante diverse degli stessi 12 cloni di *Limonium* precedentemente analizzati. I dati ottenuti da questa nuova serie di analisi sono stati trasformati in matrici binarie, e confrontati con i dati ricavati dalla precedente serie di analisi, secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6, allo scopo di verificare il grado di affidabilità e ripetibilità della tecnica applicata.

I risultati sono stati illustrati e discussi separatamente per ciascuna delle coppie di genotipi (clone selezionato / cultivar di riferimento) analizzate.

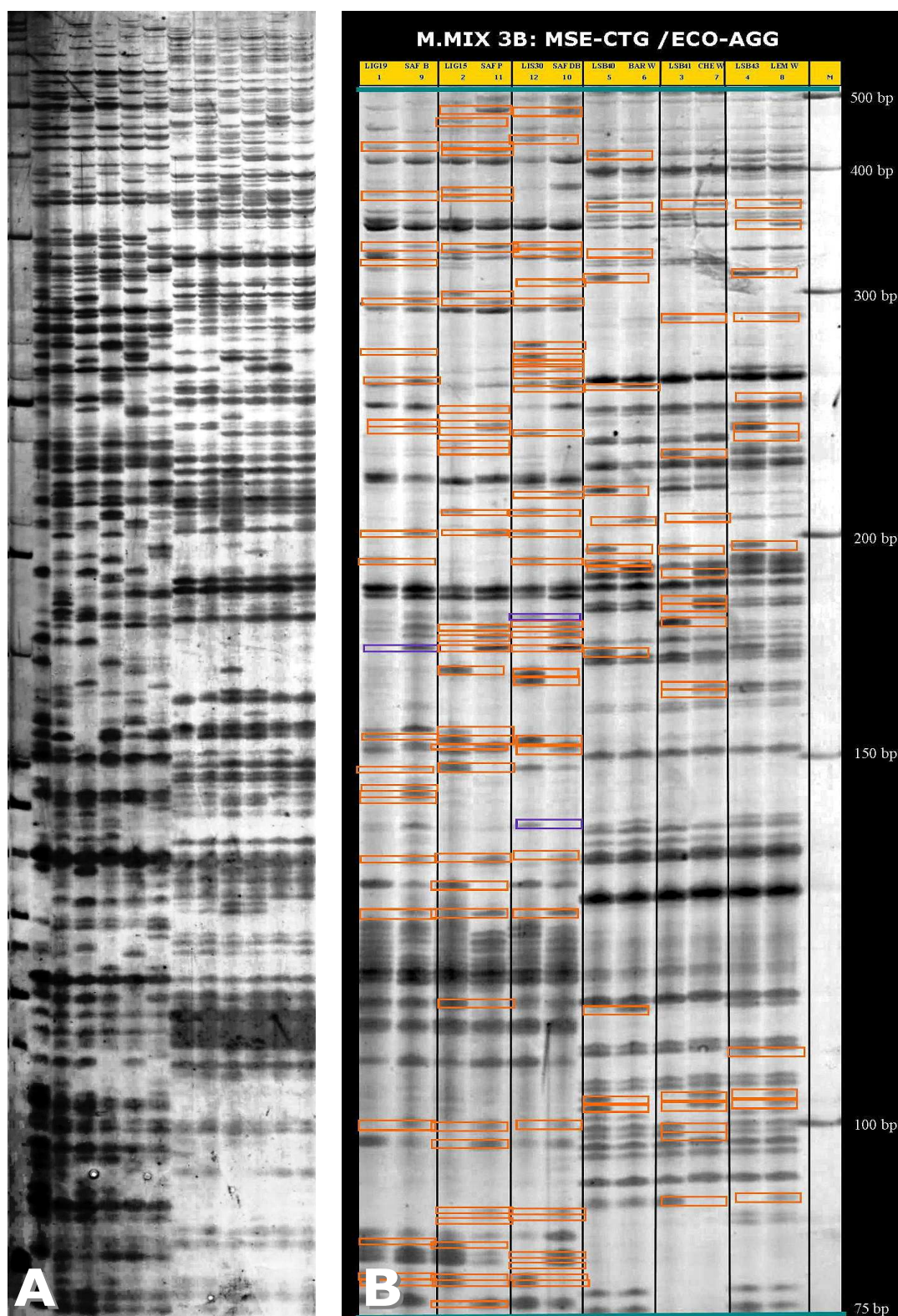


Figura 55 – Esempi di profili elettroforetici di 12 cloni di *Limonium* su gel di poliacrilammide colorati con la tecnica del *silver staining*. A: scansione totale di 12 campioni (estrazione DNA agosto 2011) con la combinazione di *primer* n. 4 (Tab. 8), più il mix di 2 *marker* prodotti da Fermentas (*Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder* e *Gene Ruler™ Ultra Low Range DNA Ladder*) in grado di verificare il peso molecolare delle bande da 10 a 1000 bp (prima colonna a sinistra); B: *scoring* dei polimorfismi all'interno del range 75-500 bp con la combinazione di *primer* n. 3 (Tab. 8). Estrazione DNA del dicembre 2011.

LIG19 / SAFORA BLUE							
COPPIE PRIMER		MSE: CAC ECO: ACT	MSE: CTC ECO: AGT	MSE: CTG ECO: AGG	MSE: CTT ECO: ACC	MSE: CTG ECO: AAC	MSE: CAT ECO: ACA
BANDE (75-500bp)	TOTALI	49	35	67	69	43	56
	COMUNI	24	23	44	38	40	53
	LIG19	13	1	8	9	0	1
	SAFORA® BLUE	12	11	15	22	3	2
N. POLIM. / N. BANDE TOT.		25/49	12/35	23/67	31/69	3/43	3/56
% POLIM. / BANDE TOT.		51,02%	34,29%	34,33%	44,93%	6,98%	5,36%
LIG15 / SAFORA PURPLE							
COPPIE PRIMER		MSE: CAC ECO: ACT	MSE: CTC ECO: AGT	MSE: CTG ECO: AGG	MSE: CTT ECO: ACC	MSE: CTG ECO: AAC	MSE: CAT ECO: ACA
BANDE (75-500bp)	TOTALI	56	34	64	63	44	51
	COMUNI	24	22	28	32	39	45
	LIG15	12	3	17	15	1	5
	SAFORA® PURPLE	5	9	19	16	4	1
N. POLIM. / N. BANDE TOT.		17/56	12/34	36/64	31/63	5/44	6/51
% POLIM. / BANDE TOT.		30,36%	35,29%	56,25%	49,21%	11,36%	11,76%
LIS30 / SAFORA DARK BLUE							
COPPIE PRIMER		MSE: CAC ECO: ACT	MSE: CTC ECO: AGT	MSE: CTG ECO: AGG	MSE: CTT ECO: ACC	MSE: CTG ECO: AAC	MSE: CAT ECO: ACA
BANDE (75-500bp)	TOTALI	59	43	65	62	47	49
	COMUNI	36	30	32	38	44	41
	LIS30	18	6	15	14	1	4
	SAFORA® DARK B.	5	7	18	10	2	4
N. POLIM. / N. BANDE TOT.		23/59	13/43	33/65	24/62	3/47	8/49
% POLIM. / BANDE TOT.		38,98%	30,23%	50,77%	38,71%	6,38%	16,33%
LSB40 / BARBIE WINGS							
COPPIE PRIMER		MSE: CAC ECO: ACT	MSE: CTC ECO: AGT	MSE: CTG ECO: AGG	MSE: CTT ECO: ACC	MSE: CTG ECO: AAC	MSE: CAT ECO: ACA
BANDE (75-500bp)	TOTALI	59	40	61	78	47	54
	COMUNI	48	36	46	68	38	45
	LSB40	5	2	10	3	6	5
	BARBIE WINGS®	6	2	5	7	3	4
N. POLIM. / N. BANDE TOT.		11/59	4/40	15/61	10/78	9/38	9/54
% POLIM. / BANDE TOT.		18,64%	10,00%	24,59%	12,82%	19,15%	16,67%
LSB41 / CHERRY WINGS							
COPPIE PRIMER		MSE: CAC ECO: ACT	MSE: CTC ECO: AGT	MSE: CTG ECO: AGG	MSE: CTT ECO: ACC	MSE: CTG ECO: AAC	MSE: CAT ECO: ACA
BANDE (75-500bp)	TOTALI	49	38	58	65	46	47
	COMUNI	39	32	43	56	28	43
	LSB41	4	0	7	3	10	2
	CHERRY WINGS®	6	6	8	6	8	2
N. POLIM. / N. BANDE TOT.		10/49	6/38	15/58	9/65	18/46	4/47
% POLIM. / BANDE TOT.		20,41%	15,79%	25,86%	13,85%	39,13%	8,51%
LSB43 / LEMON WINGS							
COPPIE PRIMER		MSE: CAC ECO: ACT	MSE: CTC ECO: AGT	MSE: CTG ECO: AGG	MSE: CTT ECO: ACC	MSE: CTG ECO: AAC	MSE: CAT ECO: ACA
BANDE (75-500bp)	TOTALI	66	34	69	70	49	53
	COMUNI	53	26	58	59	39	46
	LSB43	9	2	3	7	4	5
	LEMON WINGS®	4	2	8	4	6	2
N. POLIM. / N. BANDE TOT.		13/66	4/34	11/69	11/70	10/49	7/53
% POLIM. / BANDE TOT.		19,70%	11,76%	15,94%	15,71%	20,41%	13,21%

Tabella 20 – Risultati dello *scoring* dei profili elettroforetici effettuati sui campioni di DNA estratti in agosto 2011, utilizzando 6 diverse combinazioni di *primer* (Tab. 8). Le colonne evidenziate in arancio indicano i valori ottenuti con le combinazioni di *primer* risultate complessivamente più informative.

