



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE)

Corso di Dottorato di Ricerca in
Scienze delle Produzioni Animali e Vegetali - XXXIII Ciclo

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**INTERVENTI ECOSOSTENIBILI SULLE CRITICITA' DELLA
PRODUZIONE DEL SEME DI FINOCCHIO E BASILICO**

Settore scientifico-disciplinare
AGR/04

Tesi di dottorato di

Dott. Guido Bernabei

Guido Bernabei

Coordinatore del corso

Prof.ssa Roberta Bernini

Roberta Bernini

Tutore

Dott.ssa Paola Crinò

Paola Crinò

Co-tutore

Prof. Giuseppe Cola

Giuseppe Cola

A.A. 2020/21

A mià mādre e à mià nonnà.

*Alla mià fàmiglia che mi hà
sempre sostenuto.*

*Al Professor Francesco Saccardo
e alla Dott.ssa Paola Crinò,
miei maeſtri.*

RIASSUNTO

A livello europeo, l'Italia si conferma tra i paesi leader nel settore della produzione sementiera di specie ortive e aromatiche. Si tratta tuttavia di un comparto che richiede continua innovazione per far fronte alle mutate condizioni climatiche e ambientali nonché alle esigenze del consumatore e dell'industria di trasformazione, garantendo in maniera sostenibile elevati livelli di competitività all'intero sistema produttivo. In tale contesto il presente lavoro, svolto in collaborazione con l'azienda sementiera LA SEMIORTO Sementi (Sarno, Salerno), si è posto l'obiettivo di affrontare alcune criticità di due importanti filiere produttive quali quelle del basilico e del finocchio, attraverso l'impiego di tecnologie innovative sostenibili e lo sviluppo di nuove conoscenze in ambito molecolare.

La prima problematica, comune a entrambe le filiere, rientra nel contesto del controllo degli stress biotici, in particolare di patogeni fungini. L'impiego di varietà resistenti appare come un metodo alternativo a quello chimico in quanto consente di eliminare o quanto meno ridurre gli interventi con fitofarmaci a vantaggio della qualità delle produzioni e della conservazione ambientale. Primo obiettivo di questa tesi è stato pertanto la selezione di varietà resistenti a tre diversi agenti patogeni quali *Sclerotinia sclerotiorum* in finocchio e *Peronospora belbahrii* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* in basilico. Verso questi patogeni che riducono fortemente la redditività delle coltivazioni con enormi rischi, come nel caso del basilico per l'industria del pesto, non esistono attualmente mezzi efficienti di controllo. A riguardo, sono stati reperiti e mantenuti in collezione i patogeni, sono state messe a punto le tecniche d'inoculazione artificiale in ambiente controllato, sono state individuate le fonti di resistenza all'interno della variabilità naturale e sono state effettuate le prime ibridazioni per il trasferimento in germoplasma di pregio sviluppato dall'azienda sementiera LA SEMIORTO Sementi.

Negli ultimi anni, anche in finocchio, la costituzione di varietà ibride ha subito un forte incremento e l'ottenimento di seme ibrido F_1 ha rappresentato un traguardo importante per poter raggiungere elevate rese produttive, qualità del grumolo e resistenza a stress biotici e abiotici. La produzione di ibridi F_1 è ampiamente facilitata

dalla disponibilità di linee maschio sterili le quali consentono di evitare lunghe e dispendiose operazioni di emasculazione manuale necessarie per effettuare l'incrocio controllato. La maschio sterilità in pianta è un fenomeno complesso che, nelle linee maschio sterili (MS) di finocchio maggiormente caratterizzate, ha un controllo di tipo citoplasmatico. Secondo obiettivo di questa tesi è stato quello di approfondire i meccanismi molecolari alla base della maschio sterilità citoplasmatica (*Cytoplasmic Male Sterility* o CSM) in una linea MS di finocchio disponibile presso la ditta LA SEMIORTO Sementi. A tale scopo si è proceduto al sequenziamento del DNA mitocondriale in linee isogeniche maschio sterili e maschio fertili con l'obiettivo di individuare eventuali varianti (SNP, inserzioni, delezioni) in geni potenzialmente coinvolti nella sterilità maschile di finocchio. Lo studio molecolare del carattere in questione è finalizzato ad un'efficiente produzione di seme ibrido.

Limitatamente alla filiera del finocchio, l'attività della tesi è stata focalizzata su un'altra criticità legata alle prime fasi del ciclo della pianta ovvero la germinabilità dei semi. Ad oggi, con un sistema vivaistico sempre più specializzato, è di cruciale importanza disporre di semente caratterizzata da una buona energia germinativa per ridurre i costi di gestione e garantire l'ottenimento di piantine più vigorose in grado di rispondere con efficacia a stress di vario genere. Il terzo obiettivo è stato quindi quello di sviluppare protocolli relativi all'applicazione di sostanze biostimolanti attraverso il metodo *priming*. Tale metodologia, che rientra nel contesto della "tecnologia del seme", consiste in un processo d'idratazione controllata che viene interrotto poco prima della protrusione della radichetta; questo permette di garantire una migliore sincronizzazione della germinazione e un migliore vigore delle piantine.

ABSTRACT

At the European level, Italy is confirmed as one of the leading countries in the sector of seed production for vegetable and aromatic species. However, this sector requires continuous innovation to cope with the climate changes and the environmental conditions as well as with the consumer and processing industry needs, so ensuring

high levels of competitiveness in a sustainable manner for the entire production system. In this context, the present work, carried out in close collaboration with the Italian seed company LA SEMIORTO Sementi (Sarno, Salerno - Italy), has the objective to address some critical issues of two important production chains such as those of basil and fennel through the use of innovative sustainable technologies and the development of new knowledge at the molecular level.

The first problem, common to both species, falls within the context of the control of biotic stresses, in particular fungal pathogens. The development of resistant germplasm appears as an alternative method to the chemical one as it allows to eliminate or at least reduce the use of pesticides with advantages for the production quality and the environmental conservation. Therefore, the first objective of the thesis was the selection of germplasm resistant to three different pathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* in fennel as well as *Peronospora belbahrii* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* in basil. Currently, there are no efficient means of controlling these pathogens that greatly reduce the profitability of crops with enormous risks, as for the pesto industry in basil. In this regard, the pathogens were found and kept in the collection, the artificial inoculation techniques under controlled environmental conditions were developed, some sources of resistance within the natural variability were identified and then started to be transferred into valuable germplasm developed by the seed company LA SEMIORTO Sementi.

In recent years, even in fennel the constitution of F₁ hybrids has undergone a strong increase and the obtaining of seed hybrid has represented an important milestone to achieve high yields, quality, and resistance to biotic and abiotic stresses. Production of F₁ hybrids is greatly facilitated by the availability of male sterile lines, which allow to avoid long and expensive manual emasculation operations required to carry out the controlled hybridizations. Male sterility in plants is a complex phenomenon that has a cytoplasmic control in fennel. The second objective of this thesis was to investigate the molecular mechanisms underlying cytoplasmic male sterility (*Cytoplasmic Male Sterility* or CSM) of a fennel MS line available at LA SEMIORTO Sementi. For this, mitochondrial DNA sequencing in male sterile and male fertile

isogenic lines was carried out with the aim of identifying any variants (SNPs, insertions, deletions) in genes potentially involved in the male sterility character. The molecular studies of the trait are aimed at an efficient production of F₁ hybrid seeds. For the fennel production chain, the thesis activity was focused on another critical issue related to the early stages of the plant cycle, namely the seed germination. To date, with an increasingly specialized nursery system, it is of crucial importance to have seeds characterized by a good germination energy to reduce management costs and ensure the achievement of more vigorous seedlings capable of responding effectively to various types of stresses. The third goal was therefore to develop protocols on the application of biostimulating substances through the priming method. This methodology, which falls within the context of "seed technology", consists of a controlled hydration process that is interrupted just before the radicle protrusion; this allows to guarantee a better synchronization of the seed germination and a better seedling vigour.

