

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

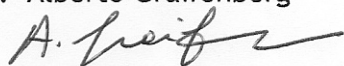
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

in Ortoflorofrutticoltura XXI CICLO.

**Messa a punto di tecniche molecolari per l'identificazione precoce di virosi e
risanamento del materiale propagato di nuovo ottenimento in *Lilium***

AGR/04

Coordinatore: Prof. Alberto Graifenberg



Tutor: Dott. Antonio Grassotti

Dottoranda: Debora Trinchello

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

in Ortoflorofrutticoltura XXI CICLO.

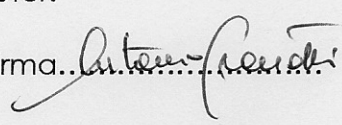
**Messa a punto di tecniche molecolari per l'identificazione precoce di virosi e
risanamento del materiale propagato di nuovo ottenimento in *Lilium***

AGR/04

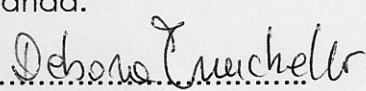
Coordinatore:

Firma

Tutor:

Firma... 

Dottoranda:

Firma... 

INDICE DEGLI ARGOMENTI

RIASSUNTO	5
------------------	---



1. INTRODUZIONE	7
1.1 Il lilium	7
1.1.1. <i>Origine, diffusione ed importanza</i>	7
1.1.2. <i>Situazione economica a livello mondiale e nazionale</i>	8
1.1.3. <i>La morfologia del Lilium</i>	10
1.1.4. <i>Ibridi e loro classificazione</i>	12
1.2 Tecniche colturali	17
1.2.1 <i>Ciclo vegetativo</i>	17
1.2.2 <i>Tecnica colturale per la produzione di fiore reciso</i>	19
1.2.3 <i>Propagazione</i>	21
1.2.3.1 <i>Propagazione gamica</i>	21
1.2.3.2 <i>Propagazione agamica</i>	21
1.2.4 <i>Avversità e difesa</i>	23
1.2.5 <i>Il Lilium e la coltura 'in vitro'</i>	25
1.2.5.1 <i>Moltiplicazione di gemme da scaglie</i>	25
1.2.6 <i>Miglioramento genetico</i>	27
1.3 I Virus	29
1.3.1 <i>Tassonomia</i>	32
1.3.2 <i>Patogenesi delle malattie virali</i>	32
1.3.3 <i>Trasmissione delle virosi</i>	34
1.3.4 <i>Modificazioni fisiologiche e principali sintomatologie delle virosi</i>	38
1.3.5 <i>Diagnosi delle malattie virali</i>	38
1.3.6 <i>Il controllo delle virosi</i>	43
1.3.7 <i>Chemioterapia</i>	44
1.3.8 <i>Coltura dei meristemi</i>	46
1.3.9 <i>Termoterapia</i>	47

	1.4 La certificazione fitosanitaria del materiale moltiplicato dai vivaisti italiani	49
	2. SCOPI DEL LAVORO	51
	3. MATERIALI E METODI	52
	3.1 Valutazione dei cloni con sintomi riconducibili a virosi	52
	3.2 Reperimento di materiale in campo e propagazione	52
	3.3 Estrazione e quantificazione dell'RNA	53
	3.4 Messa a punto del protocollo diagnostico e diagnosi di LSV e CMV tramite RT-PCR	54
	3.5 Primo prelievo di apice meristematico	56
	3.6 Termoterapia e secondo prelievo di apice meristematico	57
	3.7 Valutazione dell'avvenuto risanamento	57
	4. RISULTATI	58
	4.1 Esame dei singoli cloni	61
	5. CONCLUSIONI	69
	6. BIBLIOGRAFIA	70

Riassunto

Con lo scopo di ottenere un protocollo efficace e veloce per diagnosticare la presenza di agenti virali nei cloni di ibridi Asiatici di *Lilium*, è stato messo a punto un metodo molecolare utilizzando RT-PCR. Il virus più comune e, l'unico specifico, che colpisce quasi tutti gli ibridi coltivati è l' LSV (*Lily Symptomless Virus*) (Marani e Bertaccini ,1984) che in alcuni ibridi non provoca nessuna sintomatologia virale, mentre in altri può causare la deformazione delle foglie, che tendono ad arricciarsi e arrotolarsi a spirale e, la comparsa di striature sulle lamine. La sua presenza limita lo sviluppo vegetativo della pianta, diminuisce il numero e la grandezza dei fiori, rendendo la pianta più suscettibile ad attacchi patogeni di *Botrytis* e *Fusarium*. Quando LSV infetta le piante insieme al CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), caso molto frequente, la sintomatologia si complica: le foglie manifestano mosaico in striature, anulature di colore brunoastro e tacche necrotiche; anche i fiori vengono danneggiati, il loro sviluppo è ostacolato oppure compaiono rotture di colore e screziature dei petali. Bulbi di ibridi Asiatici di *Lilium* ('409', '599', '20', '00158', '0045', '0097', '0035', '00136', '216', '505'), con buone caratteristiche commerciali ed agronomiche (riduzione o assenza di polline, nuove forme e colori dei fiori, taglia elevata, idoneità alla coltivazione in pieno sole) sono stati presi in campo e tramite propagazione 'in vitro' di scaglie sono stati ottenuti nuovi bulbetti sottoposti a una prima diagnosi molecolare tramite RT-PCR. L' RT-PCR è stata condotta utilizzando il Kit della Sigma 'Enhanced Avians HS RT-PCR'. Sono stati usati primers degenerati, sintetizzati a partire dalle proteine del capsido di 4 LSV e 17 CMV, che amplificano 483 e 408 bp di specifici frammenti di LSV e CMV rispettivamente. I bulbetti risultati virosati, sono stati sottoposti a un primo prelievo di apice meristematico, nel tentativo di risanarli. E' stata effettuata un'ulteriore diagnosi (RT-PCR) e successivamente, su bulbetti ancora virosati, è stata effettuata una termoterapia (42 giorni a 35 °C) e un secondo prelievo di apice meristematico, cercando di mettere a punto un protocollo anche per il risanamento. I cloni '599' e '409' sono stati sottoposti sia a diagnosi mediante ELISA test (condotto presso l'Università di Bologna Sezione di Scienze e Tecnologie Agroambientali), che a diagnosi molecolare tramite RT-PCR per convalidare l'efficienza del metodo molecolare in cloni di ibridi Asiatici. Successivamente l'RT-PCR è stata applicata per verificare lo stato di sanità di piante ottenute mediante propagazione di meristema 'in vitro'. Gli altri cloni sono stati analizzati solo mediante RT-PCR. Le piante virus-free sono state cresciute in 'vitro' e successivamente acclimatate in serre ombreggiate. Dopo un anno dalla messa a dimora in campo le piante virus-free sono cresciute vigorosamente e sviluppando un

discreto apparato fogliare. Sui cloni risanati sono state effettuate periodicamente altre indagini a campione che hanno dato sempre risultati negativi, cioè assenza di virosi.

1.INTRODUZIONE

1.1 IL LILIUM

1.1.1 Origine, diffusione ed importanza

Il termine *Lilium* deriva dal latino e prende origine dalla parola greca 'Leiron' usata da Teofrasto per indicare le caratteristiche forme dei tepali dei fiori coltivati in quel tempo nelle zone di influenza della coltura ellenica. Altri lo riconducono alla parola celtica *li*, alla quale si attribuisce il significato di candore, purezza e verginità. Nel linguaggio dei fiori come pure nella simbologia religiosa, il Giglio, soprattutto nella forma imbutiforme del *Lilium candidum*, è sinonimo di purezza e di innocenza.

Il genere *Lilium* appartiene all'ordine delle *Liliales* che occupa una posizione centrale nelle monocotiledoni. L'evoluzione delle famiglie che lo compongono ha seguito direzioni differenti: da un lato troviamo le *Liliaceae* con fiori attinomorfi ed ovario supero, dall'altro le *Amaryllidaceae* con fiori sempre attinomorfi ma ovario infero, alle quali seguono le famiglie con fiori zigomorfi, caratterizzate da ovario supero oppure infero.

La famiglia delle *Liliaceae* annovera oltre 220 generi di piante (Scilla, Allium, Agapanthus, Hemerocallis,...), tra le quali *Lilium spp* occupa una posizione di rilievo per la numerosità delle specie e per la sua ampia distribuzione geografica.

Classificazione
tassonomica del *Lilium*.

Divisione	<i>Spermatophita</i>
Sottodivisione	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Monocotiledone</i>
Ordine	<i>Liliflorae</i>
Famiglia	<i>Liliaceae</i>
Sottofamiglia	<i>Liloideae</i>
Genere	<i>Lilium</i>

Il genere *Lilium* comprende circa 100 specie originarie dell'Europa, Asia, Nord America (Anderson, 1986), tra i 10° e i 60° Nord di latitudine. L'areale di diffusione si estende su di un territorio vastissimo e comprende zone temperate dell'Europa e dell'Asia (al di sopra

dell'equatore) e l'America Settentrionale. In senso longitudinale, tale area si estende attraverso l'Europa e l'Asia, sino alla Kamchatka e, dall'isola di Vancouver ad oriente, attraverso la nuova America, fino alla Nuova Scozia.

Circa una dozzina di specie crescono in Europa, due dozzine in Nord America e il resto delle specie crescono in Asia (Haw, 1986). Le specie che fanno parte della flora spontanea italiana sono: *Lilium bulbiferum* (croceum), *L. martagon*, *L. candidum* (Giglio di S. Antonio), *L. pomponium* e *L. carniolicum*.

Considerata l'ampia distribuzione delle diverse specie ed i diversi habitat in cui esse vivono è facile immaginare come anche le loro esigenze colturali siano ben diversificate secondo i diversi gruppi di specie. La maggior parte di esse sono rustiche, ma soprattutto quelle originarie delle zone tropicali, subtropicali e quelle precoci, risultano più sensibili al freddo e necessitano quindi di strutture di protezione per essere coltivate negli ambienti temperati.

1.1.2 Situazione economica a livello mondiale e nazionale

La floricoltura italiana, settore molto vivace dell'agricoltura nazionale, è tradizionalmente penalizzata dalla limitata disponibilità di materiale vegetale di provenienza locale e quindi è costretta ad importare quasi tutto quanto è necessario alla produzione di fiore reciso e vaso fiorito. Questo penalizza fortemente il comparto, che pure rimane attivo nel rapporto import-export, in particolare grazie al livello di esportazione di fiori recisi e fogliame fresco. Questa situazione di dipendenza dall'estero è ancora più vera, sentita e limitante per quello che riguarda l'approvvigionamento di bulbi da fiore, che ogni anno vengono importati, in forti quantitativi, dai 700 agli 800 milioni di bulbi di dimensioni varie, appartenenti ad alcune decine di generi e specie diverse. Nel 2004 l'Italia ha importato dall'Olanda bulbi per oltre 30 milioni di Euro, rispetto ai poco più di 31 milioni da tutto il mondo (Tab. 1) (AIPH/Union Fleurs, 2005).

Provenienza	Tonnellate (1997)	Tonnellate (2004)
OLANDA	15.846	14.679
EUROPA	16.193	14.880
MONDO	16.212	14.902

Tab. 1: Importazione dei bulbi da fiore nel 1997 e nel 2004 (AIPH/Fleurs 1998, 2005).

Tra i bulbi maggiormente coltivati per il fiore reciso figurano *Lilium*, Tulipani, Gladioli, Fesie e Iris (Grassotti e Nesi, 2002) (Tab. 2). I *Lilium* risultano senza dubbio la specie più importante dal punto di vista economico, con bulbi che possono costare da 0,30 a 0.50 Euro e steli fioriti che sul mercato possono essere venduti da 0,54 a 1.70 Euro.

SPECIE	N. BULBI IMPORTATI
Tulipani	76,7 milioni
Iris	82,5 milioni
Gladioli	320,5 milioni
<i>Lilium</i>	559,0 milioni

Tab. 2: Principali bulbose a fiore reciso importate dall'Olanda in Italia (AIPH/Union Fleurs 1998, 2005).

Attualmente vengono coltivate in Italia diverse varietà di *Lilium* prevalentemente dei tre principali gruppi commerciali. Il 70% appartiene al gruppo degli "Ibridi Asiatici", il 20% al gruppo degli "Ibridi Orientali", il 10% a quelli degli "Ibridi *Longiflorum*". Sono, comunque, presenti nel settore commerciale anche ibridi denominati LA, ibridi interspecifici tra *Longiflorum* e Asiatici, dove vengono esaltati i caratteri positivi dei primi, attraverso un incremento della dimensione dei fiori e dei secondi, attraverso un ampliamento della gamma dei colori.

La coltivazione di *Lilium* per fiore reciso in Italia inizialmente si è fortemente sviluppata nelle aree tradizionali della Liguria (Sanremo) e della Toscana (Pescia e Viareggio), per poi spostarsi a Sud, nel Lazio, in Puglia, in Sicilia e, in particolare, in Campania. Questa regione, che nel 1987 deteneva il 10% della superficie nazionale coltivata, nel 1994 passava al 32% (I.S.T.A.T., 1994) e nel 2001 a circa il 50%, con una produzione di oltre 104 milioni di steli, di cui 18 milioni in pien'aria e circa 86 in serra (ISMEA, 2004). Nelle altre regioni italiane maggiormente interessate alla coltivazione del *Lilium* le più recenti statistiche segnalano per il Lazio 24 milioni di steli, per la Toscana 22 milioni, per la Puglia 13 milioni e per la Sicilia 10 milioni (ISMEA, 2004).

Dopo una flessione nei primi anni di questo secolo, più o meno in coincidenza con l'avvento della moneta unica europea, la coltivazione di *Lilium* per la produzione di fiore reciso, è oggi in forte ripresa in tutta Europa e quindi anche in Italia.

1.1.3 La morfologia del *Lilium*

Il *Lilium spp.*, bulbosa monocotiledone, è una pianta perenne la cui struttura base è costituita da un organo di riserva sotterraneo, un bulbo non tunicato, costituito da un piatto basale, detto *disco*, carnoso, appiattito alla base e conico superiormente sul quale sono presenti l'apice vegetativo e le radici perenni. Sul disco ed intorno all'apice sono inserite in maniera spiralata numerose scaglie, che costituiscono la parte più visibile del bulbo. Queste morfologicamente non sono altro che le foglie basali modificate, con consistenza carnosa e funzione di riserva espletata da nutrienti quali amidi, zuccheri, proteine e mucillagini finalizzate ad assicurare elevate quantità di acqua e amminoacidi. Per "bulbo", quindi, si intende un organo specializzato caratterizzato da un accentuato polimorfismo, la cui finalità è di consentire la propagazione della specie, assolvendo a due compiti essenziali: fungere da organo di riserva e assicurare la moltiplicazione vegetativa (De Hertogh e Le Nard, 1993; Di Genova, 2000).

Ogni anno, in un bulbo adulto, si sviluppano nuove scaglie intorno alla gemma vegetativa che darà origine al fiore dell'anno successivo, mentre alcune di quelle più vecchie ed esterne, esaurite le sostanze di riserva, si dissolvono così da lasciare apparentemente un bulbo delle stesse dimensioni. Nei bulbi giovani l'esaurimento delle scaglie esterne avviene più lentamente rispetto alla formazione delle nuove, con conseguente aumento di volume del bulbo finale.

Il *Lilium* è caratterizzato dalla formazione di organi di riserva diversi dai bulbi che prendono il nome di bulbetti (quando si formano nel terreno) o bulbilli (quando si formano all'ascella delle foglie). La formazione di bulbetti e bulbilli e la loro quantità è un carattere genetico e si manifesta quindi a seconda della cultivar.

L'apparato radicale è perenne ed una sua corretta manipolazione durante le diverse fasi è cruciale per una buona riuscita della coltivazione, in particolare nel caso di produzione di fiore reciso. Le radici del *Lilium* sono di due tipi: radici basali e radici dello stelo o *stem roots*. Le radici basali sono poste alla base del bulbo, si dipartono dal girello ed hanno la funzione di supportare la ripresa vegetativa del bulbo dopo la sua piantagione. Le radici dello stelo sono poste nel tratto di fusto al di sopra del bulbo, appena al di sotto del livello del terreno. Queste radici, che sono tipiche delle specie Asiatiche, e dei loro ibridi, rappresentano un apparato radicale secondario e vengono denominate avventizie. Questo secondo apparato radicale dura soltanto una stagione vegetativa, per poi disseccare con il fusto (Fig.1) ed ha una funzione fondamentale dal punto di vista della nutrizione della pianta durante l'accrescimento, la fioritura e la successiva fase di accumulo di sostanze di riserva, lo sviluppo dipende dalle condizioni pedologiche circostanti.



Fig. 1: Apparato radicale in *Lilium*: a) radici basali, b) radici avventizie o secondarie.

Lo stelo o fusto erbaceo varia la sua consistenza durante i diversi stadi vitali della pianta e della 'forza fiore' del bulbo. Di colore dal verde al violetto purpureo, è costituito da numerosi nodi e internodi, il cui allungamento influisce sull'altezza finale della pianta. L'allungamento dello stelo ha una sua valenza "economica", in quanto il "reciso" viene valutato oltre che dal numero di fiori, anche per l'altezza e la robustezza dello stesso.

Le foglie sono sessili, ovvero inserite sul fusto con un picciolo quasi inesistente; hanno consistenza carnosa e coriacea e possono essere larghe, a volte strette e allungate, altre volte larghe e lanceolate. La disposizione delle foglie è anch'essa molto varia: spiralata, a palchi sovrapposti, a foglie opposte, talvolta inserite in ordine sparso (*L. martagon*, *L. canadense*) o verticillate ad intervalli regolari come negli ibridi Asiatici.

I fiori sono grandi, appariscenti, spesso profumati, eretti, orizzontali o penduli, solitari o inseriti in un racemo o falso ombrello, con pochi o molti fiori, perianzio deciduo. I tepali sono segmenti liberi, variabili di forma o portamento, non troppo larghi alla base, tutti provvisti di nettario. La struttura florale delle *Liliaceae* mostra: da tre a sei tepali, sei stami, con sottili filamenti e antere dorsofisse, molto caratteristiche per la loro ricchezza in polline; lo stilo è trifido. I fiori collocati sulla parte distale dello stelo, risultano riuniti in infiorescenze, il cui numero di fiori e/o di palchi dipende dalla grandezza del bulbo. Le infiorescenze sono di diverso tipo: a fiore indipendente (*Lilium longiflorum*) o a singolo fiore terminale, a grappolo o racemo (*Lilium candidum*, *L. speciosum*, *L. tigrinum*) in cui i fusticini che si dipartono dallo stelo possono portare uno o più fiori terminali, ad ombrella (ibridi Mid century; *L. auratum*), quando tutti i fiori si originano da un solo punto o nodo dello stelo. L'accentuata variazione del colore dei tepali dimostra l'elevata variabilità genetica intrinseca nel genere stesso: le gradazioni di colore vanno dal giallo al rosso, con l'esclusione del colore blu, che rimane un pigmento estraneo al genere *Lilium*.

Il frutto (Fig.2) è una capsula trilocolata, cioè divisa, in tre sezioni bilobate, da membrane interne. La capsula è lunga anche fino a 6-7 cm, e può contenere fino a 200 semi, di natura papiracea (Beattie e White, 1993). Il numero cromosomico è generalmente $2n = 24$ (diploide), anche se esistono cultivars poliploidi ottenute da incroci intra e interspecifici.

1.1.4 Ibridi e loro classificazione

Il riconoscimento e la classificazione del *Lilium*, a motivo della sua complessa base genetica, non sono di agevole approccio e i molti ibridi in commercio complicano ulteriormente il problema; per questo non esiste un unico sistema, ma solitamente si fa riferimento a tre diversi tipi di classificazione.



Fig. 2: Frutto di *Lilium*: capsula trilocolata

Se si tiene conto della larga distribuzione delle specie diverse comprese nel genere *Lilium* e gli habitat diversi da cui originano, è evidente che la gamma di esigenze pedoclimatiche e colturali è piuttosto estesa e varia secondo gruppi di specie.

Per quanto attiene alla sistematica di queste specie, una prima classificazione può essere rappresentata dalla loro originaria distribuzione geografica, indicativa per la scelta degli ambienti ottimali di coltivazione. Sulla base di questa, si suddividono in specie Europee, Asiatiche ed Americane.

Le specie **Europee**, esigono terreni ben drenati, fertili, arricchiti se necessario con materiale di origine vegetale o letame completamente maturo. Appartengono a questo gruppo: *L. bulbiferum croceum*, *L. candidum*, *L. chalcedonicum*, *L. martagon*, *L. monadelphum*, *L. pomponium*, *L. pyrenaicum*, *L. szovitsianum*.

Le specie **Asiatiche**, esigono le stesse condizioni pedologiche del gruppo precedente, ma in genere si avvantaggiano di uno strato di terreno più fertile in superficie. Prediligono condizioni ambientali analoghe a quelle di origine, cioè suoli vulcanici molto porosi, climi ad inverno piuttosto asciutto e periodo estivo mitigato da frequenti piogge. Le piante si sviluppano meglio in ambienti ombreggiati e riparati dai venti. Alcune delle specie più comuni sono: *L. auratum*, *L. brownii*, *L. davidii*, *L. hansonii*, *L. henryi*, *L. regale*, *L. rubellum*, *L. speciosum*, *L. tigrinum*.

Le specie **Americane** possono avere bulbi rizomatosi o stoloniferi; sembrano prediligere terreni che contengano, in abbondanza, residui di foglie o torba. Vi appartengono: *L. pardalium*, *L. parryi*, *L. superbum*, *L. washingtonianum*.

Una recente classificazione è quella fatta in base alla forma del fiore:

Sezione I “Martagon”: fiori penduli con tepali molto ricurvi all’indietro:

- ✓ *L. martagon* spontaneo delle montagne italiane, con fiori rosati a punteggiatura scura (Foto 1 e 2).
- ✓ *L. davidii* con steli di circa un metro e fiori arancioni con punteggiatura bruna (Foto 3 e 4);
- ✓ *L. pardalium* originario della California, necessita di terreni molto sciolti ed umidi;
- ✓ *L. tigrinum* che non si riproduce per seme ma per bulbilli ascellari, ha fiori arancioni con punteggiatura marrone scuro. Le varietà più diffuse sono *L. splendens* e *L. fortunei*.