LIG19 / ‘Safora[®] blue’.

La prima serie di analisi AFLP, su campioni estratti in agosto, ha evidenziato una percentuale di bande polimorfiche particolarmente elevata con tutte e tre le coppie di *primer* selezionate [51,02% con la mix n. 1 (MSE-CAC/ECO-ACT); 34,33% con la mix n. 3 (MSE-CTG/ECO-ACC) e 44,93% con la mix n.4 (MSE-CTT/ECO-ACC), su un numero di bande totali individuate nel *range* 75-500 bp rispettivamente di 49, 67 e 69, come indicato in tabella 20]. I dati della prima estrazione (riportati in tabella 21 nelle prime 2 colonne a sinistra di ciascuna matrice, contrassegnate il numero corrispondente alle combinazioni di *primer* seguito dalla lettera A) sono stati sostanzialmente confermati dalle analisi replicate nel dicembre 2011 (dati riportati nelle due colonne a destra di ciascuna matrice, contrassegnate con la lettera B).

Il numero delle bande polimorfiche non confermati nella replica delle analisi AFLP è risultato estremamente basso (righe evidenziate in rosso in tabella 21): 1 su 25, 1 su 23 e 1 su 31, rispettivamente con le mix 1, 2 e 3). La presenza di un numero non significativo di bande polimorfiche tra le repliche può essere attribuita a frammenti di DNA aspecifici, amplificati dalla taq polimerasi, o all’esistenza di una minima variabilità somaclonale tra individui diversi all’interno dello stesso clone. In ogni caso, la trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” del software *open source* “R” ha confermato la netta separazione tra i profili elettroforetici del clone LIG19 e quelli del clone di controllo Saphora[®] Blue, con valori di “*p-value*” AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*) del 100% (Fig. 56).

LIG15 / ‘Safora[®] purple’.

Anche in questo caso le analisi AFLP effettuate sulla prima serie di campioni (estratti in agosto), hanno evidenziato una percentuale di bande polimorfiche molto elevata con tutte e tre le coppie di *primer* selezionate [30,36% con la mix n. 1 (MSE-CAC/ECO-ACT); 56,25% con la mix n. 3 (MSE-CTG/ECO-ACC) e 49,21% con la mix n.4 (MSE-CTT/ECO-ACC), su un numero di bande totali individuate nel *range* 75-500 bp rispettivamente di 56, 64 e 63, come indicato in Tab. 20]. Con questa combinazione di *primer*, i dati della prima estrazione (riportati nelle prime 2 colonne a sinistra di ciascuna matrice, contrassegnate con la lettera A) in Tab.22, sono stati totalmente confermati dalle repliche del dicembre 2011 (dati riportati nelle due colonne a destra di ciascuna matrice, contrassegnate con la lettera B).

La trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” ha confermato la netta separazione tra i profili elettroforetici del clone LIG15 e quelli del clone di controllo ‘Safora[®] purple’, con valori di “*p-value*” AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*) del 100% (Fig. 56).

LIS30 / ‘Safora[®] dark blue’

Come per i cloni precedenti, le analisi AFLP effettuate sulla prima serie di campioni hanno evidenziato una percentuale di bande polimorfiche molto elevata con tutte e tre le coppie di *primer* selezionate [39,38% con la mix n. 1 (MSE-CAC/ECO-ACT); 50,77% con la mix n. 3 (MSE-CTG/ECO-ACC) e 38,71% con la mix n.4 (MSE-CTT/ECO-ACC), su un numero di bande totali individuate nel *range* 75-500 bp rispettivamente di 59, 65 e 62, come indicato in Tab. 20]. Con le combinazioni di *primer* n. 1 e n. 4 i dati della prima estrazione sono stati totalmente confermati dalle repliche del dicembre 2011, mentre con la mix n. 3 sono state riscontrate appena 2 bande polimorfiche tra le repliche (righe evidenziate in rosso, in Tab. 23), contro 33 su 65 tra il campione ed il testimone. La trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” ha confermato la netta separazione tra i profili elettroforetici del clone LIS30 e quelli di ‘Safora® dark blue’, per tutte e tre le combinazioni di *primer* valutate, con valori di “*p-value*” AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*) del 100% (Fig. 56).

LSB40 / ‘Barbie Wings’®

Le analisi AFLP effettuate sulla prima serie di campioni del gruppo degli statici hanno evidenziato una percentuale di bande polimorfiche mediamente inferiore rispetto agli altri genotipi di *Limonium*. Nel caso della coppia LSB40 / ‘Barbie Wings’®, con la mix n. 1 (MSE-CAC/ECO-ACT) è stata riscontrata una percentuale di polimorfismi pari al 18,64% delle bande; la percentuale è salita al 24,59% con la mix n. 3 (MSE-CTG/ECO-ACC) e si è fermata al 12,82% con la mix n.4 (MSE-CTT/ECO-ACC), su un numero di bande totali individuate nel *range* 75-500 bp rispettivamente di 59, 61 e 78, (Tab. 20). Con la combinazioni di *primer* n. 4 i dati della prima estrazione sono stati totalmente confermati dalle repliche del dicembre 2011, mentre con le mix n. 1 e n. 3 è stata osservata una banda polimorfica tra le repliche (righe evidenziate in rosso, in Tab. 24), contro 11 e 15 polimorfismi osservati tra il campione ed il testimone. La trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” ha comunque confermato la netta separazione tra i profili elettroforetici del clone LSB40 e quelli di ‘Barbie Wings’®, per tutte e tre le combinazioni di *primer* valutate, con valori di “*p-value*” AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*) del 100% (Fig. 56).

LSB41 / ‘Cherry Wings’®

Per la coppia LSB41 / ‘Cherry Wings’® le analisi AFLP effettuate sui campioni estratti in agosto hanno evidenziato, con la mix n. 1 (MSE-CAC/ECO-ACT), una percentuale di bande polimorfiche pari al 20,41% delle bande; anche in questo caso la percentuale è salita (attestandosi al 25,86%) con la mix n. 3 (MSE-CTG/ECO-ACC) per scendere di nuovo (13,85%) con la mix n.4 (MSE-CTT/ECO-ACC), su un numero di bande totali individuate nel *range* 75-500 bp rispettivamente di 49, 58 e 65 (Tab. 20). Con la combinazioni di *primer* n. 3 i

dati della prima estrazione sono stati totalmente confermati dalle repliche del dicembre 2011, mentre con le mix n. 1 e n. 4 sono state osservate rispettivamente 1 e 3 bande polimorfiche tra le repliche (righe evidenziate in rosso, in Tab. 25), contro 15 e 9 polimorfismi osservati tra il campione ed il testimone. La trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” ha comunque confermato, anche in quest’ultimo caso, la netta separazione tra i profili elettroforetici del clone LSB41 e quelli di ‘Cherry Wings’[®], per tutte e tre le combinazioni di *primer* valutate, con valori di “*p-value*” AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*) del 100% (Fig. 56).