INDICE

PARTE GENERALE

CAP. 1 – PRODUZIONE DEL SEME

1.1 Introduzione	1
1.2 Criticità.....	2
1.3 Ruolo della ricerca e del miglioramento genetico	3
1.4 Finocchio e basilico: esempio di filiere con criticità	6
1.4.1 Finocchio	6
1.4.2 Basilico	8

CAP. 2 – RESISTENZA A MALATTIE

2.1 Introduzione	12
2.2 Interazione ospite-patogeno	14
2.3 Basi genetiche dell'adattamento a stress biotici.....	18
2.4 Tipi di resistenza	20
2.5 Geni di resistenza	23
2.6 Principali malattie del finocchio e del basilico	24
2.6.1 Finocchio	24
2.6.2 Basilico	25

CAP. 3 – MASCHIO STERILITA' PER PRODUZIONE DI SEME IBRIDO

3.1 Caratteri generali e importanza	31
3.2 Classificazione.....	32
3.3 Tipi di maschio sterilità.....	33
3.3.1 Genetica.....	33
3.3.2 Citoplasmatica	34
3.3.3 Genetico-citoplasmatica	39
3.3.4 Genetica sensibile alle condizioni ambientali (EGMS)	41

3.3.5 Non genetica.....	42
-------------------------	----

CAP. 4 – MIGLIORAMENTO DEL POTERE GERMINATIVO DEL SEME

4.1 <i>Priming</i>	44
4.2 Germinazione del seme	47
4.2.1 Non <i>priming</i>	47
4.3.1 <i>Priming</i>	48
4.3 Vantaggi e limitazioni del <i>priming</i>	49
4.4 Fattori che influenzano il <i>priming</i>	51

PARTE SPERIMENTALE

OBIETTIVI DELLA RICERCA	56
--------------------------------------	----

CAP. 1 – RESISTENZA A MALATTIE

1.1 Interazione finocchio/<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	59
1.1.1 Introduzione	59
1.1.2 Materiali e Metodi	60
1.1.3 Risultati e Discussione	64
1.2 Interazione basilico/<i>Peronospora belbahrii</i>	67
1.2.1 Introduzione.....	67
1.2.2 Materiali e Metodi	70
1.2.2.1 Inoculo	71
1.2.2.2 Tecnica di inoculazione	71
1.2.3 Risultati e Discussione	73
1.2.3.1 Inoculo	73
1.2.3.2 Metodo di inoculazione.....	74
1.2.3.3 Saggi di resistenza	76
➤ <i>Concentrazione standard di inoculo</i>	76
➤ <i>Bassa concentrazione di inoculo</i>	77
➤ <i>Infezione naturale</i>	78
➤ <i>Inoculazione su prime introgressioni</i>	80
1.3 Interazione basilico/<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>basilici</i>	84
1.3.1 Introduzione	84

1.3.2 Materiali e Metodi	85
1.3.3 Risultati e Discussione	88
CAP. 2 – MASCHIOSTERILITA' PER LA PRODUZIONE DI SEME IBRIDO DI FINOCCHIO	
2.1 Introduzione	90
2.2 Materiali e Metodi	91
2.2.1 Estrazione DNA mitocondriale	92
➤ Separazione dei mitocondri	92
➤ Isolamento DNA	93
2.2.2 Analisi DNA	101
2.2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)	102
2.2.4 Sequenziamento DNA mitocondriale	103
2.2.5 Annotazione e Chiamata delle Varianti	104
2.2.6 Genoma plastidiale	104
2.3 Risultati e Discussione	105
2.3.1 Estrazione del DNA	105
2.3.2 PCR e analisi purezza del DNA mitocondriale	105
2.3.3 Sequenziamento e analisi del DNA mitocondriale	106
2.3.4 Analisi delle Varianti	110
CAP. 3 – MIGLIORAMENTO DEL POTERE GERMINATIVO DEL SEME DI FINOCCHIO	
3.1 Introduzione	113
3.2 Materiali e Metodi	114
3.2.1 Prova <i>in vitro</i>	117
3.2.2 Prova <i>in vivo</i>	117
3.3 Risultati e Discussione	119
3.3.1 Prova <i>in vitro</i>	119
3.3.2 Prova <i>in vivo</i>	124
CONCLUSIONI	116
BIBLIOGRAFIA	120
RINGRAZIAMENTI	135

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1

PRODUZIONE DEL SEME

1.1 INTRODUZIONE

L'attività sementiera è importante per lo sviluppo sostenibile e competitivo del sistema produttivo in quanto (a) assicura la disponibilità di sementi di qualità ed in quantità sufficienti; (b) garantisce la disponibilità di nuove varietà produttive, resistenti ai patogeni ed ai cambiamenti climatici; (c) fornisce uno strumento per garantire la tracciabilità e quindi la sicurezza delle produzioni.

I cambiamenti climatici e la minore disponibilità di terre coltivabili (SAU specie ortive: -6,3% rispetto al 2020; dati ISTAT 2021) insieme all'esigenza di utilizzare sistemi produttivi sostenibili, impongono soluzioni in grado di dare risposte concrete e innovative alle richieste emergenti. In tale ottica, il seme è un fattore chiave in quanto racchiude il patrimonio genetico della specie e quindi potenzialmente le innovazioni per superare le principali sfide che il sistema agricolo è chiamato ad affrontare (Fig. 1.1).

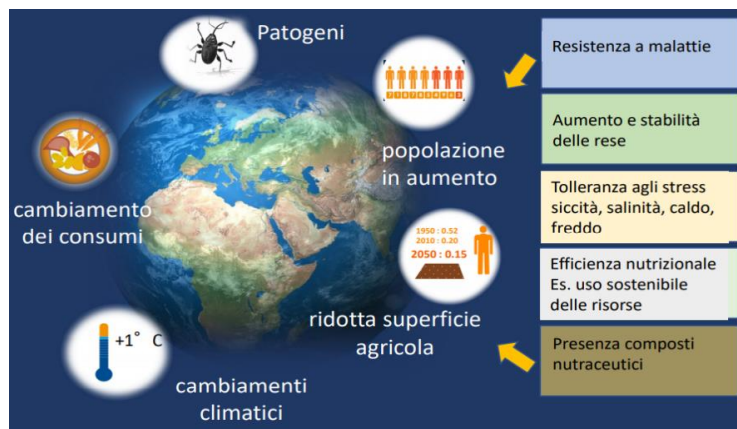


Fig. 1.1 – Scenario di sfide affrontate dal sistema

Le specie orticole primeggiano per il valore economico generato (200 milioni di Euro secondo www.sementi.it/documenti/assosementi/Brochure_2017_ITA.pdf) con superfici di circa 23.000 ettari destinate in Italia alla moltiplicazione di seme sia di specie ortive sia di specie aromatiche (<http://www.sementi.it/statistiche/560/indagine-moltiplicazione-orticola-campagna-2019>).