Altre specie poco diffuse sono: *L. hansonii*, *L. pyrenaicum*, *L. pomponium*, *L. chalcedonicum*.

Sezione II “Isolirion o Pseudolirion”: fiori eretti a imbuto:

- ✓ *L. bulbiferum* var. *croceum* spontaneo in Italia con fiori giallo arancio;
- ✓ *L. dauricum* originario della Siberia, incrociato con *L. bulbiferum* var. *croceum* ha originato *L. umbellatum* noto anche come *L. hollandicum*

Sezione III “Eulirion o Leucolirion”: fiori orizzontali a forma di tromba:

- ✓ *L. longiflorum*, elegante, con fiori generalmente bianchi o leggermente bruni all’esterno, è la specie più nota di questa sezione;
- ✓ *L. regale*, rustica, con steli alti più di un metro e mezzo, possiede fiori bianchi, sfumati di giallo nella gola e marrone scuro esternamente: si moltiplica solo per seme. Simili a *L. regale* si distinguono per la produzione di bulbilli, il *L. philippinense* e il *L. formosanum*;
- ✓ *L. candidum*, noto in Italia come “Giglio di S. Antonio” o “Giglio di S. Giovanni”, di

facile coltivazione e propagazione mediante scaglie, non produce semi.

Sezione IV “Archelirion”: fiori larghi, molto aperti, tepali solo in parte ricurvi all’indietro:

- ✓ *L. auratum*, proveniente dalle montagne del Giappone, è considerato il più bello tra tutti i Gigli. Questa specie mal si adatta ai nostri climi e i bulbi sono spesso contaminati da virus. I suoi fiori sono giallo arancio con punteggiature color porpora;
- ✓ *L. speciosum*, originario anch’esso del Giappone, ha tepali di colore bianco rosato sfumato in rosso con punteggiature color porpora. Le varietà più note sono: “*rubrum*”, “*roseum*” e “*album*”;
- ✓ *L. henryi* ha i fiori giallo-citrino con centro verde e punteggiatura papillosa marrone.

Il terzo tipo di classificazione prende in esame gli ibridi, dei quali i più interessanti sono quelli ottenuti da J. De Graaff, coltivatore olandese che negli anni ‘40 si trasferì negli U.S.A. dove dette il via ad una vastissima coltivazione di *Lilium*, che fu la base iniziale dello sviluppo della coltivazione per fiore reciso di questa bulbosa.

Gli ibridi di De Graaff sono stati classificati dalla Royal Horticultural Society e descritti da Daniels (1986) e Trehane (1989). Questo inquadramento è basato sull’origine delle specie e sulla derivazione dei loro ibridi.



Foto 1: Lilium martagon



Foto 2: Lilium martagon



Foto 3: Lilium davidii



Foto 4: Lilium davidii

Divisione I: ibridi asiatici derivati da specie o gruppi di ibridi come *L. tigrinum*, *L. cernuum*, *L. davidii*, *L. leichtlinii*, *L. maculatum*, *L. hollandicum*, *L. amabile*, *L. pumilium*, *L. concolor*, *L. bulbiferum*. Questa sezione è divisa in tre Sottosezioni:

- ✓ I(a): piante a fioritura precoce con fiori rivolti verso l'alto, singoli riuniti ad ombrella, come Enchantment o Joan Evans;
- ✓ I(b): piante con fiori rivolti verso l'esterno come Prosperità, Valencia o Brandy Wine;
- ✓ I(c): piante con fiori pendenti come Lady Bowes Lion, Edit Cecilia o Palomino.

Appartengono a questa sezione gli ibridi Mid Century derivati dall'incrocio di *L. tigrinum* x *L. hollandicum*, ottenuti da De Graaff nel 1949.

Divisione II: ibridi martagon derivati da specie come *L. martagon* e *L. hansonii*. Tra i più famosi ricordiamo St. Nicolas, Achievement e gli ibridi Backhouse.

Divisione III: ibridi candidum derivati da *L. candidum*, *L. chalcedonicum* ed altre specie di origine europea escluso il *L. martagon*. Si annoverano Ares e Apollo.

Divisione IV: ibridi americani comprende ibridi di specie americane come Shuksan, Sunset e gli ibridi Bellingham.

Divisione V: ibridi longiflorum comprende ibridi di *L. longiflorum* e *L. formosanum*. Le piante appartenenti a questa sezione hanno sviluppo diverso, ma fiori sempre bianchi ed allungati.

Divisione VI: ibridi a tromba o aureliani derivati da diverse specie asiatiche escluse *L. auratum*, *L. speciosum*, *L. japonicum* e *L. rubellum*. Questa sezione è ulteriormente suddivisa in quattro sottosezioni:

- ✓ VI(a): ibridi con fiori a forma di tromba, derivati da *L. longiflorum*, *L. formosanum*, *L. wallichianum* e *L. philippinense*;
- ✓ VI(b): ibridi con fiori a forma di coppa rivolti verso l'esterno come Gwendoin Anley o New Era;
- ✓ VI(c): ibridi con fiori pendenti come il Golden Clarino, Summer Song e Christmas Day;
- ✓ VI(d): ibridi con fiori piatti, a forma di stella, come T. A. Havemeyer o Mimosa Star.

Divisione VII: ibridi derivati da specie dell'estremo oriente come ad esempio *L. auratum*, *L. speciosum*, *L. japonicum* e *L. rubellum*. Anche questa divisione è suddivisa in quattro sottodivisioni:

- ✓ VII(a): ibridi con fiore a forma di tromba;
- ✓ VII(b): ibridi con fiore a forma di scodella come Empress of India, Pink Princess o gli Ophal Hybrids;
- ✓ VII(c): ibridi con fiori a forma piatta come Willian Fallace, Lavender Princess o Aurora;
- ✓ VII(d): ibridi con fiori ricurvi come i Potomac Hybrids, Journey's End o Electra.

Divisione VIII: comprende tutti gli ibridi non inclusi in altre divisioni.

Divisione IX: comprende tutte le specie e le relative forme.

Per concludere la descrizione delle più importanti classificazioni, si può dire che da un punto di vista commerciale gli Ibridi di *L. longiflorum* sono originari del Giappone, dell'arcipelago delle Liukiu, caratterizzato da clima tropicale. La pianta produce numerose foglie (da 50 a 150), il cui numero può variare a seconda del genotipo nonché della dimensione, delle condizioni e durata di conservazione del bulbo. I fiori sono bianchi, a forma di imbuto, con tepali talvolta ricurvi all'apice; generalmente singoli, sostenuti da un peduncolo lungo da 4 a 20 cm.

Gli Ibridi Orientali derivano da incroci fra *L. auratum*, *L. speciosum* e *L. rubellum*. I fiori sono prevalentemente rosa e bianchi, spesso molto profumati e producono elevate quantità di polline.

Gli Ibridi Asiatici hanno una base genetica ancora più ampia, essendo il risultato di incroci effettuati fra almeno 12 specie: *L. amabile*, *L. bulbiferum*, *L. concolor*, *L. dauricum*, *L. davidii*, *L. maculatum*, *L. leichtlinii*, *L. pumilium*, *L. henryii*, *L. japonicum* e *L. tigrinum*, ora

conosciuto come *L. lancifolium*. Tali specie presentano una morfologia fiorale molto variabile: dai fiori piccoli del *L. pumilium* a quelli grandi del *L. tigrinum*. I fiori degli ibridi Asiatici sono in genere di colore arancione, rosso, giallo e bianco panna e sono poco profumati.

Negli ultimi anni si è andato fortemente affermando un quarto gruppo, quello degli LA, ibridi interspecifici ottenuti da *Longiflorum* e dal gruppo degli Ibridi Asiatici. Gli LA manifestano qualità apprezzabili sotto l'aspetto della taglia, della robustezza dello stelo, della grandezza, forma e colore dei fiori, come anche della "qualità agronomica", presentano facilità di coltivazione, resistenza alle più usuali fitopatie e virosi, ciclo breve di coltivazione (in alcuni casi meno di 90 giorni), le piante non necessitano di temperature molto elevate durante il periodo invernale e il bulbo è piuttosto facile da riprodurre. La disponibilità varietale risulta essere però ancora piuttosto limitata.

Di seguito si elencheranno alcune delle caratteristiche più importanti che differenziano gli ibridi fra loro.

In genere, la durata del ciclo colturale per gli Ibridi Orientali è di 11-17 settimane, per gli Asiatici di 9-13 settimane e per quelli di *Longiflorum* di 12-15 settimane.

La dimensione dei bulbi comunemente impiegati dai floricoltori, per la produzione di fiore reciso di *Lilium*, dipende dalla varietà e dal periodo di impianto. Le dimensioni comunemente impiegate sono: calibri da 14/16 a 16/18 per gli Ibridi Asiatici; calibri da 16/18 a 18/20 per gli Ibridi Orientali; calibro 10/12 per steli monofore e 12/14 per steli con 2-3 fiori per i *Longiflorum*.

I tipi di *Lilium* che hanno una specifica rilevanza economica sono elencati nella tabella 3.

1.2 TECNICHE COLTURALI

1.2.1 Ciclo vegetativo

I cicli vegetativi delle diverse specie di *Lilium spp* sono apparentemente simili. Lo stadio vegetativo dei bulbi di *Lilium* ha di solito una durata non inferiore ai due/tre anni e tale durata aumenta fino a tre/quattro anni quando si vogliono bulbi 'forza fiore' di una certa consistenza.

Nel *Lilium*, possono essere chiaramente individuate due diverse fasi:

1. FASE DI RIPOSO: nei mesi freddi dell'anno, durante i quali il bulbo rimane in stasi vegetativa;
2. FASE VEGETATIVA: inizia in tarda primavera e porta, durante l'estate, all'allungamento dello stelo fiorale e poi alla fioritura.

Tipi di Lilium	Specie da cui derivano
a) Ibridi Asiatici	<i>L. amabile</i> ; <i>L. bulbiferum</i> ; <i>L. cernuum</i> ; <i>L. concolor</i> ; <i>L. davidii</i> <i>L. pumilum</i> ; <i>L. tigrinum</i> ;
b) Ibridi Orientali	<i>L. auratum</i> ; <i>L. speciosum</i> ; <i>L. japonicum</i> ; <i>L. rubellum</i> ;
c) Ibridi Longiflorum	<i>L. Longiflorum</i> ; <i>L. formosanum</i> ; ibrido Formolong
d) Ibridi L.A.	Incroci interspecifici tra <i>L. asiatici</i> e <i>L. Orientali</i>
e) Ibridi a Tromba	<i>L. henryi</i> ; ibridi Aureliani
f) Ibridi Candidum	<i>L. candidum</i> ; <i>L. chalcedonicum</i> ;
g) Ibridi Americani	<i>L. bellingham</i> ; <i>L. shuksan</i> ; <i>L. butercarp</i>

Tab. 3: I principali tipi di *Lilium* con rilevanza economica sono ibridi, cioè derivanti da incroci tra specie.

Durante le fasi vegetative della pianta, si individuano due stadi:

1. STADIO VEGETATIVO: con aumento del volume del bulbo fino al raggiungimento del suo peso massimo e delle dimensioni adatte alla fioritura.
2. STADIO RIPRODUTTIVO: con induzione alla fioritura, differenziazione degli organi fiorali, allungamento dello stelo, fioritura e formazione del seme

Un ciclo vegetativo completo - senza forzature - è usualmente caratterizzato da 4 fasi:

1. periodo di crescita vegetativo;
2. fioritura e stadio riproduttivo;
3. accrescimento dell'organo propagativo con accumulo di sostanze di riserva;
4. stato latente di riposo o dormienza.

Quando il bulbo viene piantato è usualmente allo stato di riposo. Nel momento in cui si verificano le condizioni esterne ottimali, cioè una temperatura esterna superiore ai 2°C, le gemme apicali iniziano il loro sviluppo, con il progressivo allungamento del fusto e la prima emissione delle foglioline, contemporaneamente alla quale avviene la ripresa vegetativa delle radici esistenti. Questa attività è alimentata dalle sostanze di riserva accumulate nel bulbo: sostanze che si esauriscono lentamente per terminare di solito in corrispondenza, o poco prima, della fioritura, quando ormai la nuova pianta ha sviluppato un consistente apparato radicale costituito da più palchi radicali posto lungo il fusto ipogeo, sopra il bulbo (Beattie e White, 1993).

A fioritura avvenuta, le foglie continuano la loro attività di fotosintesi con la produzione di zuccheri semplici, di amidi e di sostanze proteiche che vengono gradualmente accumulate nei bulbi. Il bulbo raggiunge la maturità fisiologica dopo qualche giorno dal completo disseccamento: tutti gli zuccheri traslocati nell'organo di riserva infatti devono essere quasi integralmente trasformati in amidi o glico-proteine per una ottimale conservazione del bulbo stesso.

Durante la fase di accrescimento e di fioritura della pianta, alla base di una scaglia mediana o di una scaglia posta in prossimità dell'asse florale si differenziano uno o più apici vegetativi a seconda della dimensione del bulbo piantato.

La produzione di un bulbo maturo o 'forza fiore', ovvero capace di produrre uno stelo con un numero e una grandezza dei fiori commercialmente idonei, richiede generalmente non meno di due anni, durante i quali il bulbo e la pianta subiscono processi di forzatura con pratiche colturali tese ad esaltare alcune caratteristiche fisiologiche per raggiungere il massimo ingrossamento possibile del bulbo. Il bulbo 'forza fiore' piantato per la produzione del fiore reciso è usualmente chiamato bulbo madre, per distinguerlo dai bulbi-figli che si sviluppano al suo interno (Di Genova, 2000).

1.2.2 Tecnica colturale per la produzione di fiore reciso

In passato i *Lilium* venivano coltivati in pien'aria, con piantagioni autunno-invernali, anche in ambienti dal clima temperato-freddo, impiegando bulbi in grado di sopportare temperature di alcuni gradi sotto zero anche per periodi prolungati. In primavera si assisteva alla emergenza e poi alla fioritura, quasi contemporanea. Questo tipo di coltivazione non presentava problemi particolari, ma in pratica oggi sopravvive soltanto ad integrazione della produzione programmata di serra. Con i moderni sistemi di produzione continua, che richiedono investimenti ed anticipazioni notevoli, è importante conoscere i parametri ambientali ottimali per ottenere, nei tempi più brevi, le più alte percentuali di steli di buona qualità da tutti i bulbi piantati.

Il *Lilium* richiede molta luce per dare una fioritura di buona qualità, pur non essendo una pianta longidiurna obbligata. L'insufficienza di luce, che si registra fra ottobre e marzo, non solo costringe a ridurre la temperatura e a rallentare il ciclo di produzione, ma provoca anche l'aborto o l'abscissione dei bocci nelle varietà più sensibili. Per superare questo inconveniente, spesso si rende necessaria l'illuminazione artificiale operata con lampade ad alto rendimento.

Come molte altre bulbose, i *Lilium* temono più gli eccessi di temperatura che non il freddo. La temperatura dell'ambiente di coltivazione non dovrebbe superare i 12-15°C notturni e i 21-

25°C diurni. La formazione dei fiori attraversa due stadi, prima la differenziazione e successivamente lo sviluppo, entrambi parametri importanti nel determinare il numero dei bocci che arriveranno a fiorire su ogni stelo. Infatti nei bulbi tenuti a temperature elevate si induce la formazione di un numero minore di fiori, probabilmente a causa di squilibri ormonali. Viceversa, coltivare a temperature più basse, provoca il rallentamento della crescita, ma nel contempo il miglioramento della qualità, ovvero la produzione di steli più lunghi e robusti con un elevato numero di fiori. Se la temperatura viene però ridotta sotto gli 8°C, si ritarda la fioritura e si tiene occupata la serra troppo a lungo, con il rischio di perdere competitività sul mercato (Pergola e Grassotti A, 1984; Grassotti, 1996).

Il terreno più adatto alla coltivazione di *Lilium* deve rimanere sempre umido e ben aerato, con pH neutro o sub-acido e contenere modeste quantità di sali solubili. In natura un terreno con queste caratteristiche è un terreno sabbioso o torboso, meglio se una miscela dei due. L'apporto di sostanza organica è molto importante perché migliora sempre la capacità idrica di quelli sabbiosi e la granulometria di quelli argillosi. Perciò una volta l'anno sono opportuni notevoli apporti di sostanza organica preferibilmente di letame maturo ad una dose di circa 10 kg/m².

La densità di piantagione è funzione di alcune variabili:

- ✓ Epoca di impianto: la densità aumenta durante i periodi stagionali favorevoli e tende a diminuire nel caso di piantagioni precoci.
- ✓ Calibro dei bulbi: ogni varietà è caratterizzata da uno standard del bulbo per la coltivazione commerciale di fiore reciso. I bulbi con calibro maggiore sono usati nei periodi stagionalmente più sfavorevoli poiché riescono a superare meglio le difficoltà ambientali.

La scelta della data di piantagione è finalizzata ad una produzione nei momenti di maggiore richiesta del mercato. Ciò è possibile conoscendo i tempi necessari alle varie specie per giungere alla fioritura, combinati con l'epoca di impianto (Grassotti, 1996).

Il terreno deve essere mantenuto umido dalla piantagione di bulbi fino alla raccolta e le irrigazioni dovranno essere regolate di conseguenza: meno frequenti e meno abbondanti nelle prime settimane di coltivazione e nei periodi invernali, più frequenti e più abbondanti su piante in pieno sviluppo ed in estate. Gli ibridi di *Lilium* attualmente coltivati sono forniti di un apparato radicale secondario, formatosi sulla parte interrata del fusto, sopra al bulbo, che deve essere mantenuto sempre attivo e funzionale per far fronte alle richieste idriche della pianta. Questo apparato radicale è molto superficiale e perciò non diventa importante la quantità di acqua, ma la frequenza degli interventi irrigui.

Per la produzione di fiore reciso, il *Lilium* non richiede grandi apporti di fertilizzanti. Nelle prime fasi di sviluppo, il bulbo soddisfa le sue esigenze nutrizionali a spese delle sostanze di riserva. Dopo l'emergenza, quando l'apparato radicale si sviluppa, la coltura si avvantaggia al massimo della fertilizzazione chimica. Si ritiene che il rapporto ideale tra N P e K sia di 1:0,5:1,5 (Pergola e Grassotti, 1984; Grassotti, 1996).

1.2.3 Propagazione

Il *Lilium* si moltiplica facilmente sia per via sessuata che per via asessuata. La moltiplicazione per seme presenta molti aspetti negativi, soprattutto legati alla lunghezza dei tempi necessari per l'ottenimento di nuovo materiale ed all'elevata eterogeneità del materiale ottenuto, per questo tale metodo viene utilizzato per lo più nei programmi di miglioramento genetico, soprattutto finalizzato all'ottenimento di nuove cultivars. Per ottenere materiale omogeneo da destinare all'ingrossamento, viene comunemente adottata la moltiplicazione per via agamica. La finalità della moltiplicazione del *Lilium* è quella di produrre nuovo materiale partendo da tessuti vegetali come bulbi, bulbetti, bulbilli, al fine di ottenere nuove plantule da destinare all'ingrossamento. Solitamente sono necessari tre cicli della durata di un anno, nel quale si effettua la sboccatura, mediante la quale si eliminano i boccioli per garantire l'afflusso di linfa solo nell'organo di riserva da ingrossare. La raccolta avviene al momento del massimo ingrossamento del bulbo, cioè quando si ha il disseccamento, non patologico, della parte aerea.

1.2.3.1 Propagazione gamica

La moltiplicazione per via sessuata o gamica si effettua con il seme derivante dalla fecondazione dell'ovulo, presente all'interno dell'ovario, da parte del granulo pollinico, prodotto dall'antera.

Il *Lilium* è una pianta allogama caratterizzata da spiccata auto incompatibilità e quindi difficilmente è in grado di produrre seme se autoimpollinata. Questa caratteristica, unita a frequenti casi di incompatibilità interspecifica, costituiscono un ostacolo ai fini dell'esecuzione di programmi di miglioramento genetico.

1.2.3.2 Propagazione agamica

Questo tipo di propagazione consente di ottenere bulbi che produrranno piante omogenee per quanto riguarda i caratteri varietali. In alcuni casi vengono utilizzati organi già preformati

sulla pianta, bulbetti e bulbilli, in altri, è richiesta la disarticolazione meccanica di parti vegetative, come scaglie, foglie e steli.

La moltiplicazione di bulbetti da scaglie può essere applicata a tutte le specie e varietà di *Lilium*. Le scaglie poste in idonee condizioni ambientali formano, nella parte basale interna, bulbetti in numero diverso in relazione a fattori intrinseci (specie, dimensione, posizione delle scaglie, età del bulbo) ed estrinseci (parametri ambientali legati alla conservazione ed alla moltiplicazione).

Durante le prime fasi di sviluppo vegetativo, vicino alla gemma che ha originato il fusto florale si formano una, due o più gemme vegetative che tendono a rivestirsi di scaglie e a formare nuovi bulbi (bulbetti). Quest'ultimi possono essere separati dal bulbo materno e dopo un anno di ingrossamento essere utilizzati come materiale per la produzione di fiori.

Possono essere destinati all'ingrossamento anche i bulbetti che si formano nella parte ipogea dello stelo florale e possono variare sia per numero (da 10 a 20) che per calibro in base alla specie (2/4, 4/6, 6/8). Alcune specie producono di norma numerosi bulbetti (es. *L. speciosum* ed ibridi asiatici), altri ne producono in numero limitato, altre ancora non sono in grado di emetterne.

La moltiplicazione per bulbetti da foglie è utilizzata soprattutto in quelle varietà nelle quali la moltiplicazione da scaglie è particolarmente bassa. Se si considera che il numero di foglie per pianta è sempre piuttosto elevato, è chiaro come la possibilità di ottenere nuovo materiale a partire da questi organi, si riveli un metodo vantaggioso almeno in termini quantitativi. Su *L. lancifolium* le foglie poste in sabbia hanno una notevole capacità di emettere bulbetti. Roh, nel 1982, vide che in *L. longiflorum* le foglie mediane dello stelo mostravano una percentuale del 60%, mentre quelle poste più in alto arrivavano all'80% di rigenerazione, ma con un numero minore di bulbetti per foglia.