LSB43 / ‘Lemon Wings’[®]

Nel caso della coppia LSB43 / ‘Lemon Wings’[®], con la mix n. 1 (MSE-CAC/ECO-ACT) è stata osservata una percentuale di polimorfismi pari al 19,7% delle bande; la percentuale è scesa al 15,94% con la mix n. 3 (MSE-CTG/ECO-ACC) per attestarsi al 15,71% con la mix n.4 (MSE-CTT/ECO-ACC), su un numero di bande totali individuate nel *range* 75-500 bp rispettivamente di 66, 69 e 70, (Tab. 20). I dati ottenuti dalla prima estrazione sono stati ampiamente confermati dalle repliche del dicembre 2011, con la presenza di un solo polimorfismo tra le repliche con le mix n. 1 e n. 3 (righe evidenziate in rosso, in Tab. 26), contro 13 e 11 polimorfismi osservati tra il campione ed il testimone, e di 4 polimorfismi contro 11 con la mix n. 4. La trasformazione in *cluster* gerarchici realizzati con il pacchetto “PVCLUST” ha comunque confermato, anche in quest’ultimo caso, la netta separazione tra i profili elettroforetici del clone LSB43 e quelli di ‘Lemon Wings’[®] per le tre le combinazioni di *primer* valutate, con valori di “*p-value*” AU (*Approximately Unbiased*) e BP (*Probability Bootstrap*) del 100% , tranne che nella ripetizione di LSB43 con la Mix n. 4 (AU 81%) e nella ripetizione di ‘Lemon Wings’[®] con la Mix n. 3 (AU 76%, Fig. 56).

L’esistenza di un più elevato numero di bande polimorfiche tra i profili elettroforetici di individui appartenenti allo stesso clone in genotipi di statiche, rispetto ad altre specie di *Limonium*, può essere dovuta a una maggiore tendenza alla formazione di frammenti di DNA aspecifici. Infatti, con tutte le combinazioni di *primer* valutate, negli statici è stata riscontrata una presenza di *smear* e di *background* più consistente rispetto ad altri cloni di *Limonium*. Un analogo comportamento è stato osservato anche con gli statici botanici (Teani, 2011). D’altra parte, la presenza di un minor numero di polimorfismi tra i cloni di statiche LSB40, LSB41, LSB43 e i rispettivi testimoni (‘Barbie Wings’[®], ‘Cherry Wings’[®] e ‘Lemon Wings’[®]), rispetto a quelli osservati tra i diversi cloni del gruppo “*L. gmelinii*-*altaica*-*serotinum*” può essere imputata a una maggiore omogeneità genetica del materiale vegetale di partenza: infatti, sia le cultivar, sia le selezioni del CRA-VIV, derivano comunque da incroci tra *L. sinuatum* ed *L. bonduellei* (gli unici in grado di garantire l’assortimento cromatico tipico delle varietà di

statiche), mentre, per le altre varietà di *Limonium* le possibili combinazioni genetiche sono più numerose.

bp	MIX1A		MIX1B	
	LIG19	SAF B	LIG19	SAF B
500	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
400	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
300	1	0	1	0
	1	0	1	0
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	0	1	0
	1	0	1	0
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	0	1	0
	1	0	1	0
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

bp	MIX3A		MIX3B	
	LIG19	SAF B	LIG19	SAF B
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	0	1	0
400	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
300	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
150	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

bp	MIX4A		MIX4B	
	LIG19	SAF B	LIG19	SAF B
500	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	0	1	0	1
400	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
300	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

Tabella 21 – Matrici binarie dei polimorfismi (righe gialle e verdi) ottenuti tra i profili elettroforetici di LIG19 e ‘Safora® blue’, in 2 repliche effettuate con campioni distinti di DNA (A e B) e 3 diverse combinazioni di primer (Mix 1, 3 e 4). Le righe evidenziate in rosso indicano i polimorfismi riscontrati tra le repliche.

	MIX1A		MIX1B	
	LIS30	SAF DP	LIS30	SAF DP
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
400	0	1	0	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
300	0	1	0	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
150	0	1	0	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

Tabella 23 – Matrici binarie dei polimorfismi (righe gialle e verdi) ottenuti tra i profili elettroforetici di LIS30 e ‘Safora® dark blue’ in 2 repliche effettuate con campioni distinti di DNA (A e B) e 3 diverse combinazioni di *primer* (Mix 1, 3 e 4). Le righe evidenziate in rosso indicano i polimorfismi riscontrati tra le repliche nella combinazione di *primer* n. 3.

	MIX1A		MIX1B	
	LSB40	BAR W	LSB40	BAR W
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	0	0	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
400	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

	MIX3A		MIX3B	
	LSB40	BAR W	LSB40	BAR W
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
400	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	0	1	0
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
150	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

	MIX4A		MIX4B	
	LSB40	BAR W	LSB40	BAR W
500	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	0	1	0	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
300	1	0	1	0
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
150	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

Tabella 24 – Matrici binarie dei polimorfismi (righe gialle e verdi) ottenuti tra i profili elettroforetici di LSB40 e ‘Barbie Wings®’ in 2 repliche effettuate con campioni distinti di DNA (A e B) e 3 diverse combinazioni di *primer* (Mix 1, 3 e 4). Le righe evidenziate in rosso indicano i polimorfismi riscontrati tra le repliche.

	MIX1A		MIX1B	
	LSB41	CHE W	LSB41	CHE W
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	0	1	0	0
	1	1	1	1
400	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	0	1	0	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	0	1	0
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	0	1	0
	1	0	1	0
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

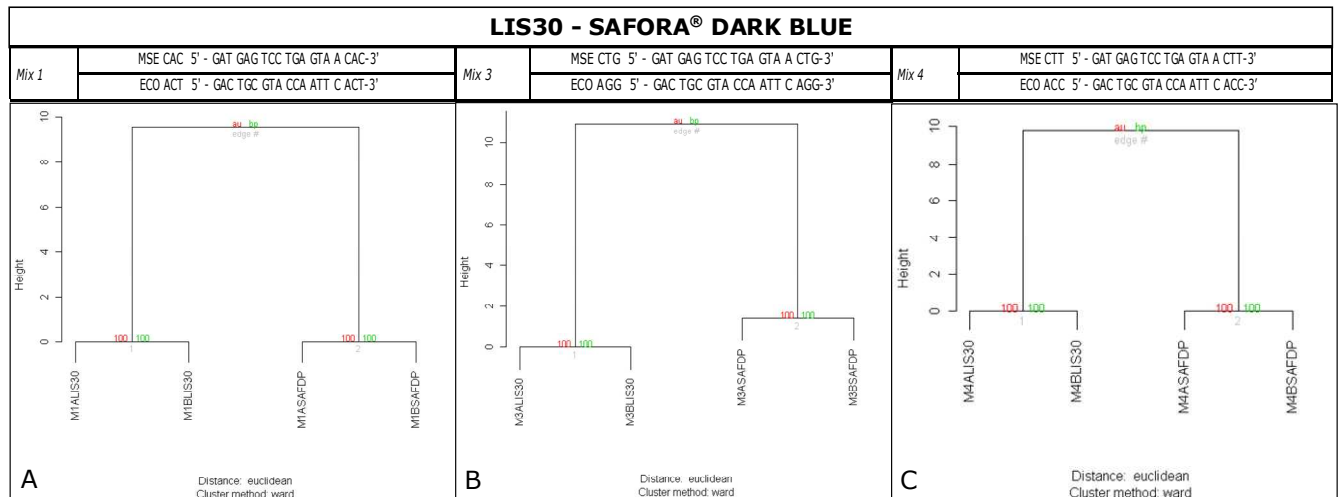
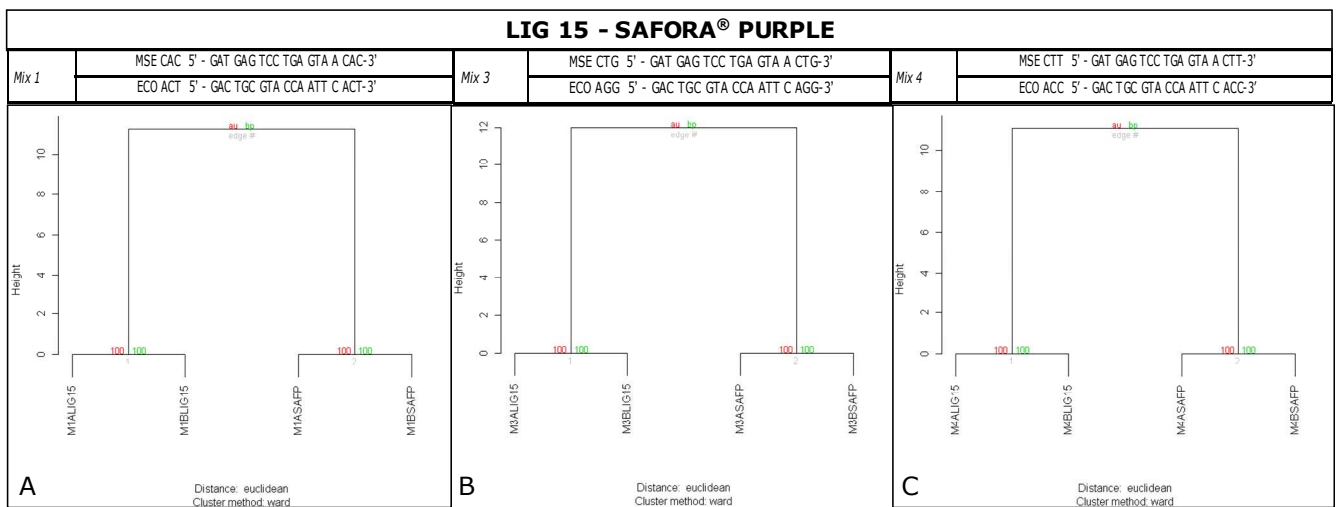
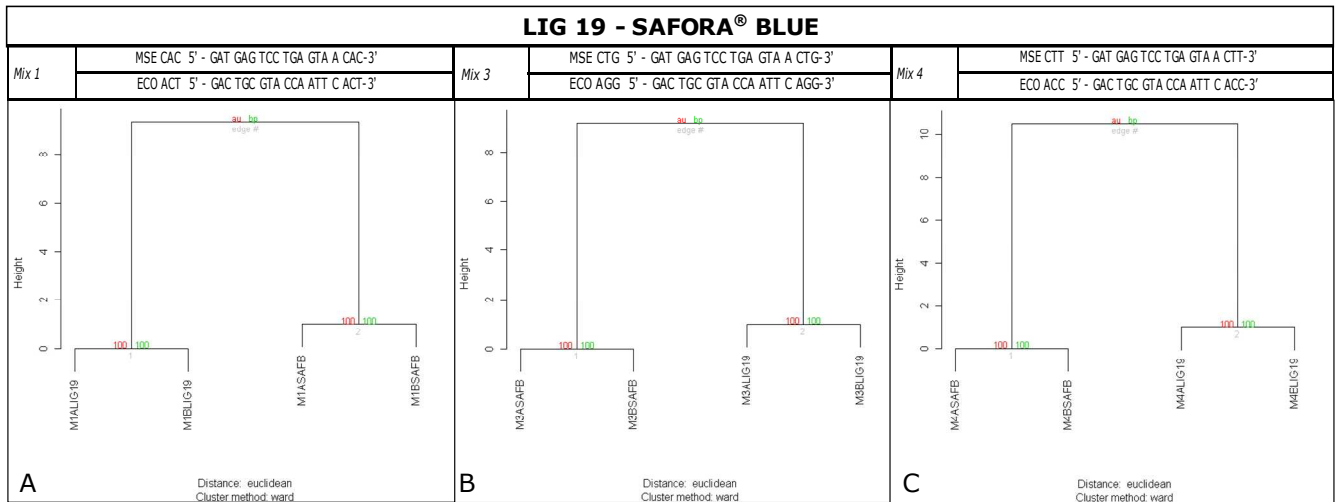
	MIX3A		MIX3B	
	LSB41	CHE W	LSB41	CHE W
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
400	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	0	1	0
150	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