1.2 CRITICITA'

A fronte dei punti di forza del settore della produzione del seme (ambienti vocati ad elevata specializzazione per la produzione di sementi di alcune specie, tradizione professionale e intraprendenza degli operatori, opportunità di ricerca e di interazione con istituzioni di ricerca), la carenza di innovazione rappresenta un importante fattore di criticità che riduce la possibilità di fornire risposte mirate alle esigenze del mondo produttivo e limita l'affermazione concorrenziale dei prodotti sia in ambito nazionale che internazionale. La diffusione di nuove varietà e tecnologie rappresenta un elemento fondamentale per il miglioramento colturale e qualitativo delle produzioni agricole.

La maggior parte delle aziende sementiere italiane si occupa quasi esclusivamente di produzione e/o vendita delle sementi; ciò è dovuto al fatto che l'innovazione varietale e di tecnologie ha un costo non indifferente. In Italia, la maggior parte delle varietà non viene inoltre sviluppata dalle imprese private per limitazioni strutturali ed economiche e non è per lo più costituita dagli enti pubblici perché non è previsto nei loro compiti istituzionali. La carenza di innovazioni varietali a livello nazionale può indurre alcune ditte sementiere a dotarsi di un portafoglio varietale talvolta anche straniero e non sempre adatto alle condizioni ambientali del nostro Paese. La continua introduzione di varietà estere aiuta a risolvere problemi immediati ma compromette la tipicità del *made in Italy* comportando inoltre un esborso non indifferente. È auspicabile stimolare interazioni produttive tra imprese sementiere ed enti pubblici di ricerca mirate alla costituzione di varietà e tecnologie migliorate e concorrenziali.

Il ruolo del sistema della produzione del seme consiste nell'assicurare:

- innovazione varietale, che a sua volta corrisponde ad innovazione di prodotto;
- qualità e vantaggi all'azienda (germinabilità, concia con prodotti specifici, rese superiori, qualità tecnologica, maggiori redditi);
- qualità e vantaggi alla filiera (qualità tecnologica, salubrità, tracciabilità, maggiori redditi);

- contributo alla sostenibilità dei seminativi (varietà resistenti ai patogeni, migliore efficienza d'uso dei nutrienti, ridotte esigenze idriche).

1.3 RUOLO DELLA RICERCA E DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

Uno degli strumenti fondamentali di cui si dispone per affrontare le sfide emergenti che il settore della produzione del seme è chiamato ad affrontare è il miglioramento genetico; questo opera secondo il dogma illustrato in *Fig. 1.2*. Il primo patrimonio a cui si può attingere è la biodiversità, frutto di secoli di incroci spontanei e mutazioni naturali.

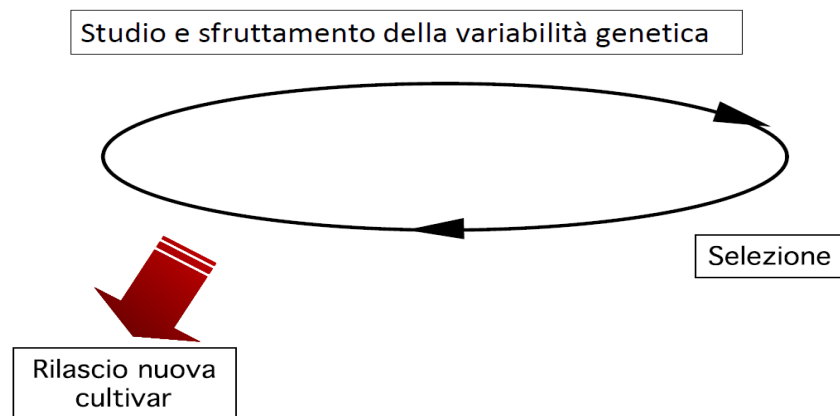


Fig. 1.2 – Dogma centrale del miglioramento genetico (http://cnbbsv.palazzochigi.it/media/1507/2-pezzotti_limportanza-del-miglioramento-genetico-in-agricoltura.pdf)

In molte varietà selvatiche, progenitrici di quelle oggi coltivate, sono presenti meccanismi di resistenza a patogeni che la specie si è trovata ad affrontare nel corso della sua storia evolutiva e di adattamento a condizioni climatiche avverse; queste caratteristiche potrebbero non essere state sinora adeguatamente valorizzate nelle varietà coltivate in quanto non sono di immediato vantaggio per la pianta o per l'uomo in determinate condizioni (es. assenza del patogeno o condizioni climatiche più favorevoli). Combinando il germoplasma disponibile proveniente da varietà esistenti, banche di germoplasma, specie affini, il miglioramento genetico mette a

disposizione del mercato nuova variabilità in grado di rispondere alle richieste delle diverse filiere alimentari e del consumatore finale.

Per soddisfare tali esigenze e competere sui mercati internazionali, non si può prescindere dal costante miglioramento che l'innovazione varietale assieme alle nuove tecnologie può garantire. I tempi derivanti dall'impiego delle tecniche tradizionali di miglioramento genetico sono troppi lunghi per poter sostenere, ad esempio, i ritmi dei cambiamenti globali e la velocità con cui mutano, si evolvono e si diffondono molti dei patogeni che colpiscono le varietà coltivate. Grazie ai progressi tecnologici, oggi è possibile disporre di nuovi strumenti in grado di (a) assicurare il contenimento dei tempi necessari per produrre nuove varietà vegetali; (b) intervenire in maniera più efficace ed efficiente sulle caratteristiche agronomiche e qualitative delle piante; (c) diminuire l'uso di input chimici e nutrizionali in modo da ridurre l'impatto ambientale dell'agricoltura, migliorare l'efficienza produttiva e aumentare la sicurezza degli alimenti.

I metodi tradizionali di miglioramento genetico devono oggi essere integrati con le nuove tecnologie disponibili (*Fig. 1.3*) in grado di migliorarne l'efficienza o anche di generare nuovi caratteri non presenti nel germoplasma coltivato.

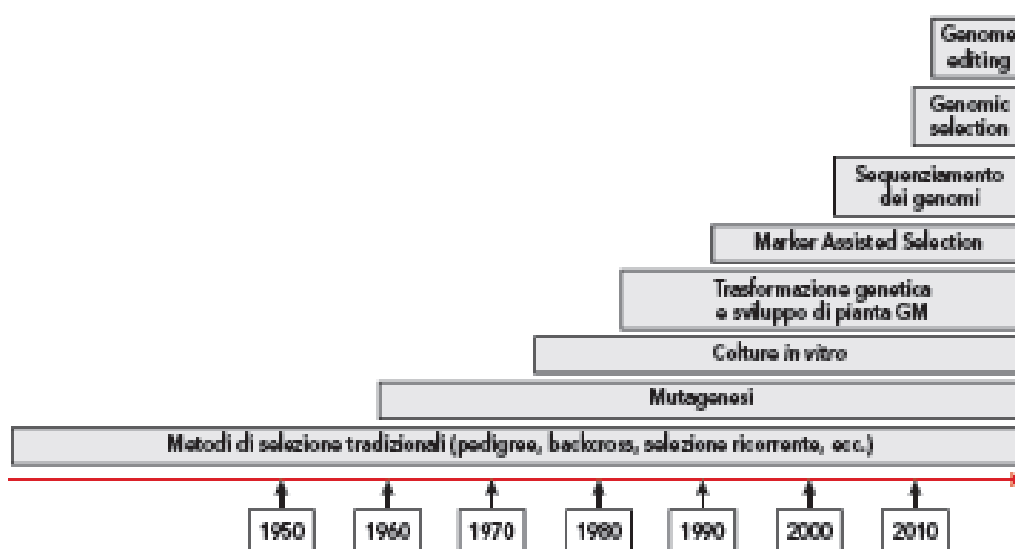


Fig. 1.3 – Evoluzione dei metodi e delle biotecnologie applicate al miglioramento genetico delle piante (da Cattivelli e Valé, 2017)

Dai primi anni '90, la disponibilità di strumenti innovativi e sofisticati ed in generale le applicazioni basate sull'analisi del DNA, hanno consentito di velocizzare lo screening dei materiali affinando al contempo la conoscenza del genoma.