Alcune specie come *L. tigrum*, *L. sulphureum* e *L. croceum* sono in grado di emettere bulbetti epigei, detti bulbilli, che si formano all'ascella delle foglie e che possono essere ingrossati con metodi analoghi a quelli utilizzati per i bulbetti ipogei. L'emissione di bulbilli può essere stimolata dall'asportazione dell'apice florale, promuovendo in questo modo l'emissione di un maggior numero di bulbilli all'ascella delle foglie. Trattamenti ripetuti con citochinine promuovono lo sviluppo di bulbilli anche in specie che normalmente non ne producono, infatti è stato osservato che sottoponendo piante di *L. longiflorum* a trattamenti ripetuti di benzilamminopurine (BAP), durante la fase di accrescimento, sono in grado di generare circa 40 bulbilli per stelo.

1.2.4 Avversità e difesa

La difesa fitosanitaria riveste una importanza notevole nell'ambito della produzione vivaistica dato che, per l'ottenimento di un prodotto finale qualitativamente elevato, occorre proteggere la pianta di *Lilium* ed il suo bulbo durante tutto l'iter vivaistico, dalla propagazione e moltiplicazione, alla coltivazione e raccolta, fino al momento della commercializzazione. Durante la fase topica dell'accrescimento dei bulbi nel terreno, i parassiti animali, quelli vegetali e le avversità di natura abiotica, legate queste ultime al clima e alla nutrizione della pianta, possono influire su tale processo in modo diretto e/o indiretto. Possono cioè essere colpiti direttamente gli organi sotterranei della pianta (radici, bulbo e bulbetti), deputati alla funzione di assorbimento ed immagazzinamento delle sostanze nutritive, come pure le parti aeree (foglie, stelo, bocciolo e fiori), implicate per lo più nell'attività di fotosintesi (Abbruzzetti, 2000).

Generalmente i *Lilium* sono attaccati da diversi fitofagi sia nella parte epigea (steli e fiori) sia in quella ipogea (radici e bulbi). I fitofagi più pericolosi della parte epigea sono soprattutto afidi e tripidi (*Myzus persicae*, *Macrosipum solani*, *M. circumflexus*, *M. lili*, *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*) che provocano con l'apparato boccale la deformazione degli organi vegetativi e favoriscono la trasmissione dei virus. Gli attacchi si evidenziano con l'arricciamento delle foglie e dei germogli, sui boccioli causano delle macchie traslucide, i fiori sono piccoli, deformi e decolorati e in alcuni casi si ha anche l'aborto dei boccioli. Larve e adulti di *Criocera* (*Lilioceris lili*) si cibano delle foglie, dei boccioli e dei fiori causando profonde erosioni degli organi vegetali; le larve, inoltre imbrattano la pianta con le loro deiezioni provocando ulteriori danni alla cultura. I fitofagi della parte ipogea (*Agrotis segetum*, *A. ipsilon*) provocano lesioni dei bulbi e sono pericolosi soprattutto allo stadio larvale, quando fuoriescono dal terreno per nutrirsi delle foglie più basse e del fusto a livello del colletto. Possono scavare anche delle gallerie all'interno del bulbo provocando gravi problemi alla cultura.

La dannosità dei nematodi è dovuta sia alla loro azione diretta che alle possibili infezioni di funghi, batteri e virus, di cui possono essere vettori. Tra le specie più pericolose si ricordano: *Meloidogyne incognita*, *Aphelenchoides fragariae*, *Ditylenchus dipsaci*, *Pratylenchus penetrans*. I nematodi attaccano principalmente le radici, da cui traggono i succhi cellulari ed in cui depositano le uova, portando alla necrosi dei tessuti, che divengono flaccidi e inconsistenti, ed all'ingiallimento ed appassimento della pianta (Garibaldi e Rapetti, 1984).

Numerose e gravi sono le patologie fungine del *Lilium*. Le principali specie che attaccano la parte ipogea sono *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Colletotricum*, che

causano generalmente marciumi radicali sui bulbi con formazione di macchie, conseguente alterazione dello stelo ed ingiallimento delle foglie. Tra i funghi che attaccano la parte epigea si ricordano *Rhizoctonia solani*, che, nel caso di lievi attacchi, provoca delle macchie bruno chiare sulle foglie basali mentre, nel caso di gravi attacchi, causa delle macchie anche sulle foglie apicali fino a compromettere la fioritura. La *Botrytis elliptica*, crittogama di maggiore rilevanza per la parte aerea del *Lilium*, si manifesta con piccole macchie circolari sulle foglie che vanno ingrandendosi fino ad occupare tutta la superficie fogliare e, in seguito, anche sul resto della pianta. Le temperature medie e tassi alti di umidità favoriscono lo sviluppo di questo patogeno.

Le malattie virali, insieme alle tracheomicosi, rappresentano le maggiori avversità del *Lilium*, sia per gli effetti devastanti provocati alle coltivazioni, sia per l'effettiva assenza di fitoterapie curative.

Tra i virus presenti nel *Lilium* quelli che provocano i danni maggiori sono: LSV (*Lily Symptomless Virus*) il CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) e il TBV (*Tulip Breaking Virus*). Altri tipi di virus identificati su *Lilium* sono: AMV (*Arabic Mosaic Virus*), il TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), il TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*), l'LVX (*Lily Virus X*); nessuno di questi ha finora provocato seri danni alla coltura. Il quadro sintomatologico delle piante affette da virosi può complicarsi quando nello stesso ospite si trovano associati più virus.

Il virus più comune e, l'unico specifico, che colpisce quasi tutti gli ibridi coltivati è l' LSV, (Marani e Bertaccini,1984) che in alcuni ibridi non provoca alcuna sintomatologia virale, mentre in altri può causare la deformazione delle foglie, che tendono ad arricciarsi e arrotolarsi a spirale e, la comparsa di striature sulle lamine. La sua presenza limita lo sviluppo vegetativo della pianta, diminuisce il numero e la grandezza dei fiori, rendendo la pianta più suscettibile ad attacchi patogeni di *Botrytis* e *Fusarium*. Quando LSV infetta le piante insieme al CMV, caso molto frequente, la sintomatologia si complica: le foglie manifestano mosaico in striature, anulature di colore brunastro e tacche necrotiche; anche i fiori vengono danneggiati, il loro sviluppo è ostacolato oppure compaiono rotture di colore e screziature dei petali. I tre principali virus patogeni associati a *Lilium* (LSV, TBV, CMV) vengono trasmessi dagli afidi per mezzo del loro apparato pungente succhiante; tra le specie di afidi identificate come sicuri vettori di malattie virali ricordiamo: l'afide *Myzus persicae*, capace di trasmettere CMV, l'afide *Aphis gossypii* capace di trasmettere sia l'LSV che il CMV e l'afide *Aphis fabae* che trasmette il TBV.

Indagini conoscitive e epidemiologiche effettuate in Italia dal 1997 al 1999, hanno permesso di identificare i più frequenti virus del *Lilium* spp. Nel 1998, 209 bulbi di *Lilium* sono stati

testati singolarmente: l' 1% risultava infetto da LSV e il 54% anche da CMV. Durante lo stesso anno, bulbi di *Lilium* cv. Casablanca, appartenente al gruppo degli Orientali, sono stati trovati infetti da LSV e anche da SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Nepovirus*). Nel 1999, nel Lazio alcuni *Lilium*, che mostravano rottura del colore dei petali, sono risultati infetti da un potyvirus possibilmente relazionabile con TuMV (*Turnip Mosaic Potyvirus*) (Bellardi *et al.*, 2002).

La diffusione delle virosi negli ambienti di coltivazione è quasi sempre associata alla pratica di propagazione vegetativa delle piante. Inoltre vari virus possono essere trasmessi da vettori quali principalmente insetti (spesso Afidi), nematodi e, in certi casi, anche da funghi che trasmettono le infezioni dalle piante malate a quelle sane. Dato che non esistono prodotti in grado contrastare i virus, la difesa deve essere orientata alla prevenzione di queste modalità di trasmissione. È importante, innanzitutto, impiegare materiale di propagazione sicuramente esente da virus; a questo proposito occorre tener presente che spesso piante infette da virus non manifestano alcun sintomo. La pratica che consente di ottenere materiale sano, che attualmente si sta sempre più diffondendo, è la coltura dei meristemi. Indispensabili sono anche l'allontanamento delle piante di specie diversa e la distruzione delle infestanti potenziali ospiti di virus, che possono essere trasmessi alla coltivazione. Infine le piante infette devono essere allontanate e distrutte prontamente.

1.2.5 Il *Lilium* e la coltura 'in vitro'

L'uso delle tecniche di coltivazione 'in vitro' ha portato un contributo sostanziale ad alcuni aspetti del miglioramento genetico ed a quelli della propagazione. Attraverso la coltura 'in vitro', oltre alla rigenerazione da scaglie (Han *et al.*, 2005; Ishimori *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007), è stato possibile in *Lilium* ottenere piante aploidi da antere e da ovuli (Van Tuyt *et al.*, 1993); valutare la capacità generativa da altri espianti, come ad esempio da protoplasti (Simmond e Cumming, 1976; Sugiura, 1993), da foglie e da nodi (Bacchetta *et al.*, 2003).

1.2.5.1 Moltiplicazione di gemme da scaglie

Molti fattori influenzano la formazione di gemme e quindi anche il numero di bulbetti per espianto. La formazione di gemme avviene quasi sempre sulla superficie interna del tessuto della scaglia. E' stato dimostrato che bulbetti formati a partire da scaglie di Liliaceae, derivavano da cellule epidermiche più vicine al tessuto vascolare e, che la maggior parte di esse si trovava vicino all'epidermide interna. Gli espianti della regione basale della scaglia formano un maggior numero di gemme e più rapidamente di quelli provenienti dalla zona

apicale (Stimart e Ascher, 1978). Takayama e Misawa (1980) hanno dimostrato che le scaglie più interne al bulbo hanno una maggiore e più veloce capacità di rigenerazione rispetto alle scaglie più esterne e che anche i bulbi più giovani hanno una maggiore capacità rigenerativa rispetto ai bulbi più vecchi. Tutto ciò porta a concludere che i tessuti ontogeneticamente più giovani hanno una capacità rigenerativa più alta. Sono stati anche studiati gli effetti dei diversi costituenti del mezzo nutritivo, relativamente ai macro e micronutrienti ed ai fattori di crescita organici di MS (Murashige e Skoog, 1962). La presenza di questi ultimi non sembra essere essenziale, come pure quella di acido nicotinico, piridossine e glicine, mentre tiamina ed inositolo sono chiaramente benefici (Van Aartrijk e Blom- Barnhoorn, 1980).

La quantità di saccarosio nel substrato influenza la rigenerazione, in particolare aumentando le concentrazioni di saccarosio, si ottiene un maggior numero di bulbetti. Il numero e la crescita di radici è stimolata da concentrazioni di saccarosio fino a 90 g/l (Takayama e Misawa, 1979). Il saccarosio regola anche la dormienza dei bulbi: i bulbi di *L. auratum* coltivati per 50 giorni a 5°C su un substrato contenente 30 g/l di saccarosio una volta trasferiti in suolo non presentavano dormienza; i bulbi coltivati allo stesso modo, ma con una concentrazione di saccarosio di 90 g/l invece, erano per la maggior parte dormienti.

Le auxine e le citochinine svolgono un ruolo chiave nella formazione delle gemme: molti studi hanno evidenziato che le auxine (soprattutto acido naftalenacetico, NAA) aumentano il numero delle gemme avventizie, mentre altre ricerche hanno dimostrato che l'uso di citochinine abbinate ad auxine, produce un più alto numero di bulbetti per scaglia. Anche il carbone attivo (AC) e la Benziladenina (BA) sembrano influenzare la rigenerazione da scaglie; la BA stimola la differenziazione dei bulbi da scaglie, ma inibisce la formazione di radici, mentre l'aggiunta di AC (0.5%) al substrato contrasta l'azione del BA, ma stimola in maniera marcata la crescita dei bulbi (Mestato *et al.*, 1994).

Fattori esterni quali temperatura, condizioni di luce e composizione dell'atmosfera hanno dimostrato effetti sulla formazione di gemme; generalmente gli studi '*in vitro*' del *Lilium* vengono portati avanti alla temperatura di 20-25°C. Per quanto riguarda l'illuminazione ci sono risultati contrastanti: molti studi sulla micropropagazione del *Lilium* suggeriscono che l'illuminazione continua sia migliore del buio (Mestato *et al.*, 1994); altri invece rilevano che l'illuminazione continua sopprime la formazione di bulbi su segmenti di scaglia e che quindi è il buio ad essere più favorevole (Niimi e Onozawa, 1979).

1.2.6 Miglioramento genetico

A partire dagli anni '70, l'importanza del *Lilium* per la produzione di fiori recisi è aumentata enormemente. Le ragioni dell'aumentato interesse nei confronti di questa bulbosa rispetto al passato sono ascrivibili ai progressi del miglioramento genetico, che ha consentito di portare sul mercato nuovi ibridi di elevato interesse commerciale, per colore, forma e dimensione del fiore ed al miglioramento delle tecniche di preparazione e conservazione dei bulbi che oggi, potendo essere conservati a -1°C, possono essere coltivati durante tutto l'arco dell'anno, consentendo quindi una programmazione aziendale adeguata (Grassotti e Nesi, 2002).

Il successo commerciale del *Lilium* ha indotto le grandi aziende di produzione e di commercializzazione alla creazione di cultivar proprie, al fine di evitare l'oneroso passaggio delle "royalties", dovute al detentore del brevetto vegetale. Le cultivar di *Lilium* coltivate sono oggi diventate centinaia, grazie al continuo lavoro di miglioramento genetico e di ibridazione portato avanti da numerose aziende specializzate.

La quasi totalità delle varietà commerciali oggi coltivate sono ibride, cioè derivate dall'incrocio tra specie.

Gli obiettivi principali nel miglioramento genetico del *Lilium* sono:

1. l'individuazione di ibridi in grado di rispondere positivamente alla forzatura, in modo da creare cultivars che assicurino buoni risultati per la coltivazione di fiore reciso durante tutto l'arco dell'anno;
2. il reperimento di nuovi colori, per ampliare la gamma presente in natura e rispondere positivamente alle continue richieste di novità da parte del mercato;
3. la messa a punto di nuovi tipi di infiorescenza, cercando di fondere nei nuovi ibridi le diversità rinvenibili anche nelle specie spontanee. Come già ricordato negli ultimi anni si è andato affermando un nuovo gruppo, quello degli LA, ibridi interspecifici tra *Longiflorum* e gruppo degli Ibridi Asiatici, nei quali vengono esaltati i caratteri positivi dei primi, attraverso un incremento della dimensione dei fiori, ed un ampliamento della gamma dei colori grazie al contributo dei secondi. Questo nuovo gruppo sta riscuotendo un notevole apprezzamento da parte dei produttori e dei consumatori, sotto l'aspetto della taglia, della robustezza dello stelo, oltre che della grandezza, forma e colore dei fiori. Presenta infatti, facilità di coltivazione, resistenza alle più usuali fitopatie e virosi, ciclo breve di coltivazione (meno di 90 giorni in alcuni casi). La pianta è poco bisognosa di temperature elevate durante il periodo invernale e il bulbo piuttosto facile da riprodurre. La disponibilità varietale risulta però essere ancora piuttosto limitata.

4. l'individuazione di cultivars virus resistenti;
5. la versatilità di impiego dei bulbi per la coltivazione sia per fiore reciso che per vaso, utilizzando selezioni di taglia ridotta, oppure mediante il ricorso a trattamenti con agenti fisici o chimici per ridurre la taglia;
6. il superamento di barriere di incompatibilità interspecifica, al fine di dare origine a ibridi che presentino caratteri agronomici e commerciali validi e rinvenibili nelle diverse specie.

Negli anni '80, sulla base dell'esigenza di ottenere cultivars di *Lilium* adatte agli ambienti agronomici italiani, caratterizzate da breve ciclo biologico ed in grado di essere facilmente propagate vegetativamente, fu avviato a Pescia, presso l'allora Sezione dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura, un programma di miglioramento genetico che prese in considerazione 19 tra le varietà di *Lilium* più coltivate in quel momento, in Italia, per il fiore reciso.

Utilizzando uno schema di tipo diallelico, parziale e incompleto, furono effettuate impollinazioni manuali riguardanti 130 delle 161 possibili combinazioni teoriche. Nel 1984-1985, 5 cvs. di *Lilium* furono irraggiate con raggi X per valutare la possibilità di ottenere mutanti in possesso di buoni e innovativi caratteri (Grassotti *et al.*, 1989). La selezione delle progenie derivanti dai diversi programmi di incroci e di irraggiamento si è sviluppata fino al 2000 e ha consentito di individuare, moltiplicare, ingrossare e valutare alcune decine di cloni dotati di caratteri rilevanti a livello agronomico e commerciale quali: taglia, forma, colore del fiore, idoneità alla coltivazione in pieno sole (normalmente con eccesso di illuminazione l'altezza del *Lilium* si riduce notevolmente peggiorando la qualità della produzione), taglia elevata per la varietà da utilizzare nel mercato del fiore reciso, ciclo culturale, attitudine alla produzione di bulbilli e alla coltivazione in vaso, fiori senza polline.

Il programma di miglioramento genetico su *Lilium* sviluppato a Pescia ha consentito di rendere disponibili varietà appartenenti al tipo degli ibridi Asiatici, in possesso di caratteri innovativi che, testati agronomicamente, hanno permesso di avviare programmi di moltiplicazione ed ingrossamento in vista di un loro inserimento in opportuni cicli di coltivazione (Grassotti e Nesi, 2002).

1.3 I VIRUS

Virus significa "farmaco" e "veleno", parallelamente al greco *pharmakon*. È un termine latino che incorpora in sé il concetto di forza (*vir*), ma vuole significare più che altro "forza negativa". I virus sono definiti semplicemente "entità infettive"; non possono essere definiti "organismi viventi" non essendo formati da cellule, ma semplicemente da una molecola di acido nucleico, costituito da DNA oppure da RNA, inclusa in un involucro generalmente di natura proteica (capside). L'acido nucleico rappresenta dal 5 al 40% del virus. Oltre al capsido alcuni virus sono protetti da un involucro di natura lipoproteica (pericapside). Esistono, infine, delle entità "infettive nude", costituite dal solo frammento di acido nucleico, definite viroidi. I virus che infettano le piante hanno, per la maggior parte, come acido nucleico l'RNA.

I virus non sono capaci di riprodursi autonomamente, infatti per moltiplicarsi necessitano di una cellula vivente; inoltre non sono dotati di un metabolismo proprio e non rispondono a sollecitazioni ambientali. I virus si comportano, quindi, sempre come parassiti obbligati: essi infatti obbligano la cellula ospite a replicare tante altre entità virali a spese della cellula stessa, che alla fine, viene distrutta (ciclo litico).

I virus hanno dimensioni tanto piccole (da 0,03 a 0,30 micrometri circa) da non essere trattenuti dai filtri batteriologici e sono visibili solo al microscopio elettronico.

Le malattie delle piante provocate da virus sono, in genere, chiamate virosi. Fortunatamente le virosi realmente pericolose, che portano a morte la pianta, non sono molte. In ogni caso è opportuno sottolineare i danni, sia qualitativi che quantitativi, che molte malattie virali determinano nel settore agrario e in quello relativo alla produzione di piante da fiore ed ornamentali, anche in considerazione dei pochi mezzi terapeutici che possano essere considerati risolutivi.

Occorre però rilevare che in certi casi l'infezione da virus non è considerata un fattore negativo per le piante da fiore, per quelle verdi da interno e alcune altre ornamentali, anzi la virosi può valorizzare l'aspetto estetico della pianta stessa. Il caso più noto, a questo proposito, è quello dei Tulipani dai fiori screziati. La screziatura o rottura di colore dei fiori dei Tulipani, causata da infezioni da parte di TBV è una malattia di cui si hanno testimonianze già dal secolo XVI secolo, quando i Tulipani provenienti dal continente asiatico vennero importati in Europa. Pregiate sono anche le Camelie dai petali variegati e varie piante verdi da interno, tra cui il Croton, ed alcuni arbusti da esterno come l'Aucuba, caratterizzati da fogliame maculato, mosaicato e screziato da vari colori.

I virus fitopatogeni sono soggetti a rapide e frequenti mutazioni; ciò determina spesso l'origine di ceppi mutanti che si specializzano su piante diverse da quelle colpite dal ceppo originario: ad esempio il Virus del Mosaico, che colpisce il cetriolo ha formato ceppi virulenti adattati a diverse specie di piante da fiore e ornamentali (bulbose da fiore, Dalia, Crisantemo, Geranio, Aralia, Orchidee).

La classificazione dei virus si basa su diversi parametri: forma e dimensioni della particella virale, tipo di acido nucleico (DNA o RNA), presenza dell'acido nucleico in forma di singola elica o di doppia elica e varie altre caratteristiche tra cui forma del capsido, presenza o meno dell'involucro lipoproteico (Fig.3, 4).

In base alla forma si distinguono tre tipi di virus (fig.5):

- ✓ **Virus a simmetria elicoidale** : sono virus di forma allungata tubolare, internamente cavi e comprendono virus sia di forma dritta (virus a bastoncino), sia di forma sinuosa detti (virus flessuosi). Tali virus comprendono molti dei virus fitopatogeni, come per esempio il TMV
- ✓ **Virus icosaedrica**: sono virus sferici; comprendono la maggior parte dei virus attualmente conosciuti che infettano le piante.
- ✓ **Virus a simmetria complessa (con involucro ipoproteico)**: sono virus allungati e terminano con le estremità arrotondate. Sono poco numerosi.

In aggiunta al virus "tipico" brevemente descritto come aggregato macromolecolare nucleo proteico che si auto replica nella cellula vegetale inducendo uno stato patologico si ritrovano, talvolta associati a questi, due strutture molecolari virus-simili quali il virus satellite e l'RNA satellite.