	MIX4A		MIX4B	
	LSB41	CHE W	LSB41	CHE W
500	1	1	1	1
	0	1	0	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
400	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

Tabella 25 – Matrici binarie dei polimorfismi ottenuti tra i profili elettroforetici di LSB41 e ‘Cherry Wings®’ in 2 repliche effettuate con campioni distinti di DNA (A e B) e 3 diverse combinazioni di *primer* (Mix 1, 3 e 4). Le righe evidenziate in rosso indicano i polimorfismi riscontrati tra le repliche.

	MIX1A		MIX1B	
	LSB43	LEM W	LSB43	LEM W
500	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
400	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
300	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
200	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
150	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
100	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
75	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1

Tabella 26 – Matrici binarie dei polimorfismi ottenuti tra i profili elettroforetici di LSB43 e ‘Lemon Wings®’, in 2 repliche effettuate con campioni distinti di DNA (A e B) e 3 diverse combinazioni di *primer* (Mix 1, 3 e 4). Le righe evidenziate in rosso indicano i polimorfismi riscontrati tra le repliche.



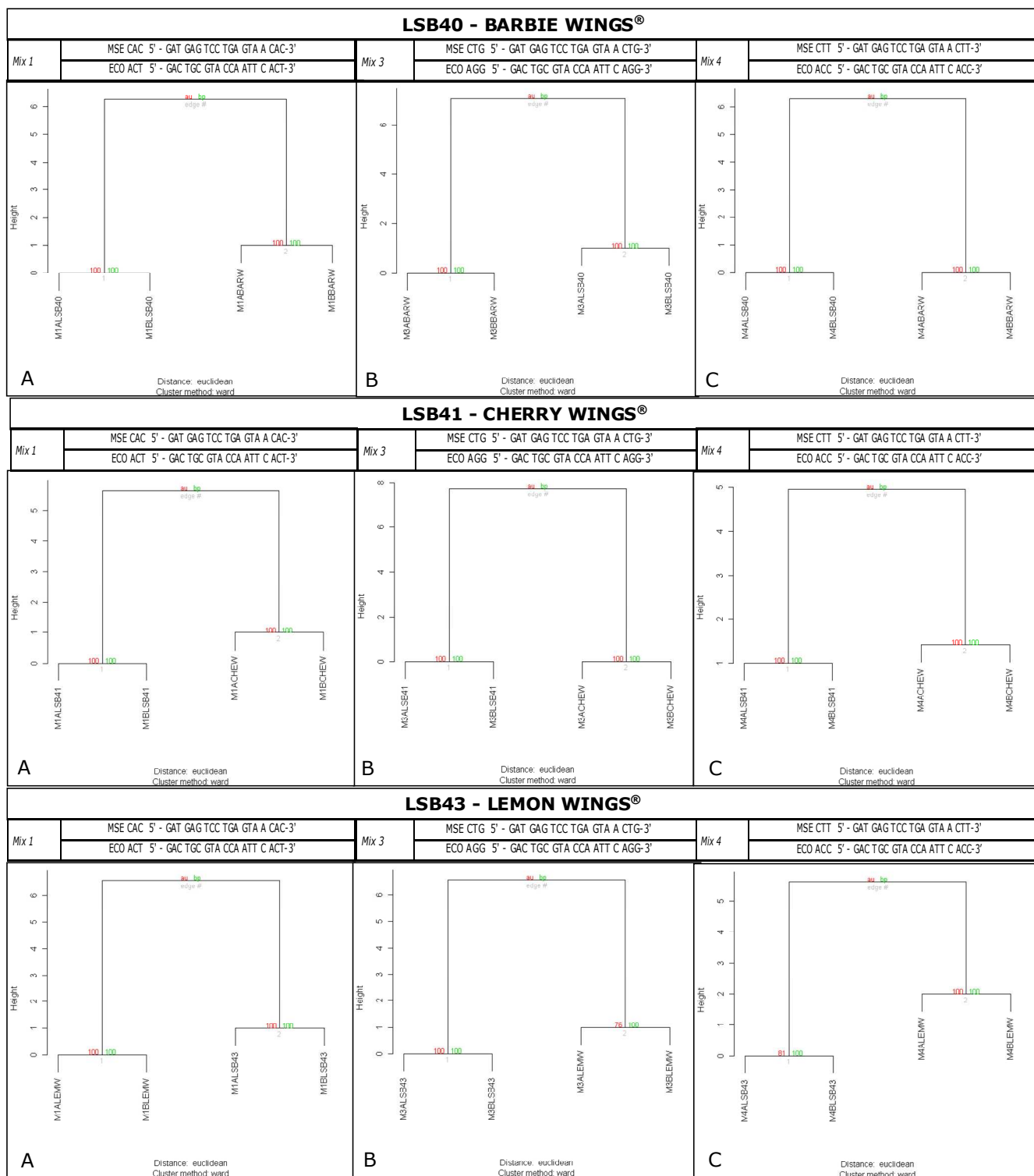


Figura 56 – Cluster gerarchici tra i profili elettroforetici dei 6 cloni di *Limonium* selezionati presso il CRA-VIV e delle rispettive cv impiegate come testimoni. I grafici sono stati realizzati con il pacchetto “PVCLUST” del software open source “R”. I valori di AU (in rosso) e BP (in verde) indicano il grado di rispondenza dei grafici con i dati di riferimento mediante 2 distinti metodi di elaborazioni del “p-value”: *Approximately Unbiased* e *Probability Bootstrap*.