Le conoscenze genomiche hanno arricchito il miglioramento genetico aggiungendo alla tradizionale selezione fenotipica la componente molecolare, sia in termini di marcatori per selezione assistita o per selezione genomica sia in termini di conoscenze sulla funzione dei geni che influenzano caratteri agronomici fondamentali per sviluppare nuove piante o modificare specifiche sequenze modificate mediante *genome editing*. In *Tab. 1.1* sono riportati esempi di applicazioni ottenute con questa ultima tecnica per produrre piante con caratteristiche desiderate quali la resistenza alle malattie, la tolleranza alla siccità o un miglior profilo nutrizionale.

Tab. 1.1 – Applicazioni del *genome editing*: esempi di caratteri migliorati [da Plant Biotechnology Reports (2019) 13: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0509-4>]

Tipo	Gene	Caratteri	Specie
<i>Gene editing</i>	<i>FAD2</i>	Qualità nutrizionale	<i>Brassica</i>
	<i>LOB1</i>	Resistenza a patogeni	<i>Citrus</i>
	<i>ALS</i>	Resistenza ad erbicida	Riso
	<i>CDC48</i>	Senescenza	Riso
	<i>SLR1</i>	Crescita della pianta	Riso
	<i>ACC-T1</i>	Resistenza ad erbicida	Riso
	<i>eIF4G</i>	Resistenza a patogeni	Riso
	<i>AAP3</i>	Produzione	Riso
	<i>CycB</i>	Qualità nutrizionale	Pomodoro
	<i>JAZ2</i>	Resistenza a patogeni	Pomodoro
	<i>16DOX</i>	Qualità	Patata
	<i>FT2a</i>	Fioritura	Soia
	<i>ALC</i>	Qualità	Pomodoro

<i>Gene replacement</i>	<i>ALS</i>	Resistenza ad erbicida	Riso
	<i>NRT1.1B</i>	Qualità	Riso
	<i>EPSPS</i>	Resistenza ad erbicida	Cassava

Come già riferito, l'attività di ricerca e la conseguente innovazione varietale richiede l'utilizzo di risorse genetiche per costituire nuove varietà, nonché per migliorare quelle tradizionali al fine di soddisfare la domanda sempre più diversificata degli agricoltori e del mercato. Questa attività coinvolge inoltre tutti i settori della produzione del seme con obiettivi diversi a seconda della coltura.

1.4 FINOCCHIO E BASILICO: ESEMPI DI FILIERE CON CRITICITÀ

Il settore della produzione del seme potrà essere forte e innovativo solo se sarà in grado di sfruttare le potenzialità del germoplasma della specie e promuovere filiere agricole e alimentari solide, diversificate, sostenibili, competitive e capaci di rispondere alle sfide presenti e future della società. Il finocchio tra le ortive e il basilico tra le aromatiche sono due esempi importanti di filiera che presentano criticità nel comparto italiano della produzione del seme.

1.4.1 FINOCCHIO

Il finocchio (*Foeniculum vulgare* Mill.) è una specie diploide ($2n=2x=22$ cromosomi), prevalentemente allogama, appartenente alla famiglia delle Ombrellifere. Originaria del bacino del Mediterraneo, trova in Italia il suo clima ideale.

Nella coltivazione del finocchio, l'Italia vanta infatti il primato mondiale con 19.269 ha di superficie coltivata e un volume annuo di 509.885 t raccolte (dati ISTAT, 2020). A livello nazionale, la Puglia è la regione con la maggiore offerta seguita dalla Calabria, Campania e Abruzzo (dati ISTAT, 2020). Coltivato prevalentemente in pieno campo, il finocchio presenta anche una piccola produzione in serra (3.688 t) limitata ad una

superficie di 94,92 ha (dati ISTAT, 2020) principalmente localizzati in Sardegna, Veneto e Piemonte (dati ISTAT, 2020).

Malgrado l'importanza economica ed una certa stabilizzazione degli ettari coltivati negli ultimi 15 anni (*Fig. 1.4*), la filiera produttiva per anni ha presentato delle criticità di tipo tecnico-agronomico soprattutto dovute alla scarsa attenzione di istituzioni di ricerca e di industrie sementiere verso le attività di miglioramento genetico e lo sviluppo di innovazioni.

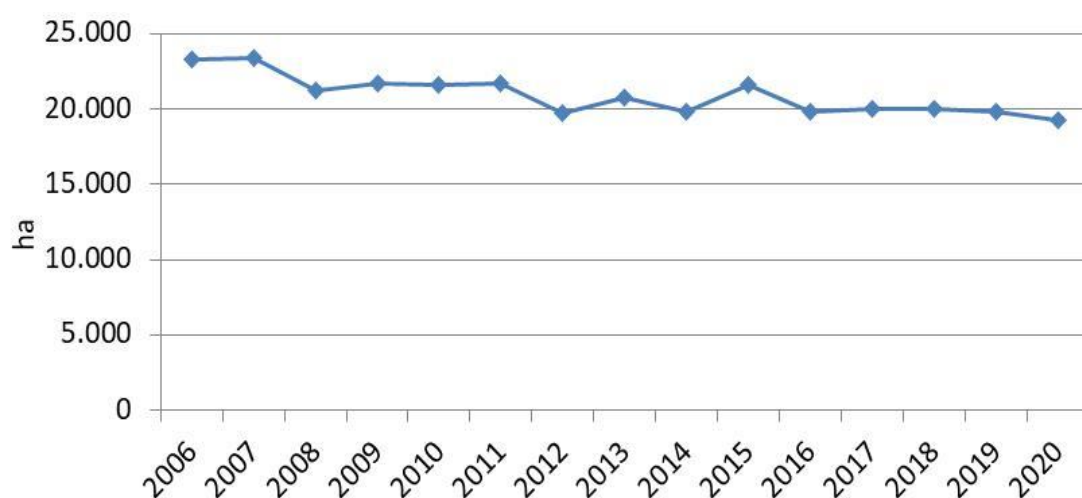


Fig. 1.4 – Superficie coltivata a finocchio in Italia negli ultimi 15 anni (dati ISTAT, 2020)

Il mercato del finocchio, dominato in passato esclusivamente da cultivar locali, ha attualmente raggiunto una certa innovazione varietale, soprattutto con l'introduzione di ibridi F_1 che richiedono però di essere sempre più orientati ad allargare la segmentazione d'uso (<https://www.freshplaza.it/article/4015628/la-rivoluzione-nel-comparto-del-finocchio-si-chiama-seminis/>), soprattutto con lo sviluppo di nuovo germoplasma tardivo.