Il primo è un piccolo aggregato icosaedrico nucleo proteico che si accompagna obbligatoriamente al virus vero (virus ausiliario) dal quale dipende per la replicazione e l'infezione, poiché il suo acido nucleico codifica solo per la proteina capsidica. Questi generalmente riduce l'abilità della replicazione del virus ausiliario e la sua virulenza fitopatogena; si comporta come parassita del virus ausiliario. Il secondo, l'RNA satellite, è una piccola molecola lineare o circolare di acido nucleico che si colloca all'interno del virus vero e proprio, non affine o solo in parte affine all'RNA virale, che incrementa, o più comunemente, abbassa la virulenza dello stesso.

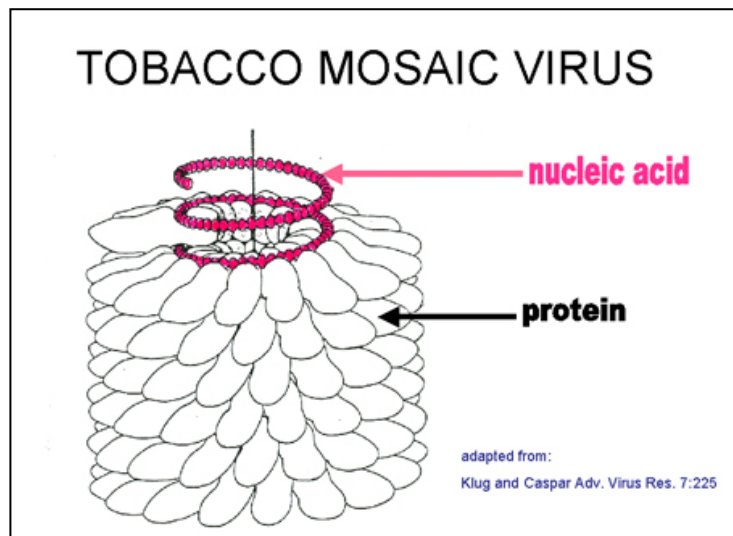


Fig. 3: Genoma, capside o rivestimento proteico

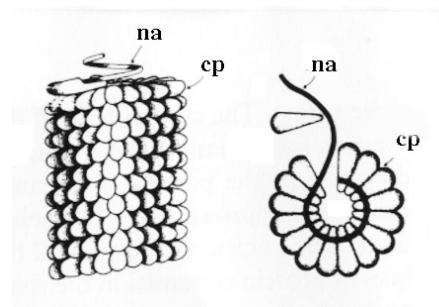


Fig. 4: Particolare del rivestimento proteico

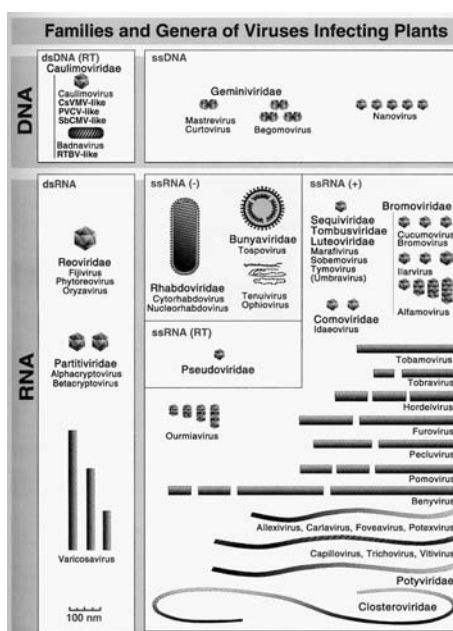


Fig.5: Simmetria icosaedrica, simmetria elicoidale, simmetria complessa

1.3.1 Tassonomia

Molti virus sono indicati con un termine che corrisponde al sintomo dominante nel quadro di malattia causato su un determinato ospite. Alcuni esempi sono, il *Virus del Mosaico del Tabacco* poiché induce sintomi di mosaico sul tabacco, il *Virus del Giallume della Barbabietola* in quanto produce giallume nell'apparato fogliare della chenopodiacee. Questa terminologia si è rilevata sempre più incerta ed inadatta per svariati motivi, per cui la tendenza che si va sempre più affermando è di sostituirla con un'altra. Da una tassonomia pressoché improvvisata ed incerta si è giunti ad una più logica e ragionata che raggruppa i virus in famiglie, generi e specie (tab.4).

1.3.2 Patogenesi delle malattie virali

Il decorso delle malattie virali può essere suddiviso in tre fasi: inoculazione, moltiplicazione, diffusione.

I virus non sono capaci di penetrare attivamente nelle cellule dei tessuti vegetali. L'entrata nelle cellule ospiti è passiva e presuppone la presenza di lesioni a livello della cuticola e della parete cellulare che possono essere di varia natura, comprese quelle inferte da fitofagi, da funghi endoparassiti, o piante parassite. Anche i tricomi molto fragili e di facile rottura, possono costituire una via di ingresso. Una volta entrato nella cellula ospite, il virus inizia a moltiplicarsi: si libera dall'involucro proteico (capside) e la molecola di acido nucleico, che generalmente nei virus fitopatogeni è RNA, si localizza nel nucleo ed induce la cellula a formare RNA virale e quindi a sintetizzare le proteine virali a discapito di quelle cellulari. I nuovi materiali assemblati all'interno della cellula ospite ricostituiscono così nuove particelle virali. La cellula alla fine viene distrutta e i virus si liberano.

La diffusione del virus all'interno della pianta infetta può avvenire con differenti modalità che danno origine ad infezioni localizzate o sistemiche:

- ✓ **Infezione localizzata o parenchimatosa:** i virus passano dalle cellule infette a quelle sane contigue attraverso i plasmodesmi. Questo viene, quindi, definito un trasporto a breve distanza o parenchimatico
- ✓ **Infezione sistemica:** i virus si diffondono nella pianta attraverso i vasi conduttori che trasportano prevalentemente la linfa elaborata. La diffusione sistemica è molto veloce, e viene definita a lunga distanza o floematica. La diffusione sistemica, seppure molto veloce e generalizzata, non riesce sempre a raggiungere tutti i tessuti della pianta; infatti rimangono in genere incontaminati i meristemi apicali (i tessuti meristematici o giovani delle gemme).

FAMIGLIA	GENERE
GEMIVIRIDAE	Mastrevirus Curtovirus Topocuvirus
NANOVIRIDAE	Begomovirus Nanovirus Babuvirus
Gruppo: virus dsRNA	
CYSTEVIRIDAE	Endornavirus
PARTITIVIRIDAE	Alphacryptovirus Betacryptovirus
REOVIRIDAE	Fijyvirus Phytoreovirus Oryzavirus
Gruppo: virus sRNA	
BROMOVIRIDAE	Alfamovirus Bromovirus Cucumovirus Ilarvirus Oleavirus
CLOSTEROVIRIDAE	Ampelovirus Closterovirus
COMOVIRIDAE	Comovirus Fabavirus Nepovirus
FLEXIVIRIDAE	Potexvirus Mandarivirus Allexivirus Carlavirus Foveavirus Capillovirus Vitivirus Trichovirus Furovirus
LUTEOVIRIDAE	Luteovirus Polerovirus Machlomovirus
NODAVIRIDAE	Pecluvirus Ourmiavirus
PICORMAVIRIDAE	Pomovirus
POTYVIRIDAE	Potyvirus Ipomovirus Macluravirus Rymovirus Bymovirus Tritimovirus Sadwavirus

SEQUIVIRIDAE	Sequivirus Waikavirus Sobemovirus
TETRAVIRIDAE	Tobamovirus Tobravirus
TOMBUSVIRIDAE	Tombusvirus Avenavirus Aureovirus Carmovirus Dainthovirus Machlomovirus Necrovirus Panicovirus
TYMOVIRIDAE	Maculavirus Marafivirus Tymovirus Umbravirus
RHABDOVIRIDAE	Cytorhabdovirus Nucleorhabdovirus
BUNYAVIRIDAE	Tospovirus Ophiovirus
ORTHOMIXOVIRIDAE	Tenuivirus Varicosaivirus

Tab: 4 Tassonomia che raggruppa i virus in famiglie e generi
<http://www.microbiologybytes.com/virology/VirusGroups.html>

1.3.3 Trasmissione delle virosi

La trasmissione dei virus da una pianta infetta a una sana può avvenire in vari modi, ma si possono riconoscere due principali tipi di trasmissione:

- ✓ **Trasmissione diretta:** avviene da pianta a pianta senza intervento interposto di fattori esterni cioè per contatto diretto di organi vegetali, per propagazione vegetativa o per riproduzione gamica;
- ✓ **Trasmissione indiretta:** si verifica attraverso un vettore biologico che può essere animale (insetti, acari, nematodi, molluschi) o vegetale e talvolta attraverso piante parassite come la Cuscuta e certi funghi presenti nel terreno. Gli insetti più importanti nella trasmissione dei virus sono quelli ad apparato boccale pungente-succhiante come i Rincoti e i Tisanotteri, ma possono essere vettori di virus anche alcuni Coleotteri ed Ortotteri.

La trasmissione diretta di fitovirus in natura per trasferimento immediato (contatto di organi

epigei o ipogei) o mediata (attrezzi di lavoro contaminati) non è comune, né frequente.

Tale evenienza si concretizza qualora il succo citoplasmatico infetto venga a contagiare siti di organi della pianta interessati da microlesioni o da traumi meccanici che realizzano soluzioni di continuità nei tessuti vegetali.

La trasmissione per propagazione vegetativa può avvenire molto facilmente in quanto, qualora la pianta madre sia infetta da un'entità patogena tutto il materiale di derivazione agamica lo è parimenti. Quindi, in questo caso è l'operatore agricolo che utilizzando questo materiale di propagazione, senza accertarsi delle condizioni di sanità, senza cioè operare una adeguata selezione qualitativa, si assume un ruolo di responsabilità in questa trasmissione.

La trasmissione per riproduzione gamica dipende generalmente dalla combinazione pianta ospite-virus fitopatogeno, e dallo stato di sviluppo ontogenetico ed agronomico della pianta stessa. Tanto più precocemente, rispetto alla fase di riproduzione, la pianta viene a contrarre l'infezione, tanto più frequente ed elevata è la percentuale di trasmissione seminale del virus.

La trasmissione per seme si verifica quando il virus, raggiunto l'embrione, nel corso della sua distribuzione sistemica nella pianta, vi persiste integro. Per quanto concerne questa tappa della distribuzione del virus nella pianta, essa può realizzarsi tramite l'ovulo e/o tramite il polline che può, in qualche caso, risultare infetto. In qualche altro caso il virus si trasferisce soltanto dalla pianta madre ai tegumenti seminali, non nell'embrione, ed infetta la nuova plantula per contagio diretto durante la germinazione.

La trasmissione per vettori biologici è la modalità di trasmissione più importante dal punto di vista epidemiologico. Tale trasmissione è definita indiretta perché richiede un'entità biologica, il vettore, che acquisisca il virus della pianta infetta e più o meno celermente lo introduca in una delle piante sane in successione temporale. Entità vettrici dei virus fitopatogeni risultano essere: insetti, acari, nematodi, protozoi e funghi.

Gli insetti sono in assoluto i più importanti e frequenti vettori di fitovirus. Tra di essi annoverano, anzitutto, gli Omotteri (afidi, cicaline, aleurodidi e coccidi), qualche Emittero, alcune specie di Tisanotteri (tripidi), qualche Coleottero e qualche Ortottero (cavallette). Lo schema generale, nel caso degli insetti fitomizi (Omotteri) ad apparato boccale pungente-succhiante, è il seguente: gli stiletti mandibolari e quelli mascellari costituenti la parte distale dell'apparato stesso, vengono fatti penetrare a profondità variabile nei tessuti vegetali ove avviene il contagio del succo cellulare con l'eventuale entità virale presente. Attraverso il canale alimentare il succo cellulare passa nell'esofago insieme al virus che si diffonde poi nell'emolinfa per accumularsi, infine, nelle ghiandole salivari; da queste e mescolato alla saliva, il virus viene introdotto in altro tessuto nel corso della nutrizione successiva

dell'insetto medesimo.

Il processo di trasmissione da parte di questi insetti si articola in momenti particolari e diversi:

- ✓ Periodo di acquisizione, il lasso di tempo di alimentazione affinché sia acquisito il virus (insetto virulifero)
- ✓ Periodo di latenza, il tempo di incubazione utile affinché l'insetto virulifero trasmetta il virus ad una nuova sede di alimentazione
- ✓ Periodo di inoculazione, il tempo di alimentazione minimo necessario all'insetto virulifero per iniziare la trasmissione del virus
- ✓ Periodo di infettività, l'intervallo di tempo tra l'acquisizione della virulificabilità e la perdita della stessa.

In accordo alla durata di questi periodi si differenziano tre essenziali modalità di trasmissione.

Non persistente, semi-persistente e persistente.

Nel primo caso l'acquisizione e l'inoculazione del virus si compiono in pochi secondi e non si riscontra latenza. La virulificabilità è di una al massimo, di qualche ora. Il virus, che non si moltiplica dentro il corpo degli insetti, è acquisito e inoculato nei tessuti epidermici della pianta; aderisce soltanto alla parete dell'estremità distale del canale di suzione ed alla superficie degli stiletti boccali, mentre l'esofago, le ghiandole salivari e la stessa saliva non sono coinvolti.

Nel trasmissione persistente, invece, l'acquisizione e l'inoculazione del virus si realizzano in intervalli di tempo molto lunghi, si riscontra, per esempio, sempre un periodo di latenza e l'infettività varia da alcuni giorni, a svariate settimane, a tutta la restante vita dell'insetto. Il virus, pertanto, si moltiplica nel corpo dell'insetto e quindi viene acquisito ed inoculato nei tessuti interni della pianta dal canale alimentare all'esofago, all'emolinfa, alle ghiandole salivari e, unitamente alla saliva, è introdotto nella pianta. Questo tipo di trasmissione può essere differenziato in circolativo e propagativo. Tale distinzione ha tra l'altro rilevanza epidemiologica per le malattie connesse ai virus che si moltiplicano nell'insetto vettore. Alcuni di questi si propagano alla prole ovipara dell'insetto.

Nella trasmissione semi-persistente si riscontrano comportamenti intermedi tra i due precedentemente illustrati.

Nel caso di insetti ad apparato boccale masticatore (Coleotteri) lo schema di trasmissione è connesso al rigurgito di quanto precedentemente ingerito dall'insetto nel corso dell'alimentazione; al tessuto che viene mordicchiato si unisce il rigurgito infetto dell'alimentazione precedente.

Tra gli Omotteri, gli afidi sono quelli maggiormente coinvolti ed attivi. Circa 200 specie e

sottospecie di questi esapodi trasmettono complessivamente i due terzi dei fitovirus (circa 250) che vengono usualmente trasmessi da pianta a pianta da artropodi e nematodi. Alcune specie veicolano molti virus (*Aphis fabae*, *Myzus persicae*), altre solo alcuni virus o, al limite, un solo biotipo di una stessa specie virale patogena. Le cicaline che trasmettono solo secondo modalità della persistenza o semi-persistenza sono molto meno numerose ed attive, specialmente nelle nostre regioni agro-ecologiche. Gli aleurodidi possiedono l'attitudine a trasmettere nei vari modi indicati, eccetto quello persistente propagativo. Nel nostro paese il più pericoloso in tal senso è la *Bemisia tabaci*, che si ritrova sulle piante coltivate in serra. I coccidi, anche in accordo alla loro limitata mobilità, ricoprono un ruolo secondario, specialmente nella nostra agricoltura; si ricordano per le trasmissioni di alcuni tipi di Closterovirus e Trichovirus della vite. I tripidi, piccoli insetti polifagi a vita breve ma spiccatamente riproduttivi e mobili, trasmettono pressoché esclusivamente Tospovirus. Si ricordano *Thrips tabaci* e *Franklinella occidentalis* ed altre specie che acquisiscono il virus allo stato di neanide e lo trasmettono da adulti. Le specie di Coleotteri ed Ortotteri in causa sono assai limitate, essi trasmettono in una maniera molto simile alla semi-persistenza ed in virtù del rigurgito alimentare.

Gli acari che trasmettono virus appartengono al raggruppamento tassonomico degli Eriofidi. La più nota e studiata è l'*Aceria tulipae*, vettrice di virus nelle graminacee che acquisisce negli stadi giovanili e trasmette da adulto.

I nematodi vettori di virus appartengono tassonomicamente ai raggruppamenti *Longidoridae* e *Trichodoridae* ed ai generi *Longidorus* e *Trichodorus*. Essi operano secondo lo schema della semi-persistenza. In età giovanile o da adulti nutrendosi su giovani radici di piante infette acquisiscono il virus che trasmettono nel corso di successive alimentazioni su altri siti e piante. Essi perdono la capacità di infettare con il tempo e soprattutto con la muta. Svariati virus poliedrici, indicati tassonomicamente come *Nepovirus*, come l'arricciamento della vite e la maculatura anulare del tabacco, vengono veicolati da specie dei generi citati sopra.

I protozoi. Alcune entità dell'ordine dei *Plasmodiophorales*, quali parassite obbligate a plasmodio endocellulare ed a sporangio durevole, che producono zoospore provviste di due flagelli, sono confermate vettrici di una quindicina di specie diverse di virus fitopatogeni dei generi *Furovirus* e *Bymovirus*. Si tratta di *Polymyxa betae*, *P. graminis* e di *Sporangospora sub terranea*. Lo sporangio quiescente di questi generi, organizzato in agglomerati multipli alberga il virus al suo interno e funge da ospite perpetuante. Le zoospore prodotte da questa struttura durevole, al momento dell'interruzione della quiescenza, introducendo il loro citoplasma in una cellula vegetale, vi immettono anche il virus. Questo seguirà, quindi, una

diffusione generalizzata (o quasi) a tutta la pianta.

Funghi. Alcune specie dell'ordine dei *Chytridiomycetes*, sono parassiti intracellulari di organi ipogei della pianta, dotati di zoospore con un unico flagello, zoosporangio propagativo e riproduttivo (quiescente) indiviso. Tali funghi risultano attivi per la trasmissione di una decina di virus isometrici (tra cui alcune specie di *Necrovirus*). Le zoospore acquisiscono il virus dal terreno nella loro breve esistenza da entità libere e mobili e quindi lo introducono unitamente al loro citoplasma nella cellula vegetale.

1.3.4 Modificazioni fisiologiche e principali sintomatologie delle virosi

L'infezione virale provoca dei disturbi nel metabolismo dei vegetali, quali:

- ✓ alterazione del processo fotosintetico
- ✓ consumo delle energie cellulari per la sintesi dei componenti virali
- ✓ deviazione del metabolismo dei carboidrati con accumulo di zuccheri a cui possono seguire fenomeni di accartocciamento fogliare
- ✓ diminuzione delle sostanze di crescita come le auxine per la sintesi di sostanze inibenti

La sintomatologia può essere generalizzata sulla pianta, e allora abbiamo casi di nanismo o gigantismo, oppure localizzata sui vari organi: foglie che mostrano arricciamenti, accartocciamenti, bollosità, polifillia, mosaico, giallume, bronzatura, arrossamento, rotture di colore, necrosi, enazioni localizzate soprattutto nella pagina inferiore della foglia, in forma di foglioline; fiori che presentano variegature, screziature, inverdimento dei petali, deformazione, riduzione delle dimensioni; frutti con variazioni di colore e bronzature e rami e steli in cui si possono osservare scopazzi, fasciazioni (appiattimento dei rami sia erbacei che legnosi, del tronco talora anche delle radici), plastomanie (torsioni e deformazioni del fusto e dei rami).

1.3.5 Diagnosi delle malattie virali

La diagnosi delle virosi non può basarsi solo sulla sintomatologia che spesso è aspecifica e poco individuabile. Generalmente occorre effettuare indagini di laboratorio che spesso sono complesse e laboriose. Alcuni metodi utilizzabili per riconoscere le virosi e i virus responsabili del processo infettivo possono essere i seguenti:

- ✓ Aspetto sintomatologico nel caso di sintomi evidenti e specifici o che comunque possono coadiuvare le successive analisi di laboratorio. Nel rilevamento dei sintomi è opportuno tenere conto sia della modalità di comparsa dei sintomi stessi sulla pianta, sia della distribuzione delle piante infette nell'ambiente di coltivazione.

- ✓ Inoculazioni per succo su ospiti erbacei differenziali.

Questa modalità meccanica è utilizzata per trasmissioni sperimentali e vengono impiegate specie indicatrici erbacee a fini diagnostici, per conservare e caratterizzare isolati virali e per effettuate indagini approfondite.

- ✓ Impiego di piante indicatrici di cui si conosce la risposta sintomatologica a determinati agenti infettivi, che vengono, quindi, preventivamente inoculate con succo di piante sospette. La pianta indicatrice è infatti una qualunque pianta in grado di fornire risposte sintomatologiche caratteristiche per una determinata infezione virale

A questo scopo vengono impiegate piante erbacee come Petunia, Pomodoro, Tabacco, Cetriolo, Fagiolo, *Chenopodium* spp., *Datura stramonium*. I virus della rosa hanno la caratteristica di provocare sintomi transitori, oppure possono essere latenti in certe cultivar, per cui la sola ispezione visuale non è sufficiente per individuare le piante infette. La trasmissione di virus a piante indicatrici sia mediante inoculazione per succo a piante erbacee che per innesto su Rosacee e l'esame di materiale vegetale al microscopio elettronico, sono stati, per lungo tempo, gli unici metodi per evidenziare la presenza di virus in piante di rosa. La trasmissione di virus dalla rosa alle piante indicatrici erbacee avviene con difficoltà e solo se alla soluzione di estrazione vengono aggiunte sostanze antiossidanti, quali polivinilpirrolidone in quantità variabile dal 2,5 al 5% (Fulton, 1976). I virus trasmessi a piante indicatrici vengono poi identificati con metodi sierologici.

Nel settore floricolo e ornamentale la trasmissione dei virus alle piante indicatrici mediante succo è quella che ha dato i migliori risultati; meno efficaci le tecniche di trasmissione tramite innesto e per vettori naturali.