Capitolo 5

CONCLUSIONI

In accordo con gli obiettivi del progetto “NewVarItaly”, la presente ricerca ha permesso di individuare efficaci protocolli per tutte le fasi della micropropagazione (dalla messa in coltura all’ambientamento) relativamente a 6 ibridi di *Limonium* di nuova costituzione, ritenuti idonei per un’immediata valorizzazione commerciale e, al tempo stesso, rappresentativi di altre linee clonali della collezione del CRA-VIV appartenenti alle stesse tipologie per quanto riguarda l’attitudine alla propagazione *in vitro*. Per i suddetti ibridi è stata anche messa a punto una tecnica di caratterizzazione molecolare (*fingerprinting*), mediante marcatori AFLP, rivelatasi altamente informativa ed affidabile.

L’approccio della ricerca è stato in ogni sua fase pragmatico, teso all’ottenimento di risultati direttamente fruibili dall’Azienda proponente, in accordo con lo spirito dei progetti del Bando Imprese Florovivaistiche (D.M.186/2007).

La formulazione di substrati a base LS (*Linsmaier & Skoog Medium*) è risultata più idonea rispetto alla formula MS (*Murashige & Skoog Medium*) sia per la moltiplicazione che per la radicazione *in vitro* non solo dei cloni di statiche (come già suggerito dalla letteratura scientifica), ma anche relativamente ai cloni LIG15, LIG19 e LIS30, ibridi attribuibili alle specie *L. gmelinii*, *L. altaica* e *L. serotinum*. Oltre a fornire, in alcuni casi, risultati migliori in termini di sviluppo, moltiplicazione e radicazione dei germogli rispetto ai substrati a base MS, questa formulazione risulta più economica e di più facile preparazione, in quanto priva di alcune vitamine risultate inessenziali. Sebbene siano state individuate le combinazioni ormonali e vitaminiche specifiche per una moltiplicazione e una radicazione ottimale di ciascuno dei 6 cloni selezionati, se richiesto dalla pratica di laboratorio, entro certi limiti il substrato denominato “L3” può essere efficacemente impiegato come substrato “universale” per la moltiplicazione *in vitro* di tutti i genotipi di *Limonium* impiegati nella presente ricerca, con rese soddisfacenti in termini di tasso di moltiplicazione. In generale, considerando la resa elevata di germogli ben sviluppati già in fase di moltiplicazione, con i protocolli messi a punto su *Limonium* non è necessario far precedere la radicazione da una fase di allungamento.

Per promuovere efficacemente la fase di radicazione *in vitro*, le auxine IAA ed IBA si sono rivelate in generale più efficaci dell’NAA su tutte le linee clonali di *Limonium* impiegate. Nel caso degli statici, tuttavia, una marcata tendenza all’iperidricità (probabilmente correlata alla concentrazione delle citochinine nel mezzo di moltiplicazione) può limitare sensibilmente la qualità e la percentuale di germogli radicati, con gravi ripercussioni a livello produttivo. Una

strategia da valutare caso per caso potrebbe consistere nell'effettuare, prima della radicazione, un passaggio su un substrato privo di ormoni, con effetto “drenante” sulla promozione della vitrescenza operata dalle citochinine.

Gli esperimenti preliminari di radicazione *in vitro* in presenza di ABA, effettuati allo scopo di migliorare la risposta dei germogli allo stress idrico durante la fase di acclimatazione, hanno confermato l'efficacia dell'acido abscissico nella regolazione dell'attività stomatica, ma non hanno prodotto effetti significativi sulla vitalità dei germogli in fase di ambientamento. In futuro saranno imbastite prove più mirate, variando ulteriormente la concentrazione di ABA nel mezzo di radicazione, differenziando la stagionalità della fase di ambientamento e valutando l'efficacia di composti sintetici alternativi all'ABA (un prodotto molto costoso ed estremamente fotolabile) in grado di indurre uno stato di stress idrico controllato durante la radicazione (a esempio la *pirobactina*).

Le prove di ambientamento in tunnel sotto serra ombreggiata hanno prodotto il 100% di piantine ben radicate e vitali, in tutte le linee clonali e su tutte le miscele di substrati testate. Tuttavia, sono stati ottenuti risultati significativamente migliori nel grado di sviluppo dei germogli (valutato mediante l'analisi colorimetrica delle foglie e la misurazione delle concentrazioni di clorofilla “a” e “b”, del peso fresco e secco degli apparati fogliari e radicali e dell'area fogliare) ambientati su una miscela priva di torba (denominata “BCA”), a base di clinoptinolite (un minerale appartenente alla famiglia delle zeoliti), di agriperlite e di “Biomax”, un *compost* di qualità ottenuto dalla fermentazione di residui della lavorazione dell'orzo. I risultati dimostrano che non soltanto è possibile ambientare con successo le nuove costituzioni di *Limonium* su substrati *peat-free*, di particolare rilevanza ecologica, ma che la qualità finale delle piante ne risulta addirittura migliorata. Sebbene il *compost* “Biomax” sia tuttora in fase sperimentale, senza un prezzo di riferimento per il mercato, la miscela “BCA” avrà probabilmente costi superiori rispetto ai terricci tradizionali a base di torba e agriperlite utilizzate in floricoltura. Bisogna tuttavia considerare che le particolari caratteristiche organiche e fisico-chimiche del “Biomax” e della clinoptinolite, non necessitano dell'aggiunta di ammendanti o di concimazioni, garantendo una migliore disponibilità idrica e di nutrienti all'apparato radicale in fase di sviluppo, e consentono di dilazionare la fase di trapianto senza arrestare la crescita delle piantine.

Durante il terzo ed ultimo anno del progetto di riferimento “NewVarItaly” (estate 2012), saranno portate a termine le prove agronomiche per quei genotipi che giungono a completo regime produttivo solo a partire dal secondo anno dall'impianto. L'esito delle prove realizzate finora, tuttavia, ha già evidenziato aspetti di sicuro interesse e caratteri di novità, per le 6 linee clonali selezionate, poste a confronto con altrettante varietà appartenenti alla stessa tipologia

commerciale. Tali aspetti riguardano sia la produttività annuale (per i cloni selezionati di statiche), sia caratteristiche estetiche (colore di calice e corolla, densità e struttura delle infiorescenze) sia parametri biometrici (diametro, peso e lunghezza degli steli, numero di ramificazioni, dimensioni dei fiori, *etc.*).

Viste le potenzialità di sfruttamento commerciale immediato delle 6 linee di *Limonium* selezionate, in ottemperanza agli obiettivi del progetto, è stato messo a punto un protocollo di *fingerprinting* molecolare mediante l'uso di marcatori AFLP. Sono state individuate 3 coppie di *primer* in grado di produrre un elevato numero di poliformismi nei profili elettroforetici del DNA delle nuove costituzioni di *Limonium* poste a confronto con le 6 cultivar utilizzate come testimoni nelle prove agronomiche, a conferma dell'elevata sensibilità del protocollo impiegato. La sostanziale identità dei profili ottenuti tra 2 individui distinti all'interno dello stesso clone, con tutte e tre le combinazioni di *primer*, dimostra che il *fingerprinting* ottenuto mediante marcatori AFLP è affidabile e ripetibile, oltre che altamente informativo. I *fingerprinting* così ottenuti potranno valere come documentazione accessoria da presentare congiuntamente alle schede tecniche richieste dal CPVO per la domanda di privativa comunitaria per i ritrovati vegetali. Una volta ottenuta la privativa, inoltre, rappresenteranno per l'Azienda proponente un valido strumento di difesa contro eventuali contraffazioni ed attività di propagazione e di sfruttamento commerciale illegittime.

Capitolo 6

ATTIVITA' COLLATERALI

Allo scopo di verificare la presenza dei patogeni *Peronospora statice*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloesporioides* nella collezione di linee clonali selezionate di *Limonium* del CRA-VIV, in collaborazione con il dr. Domenico Rizzo del Laboratorio Servizio Fitosanitario Regionale della Regione Toscana, sono state effettuate osservazioni microscopiche su 74 campioni fogliari di 20 diverse varietà (sintomatici ed asintomatici) preventivamente incubati in camera umida.

Dal materiale vegetale è stato estratto il DNA attraverso un protocollo basato sul CTAB 3% modificato. Per la diagnosi dei funghi di cui sopra sono stati utilizzati dei protocolli per uno *screening* per ITS4/6 (*Peronospora statice* - PCR end point), *Colletotrichum gloesporioides* (PCR end point) e *Botrytis cinerea* (PCR Real Time_SybrGreen).