E' necessario implementare la filiera produttiva con l'introduzione di innovazioni, in particolare attraverso (a) l'inserimento di resistenze genetiche a malattie di non facile controllo (es.: *Sclerotinia sclerotiorum*); (b) la valorizzazione del germoplasma locale sottoposto ad erosione genetica; (c) lo sviluppo di parentali geneticamente stabili da

utilizzare nella produzione di ibridi F₁; (d) la caratterizzazione molecolare della maschio sterilità per effettuare il *breeding* assistito finalizzato soprattutto alla realizzazione di ibridi F₁; (e) lo sviluppo di aspetti della tecnologia del seme per favorire il miglioramento della germinazione.

Oggi il prodotto è molto apprezzato in Francia e Nord-Europa. Il suo modesto valore energetico (10-15 cal/100 g di parte edule) e le sue proprietà nutrizionali (93 % di acqua, 0.5-0.7 di fibra, vitamine A e C) lo rendono idoneo per le diete ipocaloriche.

1.4.2 BASILICO

Il basilico (*Ocimum basilicum* L.) è una specie tetraploide (2n=4x=48 cromosomi) originaria dell'Asia tropicale e appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae*. Predilige climi temperati caldi.

In Italia è coltivato su una superficie di 32.301 are con una produzione raccolta di 75.945 q (dati ISTAT, 2020). Dopo la flessione del 39% registrata nel 2019 rispetto alla precedente annata e del 32% rispetto al 2020, si è avuto una tendenza al recupero nel 2020 (Fig. 1.5); il trend positivo è dovuto al crescente interesse verso un'alimentazione sana ed ecocompatibile.

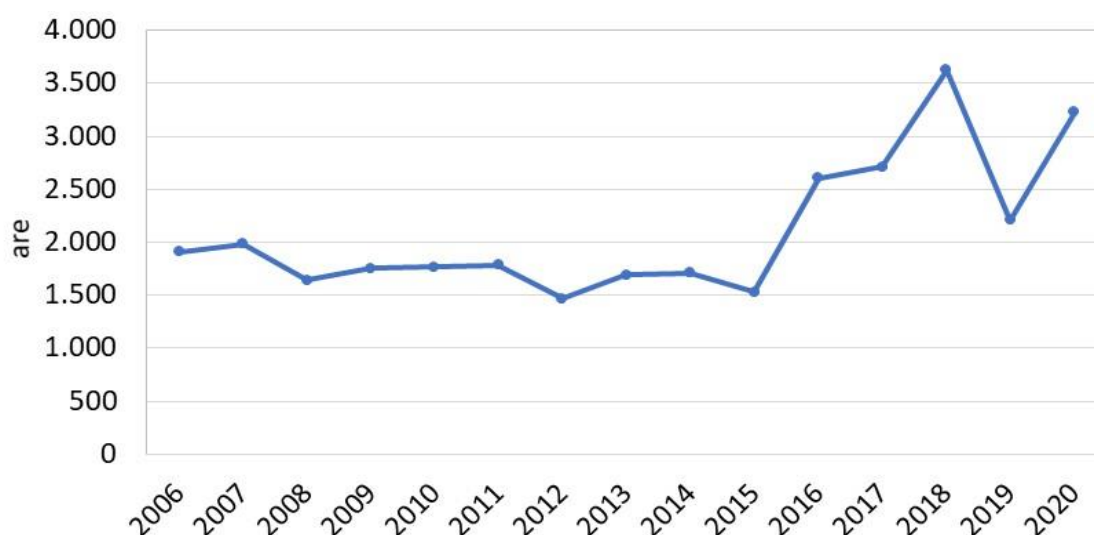


Fig. 1.5 – Superficie coltivata a basilico in Italia negli ultimi 15 anni (dati ISTAT, 2020)

Tra le regioni italiane, il basilico è coltivato particolarmente in Veneto (13.730 Campania (7.380 are) e Liguria (3.700 are). In quest'ultima regione, in particolare, dopo il 2011, il calo produttivo (Fig. 1.6) è stato molto drastico (98-99% nel 2010 e 2012, 86% nel 2015 e 2016 e 60-70% negli anni successivi fino al 2020), mettendo a rischio una delle principali eccellenze del *made in Italy*.

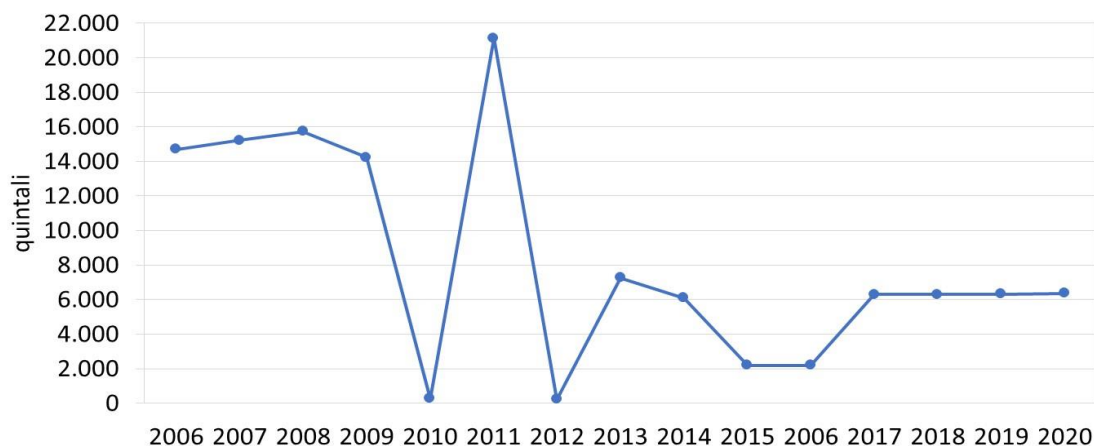


Fig. 1.6 – Calo produttivo registrato dalla coltivazione del basilico in Liguria negli ultimi 15 anni (dati ISTAT, 2020).

Le coltivazioni del basilico effettuate in serra e in pieno campo, destinate rispettivamente al consumo trasformato e fresco, da alcuni anni sono ormai pesantemente danneggiate da infezioni di *Peronospora belbahrii* (Garibaldi 2004b; Minuto *et al.*, 2003; 2004; Wyenandt *et al.*, 2015) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* che stanno seriamente compromettendo la capacità produttiva della specie nelle aree storiche di produzione. Soprattutto la situazione fitosanitaria associata a *P. belbahrii* rappresenta la maggiore criticità della filiera del basilico italiano, in modo particolare nell'economia della Liguria dove il basilico può oggi fregiarsi del marchio di Basilico Genovese DOP con l'obiettivo di difendere e rivendicare l'appartenenza alla regione e aumentare il valore intrinseco del prodotto.