- ✓ Indagini microscopiche e di laboratorio sulla composizione chimico fisica delle particelle virali.
- ✓ Tecniche diagnostiche di laboratorio:

1. Indagini sierologiche

Si fondano sulla proprietà dei virus di comportarsi da antigeni (o da gruppo di antigeni) nel sangue di alcuni mammiferi, provocando la formazione di anticorpi specifici e noti. Gli anticorpi prodotti originano un antisiero animale contenente gli anticorpi noti di un determinato virus. Nei laboratori specializzati questi antisieri vengono purificati e conservati al fine di costituire una “serioteca” relativa alla maggior parte dei virus noti, che può essere impiegata nelle reazioni sierologiche di identificazione dei virus.

Tra le reazioni sierologiche che attualmente vengono maggiormente impiegate vi è il test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) un saggio virus specifico di tipo massale. Si tratta di un test che prevede, per il successo della prova l'impiego di materiale (antisiero e

antigene) molto purificato. L'utilizzo degli anticorpi, una classe di glicoproteine del siero, prodotte da linfociti B degli animali a sangue caldo, in risposta a molecole estranee di varia natura (antigeni), iniziò nella diagnosi delle malattie umane, per poi estendersi alla diagnosi fitopatologica (Hampton *et al*, 1990). Oggigiorno i test ELISA sono di uso corrente in fitovirologia (Clark e Adams, 1977). Essi consentono lo screening di un numero elevato di campioni in breve tempo (tipicamente 24-48 ore) e con parziale o totale automazione della procedura (Schaad, 1979). In questi test, eseguiti su piastra di polietilene ad alta capacità di assorbimento per le proteine (Lehtonen e Viljanen, 1980), gli anticorpi vengono coniugati covalentemente con enzimi, formando complessi che conservano sia le capacità immunologiche che quelle catalitiche di trasformare specifici substrati. Questi ultimi, modificando le loro proprietà colorimetriche, permettono la visualizzazione-misurazione della reazione positiva. (O'Beirne e Cooper, 1979). La più significativa caratteristica dei saggi di immunoassorbimento è la capacità di determinare fitopatogeni utilizzando concentrazioni molto più basse di quelle utilizzabili con i classici metodi di immunoprecipitazione. Un'altra caratteristica dell'ELISA è la sua versatilità, cioè la sua abilità di determinare antigeni di diverse morfologie e dimensioni (Clark, 1981).

Gli svantaggi principali del test ELISA sono l'impossibilità di osservare le cellule direttamente, la possibilità di osservare falsi positivi e negativi e la bassa sensibilità (10^4 - 10^5 cellule/ml) (Clark, 1981; Mazzucchi, 1995). I protocolli possibili sono numerosi ma tutti riconducibili a due classi principali ELISA *diretto* ed ELISA *indiretto*.

ELISA diretto: si procede alla sensibilizzazione dei pozzetti con anticorpi batterio specifici, incubandoli per alcune ore (2-6 ore) a 37°C. Si asporta l'eccesso di anticorpo con appositi tamponi e si aggiunge il campione da testare, incubando in genere per una notte. Se sono presenti antigeni omologhi, questi si legheranno ai pozzetti sensibilizzati, l'aggiunta dell'anticorpo specifico coniugato con un enzima (fosfatasi alcalina) e la successiva aggiunta, dopo i necessari lavaggi, del substrato colorimetrico specifico per l'enzima, darà origine, nel caso di responso positivo, ad una modificazione dello spettro di assorbimento del substrato con la possibilità di registrare l'assorbimento a una data lunghezza d'onda (DAS-ELISA: double antibody sandwich ELISA) (Clark, 1981) (Fig. 6).

ELISA indiretto: si procede alla sensibilizzazione dei pozzetti con un anticorpo policlonale. Gli antigeni omologhi si legano ai pozzetti sensibilizzati. A questo punto un anticorpo monoclonale non coniugato si lega all'antigene. Per fare avvenire la reazione colorimetrica si utilizza un anticorpo antimouse coniugato con la fosfatasi alcalina (DASI-ELISA: "double

antibody sandwich indirect"). La procedura prevede in seguito, una rivelazione-misurazione analoga alla metodica precedentemente descritta.

Nel PAS-ELISA i pozzetti vengono presensibilizzati con la proteina A (Fig.7).

Nel caso in cui l'anticorpo non si legni né ai pozzetti né alla proteina A, la piastra viene sensibilizzata con l'antigene al quale si lega l'anticorpo monoclonale e successivamente l'anticorpo antimouse coniugato (DIRECT-BANDING).

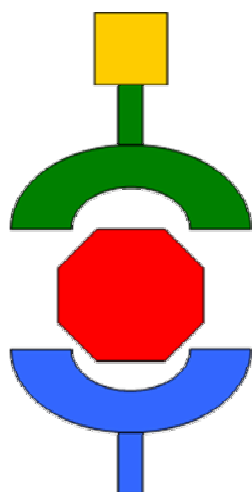


Fig. 6 DAS-ELISA test; blu: anticorpo; rosso: antigene; verde: anticorpo specifico coniugato con enzima per la reazione colorimetrica.

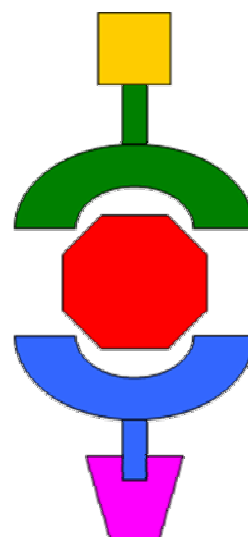


Fig. 7 PAS- ELISA test; rosa: la proteina A; blu: anticorpo; rosso: antigene; verde: anticorpo specifico coniugato con enzima per la reazione colorimetrica.

2. Indagini molecolari

Le tecniche molecolari che utilizzano le proprietà degli acidi nucleici virali sono in rapida affermazione in virologia vegetale in quanto la versatilità d'uso e l'attendibilità dei risultati ne permettono l'impiego come strumento di ricerca di base e per la diagnosi massale. La possibilità di esplorare a fini diagnostici e identificativi, l'intero genoma virale e non la sola porzione codificante la proteina capsidica rappresenta il punto di forza di queste tecniche nei confronti di quelle sierologiche. La sierologia può trovare infatti serie limitazioni nel caso del rilevamento di: virus instabili, virus con scarso potere immunogeno, virus per i quali è difficile ottenere preparati purificati, virus con basso titolo nell'ospite naturale e non trasmissibili meccanicamente, viroidi o ceppi virali assai prossimi o indistinguibili. Le tecniche molecolari, più sensibili ad individuare basse concentrazioni virali ed adatte ad utilizzare poche quantità di materiale allevato '*in vitro*', hanno completamente rivoluzionato i criteri di studio poiché permettono di sintetizzare e clonare copie degli RNA virali sotto forma di DNA complementare (cDNA) e di manipolare ed adattare ad usi specifici i cloni ottenuti,

impiegando enzimi che potrebbero essere utilizzati su molecole di RNA (Gallitelli e Boscia, 1995).

Per la retrotrascrizione di rilevante importanza è la coda di circa 200 residui di adenina (coda poli A) che solitamente gli RNA eucariotici presentano alla loro estremità 3'-OH, in seguito a maturazione. Incubando l' RNA totale (quindi contenente anche RNA ribosomiale) estratto da una cellula, l'enzima trascrittasi inversa, precursori deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), tampone e ioni bivalenti Mg^{++} , è possibile in presenza di oligo dT dare il via alla formazione di un filamento di cDNA (DNA copia), a partire dal primer che riconosce la coda di poli A secondo le regole della complementarità. L'oligo dT è una catena di circa venti residui di timina. Questo processo di appaiamento, anche per altre reazioni che non chiedono oligo dT, si chiama *annealing*. Il primer fornisce un 3'-OH che la trascrittasi inversa usa per allungare la catena usando come stampo il trascritto. Questa seconda fase, detta di *allungamento* avviene alla temperatura di circa 50°C in 1 ora (Fig.8). Sintetizzato il primo filamento, prima di procedere con l'amplificazione del cDNA, viene aggiunto alla reazione l'enzima RNasi (solitamente derivata dal batterio *Escherichia coli*) che degrada il filamento di RNA originale che è stato usato come stampo dalla trascrittasi inversa.

Quando la retrotrascrizione è completa, il cDNA generato viene amplificato tramite una metodica di PCR standard. Una DNA polimerasi termostabile, un enzima con attività 5'→ 3' polimerasica, viene aggiunta allo stampo di cDNA ed in presenza di una coppia di primers specifici per la sequenza del gene che si desidera amplificare, la reazione di PCR viene avviata. Se non si dispone della sequenza o se interessa l'amplificazione di tutto il DNA, il secondo primer sarà aspecifico in modo tale che si appai con l'estremità del primo filamento di DNA e di tutti i cDNA neosintetizzati. Dapprima viene sintetizzata una molecola di DNA a doppio filamento a partire dalla molecola di cDNA, conducendo la reazione ad una temperatura adatta a permettere l'annealing dei primers al DNA. Successivamente portando la temperatura a 95°C, la nuova molecola di DNA si denatura e i due filamenti così separati sono pronti per un nuovo appaiamento dei primers e per la sintesi da parte della polimerasi, ad un nuovo abbassamento della temperatura (72°C circa 1000 bp/minuto). Dopo circa 30 cicli, milioni di copie della sequenza di interesse saranno generate.

Usta *et al* nel 2005 hanno condotto numerose prove, testando per ogni reagente coinvolto nella reazione diverse concentrazioni e lasciando invariate le concentrazioni degli altri. Sono riusciti a mettere a punto un protocollo di RT-PCR efficace e standardizzato per la diagnosi di *Prunus Necrotic ringospot Virus* (PNRSV), il virus più comune in specie coltivate di *Prunus*,.

Ragozzino *et al* nel 2005 hanno dimostrato che l'RT-PCR con un unico step è il metodo diagnostico più veloce ed efficiente, per determinare la presenza di *Citrus exocortis viroid* e *Hop stunt viroid*, due viroidi entrambi causa di un importante malattia in *Citrus*.

Nel 2003 Niimi *et al*, hanno diagnosticato la presenza di CMV di LSV e LMoV in tre diverse cultivar di *Lilium* utilizzando la tecnica molecolare della RT-PCR, e hanno confrontato i risultati ottenuti con il metodo immunoenzimatico, ELISA. I risultati hanno permesso di concludere che la RT-PCR è un metodo diagnostico più sensibile dell'ELISA nella diagnosi di agenti virali nelle specie di *Lilium*.

1.3.6 Il controllo delle virosi

La diffusione delle malattie virali nel settore floricolo-ornamentale è andata via via aumentando con l'intensificarsi degli scambi commerciali e l'importazione di materiale di moltiplicazione e di piante infette, nonché per l'introduzione di nuovi vettori naturali come nel caso del tripide *Frankliniella occidentalis*. L'applicazione di sistemi di controllo doganale e di quarantena è indispensabile per evitare l'introduzione e la diffusione di nuovi agenti patogeni.

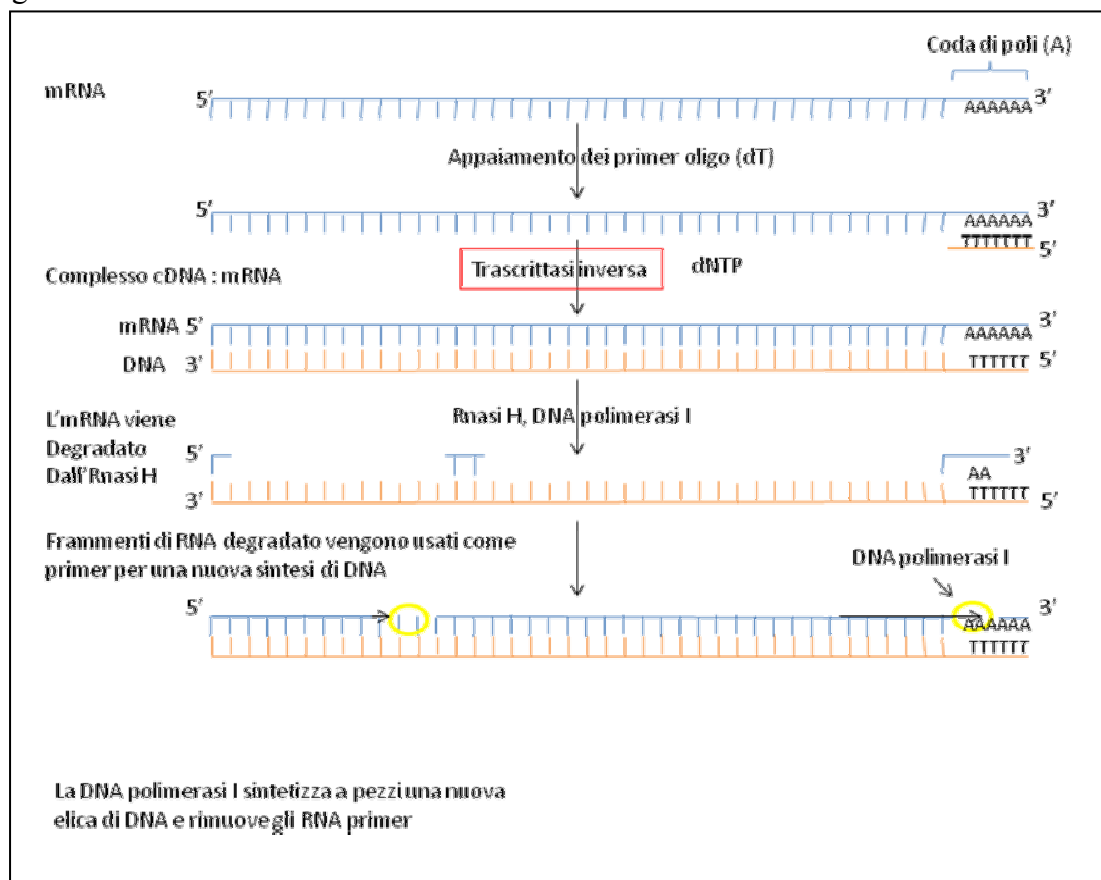


Fig. 8 Sintesi di DNA complementare a doppia elica (cDNA) da un mRNA poliadenilato, usando trascrittasi inversa, RNasi H, DNA polimerasi I.

Le principali modalità di prevenzione si basano sulle seguenti strategie:

- ✓ distruzione dei vegetali infetti che possono rappresentare fonti di inoculo
- ✓ eliminazione delle piante spontanee o infestanti ospiti secondari di alcuni virus ubiquitari
- ✓ scelta di varietà resistenti o tolleranti, soggette a infezione ma che subiscono un danno irrilevante
- ✓ lotta ai vettori animali, insetti, o vegetali con trattamenti fitoiatrici o di tipo agronomico
- ✓ impiego di seme o di materiale di propagazione vegetativa (bulbi, tuberi, talee) sicuramente sano. La sicurezza può derivare da una certificazione ufficiale, oppure, da esami di laboratorio appositamente effettuati.

A tutt'oggi, in Virologia vegetale ancora molti rimangono gli aspetti non ben conosciuti fra quelli considerati indispensabili per poter porre delle sicure basi teoriche all'applicazione di una terapia appropriata alle piante infette.

1.3.7 Chemioterapia

Considerevoli sforzi sono stati compiuti nel tentativo di evidenziare sostanze chimiche, naturali o sintetiche, in grado di interferire nella replicazione dei virus. La tabella 5, mostra un elenco di alcune sostanze sperimentate nei confronti di TMV e dà l'idea di quale sforzo sia stato compiuto nel tentativo di individuare un valido agente antivirale.

Sebbene alcune delle sostanze sperimentate si siano mostrate efficaci nell'agire sul processo infettivo e sulla replicazione dei virus, esistono tuttavia, molti aspetti, soprattutto di ordine biochimico, ancora da chiarire. Alcune di queste sostanze sono, infatti, risultate attive contro determinati virus su certe piante ospiti, ma non per gli stessi virus su ospiti diversi. Spesso si è verificato che l'attività di una data sostanza risultava condizionata dall'età della pianta o dall'epoca dell'infezione. In molti casi, infine, l'azione positiva veniva a cessare dopo un certo periodo di tempo, così che la malattia poteva riprendere il suo normale decorso. Nonostante i notevoli sforzi compiuti ed i risultati acquisiti, l'utilizzazione di sostanze in grado di ostacolare le diverse fasi del processo infettivo rimane, quindi, ben lontana dalle necessità pratiche.

I principali ostacoli si possono riassumere nella necessità che tali sostanze dovrebbero rispondere in modo adeguato, e di fatto non rispondono, a: assenza di effetti fitotossici nelle piante trattate, sistemicità nell'ospite, persistenza, economicità, tossicità.

Sostanza	Infettività estratti	Numero lesioni	Replicazione virale	Riferimento
Imanina Microcidina		+		Boby (1961)
Estratti di <i>Mytilus edulis</i>		+		Limasset (1961)
Ematoporfirine, solfato di idrazina benzochinone	+			Braun e Kradolfer (1961)
Acido cloridrico		+		Semal (1962)
Actidione, tiouracile		+	+	Hirai (1962)
Blasticidina S		+	+	Hirai (1965)
Medina , chinina			+	Kalichava et al., (1965)
Propilgallato, etilgallato	+			Kalichava e Loginova (1965)
Puromicina	+			Prozoroukaya et al., (1966)
Cloramfenicolo	□			Prozoroukaya et al., (1966)
Dimetilsulfossido	+	+		Pine (1967)
6-azouracile	±	+		Dijkstra (1969)
Ac. Glutammico e aspartico	+	+		Verma et al., (1970)
Polifosfato ammonico	+	+		Vicente et al., (1972)
Citrinina		+	+	Yasuda e Kataoka (1974)
Glicidato			+	Purohit e Tregunna (1975)
Bromophos		±	+	Schuster (1975)

Tab.5: Effetti di alcune sostanze nei confronti di TMV in tabacchi a lesioni locali; (+ = effetto positivo in termini di riduzione, — effetto negativo).

Attualmente risultati terapeutici positivi possono essere ottenuti solo attraverso l'impiego della coltura dei meristemi e della termoterapia. E' bene, comunque, chiarire che una pianta ottenuta con l'applicazione di queste tecniche, anche se perfettamente condotte, può ancora essere infetta; e che il risanamento di una pianta non porta mai all'acquisizione di

caratteristiche di immunità o di resistenza a successive infezioni. Da ciò deriva la necessità di procedere sia all'accertamento, attraverso l'impiego di idonei mezzi di indagine diagnostica, dell'effettivo risanamento, sia alla propagazione del materiale risultato sano in condizioni rigidamente controllate, per evitare la possibilità di nuove infezioni (Triolo, 2001).

1.3.8 Coltura di meristemi

La coltura dei meristemi consiste nell'impiego di cellule degli apici meristematici, quasi sempre virus-esenti, per costituire nuove piante sane. La tecnica consiste nel prelievo sotto cappa sterile a flusso orizzontale di parti di tessuto dai meristemi apicali che poi vengono posti in substrati nutritivi, agarizzati e arricchiti di fitoregolatori che stimolino sia la divisione cellulare che la rizogenesi. Trascorso un periodo di tempo di circa 2-3 mesi si ottengono delle nuove piantine che verranno trapiantate in substrati naturali e acclimatate.

La possibilità di ottenere piante normali da espianti di dimensioni variabili da frazioni, fino a pochi millimetri, prelevati da apici vegetativi ed allevati su mezzo nutritivo, è stata accertata, inizialmente, con le esperienze di Loo (1943) su Asparago e di Ball (1943) su Lupino. Le dimensioni degli espianti sono da considerarsi un parametro critico, nel senso che espianti di piccole dimensioni garantiscono migliori risultati terapeutici ma, sfortunatamente, mostrano anche rese minori di attecchimento. La coltura dei meristemi garantisce dei buoni risultati per diverse specie di piante ed in particolare nel settore delle ornamentali. Fra i risultati di maggiore rilievo conseguiti con l'applicazione di questa tecnica, che interessano Tymovirus, Nepovirus, Cucumovirus, Potexvirus, Potyvirus e Carlavirus, ricordiamo fra quelli registrati su specie da fiore, l'eliminazione da Garofano del Virus della 'Maculatura Nervale' (*Carnation Vein Mottle Virus*) e del Virus Latente (*Carnation Latent Virus*), del Virus della 'Aspermia' (*Chrysanthemum Aspermy Virus*) e del Virus B (*Chrysanthemum Virus B*) da Crisantemo; del 'Mosaico' (*Dahlia Mosaic Virus*) da Dalia, del 'Mosaico' (*Iris mosaic Virus*) da Iris.

Buoni risultati sono stati ottenuti, inoltre, nei confronti di PVX, PVY, PVA su Patata e dei Virus 'dell'Ingiallimento del Bordo' (*Strawberry Yellow Edge Virus*) e della 'Scolorazione Perinervale' (*Strawberry vein Banding Virus*) su Fragola. (Triolo, 2001).

In Olanda, nel 1970, fu adottata la tecnica della coltura 'in vitro' di apici meristematici, proprio per ottenere piante risanate a partire da *Lilium* infetti da LSV. Per gli ibridi Asiatici tale metodo consentì il risanamento del 50-70% delle piante (Allen *et al.*, 1980).

1.3.9 Termoterapia

La termoterapia consiste nel trattare la pianta infetta da virus, o parti di essa destinate alla propagazione, con calore (aria o acqua calda) allo scopo di disattivare le entità virali. Il trattamento viene effettuato immergendo i tessuti in acqua calda (50-54°C) per periodi di tempo varianti da pochi minuti a qualche ora, a seconda della combinazione virus-ospite. Questo procedimento determina la denaturazione dei virus già sintetizzati nei tessuti che vengono trattati.

Questa tecnica viene applicata di preferenza ad organi quiescenti (bulbi, tuberi) o lignificati (rami da usare come talee o come fonti di gemme), che resistono meglio alle alte temperature di quelli in vegetazione. I trattamenti con acqua calda si presentano delicati nell'esecuzione pratica in quanto, le temperature che bisogna raggiungere possono danneggiare i tessuti dell'ospite.

Per questi motivi, si preferisce ricorrere ai trattamenti a più bassa temperatura e con aria calda che possono essere fatti su ogni tipo di materiale vegetale.