I risultati emersi dalle analisi micologiche, oltre a confermare la presenza di conidiofori ascrivibili al genere *Botrytis*, hanno evidenziato l'assenza di miceli fungini in un considerevole numero di cloni per lo più appartenenti alle specie *L. gmelinii*, *L. altaica*, *L. serotinum* e a ibridi tra queste specie, tra cui LIG19 e LIS30, come mostrato in Tab.27.

CLONE	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	ITS4/6 (<i>Peronospora statice</i>)
LIG15	+	-	+
LIS30	-	-	+
LIG19	-	-	+

Tabella 27 – Sensibilità a tre funghi patogeni di 3 linee selezionate di *Limonium* presenti nella collezione del CRA-VIV.

Capitolo 7

DIVULGAZIONE

Comunicazioni orali:

ANTONETTI M., BURCHI G., 2009. *Protocolli per la micropropagazione su larga scala di nuove costituzioni di Limonium Miller*. Workshop Progetti di Dottorato su “*Tecnologie In Vitro Applicate Alle Piante*”, (Milano 22 ottobre 2009).

ANTONETTI M., BURCHI G., TEANI A., CACINI S., PACIFICI S., MERCURI A., DE BENEDETTI L., 2012. *Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana: Limonium spp.*. Convegno: “Miglioramento genetico e valorizzazione di nuovi genotipi nel florovivaismo italiano - I contributi dal bando MiPAAF “Imprese Florovivaistiche” (D.M. 186/2007)”, (Pescia, PT, 13 marzo 2012).

Poster:

ANTONETTI M., TEANI A., BURCHI G., 2009. *Valorizzazione commerciale e conservazione di germoplasma del genere Limonium Miller*. In: “Piante Mediterranee - Le potenzialità del territorio e dell'ambiente” - IV Convegno Nazionale (Nova Siri Marina, MT, 7 - 10 ottobre 2009). Edizione a cura di Giulio Sarli, Arturo Alvino, Claudio Cervelli. Pagg. 133-144.

ANTONETTI M., TEANI A. E BURCHI G., 2010. *Protocolli per la micropropagazione su larga scala di nuove costituzioni di Limonium Miller*. IX “Giornate Scientifiche SOI” (Firenze, 10-11-12 Marzo 2010).

ANTONETTI M., CACINI S., PACIFICI S., BURCHI G., 2011. *Sviluppo di protocolli di propagazione in vitro ed ambientamento per nuove costituzioni di Limonium*. 2° Convegno Nazionale sulla micropropagazione (Sanremo, IM – 7-9 /11/ 2011).

BURCHI G., ANTONETTI M., 2011. *Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana (NewVarItaly)*, (Flormart, Padova 2011).

RIZZO D., BURCHI G., STEFANI L., PAOLI M., ANTONETTI M., TEANI A., HAEGI, A., GRASSOTTI A., 2011. *Phytopathological survey for the main plant diseases of Limonium spp.* XVII Convegno Nazionale Società Italiana di Patologia Vegetale (Bologna 12 - 14 Settembre 2011).

RIZZO D., BURCHI G., STEFANI L., PAOLI M., ANTONETTI M., TEANI A., HAEGI, A., GRASSOTTI A., 2012. *Varietal susceptibility to main fungal diseases in several genotypes of Limonium spp.* XI International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials (Antalya, Turchia, 28 marzo – 1 aprile 2012).

Articoli scientifici:

ANTONETTI M., BURCHI G., TEANI A., CACINI S., PACIFICI S., MERCURI A., DE BENEDETTI L., 2012. *Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana: Limonium spp.* Acta Italus Hortus, 4-12: 95-103.

TEANI A., ANTONETTI M., BARTOLINI L., BURCHI G., CAMUSSI A., 2010. *Comparison of biometric and molecular techniques for the identification of new Limonium spp. hybrids.* Advances in Horticultural Science 24 (4): 233-242.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- AGARWAL M., SHRIVASTAVA N., PADH H., 2008. *Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences*. Plant Cell Rep 27: 617-631.
- AGUILAR M. L., ESPADAS F. L., COELLO J., MAUST B. E., TREJO C., SANTAMARIA M. L., SANTAMARIA J. M., 2000. *The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated Tagetes erecta plants when transferred directly to the field* Journal of Experimental Botany Vol. 51 No. 352 pp. 1861-1866.
- AMO-MARCO J.B., IBAÑEZ M.R., 1998. *Micropropagation of Limonium cavanillesii Erben, a threatened static, from inflorescence stems*. Plant growth regulation, 24 (1): 49-54.
- ANTONETTI M., BURCHI G., TEANI A., CACINI S., PACIFICI S., MERCURI A., DE BENEDETTI L., 2012. *Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana: Limonium spp.* Acta Italus Hortus, 4-12: 95-103.
- ANTONETTI M., MERCATELLI E., BURCHI G., 2009. *Valutazione agronomica di nuove linee di statiche di origine intra/interspecifica [Limonium sinuatum MILL., L. bonduellei (LESTIB.) O. KUNTZE, L. bonduellei x sinuatum]*. Colture Protette, 4-09. 56-62.
- ANTONETTI M., PASQUALETTO P-L., 2000. *La coltivazione delle nuove varietà di Limonium "Griffe Meristema®"* Flortecnica 5: 111-113.
- ARMITAGE A.M., 1993. *Specialty Cut Flowers*. Varsity Press/Timber Press. Portland, Oregon. Pagg.209.215.
- ARMSTRONG H., 2004. *No response to bio-alternative for peat*. FlowerTech 7 (3): 24-25.
- ARRIGONI P.V., DIANA S., 1999. *Karyology, chorology and bioecology of the genus Limonium. (Plumbaginaceae) in Sardinia*. Plant Biosystem, 133 (1): 63-71.
- BARBIERI G., DE PASCALE S., PARADISO R., FARINA E., DALLA GUDA C., CERVELLI C., SCORDO E. 2000. *Tecniche di produzione e coltivazione dei Limonium ornamentali*. Flortecnica 5: 89-94.
- BORRELLI C., 2011. *Statiche programmato* Clamer informa pp. 17-25.
- BRAGLIA L., BRUNA S., LANTERI S., MERCURI A., PORTIS E., 2010. *An AFLP-based assessment of the genetic diversity within Hibiscus rosa-sinensis and its place within the Hibiscus genus complex*. Scientia Horticulturae 123: 372-378.

- BRAGLIA L., CASABIANCA V., DE BENEDETTI L., PECCHIONI N., MERCURI A., CERVELLI C., RUFFONI B., 2011. *Amplified fragment length polymorphism markers for DNA fingerprinting in the genus Salvia*. Plant Biosystems 145 (2): 274-277.
- BRUNA S., BURCHI G., DE BENEDETTI L., MERCURI A., SCHIVA T., 2002. *Utilizzo dell'analisi RAPD nel miglioramento genetico del Limonium*. Atti del 3° Workshop 'Stato dell'arte del miglioramento genetico delle specie ortoflorofrutticole di interesse mediterraneo'-Valenzano (BA) 25-26/6/02 – pag.25.
- BRUNA S., BURCHI G., DE BENEDETTI L., MERCURI A., PECCHIONI N., BIANCHINI C., SCHIVA T. 2005. *Molecular analysis of Limonium genus through RAPD markers*. Agricoltura mediterranea 135(1): 52-58.
- BRUNA S., PORTIS E., CERVELLI C., DE BENEDETTI L., SCHIVA T., MERCURI A., 2007. *AFLP-based genetic relationships in the Mediterranean myrtle (Myrtus communis L.)*. Sci. Hort. 113: 370-375.
- BURCHI G., MERCURI A., BIANCHINI C., ANTONETTI M., PÉREZ L.Y., SCHIVA T., 2000. *Primi risultati dell'attività di breeding su Limonium*. Atti delle V Giornate Scientifiche S.O.I., Sirmione 28 -30/3/2000 : 21-22.
- BURCHI G., BRUNA S., DE BENEDETTI L., MERCURI A., SCHIVA T., 2004. *Il genere Limonium: diffusione delle specie, classificazione botanica, caratterizzazione genetica e potenzialità di sviluppo commerciale*. Italus Hortus 4: 203-205.
- BURCHI G., MERCATELLI E., MALETTA M., MERCURI A., BIANCHINI C., SCHIVA T., 2006. *Results of a breeding activity on Limonium spp*. Acta Horticulturae 714: 43-49.
- BURCHI G., MERCURI A., BRUNA S., DE BENEDETTI L., BIANCHINI C., BREGLIANO R., FOGLIA G., SCHIVA T., 2003. *Nuove varietà di Limonium spp. ottenute mediante incroci interspecifici e trasformazione genetica*. In: Florovivaismo tra innovazione e qualità - Reg. Campania e Mi.P.A.A.F., 93-97.
- BURCHI G., MERCURI A., SCHIVA T., 2000. *Sviluppo di nuovo germoplasma nel miglioramento genetico del Limonium*. Floritecnica 5: 82-87.
- CAPPELLETTI C., 1976. *Trattato di botanica*. UTET, Torino.
- CASTELLO S., 2000. *Innovazioni in arrivo per il Limonium*. Colture protette n. 8: 53-58.
- CE, 1994 - *Regolamento (CE) n. 2100/94 del Consiglio del 27 luglio 1994 concernente la privativa comunitaria per ritrovati vegetali* (OJ L 227 of 01.09.94 p.1).
- CHANG K. F., HWANG S. F., MIRZA M.. 1994. *Symptomatology and the occurrence of mycoplasma-like organisms disease of Statice (Limonium sinuatum) in Alberta, Canada*. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 101, 113-23.
- CIE, 1986. CIE Publication No. 15.2.