In Tab. 1.2 sono riportate le aree di diffusione della malattia che, in un decennio, hanno raggiunto diversi paesi causando notevoli perdite di raccolto. Nel continente africano, dove è prodotto quasi tutto il seme di basilico, la malattia è ormai endemica,

visto che la prima osservazione è avvenuta in Uganda nel 1933 (Hansford, 1933). In Italia il patogeno è apparso per la prima volta nel 2003 in Piemonte e Liguria per poi diffondersi nel sud della penisola, probabilmente a causa delle condizioni termigrometriche favorevoli (http://agricoltura.regione.campania.it/difesa/peronospera_2014.html); gli episodi più gravi d'infezione si sono verificati nel 2014, tanto da far parlare di fungo killer del basilico.

Tab. 1.2 – Diffusione di P. belbahrii dopo la sua comparsa (da Wyenandt et al, 2015)

<i>Anno</i>	<i>Paese</i>
1933	Uganda
2001	Svizzera
2003	Italia
2004	Belgio e Francia
2005	Sud Africa
2006	Iran
2007	Cameroon
2008	Argentina
2009	Taiwan, Cuba, Illinois, Florida e altri Stati in USA
2010	Ungheria
2011	Canada, Israele
2012	Cipro e Repubblica Ceca
2013	Ontario (Canada)
2014	Cipro
2015	Columbia
2018	Arkansas, New Jersey
2019	Brasile

Sembra che la rapida diffusione della malattia degli ultimi anni possa essere attribuita alla trasmissione del patogeno attraverso il seme infetto (Garibaldi *et al.*, 2004a; Belbahri *et al.*, 2005; Thines *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2017; Falach-Block *et al.*, 2019).

Secondo Garibaldi *et al.* (2004a), sarebbero sufficienti contaminazioni dello 0,017% per avere una propagazione veloce del patogeno nelle aree di coltivazione intensiva. Anche le osservazioni condotte dal CeRSAA di Albenga confermano questo tipo di diffusione e infezione (com. pers.).

Negli ultimi anni, l'export del basilico è cresciuto interessando Usa, Gran Bretagna, Francia e Germania (<https://agronotizie.imaginenetwork.com/vivaismo-e-sementi/2018/07/12/basilico-traino-per-il-made-in-italy/59433>).

Alcune delle principali criticità descritte per le due specie trattate, finocchio e basilico, sono state oggetto di studio nella presente tesi che ha riguardato in particolare:

1. Resistenza a malattie.
2. Maschio sterilità.
3. Miglioramento della germinazione dei semi mediante metodologia *priming*.

Tali tematiche sono state descritte prima nella parte generale e poi affrontate a livello sperimentale.

CAPITOLO 2

RESISTENZA A MALATTIE

2.1 INTRODUZIONE

Tra le priorità richieste dall'innovazione varietale, la resistenza a malattie rappresenta un elemento chiave per rispondere alle sfide della sostenibilità della produzione agricola. Questo soprattutto in un contesto in cui il cambiamento climatico enfatizza le problematiche di adattamento delle colture allo spostamento degli areali, all'aumento della frequenza dei fenomeni meteorologici estremi (Fig. 2.1) e al verificarsi sempre maggiore di stress biotici e abiotici. Tale situazione compromette notevolmente le coltivazioni e mette a rischio il patrimonio di prodotti tipici *'Made in Italy'*, che devono le loro specifiche caratteristiche proprio all'ambiente geografico in cui sono stati ottenuti.



Fig. 2.1 – Effetto dei cambiamenti climatici sull'agricoltura (da https://www.feger.it/blog/i-cambiamenti-climatici-gli-effetti-sullagricoltura_78.xhtml)

Le avversità biotiche hanno un impatto economico negativo sull'agricoltura (Oerke *et. al.*, 2003; Chakrabortya e Newton, 2011). E' chiaro quindi quali siano le potenzialità del miglioramento genetico per la resistenza agli stress ai fini dell'aumento della produttività sostenibile. Non sorprende infatti che tale obiettivo sia presente nei programmi di miglioramento genetico di tutte le specie.

I programmi di miglioramento genetico si propongono di inserire la resistenza a malattie in materiale genetico valido dal punto di vista agronomico e qualitativo,

permettendo di ottenere varietà produttive stabili nelle rese e adattabili ai diversi ambienti (Boyd *et al.*, 2013). Nell'ottica di un'agricoltura sostenibile, l'impiego di varietà resistenti a stress biotici si configura pertanto come un metodo ideale e alternativo a quello chimico in quanto consente di ottenere produzioni caratterizzate da un basso impatto ambientale, sopprimendo o riducendo l'uso di agrofarmaci di sintesi.

I programmi di miglioramento per resistenza a malattie presentano comunque problematiche peculiari in considerazione del fatto che il materiale biologico su cui si deve intervenire è costituito da un lato dalla pianta ospite e dall'altro dal patogeno e bisogna tener conto anche dell'ambiente che influenza in maniera determinante lo sviluppo di una malattia. La

manifestazione di una malattia può essere considerata come l'interazione di un sistema dinamico tridimensionale (Fig. 2.2) le cui componenti sono rappresentate dalla variabilità genetica del patogeno, dalla variabilità genetica della pianta ospite



Fig. 2.2 - Triangolo della malattia.

La malattia è il risultato dell'interazione tra un ambiente favorevole, una pianta suscettibile e un patogeno virulento. Sia la pianta che il patogeno sono influenzati dall'ambiente.

e dall'ambiente. Ciò richiede pertanto la conoscenza dei fattori ambientali, dei meccanismi di azione del patogeno nonché di quelli di difesa dell'ospite.

L'attività di miglioramento genetico necessita quindi della conoscenza degli aspetti epidemiologici del patogeno, della sua tendenza a variare in termini di patogenicità e quindi a differenziare nuove varianti (razze fisiologiche, patotipi o ceppi). Per quanto riguarda l'ospite, è invece fondamentale poter valutare l'efficacia di una resistenza e la sua stabilità nel tempo. E' ancora utile conoscere gli aspetti fisiopatologici dell'interazione ospite-parassita, le basi genetiche della resistenza e le metodologie di selezione. I rapporti ospite-patogeno sono inoltre fortemente

influenzati dal tipo di ecosistema in cui coesistono ed interagiscono produttori (piante), consumatori e decompositori (*Fig. 2.3*). Questa complessa trama di interazioni porta spesso ad un equilibrio dinamico dell'ecosistema in cui le piante soffrono meno l'attacco dei consumatori.

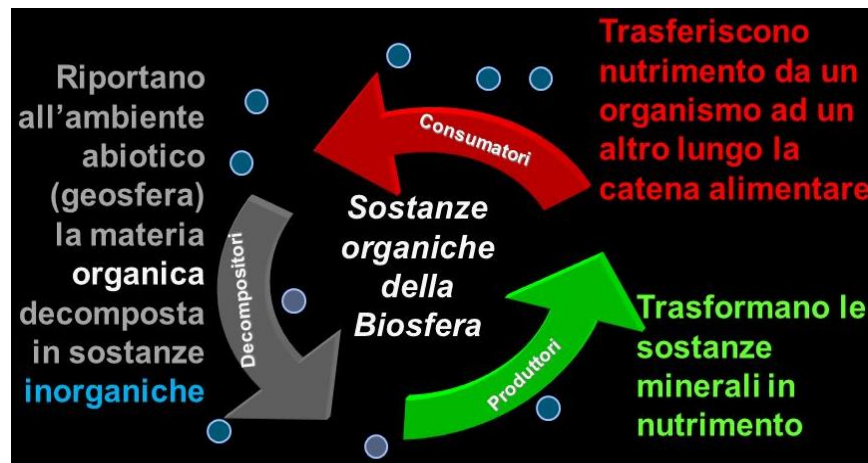


Fig. 2.3 - Ciclo della materia in un ecosistema

Negli agroecosistemi dove la diversità tra organismi è ridotta (es. la monocoltura) e dove la gran parte della biomassa è asportata dal sistema, si ha instabilità a causa del sopravvento dei consumatori. Quindi è proprio in quest'ultimo tipo di agroecosistema che si richiede l'intervento di un programma di miglioramento genetico volto all'ottenimento di resistenze genetiche.