Questo tipo di intervento si basa sul principio generale, sperimentato nella pratica, che la replicazione virale viene inibita, o per lo meno rallentata, a temperature superiori a 32°C. I trattamenti vengono effettuati esponendo giovani piante a temperature di 35-38°C per periodi di tempo prolungati (da 3-4 settimane fino anche a 10-12 mesi)

Questo trattamento oltre a rallentare la replicazione virale accelera la crescita delle piantine in modo che i germogli emessi durante tale periodo risultino virus-esenti. Il trattamento di termoterapia non garantisce un risanamento sicuro e totale, inoltre può determinare la morte o il danneggiamento delle piante o parti di esse. Per il trattamento vengono utilizzate celle climatiche o camere termo terapiche appositamente predisposte in cui temperatura, illuminazione ed umidità relativa possono essere facilmente controllate. Le piante possono essere adattate alle alte temperature mediante una procedura di ambientamento consistente, di solito, nell'aumentare gradatamente la temperatura (per esempio 1°C al giorno) fino al valore stabilito. Il successo della termoterapia è largamente determinato dalla sopravvivenza del materiale da trattare. Con questa tecnica sono stati comunque ottenuti risultati discreti per le piante arbustive per le piante da frutto e per la vite, mentre per le piante erbacee e bulbose il risanamento non è mai stato risolutivo. Nel caso della flavescenza dorata della vite, l'istituto di virologia vegetale (CNR di Torino), ha eseguito prove per ottimizzare la tecnica della termoterapia in acqua per l'ottenimento di materiale di moltiplicazione esente da fitoplasmi. Sin dal 1966 in Francia, è stato messo in evidenza che tale trattamento era in grado di

eliminare i fitoplasmi dal 'legno' di piante infette. La principale remora alla diffusione di questa tecnica, oltre ad un aumento dei costi di produzione, consisteva nel rischio che il trattamento riduca la vitalità del materiale di propagazione.

(http://www.regione.piemonte.it/agri/set_fitosanit/fitopatologia/avversita/lotte/dwd/flavescenzia/atti_convegno.pdf).

Oggi la cultura del meristema del germoglio è il metodo più comune per ottenere materiale vegetale virus-free, ed è spesso combinata con la termoterapia effettuata sulla pianta madre prima del prelievo meristematico (fig.9).

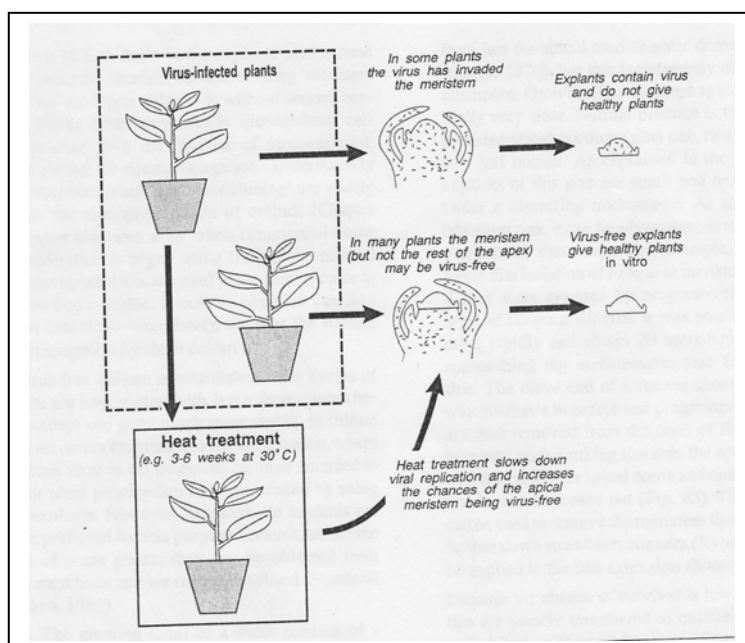


Fig. 9: Strategie per ottenere piante virus-free tramite cultura dei meristemi

In Italia, nei primi anni '70, su iniziativa del Consiglio Nazionale delle Ricerche e, successivamente, del Ministero Agricoltura e Foreste, partì un programma di selezione clonale, che aveva l'obiettivo di fornire alla viticoltura nazionale un materiale vivaistico, di identità certa e sanitarmente sicuro. Il problema maggiore era rappresentato dalle coltivazioni di cultivar "minori", che si trovano in ristretti areali, in quanto su queste era favorito l'accumulo delle patologie virali. Per questo motivo, in Piemonte, all'attività condotta con la metodologia tradizionale si è affiancato in modo massiccio il risanamento per termoterapia e per cultura di apici meristematici che permetterà sicuramente nei prossimi anni di ampliare la gamma clonale. Quest'ultima attività si completa con il confronto di materiale clonale affetto da patologie virali con la discendenza risanata degli stessi cloni, con l'obiettivo di valutare le modificazioni morfologiche e le attitudini produttive ed enologiche.

(www.regione.piemonte.it/agri/ita/piemontedoc/vino/vitigni/dwd/selezclon.)

1.4 LA CERTIFICAZIONE FITOSANITARIA DEL MATERIALE MOLTIPLICATO DAI VIVAISTI ITALIANI

In questi ultimi decenni si è fatta sempre più pressante la necessità che le produzioni vivaistiche di materiali di propagazione vegetale siano caratterizzate da alti livelli di qualità, con riferimento particolare all'assenza di agenti patogeni. L'elevata qualità di tali prodotti si ottiene iniziando il ciclo di produzione con materiali (piante madri, semi ecc..) sani e mantenendo sotto controllo le fasi critiche del ciclo stesso (Porta Puglia e Gallitelli, 2001). Il vivaista ha l'obbligo di controllare sempre l'identità varietale e la qualità dei materiali di moltiplicazione e delle piante utilizzate, in tutte le fasi della produzione (Carboni *et al.*, 1997). Nel giugno del 1997 sono stati pubblicati sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana tre decreti ministeriali del 14 aprile 1997 che recepiscono le direttive CEE in materia di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante ornamentali (dir. N. 93/49/CEE, 93/63/CEE, 93/78/CEE), degli ortaggi (dir. N.93/61/CEE, 93/62/CEE) e delle piante da frutto (dir. N. 93/48/CEE, 93/64CEE, 93/79/CEE). In tali decreti si elencano i requisiti fitosanitari, fenologici e di identità varietale necessari affinché le piantine possano essere commercializzate, oltre agli obblighi del vivaista e alle modalità di accreditamento del vivaista e dei laboratori interessati.

Le piante possono essere commercializzate se:

- ✓ i vivaisti sono accreditati;
- ✓ all'esame visivo non presentano organismi nocivi o malattie, nonché loro sintomi, che limitino la possibilità di utilizzarle come materiale di moltiplicazione o come piante ornamentali, ortive o da frutto;
- ✓ hanno vigore e dimensione soddisfacenti;
- ✓ sono identificate esplicitamente con un riferimento alla varietà o al gruppo di piante a cui appartengono.

Il vivaista ha l'obbligo, dunque, di controllare sempre l'identità varietale e la qualità dei materiali di moltiplicazione e delle piante utilizzate, in tutte le fasi della produzione.

Per ciascuna specie ornamentale, ortiva e da frutto, in base ai sintomi presentati, dovranno essere individuati gli insetti, gli acari, i nematodi, i batteri, i funghi, i virus e i virus-simili specifici elencati negli allegati dei rispettivi decreti ministeriali. Vivaisti e laboratori accreditati sono sottoposti a controlli effettuati almeno una volta l'anno dall'organismo ufficiale, che si propone di verificare che i metodi di controllo siano validi ed eseguiti durante

i diversi momenti della produzione e che siano condotte analisi fitosanitarie sui campioni da parte di persone competenti. A questi controlli, lo scorso anno è stato aggiunto quello per la diagnostica fitopatologia, in particolare per la ricerca di virus, viroidi e fitoplasmi su specie fruttifere, ortive e ornamentali con tecniche sierologiche e molecolari.

Emerge, quindi, la necessità che eventuali restrizioni alla circolazione delle merci siano basate su opportune giustificazioni tecniche e scientifiche che scaturiscano dall'applicazione di protocolli diagnostici efficienti e veloci.

2. SCOPI DEL LAVORO

L'esigenza di controlli da effettuare sulle produzioni vivaistiche e sui materiali di propagazione vegetale, nata nel giugno del 1997, con la pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana di tre decreti ministeriali in cui venivano elencati i requisiti fitosanitari, fenologici e di identità varietale necessari per la commercializzazione delle piante, ha reso necessaria l'applicazione di protocolli diagnostici efficienti e veloci, che garantiscano l'assenza di agenti patogeni.

Nella sezione del CRA-VIV è nata l'esigenza di verificare lo stato sanitario dei cloni di ibridi Asiatici di *Lilium* ottenuti, grazie a un programma di miglioramento genetico cominciato negli anni '80, che consentì di selezionare ibridi con interessanti caratteri agronomici e commerciali.

Lo scopo principale della ricerca riguarda la definizione di mezzi e protocolli per una diagnosi molecolare affidabile e veloce che consenta di intervenire tempestivamente per individuare la presenza e per prevenire la diffusione dell'agente virale e al tempo stesso di limitare i danni alle coltivazioni e ai coltivatori, oltre che a tutelare i floricoltori nei confronti del materiale importato.

In particolare, la messa a punto di un protocollo ripetibile, standardizzato e caratterizzato da un'alta sensibilità per effettuare una diagnosi molecolare mediante RT-PCR delle principali virosi in *Lilium* spp. (LSV, CMV) da estendere a numero elevato di cloni di ibridi Asiatici.

La necessità di una termoterapia, per un eventuale risanamento renderà necessaria l'individuazione di temperature e relativi tempi di esposizione più adatti per un'efficace disattivazione del virus nel *Lilium*.

L'individuazione di protocolli standardizzati di micropropagazione da utilizzare nelle diverse fasi della ricerca: dalla rigenerazione di scaglie, alla messa in coltura di apici meristematici, fino alla moltiplicazione e la propagazione di piante risanate.

3.MATERIALI E METODI

All'inizio della ricerca sono stati sottoposti a diagnosi molecolare due cloni di ibridi Asiatici, il '599' e il '409', che erano risultati virosati a seguito di una iniziale diagnosi sierologica (PAS-ELISA) effettuata presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali dell'università di Bologna. Tali risultati potevano essere utilizzati come confronto con quelli ottenuti con l'indagine molecolare e garantire la validità del protocollo.

Nel corso del secondo anno sono stati aggiunti altri otto cloni, denominati '505', '20', '0097', '00158', '0035', '0045', '00136', '216', selezionati per riduzione o assenza di polline, per taglia elevata, per nuove forme e colore del fiore, per l'idoneità alla coltivazione in vaso.

Le diverse fasi che hanno caratterizzato la ricerca hanno riguardato:

1. Valutazione dei cloni con sintomi riconducibili a virosi
2. Reperimento di materiale in campo e propagazione
3. Estrazione e quantificazione dell'RNA a partire da materiale vegetale precedentemente propagato
4. Messa a punto del protocollo diagnostico e diagnosi di LSV e CMV mediante RT-PCR
5. Primo prelievo dell'apice meristematico e diagnosi molecolare
6. Termoterapia e secondo prelievo dell'apice meristematico
7. Valutazione dell'avvenuto risanamento

Per ciascuna fase si è proceduto come di seguito riportato.

- 1) Sono stati individuati otto cloni di ibridi Asiatici, denominati '505', '20', '0097', '00158', '0035', '0045', '00136', '216', con sintomi riconducibili a virosi.
- 2) Da ciascun bulbo lavato, con un detergente comune sotto acqua corrente, sono state asportate le scaglie più esterne, mentre quelle più interne sono state sterilizzate, in etanolo al 70% per 30 secondi (s) e poste poi, in agitazione in una soluzione di ipoclorito di Na (1:2) per 10 minuti (m). Successivamente sono state trasferite sotto cappa a flusso laminare in ambiente sterile dove sono stati effettuati due lavaggi in acqua distillata, di 10 m ciascuno. Per alcuni cloni l'operazione di sterilizzazione, con modifiche, è stata ripetuta più volte, in quanto il primo metodo non risultava efficace ai fini dell'ottenimento di bulbetti non inquinati. In

particolare per lo '0035' e lo '00136' le scaglie sono state lavate con un comune detergente, poste in etanolo al 70% per 30 s, e successivamente, mantenute in agitazione per 1 ora (h), in una soluzione contenente lo 0,525% di ipoclorito di Na e twin 20 allo 0,1%. Trasferite in ambiente sterile, sono stati effettuati due lavaggi in acqua distillata di 10 ml ciascuno.

Le scaglie sterilizzate sono state messe in coltura '*in vitro*' a una temperatura di 22-23°C, al buio per circa una settimana, poi ad un fotoperiodo di 12 h, su un substrato idoneo alla rigenerazione dei bulbetti denominato LS1 e contenente 4,4 g/l di Murashige Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962), 2 ml/l di benziladenina (BA) e 200 µl/l di acido naftalenacetico (NAA), 60 g/l di saccarosio e 7 g/l di agar.

3) Da 3 bulbetti di uno stesso clone e per tutti i cloni della prova, raggiunti i 3 cm di altezza, è stato estratto l'RNA. I vari passaggi sono stati quelli descritti nel manuale di istruzione del Kit di estrazione della 'Quiagen's RNeasy Plant Mini'. Per ciascuno degli 8 campioni sono stati pesati circa 100 mg di tessuto fogliare, e successivamente macerato in un mortaio con azoto liquido e 450 µl di buffer RLC addizionato di 4,5 µl di β-mercaptoetanololo. La soluzione ottenuta è stata posta per 3 m alla temperatura di 56°C, allo scopo di assicurare la rottura dei tessuti. Il materiale ottenuto è stato trasferito in un' eppendorf da 2 ml , (QIAshredder spin column di colore viola) in dotazione nel Kit e centrifugato per 2 m alla velocità massima. Il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta, facendo attenzione a non toccare il pellet separatosi durante la centrifugazione. In seguito sono stati aggiunti e mixati a ogni campione 0,5 volumi di etanolo al 100% . Tali campioni sono stati pipettati in una colonnina (in dotazione del kit di colore rosa) inserita successivamente in un'eppendorf da 2 ml e centrifugati per 15 s a 10000 rpm. Il liquido filtrato è stato eliminato. A questo punto si sono susseguiti una serie di lavaggi. Sono stati aggiunti 700 µl di Buffer RW1 alla colonnina contenente l'RNA (RNeasy column). Il tutto è stato poi centrifugato per 15 s a 10000 rpm e il liquido filtrato è stato eliminato. Nella colonnina contenente l'RNA sono stati aggiunti 500 µl di Buffer RPE e è stata sottoposta a un altro ciclo di centrifugazione, 15 s a 10000 rpm; il liquido filtrato è stato ancora eliminato. E' stato effettuato, quindi, l'ultimo lavaggio dell'RNA presente sulla membrana della colonnina utilizzando ancora 500 µl di Buffer RPE e centrifugando per 2 m a 10000 rpm. A questo punto la colonnina contenente l' RNA è stata trasferita in un'eppendorf da 1,5 ml (in dotazione del kit) e sono stati pipettati sulla membrana 50 µl di acqua RNeasy-free. Tale provetta è stata centrifugata per 1 m a 10000 rpm. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto per aumentare la concentrazione dell'RNA ottenuto. I campioni ottenuti sono stati conservati a -20°C.

Per valutare la quantità di RNA (espressa in µg/ml) presente nei campioni eluiti è stato utilizzato uno spettrofotometro 'RNA/DNA calculator' (Pharmacia Biotech Gene quant II) a luce U.V. I valori fornitici dallo strumento sono stati utili per valutare sia la purezza dell'RNA estratto (rapporto dell'assorbanza a 280 nm e l'assorbanza a 260 nm;) sia per stabilire la quantità, in µl, da utilizzare nella RT-PCR.

4) Su ogni campione è stata condotta una RT-PCR per diagnosticare la presenza dell'agente virale LSV, utilizzando il Kit della Sigma 'Enhanced Avian HS RT-PCR'. Tale kit ha consentito di combinare l'enzima eAMV-RT, (enhanced avian myeloblastosis virus reverse transcriptase), una DNA-polimerasi RNA-dipendente ricavata dai virus delle mieloblastosi aviaria, con la JumpStart AccuTaq LA e di ottenere, quindi con una unica reazione, prima la trascrizione di cDNA, seguita immediatamente dall'amplificazione tramite PCR. Per la reazione è stata utilizzata una coppia di primer degenerati (miscele di oligonucleotidi che variano tra loro per la presenza di differenti basi in punti specifici), sintetizzati da Takara Shuzo (Niimi *et al*, 2003) (Tab. 6) a partire dalla sequenza amminoacidica del capsido di quattro LSV e usati per amplificare 483 bp di uno specifico frammento di LSV, tramite PCR.

Virus	Tipo	Sequenza	Lunghezza (bp)	Posizione (bp)	Frammenti (bp)
LSV	Up	5'-GAYGARYTYTTYAARATGAARGT-3'	23	280-302	483
LSV	Down	5'-ARYTGYYTTRTGYGCRTTTRTG-3'	20	761-742	

Tab.6 Primers degenerati che amplificano 483 bp di uno specifico frammento di LSV. R (G/A); Y (T/C)

I reagenti contenuti in un volume di 50 µl di reazione sono stati: 0,5 µg di RNA, 200 µM dNTPs, 3mM MgCl₂, 1× PCR buffer, 1µM di ciascun primer, 0,4 U/µl di enzima eAMV-RT, 0,4 U/µl di RNase inhibitor, 0,05 U/ µl, acqua PCR reagent.

Seguendo le indicazioni del protocollo del Kit sono state messe a punto diverse prove modificando le concentrazioni di 4 reagenti presenti nel Master mix (Mg²⁺, dNTPs, primers, RNA) per individuare quelle migliori, in modo da ottimizzare e standardizzare il metodo da utilizzare, in un secondo momento, su tutti i cloni di ibridi Asiatici scelti.

La presenza di magnesio condiziona l'attività della polimerasi, l'ibridizzazione dei *primers* ed aumenta la temperatura cui il DNA stampo si denatura. Per allestire una PCR, di conseguenza, è bene allestire diverse miscele di reazione contenenti quantità progressivamente scalari di magnesio che varino da un minimo di 0.05 mM ad un massimo di 5 mM. Sono state testate tre diverse concentrazioni di Mg²⁺: 1,5 mM, 3 mM, 4,5 mM (lasciando invariate le concentrazioni degli altri reagenti).

Generalmente i nucleotidi vengono utilizzati alla concentrazione di 200 μM ciascuno. Un aumento di questa concentrazione non porta ad un aumento dell'efficienza della reazione in quanto i gruppi fosfato carichi negativamente possono legarsi al magnesio della miscela rendendolo meno disponibile. I nucleotidi, in concentrazione eccessive, possono aumentare la percentuale d'errore della polimerasi od addirittura inibirla qualora presenti in concentrazione millimolare. Sono state testate tre diverse concentrazioni di dNTPs: 100 μM , 200 μM , 400 μM .

Anche la quantità dei primers ha la sua importanza, infatti una concentrazione troppo elevata potrebbe portare all'amplificazione di sequenze non specifiche, mentre, al contrario, una troppo scarsa presenza rende la PCR inefficace. Per allestire una PCR, si renderà, quindi, necessaria un'ottimizzazione della concentrazione dei primers, tramite diluizioni scalari. Sono state provate tre diverse concentrazioni dei primers: 0,4 μM , 0,7 μM , 1 μM .

Per effettuare una PCR si può benissimo utilizzare una piccola quantità di bersaglio in quanto la sensibilità della reazione è molto alta. La presenza d'un basso quantitativo di bersaglio, comunque, aumenta la probabilità che vengano amplificate sequenze non specifiche. Una quantità troppo elevata di cDNA, al contrario, può diminuire l'efficienza dell'amplificazione della PCR a causa della presenza di troppi elementi contaminanti e può rendere complessa la valutazione della resa della reazione durante i processi di ottimizzazione dei singoli parametri per cercare di allestire tutta la PCR.

Durante le fasi d'allestimento d'una PCR sarebbe bene, per evitare le problematiche appena riportate, cercare d'ottimizzare la quantità di cDNA utilizzata facendo una serie di reazioni d'amplificazione in cui tutti i parametri siano fissi tranne il quantitativo di cDNA che viene impiegato in dosi scalari. Visto che è stata effettuata una RT-PCR ad un unico step per l'RNA sono state scelte tre quantità da testare: 0,30 μg , 0,50 μg , 1 μg .

L'RT-PCR è stata condotta nel termociclatore Eppendorf programmato nel seguente modo: un primo step a 50°C mantenuto per 50 m in modo da ottenere la sintesi del cDNA per opera dell'enzima eAMV-RT e un successivo ciclo di PCR a tre temperature: una denaturazione iniziale a 94°C per 2 m, 25 cicli a 94°C per 15 s e a 55°C per 30 s, necessari per completare la denaturazione e far avvenire l'accoppiamento dei filamenti, un'estensione a 72°C per 30 s, e un'estensione finale a 72°C per 7 m, hold a 12°C .

In ciascuna reazione è stato incluso un controllo negativo per assicurare l'assenza di contaminazione nel mix dei reagenti.

I prodotti di PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1 % (Gibco-BRL), usando una cella elettroforetica Bio-Rad con tampone di corsa TAE 1X (TAE 10 $\times$:

Tris 48,4 g/l, Acido acetico glaciale 11,42 ml/l , EDTA 40 ml/l soluzione 0,5 M a pH 8) a 60 V per circa 2 h. 10 µl di ciascuno dei prodotti di PCR sono stati mixati con 2µl di loading buffer 6× e fatti correre insieme a un marker di peso molecolare (100 bp DNA ladder). Il gel, colorato con 1,2 µl di bromuro di etidio, è stato osservato sotto 254 nm di luce ultravioletta.