- COWAN R. M., INGROUILLE J., LLEDO M. D., 1998. *The taxonomic treatment of agamosperms in the genus Limonium Mill. (Plumbaginaceae)*. Folia Geobotanica 33: 353-366.
- DALLA GUDA C., RUFFONI B., BALLARDINI M., SCORDO E., FARINA E., 2000. *Limonium otolepis: alcuni aspetti della biologia della pianta sfruttabili ai fini propagativi*. Floritecnica 5:17-20.
- DE PAOLI G., ROSSI V., SCOZZOLI A., 1994. *La Micropropagazione delle piante Ortoflorofrutticole*. Edagricole Bologna, pagg. 258.
- DE PASCALE S., PARADISO R., 2000. *Valutazione di piante da seme e micropropagate di Limonium gmelini*. Floritecnica, 5, Speciale Limonium, 97-100. 27.
- DE VECCHI M., 2000. *Post-raccolta: conservazione e trasformazione dei Limonium ornamentali*. Floritecnica 5: 38-39.
- DIANA S., 1992. *Alcuni aspetti della biologia della riproduzione del genere Limonium*. Giorn. Bot. Ital., 126 (2): 187-195.
- ERBEN M., 1978. *Die Gattung Limonium im südwestmediterranen Raum*. Mitt. Bot. Staatssamml. München 14: 361 – 631.
- ERBEN M., 1979. *Karyotype differentiation and its consequences in mediterranean Limonium*. Webbia 34: 409–417.
- FANOURAKIS D., CARVALHO S. M. P., ALMEIDA D. P. F., HEUVELINK EP., 2011. *Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal function*. Physiologia Plantarum ISSN 0031-9317.
- FANOURAKIS D., MATKARIS N., HEUVELINK E., CARVALHO S. M. P., 2010. *Effect of Relative Air Humidity on the Stomatal Functionality in Fully Developed Leaves*. Acta Hort. 870, ISHS .
- FANOURAKIS D., TAPIA A., HEUVELINK E., CARVALHO S. M. P., 2009. *Cultivar Differences in the Stomatal Characteristics of Cut Roses Grown at High Relative Humidity*. Acta Hort. 847 ISHS: 251-258.
- FARINA E., CERVELLI C., PATERNIANI T., 2000. *Valutazione agronomica e caratteristiche morfologiche degli steli fioriti di due cloni di Limonium otolepis*. Floritecnica 5: 35-37.
- HARADA D., 1992. *How to grow Limonium*. FloraCulture International, Nov-Dec 1992, pp. 22-25.
- HARAZY A., LESHEM B., COHEN A., RABINOWITCH H. D., 1985. *In vitro propagation of Statice as an aid to breeding*. HortScience 20 (3): 361-362.
- HAZARICA B. N., 2006. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants*. Scientia Horticulturae 108: 105-120.
- HODKINSON T. R., CHASE M.W., TAKAHASHI C., LEITCH I. J., BENNETT M.D., RENVOIZE S.A., 2002. *The use of DNA sequencing (ITS and trnL-F), AFLP and fluorescent in-situ*

- hybridisation to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *American Journal of Botany* 89: 279–286.
- HOLMES S., LIGHTFOOT-BROWN S., BRAGG N., 2000. *Peat Alternatives: a Review of Performance, Future Availability and Sustainability for Commercial Plant Production in the UK*. DEFRA Horticulture and Potatoes Division, London, 12 pp.
- KARIS P. O., 2004. *Taxonomy, phylogeny and biogeography of sect. Pteroclados (Plumbaginaceae), based on morphological data*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 144, 461-82.
- KARP A., SEBERG O., BUIATTI M., 1996. *Molecular techniques in the assessment of botanical diversity*. *Annals of Botany* 78: 143-149.
- KATAJIMA K., HOGAN K. P., 2003. *Increase of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation*. *Plant, Cell and Environment* 26, 857-865.
- KOZAI T., 1991. *Photoautotrophic micropropagation*. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 27:47-51.
- KUNITAKE H., MII M., 1990. *Plant regeneration from cell cultured-derived protoplasts of statice (Limonium perezii Hubbard)*. *Plant Sci* 70: 115–119.
- LESHEM B., COHEN A. 1983. *Clonal propagation of statice (Limonium sinuatum L.) in vitro*. *Hassadesh* 64 (2) 318-319.
- LINSMAIER E. M., SKOOG F., 1965. *Linsmaier & Skoog medium*. *Physiol. Plantarum*, 18, 100.
- LICHTENTHALER H.K., 1987. *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes*. - *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- LLEDÓ M. D., CRESPO M. B., CAMERON K. M., FAY M. F. , CHASE M. W., 1998. *Systematics of Plumbaginaceae based upon cladistic analysis of rbcL sequence data*. *Systematic Botany* 23: 21-29.
- LLEDÓ M. D., CRESPO M. B., FAY M. F. , CHASE M. W., 2005. *Molecular phylogenetics of Limonium and related genera (Plumbaginaceae): biogeographical and systematic implications*. *American Journal of Botany*. 2005;92:1189-1198.
- MACKILL, D.J., ZHANG, Z., REDONA, E., COLOWIT, P.M. 1996. *Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice*. *GENOME*, 39: 969–977.
- MARTÍN C., PÉREZ C. 1992. *Micropropagation In Vitro of Limonium estevei Fdez. Casas*. *Annals of Botany* 70: 165-167.
- MARTÍN C., PÉREZ, C., 1994. *The use of RAPD to determine the genetic variability of micropropagated plants from endangered species. Application to the Spanish endemism, Limonium estevei*. *Phyton*, 56: 65-72.
- MARTÍN C., PÉREZ C., 1995. *Micropropagation of five endemic species of Limonium from the Iberian peninsula*. *Journal of Horticultural Science* 70: 97-103.

- MAYMON M, ZVEIBIL A, PIVONIA S, MINZ D, FREEMAN S., 2006. *Identification and Characterization of Benomyl-Resistant and -Sensitive Populations of Colletotrichum gloeosporioides from Statice (Limonium spp.)*. Phytopathology. May;96(5):542-8.
- MENSUALI-SODI A., LUCCHESINI M., PACIFICI S., SERRA G., TOGNONI F., 2009. *Dalla micropropagazione convenzionale alla micropropagazione autotrofa*. Italus Hortus 16 (2) 239-243.
- MERCURI A., ANTONETTI M., BURCHI G, BIANCHINI C., PASQUALETTO P.L., SCHIVA T. 1999. *Manipolazione in-vitro di Limonium*. Colture Protette 1 - 89-93.
- MERCURI A., BRUNA S., DE BENEDETTI L., BURCHI G., SCHIVA T., 2000. *Modificazione dell'architettura di piante di Limonium indotta dai geni rol abc di Agrobacterium rhizogenes*. FLORTECNICA n. 5: 25-26.
- MERCURI A., DE BENEDETTI L., NICOLETTI F., BALLARDINI M., DENTE F., BIANCHINI C., ANTONETTI M., BURCHI G., 2012. *Sviluppo commerciale di nuove varietà di Alstroemeria da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana*. Acta Italus Hortus, 4-12: 51-57.
- MiPAAF, 2007. Bando Imprese Florovivaistiche, D.M. 186 del 1° agosto 2007, G. U. n° 208 del 7/09/2007. *“Sviluppo commerciale di nuove varietà da fiore reciso e da vaso di costituzione italiana (“NewVarItaly”)*.
- MORGAN E.R., BURGE G.K., SEELYE J.F., GRANT J.E., HOPPING M. E., 1995. *Interspecific hybridisation between Limonium perigrinum Bergius and Limonium purpuratum L.* Euphytica 83: 215-224.
- MORGAN E.R., BURGE G.K., SEELYE J.F., HOPPING M. E., GRANT J.E., 1998. *Production of interspecific hybrids between Limonium perezii (Stapf.) Hubb. and Limonium sinuatum L. Mill.* Euphytica 102: 109-115.
- MUELLER U. G. AND WOLFENBARGER, L., 1999. *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) genotyping and fingerprinting*. Trends in Ecology and Evolution 14: 389-394.
- MURASHIGE, T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*. Physiol. Plant 15:473-497.
- PALACIOS C., GONZALEZ-CANDELAS F., 1997. *Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered Limonium dufourii (Plumbaginaceae)*. Molecular ecology 6:1107-1121.
- PALACIOS C., KRESOVICH S., GONZALEZ-CANDELAS F., 1999. *A population genetic study of the endangered plant species Limonium dufourii (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP)*. Molecular Ecology 8, 645-657.