2.2 INTERAZIONE OSPITE-PATOGENO

Per poter dare origine ad un'infezione nella pianta ospite, un agente patogeno deve superare le reazioni di difesa; queste sono classificate in sfuggenza, resistenza e tolleranza (Buscaill e Rivas, 2014).

La sfuggenza nei confronti del patogeno è rappresentata dalla precocità o tardività dello sviluppo della pianta per sfuggire all'attacco del patogeno, in quanto le condizioni climatiche favorevoli al suo sviluppo non si verificano nel periodo di maggiore recettività dell'ospite.

La resistenza consiste nella capacità di una pianta a limitare la crescita di un patogeno e il danno che questo provoca rispetto a varietà suscettibili poste nelle stesse condizioni ambientali e di pressione infettiva del patogeno. Le varietà resistenti possono tuttavia mostrare alcuni sintomi della malattia o di danno in presenza di una forte pressione da parte del patogeno.

I meccanismi di resistenza implicano il riconoscimento di molecole derivate dalla presenza del patogeno sulla pianta e la conseguente elicitazione delle risposte di difesa (*Fig. 2.4*). Tale interazione innesca una cascata di segnali a livello molecolare che promuove i meccanismi naturali alla base dei sistemi di difesa delle piante (Beanes *et al.*, 2014).

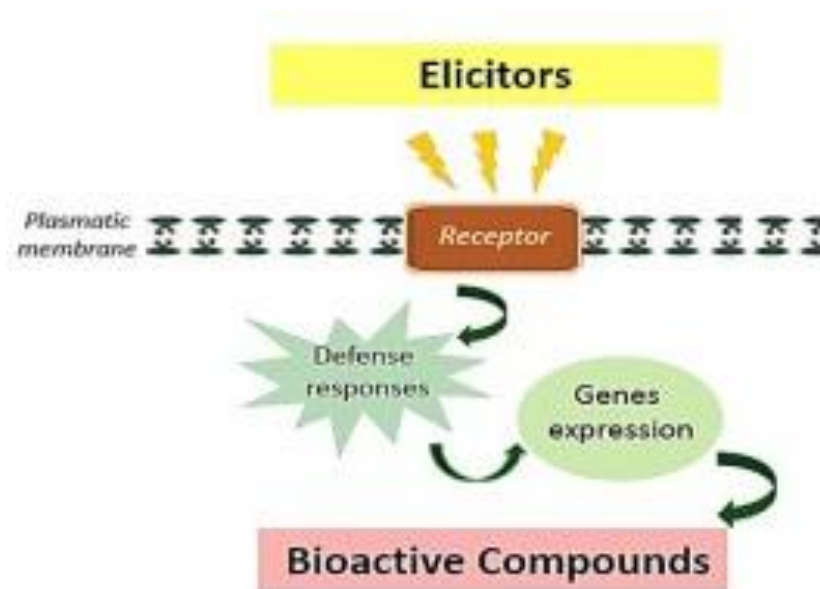


Fig. 2.4 - Induzione di resistenza a patogeni nella pianta basata principalmente sull'utilizzo di molecole, dette elicitori, riconosciute attraverso specifici recettori sulla superficie cellulare della pianta (da Beanes *et al.*, 2014).

La resistenza può essere passiva, se presente nei tessuti dell'ospite indipendentemente dalla presenza dell'agente patogeno, o attiva, se si avvia quando l'agente patogeno entra in contatto con l'ospite. In quest'ultimo caso, si verificano la reazione di ipersensibilità o HR (*Fig. 2.5*) e la produzione di fitoalessine.

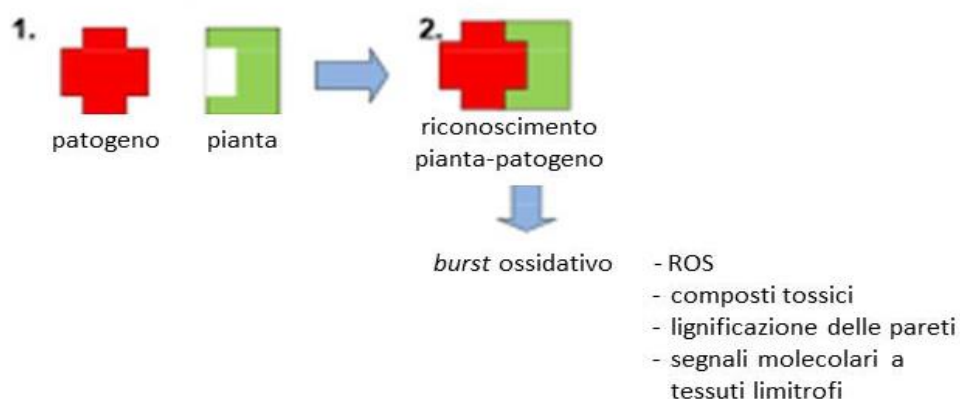


Fig. 2.5 – Reazione di ipersensibilità nella pianta

L'ipersensibilità consiste in una serie coordinata di reazioni che avvengono nelle cellule dell'ospite provocando la morte rapida di quelle infettate e modificazioni metaboliche in quelle adiacenti (Lamb e Dixon, 1997) con formazione di aree necrotiche ristrette che delimitano l'infezione. Una delle prime reazioni consiste nel *burst* ossidativo con la formazione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species* o ROS) quale l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idroperossilico (HO_2) e il radicale idrossilico (OH). I ROS possono agire direttamente sul patogeno a causa della loro tossicità acuta che si esplica sia alterando la funzionalità delle membrane cellulari sia rafforzando le pareti dell'ospite e rendendole più resistenti alla penetrazione del patogeno mediante la formazione di legami tra le glicoproteine di parete ricche di idrossipolina. Nelle cellule adiacenti si innescano invece segnali intracellulari trasmessi dal nucleo che attivano i geni correlati alla difesa coinvolti nell'ossidazione di polifenoli in chinoni con azione inibitrice su alcuni enzimi fungini, nella produzione di proteine strutturali di fitoalessine e di proteine correlate alla patogenesi. Le fitoalessine sono prodotte dalle cellule che circoscrivono il punto di infezione e sono altamente tossiche per numerosi agenti patogeni (Dixon *et al.*, 2013). Queste molecole possono avere diversa natura chimica (fenoli, terpenoidi, flavonoidi, stilbeni, ecc. alcuni esempi sono rappresentati dalla camalessina in *Brassicaceae*, gliceolina in *Fabaceae*, capsdiolo in *Solanaceae*, resveratrolo in *Vitaceae*). Le proteine correlate alla patogenesi (*Pathogenesis Related*

Proteins, PR) hanno spiccata attività antimicrobica e determinano il rafforzamento delle pareti cellulari della pianta (Lanubile *et al.*, 2014). E' nota una ventina di famiglie PR (es.: PR-2 con proteine ad attività β -1,3-glucanasi, PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11 con attività chinasi).