Su ogni campione è stata condotta una RT-PCR, ad un unico step, per diagnosticare anche la presenza dell'agente virale CMV utilizzando lo stesso protocollo utilizzato per la diagnosi dell'LSV ma modificando la temperatura di annealing durante il ciclo di PCR. Nella fase di accoppiamento (annealing) i primers si appaiano alle sequenze complementari del bersaglio e sia la temperatura che la sua durata devono essere scelte considerando due aspetti opposti: l'alta temperatura aumenta la specificità ma pregiudica l'efficienza poiché favorisce la separazione dei primer dal bersaglio, la bassa temperatura favorisce la formazione di ibridi e quindi anche quella di prodotti aspecifici. Solitamente per valutare la temperatura di annealing da adottare può essere utile prendere in esame la composizione in coppie GC del primer. Se sono poche la temperatura di annealing può essere inferiore o uguale a 55°C, se sono molte deve essere superiore. Per queste ragioni, nel caso del CMV, sono state testate due diverse temperature di annealing. Nel primo ciclo è stato impostato un primo step a 50°C mantenuto per 50 m e un successivo ciclo di PCR a tre temperature con una denaturazione iniziale a 94°C per 2 m e 25 cicli a 94°C per 15 s, a 60°C per 30 s, un'estensione a 72°C per 30 s, e un'estensione finale a 72°C per 7 m, hold a 12°C. Nel secondo ciclo è stata utilizzata una temperatura di annealing di 58°C. Per entrambe le reazioni è stata utilizzata una coppia di primer degenerati sintetizzati da Takara Shuzo (Niimi *et al*, 2003) (Tab. 7) a partire dalla sequenza amminoacidica del capsido di diciassette CMV e, usati per amplificare 408 bp di uno specifico frammento di CMV tramite PCR.

Virus	Tipo	Sequenza	Lunghezza (bp)	Posizione (bp)	Frammenti (bp)
CMV	Up	5'-ACCCTRAARCCRCCDRAAATWGA-3'	23	220-242	408
CMV	Down	5'-CGYTGRTGYCRAYGTCRACRTG-3'	23	626-604	

Tab. 7 - Primers degenerati che amplificano 408 bp di uno specifico frammento di CMV. D (A,G,T); R(A,G); W(A,T); Y(C,T)

5) Le piantine risultate virosate sono state sottoposte a un primo prelievo dell'apice meristematico effettuato in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso orizzontale e con l'ausilio di un binoculare. Per ogni clone l'operazione è stata ripetuta più volte, in modo da ottenere in questo primo step più bulbetti sui quali valutare un eventuale risanamento. I meristemi sono stati posti su un terreno contenente 4,4 g/l di MS, 30 g/l di saccarosio, 2 g/l di carbone attivo e 7 g/l di agar e mantenuti per 15 giorni al buio. Dopo circa 2 settimane sono

stati trasferiti su MS addizionato di 0,5 mg/l di acido indolbutirrico (IBA) e posti in camera di coltura a una temperatura di $23^{\circ}\text{C}\pm 2$, con un fotoperiodo di 16 h e un'intensità della luce di $35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$. Dopo circa 90-120 giorni su tali campioni, in base al loro sviluppo, è stata effettuata una seconda diagnosi molecolare: una volta estratto l'RNA dai bulbetti, utilizzando il Kit Quiagen's RNeasy Plant Mini, come descritto in precedenza, questi sono stati sottoposti a una RT-PCR, adottando le stesse coppie di primers e i medesimi protocolli sopra citati.

6) Le piantine ancora virosate sono state sottoposte a termoterapia. La termoterapia è stata effettuata al buio a una temperatura di 35°C mantenuta per 42 giorni. Successivamente, mantenendo la condizione di buio e la temperatura di 35°C sono state testati diversi tempi di esposizione: 30 giorni e 38 giorni. E' stato effettuato un secondo prelievo meristemático sotto cappa sterile e il meristema è stato posto sul terreno idoneo allo sviluppo dei piccoli bulbetti e mantenuto per 15 giorni al buio. Dopo circa due settimane i bulbetti sono stati trasferiti su MS addizionato di IBA, per la loro propagazione e posti in camera di coltura a una temperatura di $23^{\circ}\text{C}\pm 2$, con un fotoperiodo di 16 h e un'intensità della luce di $35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

7) Dopo circa 90-120 giorni su tali campioni è stata effettuata una seconda diagnosi molecolare: una volta estratto l'RNA dalle foglie dei bulbetti, utilizzando il Kit Quiagen's RNeasy Plant Mini, è stata effettuata una RT-PCR, utilizzando le stesse coppie di primer e gli stessi protocolli utilizzati in precedenza.

4. RISULTATI

Dalla prima esperienza, che aveva riguardato i cloni '409' e '599', era stato possibile valutare, confrontando i risultati ottenuti con la tecnica della RT-PCR e i risultati ottenuti presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali dell'Università di Bologna sui medesimi cloni di *Lilium* con l'analisi sierologia (ELISA test), l'efficienza e l'affidabilità della tecnica molecolare nella diagnosi del virus LSV.

I risultati ottenuti mediante la tecnica molecolare collimano con quelli ottenuti, in precedenza, sugli stessi cloni, con il metodo sierologico. I due cloni '599', '409' visibili nella foto 5 del gel, sono risultati entrambi virosati e dopo un primo prelievo dell'apice meristematico il '409₁' è risultato risanato, mentre il '599₁' è risultato ancora virosato.

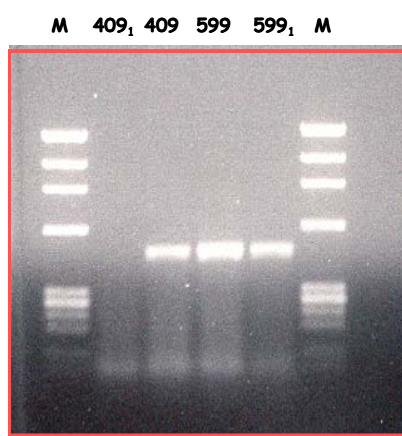


Foto 5: '409₂' :campione risanato dopo il I prelievo meristematico; '409₁': campione virosato;'599₁' campione virosato;'599₂':campione ancora virosato dopo prelievo meristematico

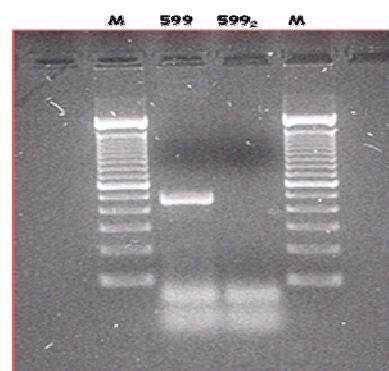


Foto6: '599':campione virosato;'599₂':campione dopo la termoterapia e il II prelievo meristematico

Sul clone virosato è stata effettuata una termoterapia e un secondo prelievo dell'apice meristematico e successivamente è stato sottoposto a nuova diagnosi molecolare che ha evidenziato un completo risanamento (foto 6). Si è potuto anche osservare come il solo prelievo dall'apice meristematico non garantisca l'ottenimento di nuove piante di *Lilium* esenti dal virus, infatti il clone '599' era risultato ancora infetto da LSV. Abbinando la termoterapia (35°C per 42 gg) a un secondo prelievo dell'apice meristematico e sottoponendo la nuova piantina ad un'ulteriore diagnosi molecolare è stato possibile valutare l'assenza del virus, constatando che termoterapia e successivo prelievo da apice meristematico garantiscono una maggiore affidabilità del metodo di risanamento. I cloni risanati sono stati successivamente propagati 'in vitro' su un terreno contenente IBA e fatti crescere su un terreno hormone-free, in camera di coltura a 22-23°C con un fotoperiodo di 12 h.

Successivamente le piante sono state acclimatate in serre ombreggiate (foto 7 e 8). Sui cloni risanati sono state effettuate periodicamente altre indagini a campione che hanno dato sempre risultati negativi, cioè assenza di virosi.

I cloni oggetto della presente prova, sono stati propagati tramite coltura '*in vitro*' di scaglie. Per i cloni '20', '505', '0097', '0045', '00158', '216' è stata utilizzata una sterilizzazione con etanolo al 70% per 30 s, soluzione di ipoclorito di Na (1:2) per 10 m, in agitazione, due lavaggi in acqua distillata sotto cappa a flusso orizzontale di 10 m ciascuno.



Foto 7



Foto 8

Tale procedura ha consentito di ottenere bulbetti sani da scaglie. Per i cloni '00136' e '0035' la precedente procedura di sterilizzazione non è apparsa sufficiente e tutte le scaglie messe in coltura '*in vitro*' si inquinavano prima che potessero originarsi i bulbetti. Si è aggiunta alla precedente procedura di sterilizzazione una bassa concentrazione di twin 20, è stata diminuita la concentrazione di ipoclorito di Na ed è stato aumentato il tempo di immersione delle scaglie. Questa è stata sufficiente nell'eliminare le contaminazioni e tale da non danneggiare il materiale vegetale utilizzato per la propagazione dei bulbetti.

I risultati ottenuti dalle prove effettuate nel tentativo di mettere a punto un protocollo efficace di RT-PCR nei cloni di ibridi Asiatici di *Lilium* utilizzando diverse concentrazioni di Mg^{2+} , dNTPs, primers, e differenti quantità di RNA sono i seguenti:

1) Nel caso del Mg^{2+} , le concentrazioni di 1,5 mM e di 3 mM hanno entrambe consentito di ottenere la banda identificativa dell' LSV, ma con la concentrazione di 3 mM si è ottenuto un frammento migliore da un punto di vista della luminosità, la banda è più visibile (foto 9).

2) Nel caso delle dNTPs, le concentrazioni di 100 μM e di 200 μM hanno entrambe consentito di ottenere la banda identificativa dell'LSV, mentre con la concentrazione di 400 μM compare anche un prodotto aspecifico. La concentrazione scelta è stata quella di 200 μM (foto 10).

3) Nel caso dei primers solo la concentrazione 1 μM ha consentito di ottenere la banda identificativa dell'LSV (foto 11).

4) Le 3 differenti quantità testate di RNA (0,30 μg ; 0,50 μg ; 1 μg) hanno consentito di ottenere la banda identificativa dell'LSV. La quantità scelta è stata quella di 0,50 μg , in quanto la banda è ben visibile (foto 12)

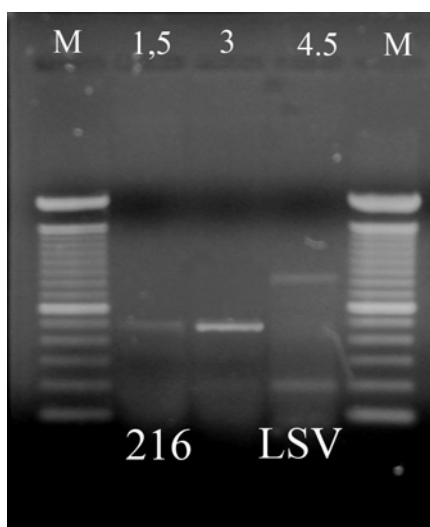


Foto 9: Concentrazione di Mg^{2+} (mM)

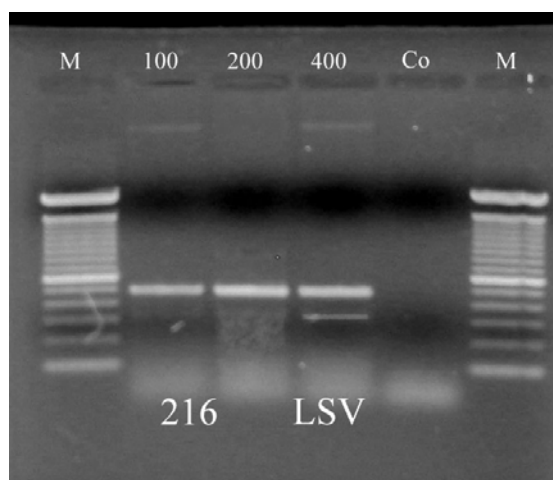


Foto 10: Concentrazione delle dNTPs (μM)

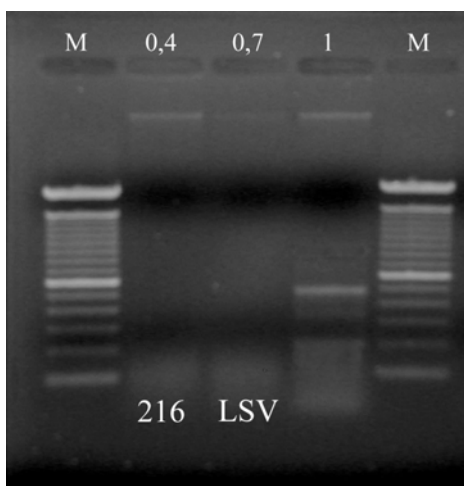


Foto 11: Concentrazione dei primers (μM)

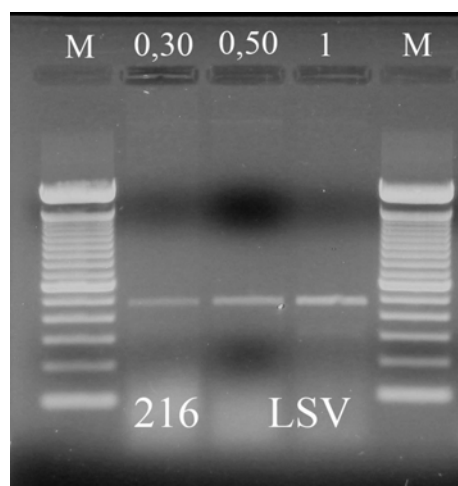


Foto 12: Differenti quantità di RNA (μg)

Una volta decise le diverse concentrazioni da utilizzare nella RT-PCR (0,5 μg di RNA, 200 μM dNTPs, 3mM MgCl_2 , 1 $\times$ PCR buffer, 1 μM di ciascun primer, 0,4 U/ μl di enzima eAMV-RT, 0,4 U/ μl di RNase inhibitor, 0,05 U/ μl , acqua PCR reagent) abbiamo effettuato la

diagnosi molecolare sui cloni scelti. L'analisi ha evidenziato che sei, degli otto cloni, sono virosati da LSV e due di questi sono virosati sia da LSV che da CMV (foto 13,14,15,16). I prelievi meristematici sono stati effettuati sui sei cloni risultati virosati.

Per la diagnosi del CMV è stato utilizzato il medesimo protocollo utilizzato per diagnosticare la presenza dell' LSV con la variazione, nel master mix, dei primers, e nella programmazione del ciclo della temperatura di annealing. Sono stati effettuati due cicli, uno con la temperatura di annealing di 60°C, con la quale si è ottenuto un solo clone virosato da CMV il '216', mentre l'altro con una temperatura di annealing di 58°C, con la quale si sono ottenuti due cloni virosati da CMV, il '216' e lo '0097' (foto 16).

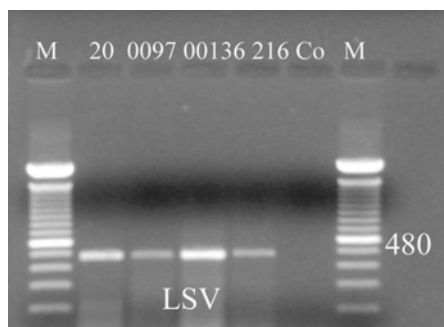


Foto 13

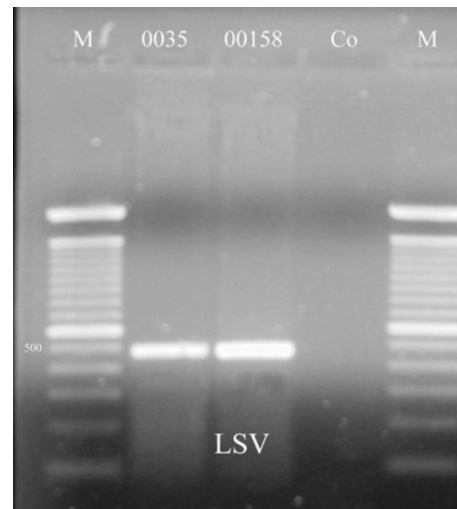


Foto 14

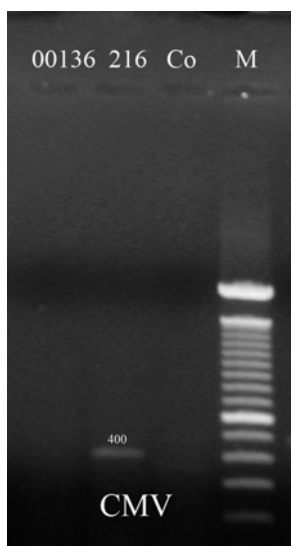


Foto 15: Temperatura di annealing 60°C

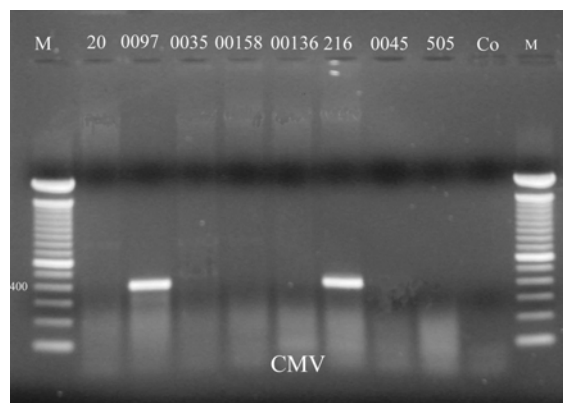


Foto 16: Temperatura di annealing 58°C

4.1 Esame dei singoli cloni

Il clone 20 (tab.8) è risultato virosato da LSV. Una volta ottenuti i bulbi necessari sono stati effettuati 21 prelievi di apice meristemático: in 9 casi non si è avuta rigenerazione di bulbetti. 7 bulbi hanno raggiunto uno sviluppo tale da consentire un'ulteriore estrazione di RNA per una successiva analisi molecolare. I cloni '20A1', '20B1', '20C1', '20D1', '20R1', e il

'20V1'(foto 17,18,19,20,22) sono risultati ancora virosati , mentre il '20E1' (foto 21) è stato risanato con il primo prelievo di apice meristemato.

I cloni '20A1', '20B1' e '20C1' sono stati sottoposti a termoterapia utilizzando una temperatura di 35°C mantenuta per 42 giorni. I cloni '20A1' e '20B1' non sono sopravvissuti alla termoterapia. Dopo la termoterapia, il clone '20C1' è stato trasferito per un periodo di circa due settimane alla luce, su un terreno hormone-free contenente MS 4,4 g/l, 30g/l di saccarosio e 7g/l di agar. Successivamente è stato effettuato un secondo prelievo dell'apice meristemato, posto in cella climatica al buio su un terreno contenente 2g/l di carbone attivo. Dopo circa un mese è stato trasferito alla luce su un terreno hormone-free. Raggiunto lo sviluppo necessario è stata effettuata una nuova diagnosi molecolare che ha verificato l'avvenuto risanamento del campione (foto 19).

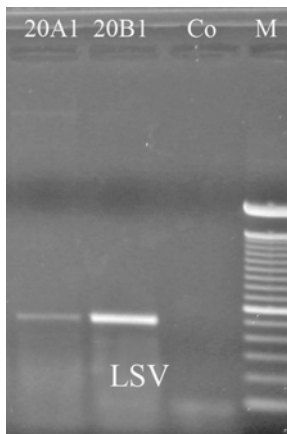


Foto 17

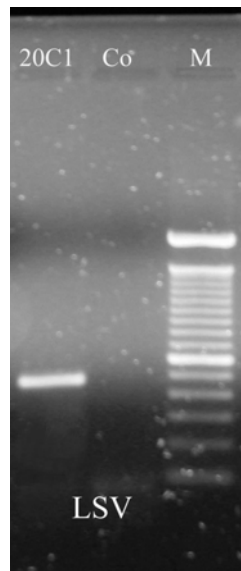


Foto 18

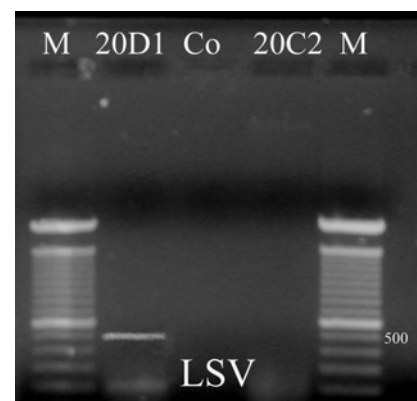


Foto 19

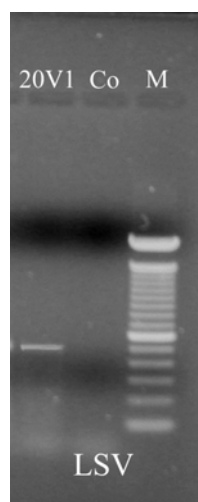


Foto 20

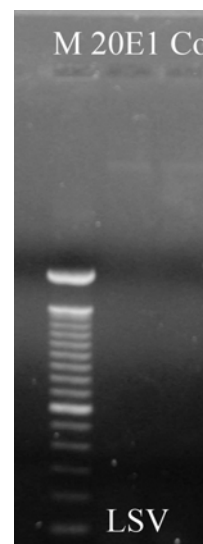


Foto 21

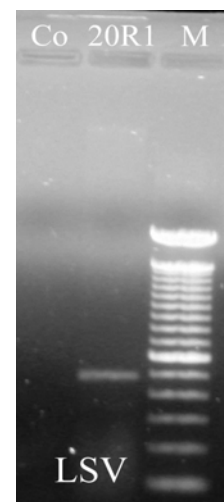


Foto 22

I prelievo meristematico	Morti	Virus-free	Virosati	Termoterapia e II prelievo meristematico	S	V
20A1			×	MORTO		
20B1			×	MORTO		
20C1			×		×	
20D1			×			
20E1		×				
20F1	×					
20G1	×					
20H1	×					
20I1	×					
20L1	×					
20M1						
20N1						
20O1	×					
20P1	×					
20Q1	×					
20R1			×			
20S1						
20T1						
20U1	×					
20V1			×			
20Z1						

Tab.8 Risultati relativi alla diagnosi molecolare del clone 20, risultato positivo al l'LSV e negativo al CMV

Il clone 0097 è risultato virosato da LSV e da CMV (tab.9). Una volta ottenuti i bulbi necessari sono stati effettuati 15 prelievi di apice meristematico: in 2 casi non si è avuta rigenerazione di bulbetti. 7 bulbi hanno raggiunto uno sviluppo tale da consentire un'ulteriore estrazione di RNA per una successiva analisi molecolare.