- PALOP M., PALACIOS C., GONZÁLEZ-CANDELAS F., 2000. *Development and across species transferability of microsatellites markers in the genus Limonium* (Plumbaginaceae). *Conservation Genetics* 00: 1-3.
- PASINI C., DEL BENE G., 2000. *Le principali avversità del Limonium*. *Flortecnica, Speciale Limonium*, 5: 78-81.
- PASSAGLIA E., BELLARMI T., GUIDETTI A., MERLOTTI F., 2005. *Utilizzo di zeolititi nella coltivazione di gerani*. *Flortecnica*, anno XXIX n° 218, 88-94.
- PEDROZA J., CORCHUELO G., ANGARITAS A., 1999. *Quantitative and qualitative analysis of the phenotypic homogeneity of micropropagated and seed derived statice (Limonium sinuatum Mill.) cv 'Midnight blue' plants* *Acta Hort* 482, ISHS : 321-327.
- PIGNATTI, S., 1982. *Flora d'Italia. Gen. Limonium* 2:302-318. Edagricole. Bologna.
- POSPÍŠILOVÁ J., TICHÁ I., KADLEČEK P., HASEL D., PLZÁKOVÁ Š., 1999. *Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions*. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.
- PRISA D., BALLARIN A., BURCHI G., 2008. *Impiego di clinoptilolite e litonita nel substrato di coltivazione del Lilium*. *Flortecnica*, 10: 32-38.
- PRISA D., BALLARIN A., BURCHI G., 2009. *Utilizzo di substrati alternativi alla torba per il miglioramento qualitativo di tulipano e Liatris spicata*. *Il Floricoltore* 10: 21-26.
- PRISA D., BURCHI G., ANTONETTI M., TEANI A., 2011. *Use of organic or inorganic substrates for reducing the use of peat and improving the quality of bulbs and inflorescences in Asiatic Lily*. *Acta Hort.* 900: 143-148.
- REA, E., 2005. *Panoramica sui substrati per la coltivazione in "fuori suolo"*. *Bollettino della Società Italiana della Scienza del Suolo* 54:510-516.
- RIDOUT C.J., DONINI P., 1999. *Use of AFLP in cereals research*. *Trends in Plant-Science* 4: 76-79.
- RUFFONI B., FABBRICO G., SEMERIA L., DALLA GUDA C., VOLPI L., 2000. *Shoot differentiation from somatic tissues of ornamental Limonium species*. *Acta Hort.* 541: 289-294.
- RUFFONI B., MASCARELLO C., 2000. *La propagazione dei Limonium ornamentali*. *Atti Giornata di studio su Limonium*. *Flortecnica* 5:101-110.
- SANTAMARIA J.M., DAVIES W.J., ATKINSON C.J., 1993. *Stomata of micropropagated Delphinium plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully*. - *J. exp. Bot.* 44: 99-107, 1993.
- SANTAMARIA J. M., KERSTIENS G., 1994. *The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development* *Physiologia Plantarum* 91: 191-195.
- SCHIVA T., 1998. *Limonium suworowii: più che una novità una opportunità*. *Flortecnica*, 12: 30.

- SCORDO E., 1997. *Limonium, steli fioriti in tutte le stagioni*. Colture Protette 2: 41-46.
- SHILLO R., 1976. *Control of flower initiation and development of statice (Limonium sinuatum) by temperature and daylength* 64:197-203.
- SYNGE P.M., NICHOLSON G., RHS, 1956. *Dictionary of gardening: a practical and scientific encyclopaedia of horticulture*, VOLUME 3. , 2 Ed. cured by CHITTEDEN J., Clarendon Press. pp. 1180-1181.
- TEANI A., ANTONETTI M., BARTOLINI L., BURCHI G. AND CAMUSSI A., 2010. *Comparison of biometric and molecular techniques for the identification of new Limonium spp. hybrids* Advances in Horticultural Science 24 (4): 233-242.
- TEANI A., 2011. *Caratterizzazione Genetica, Documentazione e Valorizzazione di una Collezione di Germoplasma di Limonium spp. con Metodi Biometrici e Biologico Molecolari*. Tesi di Dottorato, Università della Tuscia (VT).
- UPOV, 1999. *Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Statice* [Limonium Mill., Goniolimon Boiss. and Psylliostachys (Jaub. & Sapch) Newsky]. TG/168/3.
- VITTI, D., TUCCI, M., SACCARDO, F., 2000. *Micropropagazione e rigenerazione di Limonium spp.* [Limonium sinuatum Mill. - Limonium latifolium Kuntze]. Atti Giornate Scientifiche SOI 2000, Vol. 1:119-120.
- VON HENTING U.W., RÖBER R., WOHANCA W., ROHDE J., 2001. *Guida alla coltivazione delle piante ornamentali*. Ediz. Italiana a cura di Rampinini G., Pentagono Editrice – Clamer Informa. Scheda *Limonium Sinuatum*, I-V.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU, M., 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*, Nucleic Acids Res. 23, 4407–4414.
- WAUGH R., BONAR N., BAIRD E., THOMAS B., GRAMER A., HAYES P., POWELL W., 1997. *Homology of AFLP products in three mapping populations of barley*. Molecular and General Genetics 255: 311-321.
- WILFRET G.J., RAULSTON J.C., 1975. *Acceleration of flowering of statice (Limonium sinuatum Mill.) by gibberellic acid (GA3)*. HortScience 10 (1): 37-38.

Sitografia:

- CBI MARKET SURVEY: THE EU MARKET FOR SUMMER FLOWERS, 2009.
www.cbi.eu/marketinfo/cbi/docs/cut_flowers_and_foliage_the_eu_market_for_summer_flowers

D.E.F.R.A., 2010. *Consultation on reducing the horticultural use of peat in England*. Department for Environment, Food and Rural Affairs. © Crown 2010.
<http://www.defra.gov.uk/corporate/consult/peat/index.htm>

Ringraziamenti

I primi, doverosi ringraziamenti vanno al mio tutor, Dott. Gianluca Burchi, ed al Dott. Antonio Grassotti, per la fiducia, l'incoraggiamento e l'entusiasmo che hanno saputo infondermi ogni giorno, durante lo svolgimento di questo dottorato. Un ringraziamento particolare va a Angela, per essere stata una guida preziosa e costante nell'affascinante, ma insidioso universo della biologia molecolare. Allo stesso modo sono riconoscente a Sonia e Silvia per il sostanziale contributo scientifico, umano e operativo durante le prove di acclimatazione. Grazie a Wouter e a Mimmo per l'ispirazione e la collaborazione riguardo il ruolo dell'ABA nella fase di radicazione e l'indagine fitopatologia sulla collezione di *Limonium* del CRA-VIV. Un ringraziamento anche a tutti i colleghi del laboratorio Beatrice, Domenico, Jacopo, Sara e Simona per il loro contributo e per la pazienza dimostrata nei momenti più frenetici delle attività sperimentali. Ci tengo inoltre a ringraziare Linda e Gloria, straordinarie compagne di laboratorio.

Per ultimo, ma non per importanza, un grazie speciale a mia moglie Cristina che ha dovuto sopportare i miei dubbi e le mie serate davanti al computer in questi anni di ricerca.