I cloni '0097A1', '0097C1', '0097L1', e il '0097H1' sono risultati ancora virosati da LSV, mentre i cloni '0097D1', il clone '0097E1' e il clone '0097F1' sono stati risanati da LSV con il primo prelievo meristematico (Foto 23,24,25,26). Il clone '0097A1' è stato sottoposto a termoterapia (42 giorni a 35° C), ma il bulbo non è sopravvissuto. I cloni '0097L1', '0097H1' e '0097C1' sono stati sottoposti a termoterapia a una temperatura di 42°C che sarà mantenuta nei primi due per 38 giorni, mentre nel terzo per 30.

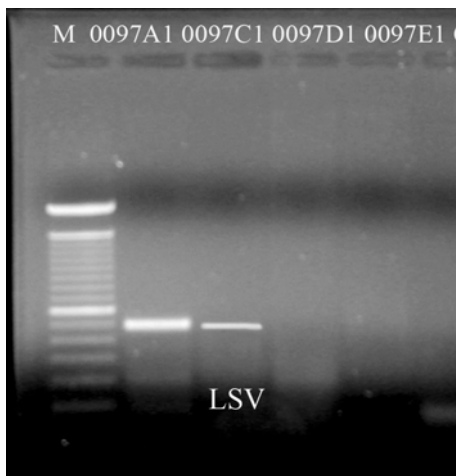


Foto 23

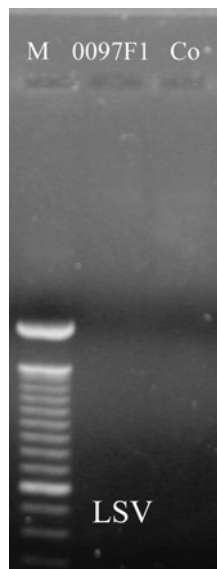


Foto 24

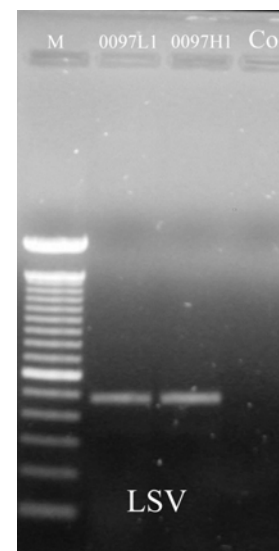


Foto 25

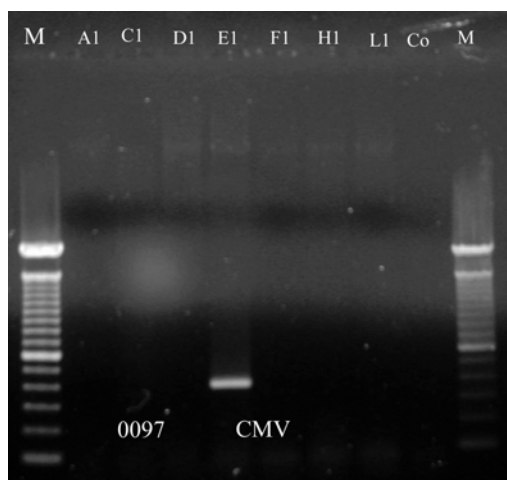


Foto 26

La foto 26 mostra come, con il primo prelievo del meristema, tutti i cloni tranne lo '0097 E1' sono risultati risanati da CMV. Il clone '0097E1' è stato sottoposto a termoterapia a una temperatura di 42°C che sarà mantenuta per 42 giorni.

Il clone '216' è risultato virosato da LSV e da CMV (tab. 10). Una volta ottenuti i bulbi necessari sono stati effettuati 11 prelievi di apice meristematico: in 3 casi non si è avuta rigenerazione di bulbetti. Tre bulbetti sono stati sottoposti a diagnosi molecolare: il clone '216A1' e il clone '216D1' sono risultati virosati, ancora da entrambi i virus, mentre il clone '216B1' è stato completamente risanato dopo il primo prelievo (foto 27,28,29,30). Il clone '216A1' sarà, a breve, sottoposto a termoterapia.

I prelievo meristemático	M	Virus free	Virosati	Termoterapia e II prelievo meristemático	S	V
0097A1		×	×	MORTO		
0097B1	×					
0097C1		×	×			
0097D1		×				
0097E1		×	×			
0097F1		×				
0097G1						
0097H1		×	×			
0097I1	×					
0097L1		×	×			
0097M1						
0097N1						
0097O1						
0097P1						
0097Q1						

Tab.9 Risultati relativi alla diagnosi molecolare del clone 0097, risultato positivo all' LSV e al CMV

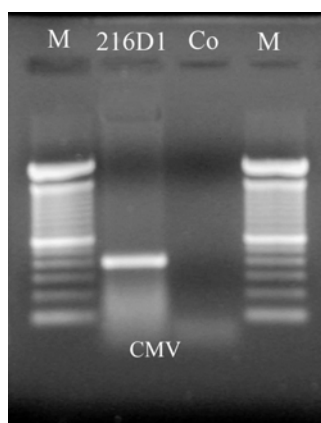


Foto 27

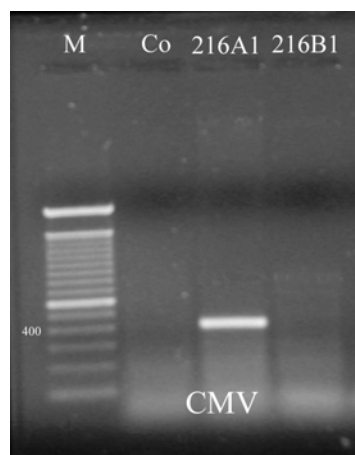


Foto 28

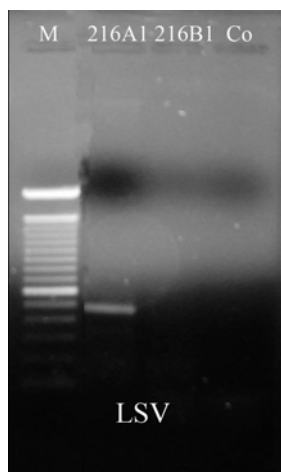


Foto 29

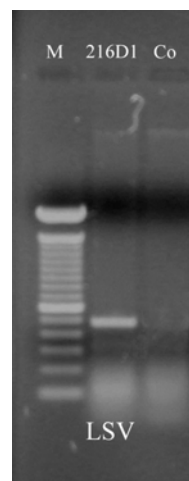


Foto 30

I prelievo meristemato	M	Virus-free	Virosati	Termoterapia e II prelievo meristemato	S	V
216A1			xx			
216B1		xx				
216C1	x					
216D1			xx			
216E1						
216F1						
216G1	x					
216H1	x					
216I1						
216L1						
216M1						

Tab.10 Risultati relativi alla diagnosi molecolare del clone 216, risultato positivo all'LSV, e al CMV

Il clone '00136' è risultato virosato da LSV (tab. 11). Una volta ottenuti i bulbi necessari sono stati effettuati 7 prelievi di apice meristemato: in 1 caso non si è avuta rigenerazione di bulbetti. E' stata effettuata diagnosi molecolare sul bulbo '00136C1' che è risultato virus-free (foto 31). E' stata modificata la sterilizzazione delle scaglie i bulbi fino ad ora ottenuti hanno sempre dimensioni ridotte e scarso apparato fogliare per poter effettuare l'estrazione dell'RNA.

I prelievo meristemato	M	Virus-free	Virosati	Termoterapia e II prelievo meristemato	S	V
00136A1	x					
00136B1						
00136C1		x				
00136D1						
00136E1						
00136F1						
00136G1						

Tab.11 Risultati relativi alla diagnosi molecolare del clone 00136, risultato positivo all'LSV e negativo al CMV.

Il clone '00158' è risultato virosato da LSV (tab. 12). Sono stati effettuati 6 prelievi di apici meristemati. E' stata eseguita la diagnosi molecolare sul clone '00158A1' ed è risultato ancora affetto da virosi (foto 32). Il campione è stato posto in stufa al buio, a una temperatura di 42°C che sarà mantenuta per 38 giorni.

I prelievo meristemático	M	Virus- free	Virosati	Termoterapia e II prelievo meristemático	S	V
00158A1			×			
00158B1						
00158C1						
00158D1						
00158E1						
00158F1						

Tab.12 Risultati relativi alla diagnosi molecolare del clone 00158, risultato positivo all'LSV e negativo al CMV.

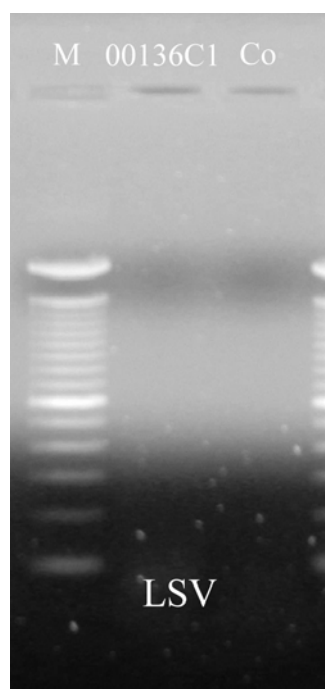


Foto31

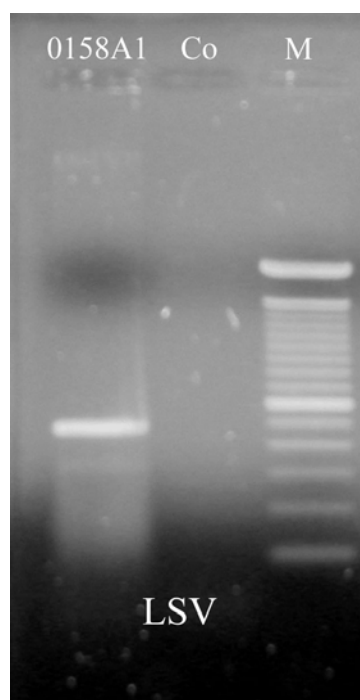


Foto32

Il clone '0035' è risultato virosato da LSV (tab.13). Sono stati effettuati 6 prelievi di apici meristematici: in 1 caso non si è avuta rigenerazione di bulbetti. Non è stata ancora eseguita nessuna diagnosi molecolare per la difficoltà trovata nella sterilizzazione iniziale del bulbo . E' stata cambiata procedura di sterilizzazione (etanolo al 70% per 30 s, 1 h in una soluzione contenente lo 0,525% di ipoclorito di Na e twin 20 allo 0,1% in agitazione, due lavaggi in acqua sterile di 10 m ciascuno, in ambiente sterile) e, ad oggi, i bulbetti hanno ancora piccole dimensioni e scarso apparato fogliare.

I prelievo meristemato	M	Virus-free	Virosati	Termoterapia e II prelievo meristemato	S	V
0035A1	×					
0035B1						
0035C1						
0035D1						
0035E1						
0035F1						

Tab.13 Risultati relativi alla diagnosi molecolare del clone 0035, risultato positivo all'LSV e negativo al CMV.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano la messa punto di un protocollo standardizzato, affidabile e veloce per la diagnosi dell'LSV e del CMV in cloni di ibridi Asiatici di *Lilium*.

I dati raccolti mettono in evidenza come il solo prelievo dall'apice meristemático non garantisca l'ottenimento di nuove piante di *Lilium* virus esenti. Infatti nel clone '20' la percentuale di individui virosati, dopo il primo prelievo di apice meristemático, è dell'85%, nel clone '216' è del 66% sia nel caso dell'LSV che nel caso del CMV, mentre nel clone '0097' la percentuale dei virosati dopo il primo prelievo è del 57% nel caso dell'LSV e del 14% nel caso del CMV. Per i restanti cloni analizzati non sono ancora disponibili dati sufficienti per esprimere dei valori in percentuale.

La termoterapia (35°C per 42 gg) e il secondo prelievo del meristema hanno risanato, nel caso del clone '20', un campione ('20C1') ma altri campioni appartenenti allo stesso clone '20A1' e '20B1' non hanno superato il trattamento, come anche il campione '0097A1'. La morte di questi cloni ('20A1', '20B1', '0097A1') potrebbe essere imputabile più che alla temperatura elevata e al tempo di esposizione lungo, alle ridotte dimensioni del bulbetto nel momento in cui è iniziata la prova. Per le prove successive sono stati utilizzati cloni con un calibro di 1,5 e ad oggi i cloni '0097C1', '0097E1', '0097H1', '0097L1', '00158A1' e '20D1' sono stati sottoposti a termoterapia utilizzando sempre la temperatura di 35°C ma con tempi di esposizione diversi: 42 giorni per il clone '0097E1', 38 giorni per lo '0097C1' e lo '00158A1', 30 giorni per lo '0097L1', lo '0097H1' e il '20D1'.

Sono stati, inoltre, individuati protocolli standard da applicare alle vari fasi della ricerca sia per quanto riguarda le sterilizzazioni dei bulbi raccolti dal campo, sia per quanto riguarda i terreni da utilizzare nelle diverse fasi della micropropagazione: dalla rigenerazione di bulbi dalle scaglie, alla messa in coltura di un meristema.

BIBLIOGRAFIA

Abruzzetti G., 2000 – Avversità e difesa del *Lilium*. *Lilium*: elementi di tecnica vivaistica indicazioni per una innovazione colturale. *CO.VI Plant scrl* 93-124.

AIPH/Union Fleurs, 2005 - International Statistics Flowers and Plants. Volume 53.

Allen T.C., Ballantyne O., Goodell J., Anderson W.C., Lin W., 1980 - Recent advances in research on lily symptomless virus. *Acta Hort.* 109:479-485

Anderson N., 1986 - The distribution of the genus *Lilium* with reference to its evolution. The Lily Yearbook of the North America Lily Society. 42:1-18.

Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., Saccardo F., 2003 - Adventitious shoot regeneration from leaf explant and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell Tissue and Org. Culture* 74 (1): 37-44.

Beattie D.J., White J.W., 1993 - *Lilium* hybrids and species. In: The physiology of flower bulbs. *Elsevier science publishers*, 423-454.

Bellardi M.G., Nanni G., Bertaccini A., 2002 - Old and new viruses of lily in Italy. *Acta Hort (ISHS)*; 568:215-220

Carboni E., Pancaldi M., Salvi A., Righini G., 1997 - La certificazione fitosanitaria del materiale moltiplicato dai vivaisti italiani. *Biolab incontri*; 4-8

Clark M.F., Adams A.N., 1977 - Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483 .

Clark M.F., 1981 - Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 19: 83-106.

Daniels L.H., 1986 - The Lily plant. The Lily Yearbook of the North America Lily Society, 39: 6-17.

De Hertogh A.A., Le Nard M., 1993 - Botanical aspect of flower bulb. In: The physiology of flower bulbs. *ELSEVIERSCIENCE PUBLISHERS*: 7-20.

Di Genova G., 2000 - La tecnica colturale per l'ingrossamento dei bulbi. *Lilium*: elementi di tecnica vivaistica – indicazioni per una innovazione colturale. *CO.VI Plant scrl*: 73-92.

Di Genova G., 2000 - Il genere *Lilium*: cenni botanici. *Lilium*: elementi di tecnica vivaistica indicazioni per una innovazione colturale. *CO.VI Plant scrl* : 43-55.

Di Genova G., Grassotti A., 2000 - La bulbicoltura: tecniche di propagazione. *Lilium*: elementi di tecnica vivaistica – indicazioni per una innovazione colturale. *CO.VI Plant scrl*: 57-72.

Fulton R.W., 1976 - An isolate of *Prunus* necrotic ringspot virus from rose with yellow net symptoms. *Proc, Xth Int. Symp. Fruit Tree Virus Disease. Heidelberg*, 29.

- Gallitelli D., Boscia D., 1995 - Moderne tecniche diagnostiche in virologia vegetale. *Petria* (5) 211-230.
- Garibaldi A., Rapetti S., 1984 - Malattie crittogamiche dei *Lilium* di importanza economica in Italia. Società Orticola Italiana, sezione floricoltura. *Lilium*– giornate di floricoltura, Viareggio 13, 14 giugno 1984: 67-74.
- Grassotti A., Torrini F., Mercuri A., Schiva T., 1989 - Genetic improvement of *Lilium* in Italy. *Acta Horticulturae*, 266:339-132.
- Grassotti A., 1996 - Economics and culture techniques of *Lilium* production in Italy. In International symposium on the genus *Lilium*, Taejon, Korea Republic, 28 Aug. - 1 Sep. 1994. Ed. by Lee JongSuk; Roh, M.S. *Acta Horticulturae* No. 414, 25-34.
- Grassotti A., Nesi B., 2002 - Il miglioramento Genetico del *Lilium*: un 'esperienza italiana. – Atti del Wokshop: "Lo stato dell'arte nel miglioramento genetico delle principali specie ortofrutticole d'interesse mediterraneo": 71-79.
- Grassotti A., Nesi B., 2002 - Nuove varietà di *Lilium*. Principali caratteri e possibili impieghi- Atti del Convegno 'Florovivaismo tra innovazione e novità'- Ercolano Novembre 2002
- Han B.H., Yae B.W., Yu H.J., Peak K.Y., 2005 - Improvement of 'in vitro' micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. *Sci. Hort.* 103: 351-359.
- Hampton R., Ball E., De Boer S., 1990 - Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. APS PRESS, 1990.
- Haw S.G., 1986 - The Lilies of China. Timber Press. Portland, Oregon. 172.
- http://www.regione.piemonte.it/agri/set_fitosanit/fitopatologia/avversita/lotte/dwd/flavescenza/atti_convegno.pdf:
- <http://www.microbiologybytes.com/virology/VirusGroups.html>
- Ishimori T., Niimi Y., Han D.S., 2007 - Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium x formolongi* 'White Aga'. cultured 'in vitro'. *Plant Cell Tissue Org Culture*.
- ISMEA, 2004 - Filiera piante e fiori.
- I.S.T.A.T., 1994 - Statistiche dell'agricoltura, della zootecnia e dei mezzi di produzione.
- Kumar S., Awasthi V., Kanwar J.K., 2007 - Influence of growth regulation and nitrogenous compounds on 'in vitro' bulblet formation and growth in oriental lily. *Hort. Sci.* 34 (2): 77-83.
- Lehtonen O.P., Viljanen M.K., 1980 - Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Methods*, 34: 61-70.

- Marani F., Bertaccini A., 1984 - Infezioni da virus e virus-simili nelle colture di *Lilium*. Società Orticola Italiana, sezione floricoltura. *Lilium* – giornate di floricoltura, Viareggio 13-14 giugno 75-88.
- Marzachi C., Argamante N., Ghilino F. - Ottimizzazione della tecnica di termoterapia in acqua per l'ottenimento di materiale di moltiplicazione esente da citoplasmi. www.regione.piemonte.it/agri/set_fitosanit/fitopatologia/avversita/lotte/dwd/flavescenza/atti_convegno.
- Mazzucchi U., 1995 - Moderne tecniche diagnostiche in fitobatteriologia. *Petria*, 5: 231-260.
- Mestato K., Sharada K., Fukui H., Hara T., Sarma K.S., 1994 - 'In vitro' bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb.: Effect of plant growth regulators and culture environment. *J. Hort. Sci.* 69: 289-297
- Murashige T., Skoog F., 1962 - A revised medium for rapid growth and bio-assay with Niimi tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Y., Onozawa T., 1979 - In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Horticulturae* 11: 379-389.
- Niimi Y., Han D.S., Mori S., Kobayashi H., 2003 - Detection of cucumber mosaic virus, lily symptomless virus and lily mottle virus in *Lilium* species by RT-PCR technique. *Scientia Horticulturae* 97: 57-63
- O'Beirne A.J., Cooper H.R., 1979 - Heterogeneous enzyme immunoassay. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1148-62,
- Pergola G., Grassotti A., 1984 - Le tecniche di coltivazione dei *Lilium* per la produzione di fiore reciso. Società Orticola Italiana, sezione floricoltura. *Lilium* – giornate di floricoltura, Viareggio 13-14 giugno 53-65.
- Porta Puglia A., Gallitelli D., 2001- Standardizzazione dei protocolli per la diagnosi fitopatologia. Progetto POM A 32 "Norme fitosanitarie e commercializzazione delle produzioni vivaistiche, 2001; 18-24
- Ragozzino E., Faggioli F., Barba M., 2005 - Distribution of citrus exocortis viroid and hop stunt viroid in citrus orchards of central Italy as revealed by one-tube one-step RT-PCR. *Phytopathol. Mediterran.* 44: 322-326.
- Roh S.M., 1982 - Propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. by leaf cutting. *HortScience*. 17: 607- 609.
- Schaad N.W., 1979 - Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 17: 123-147.
- Simmond J.A., Cumming B.G., 1976 - Propagation of *Lilium* hybrids II. Production of plant from bulb scale callus cultures for induced propagation rate. *Scientia Horticulture* 5: 161-170.

Stimart D.P., Ascher P.D., 1978 - Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 103: 182-184.

Sugiura H., 1993 - Plant regeneration of *Lilium speciosum* and *L. x elegans* from protoplast. *Journal of the Japanese Society for Breeding Science* 43: 429-437.

Takayama S., Misawa M., 1979 - Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiol Plant* 46: 184-190.

Takayama S., Misawa M., 1980 - Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiol Plant* 48: 121-125.

Treharne P., 1989 - Index Ortensis. Volume 1: Perennials. Quarterjack Publishing, Wimborne 509. ELSEVIERSCIENCE PUBLISHERS

Triolo E., 2001 - Elementi di Virologia Vegetale. Azienda Regionale D.S.U-Pisa 8:163-165.

Usta M., Sipahioğlu H.M., Polat B., 2005 - Studies on parameters influencing the performance of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in detecting Prunus necrotic ringpot virus (PNRSV). *Phytopatholog. Mediterr.* 44: 189-194.

Van Aartrijk J., Blom-Barnhoorn G.J., 1980 - Effects of sucrose, mineral salts, and some organic substances on the adventitious regeneration *in vitro* of plantlets from bulb scale tissue of *Lilium speciosum* 'Rubrum'. *Acta Horticulturae* 109: 297-302.

Van Tuyl J.M., Van Creijl M.C.M., Eikelboom W., Kerckhoffs D.M.F.J., Meijer B., 1993 - New genetic variation in the *Lilium* and *Tulipa* assortment by wide hybridization. In *Proceedings XVIIth Eucarpia Symp.*, ed. T. Schiva & A. Mercuri: 141-149, Italy, Sanremo, Istituto sperimentale per la Floricoltura.