La resistenza può essere inoltre mediata da ormoni, quali l'acido salicilico, l'etilene e l'acido jasmonico. L'acido salicilico media la resistenza sistemica acquisita (*Systemic Acquired Resistance* o SAR) in tessuti sani distanti dal sito di infezione e si manifesta in seguito ad infezioni di patogeni incompatibili, producendo una risposta HR (Fig. 2.6). L'etilene e l'acido jasmonico mediano invece la resistenza sistemica indotta (*Induced Systemic Resistance*, ISR) che può essere attivata nell'intera pianta in seguito all'instaurarsi di una simbiosi mutualistica con microrganismi benefici a livello della rizosfera come i rizobatteri e i funghi antagonisti del genere *Trichoderma* (Yan *et al.*, 2012; Fig. 2.6). Si tratta di una forma di resistenza di tipo sistemico poiché la capacità difensiva non aumenta soltanto nel sito primario di infezione ma anche nei tessuti sani spazialmente separati. La resistenza indotta non è specifica, perdura per diverse settimane e può essere influenzata dalle condizioni climatiche e nutritive.

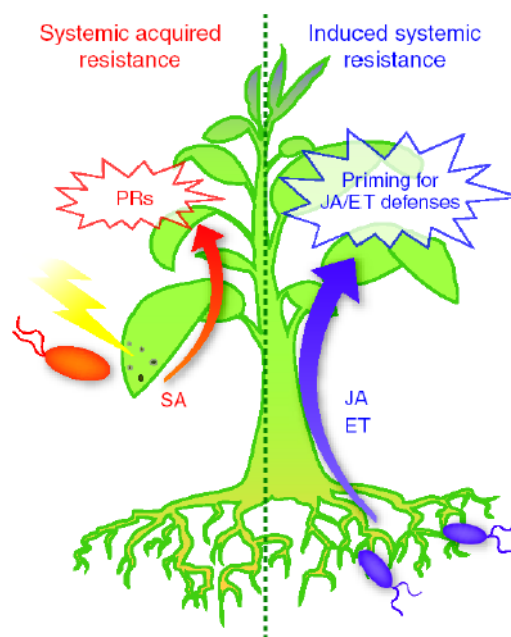


Fig. 2.6 - Le principali risposte di resistenza della pianta indotte a livello sistemico (da Pieterse *et al.*, 2009).

Infine, la reazione di tolleranza non riduce la possibilità di contatto tra ospite e agente patogeno ma indica l'abilità della pianta a sopportare severi attacchi da parte dell'agente patogeno senza determinare gravi perdite nella produttività e qualità del prodotto.

2.3 BASI GENETICHE DELL'ADATTAMENTO A STRESS BIOTICI

Per rispondere alla presenza di patogeni che cercano di invaderle, le piante hanno a disposizione meccanismi di resistenza in grado di riconoscere e rispondere all'azione di patogeni specifici. Una singola cellula che subisce un tentativo di invasione è in grado di attuare tutti i processi che portano ad una risposta di resistenza (Stanca *et al.*, 2014).

Molte interazioni pianta-patogeno sono basate su un sistema di riconoscimento gene-per-gene che prevede il coinvolgimento di un gene di resistenza (R) della pianta e un gene di avirulenza (inabilità ad infettare, *Avr*) del patogeno (Flor, 1971). Nel caso avvenga il riconoscimento tra il prodotto del gene *R* e quello del gene *Avr* (elicitore ospite-specifico), nella pianta si attiva il meccanismo di difesa che porta alla resistenza nei confronti del patogeno (Fig. 2.7).

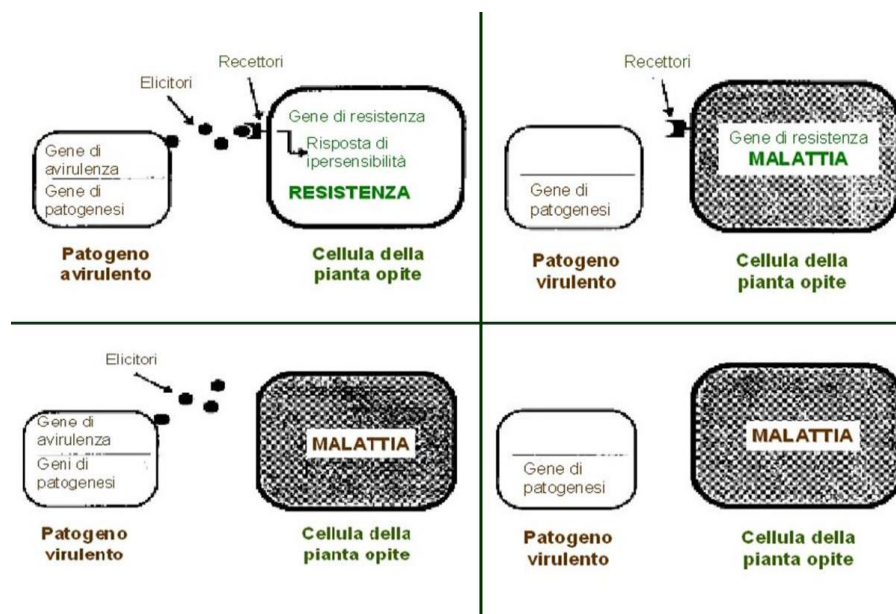


Fig. 2.7 - Interazione ospite-patogeno: riconoscimento gene-per-gene

Al contrario, la suscettibilità della pianta e la conseguente malattia si instaurano quando non avviene il riconoscimento gene-per-gene, ovvero nei casi in cui la pianta non possieda il gene *R* o il patogeno non possieda lo specifico gene di avirulenza *Avr*. Esempi di riconoscimento gene-per-gene sono noti per i batteri e per i funghi. Ad esempio, ceppi diversi del fungo *Cladosporium fulvum*, agente casuale della cladosporiosi del pomodoro, producono diversi set di geni di avirulenza *Avr*. Questi geni *Avr* sono riconosciuti da altrettanti geni di resistenza *Cf* presenti in diverse cultivar di pomodoro. Dall'interazione tra il ceppo fungino e la cultivar di pomodoro con il gene di resistenza *Cf*, si instaura una reazione di incompatibilità mentre, al contrario, le cultivar risultano suscettibili all'attacco del patogeno (Stergiopoulos *et al.*, 2010).

Alla base di questa serie di eventi, è stato individuato un repertorio molecolare di riconoscimento dei patogeni, fondamentalmente basato su due tipi di recettori proteici (Jones e Dangl, 2006; Mackawa *et al.*, 2011). La prima classe di percezione comporta la presenza, sulla superficie della membrana plasmatica, di recettori definiti *Pattern Recognition Receptors* o PRR che sono in grado di riconoscere componenti strutturali tipici del patogeno definiti come *Pathogen Associated Molecular Patterns* o PAMP. I PAMP sono generalmente elementi essenziali o strutturali di determinate classi di patogeni (es.: la proteina flagellina nei batteri o la chitina nei funghi). Una volta che i PPR sono stati attivati per mezzo del riconoscimento specifico, innescano le reazioni di difesa della pianta. La seconda classe di percezione comporta il riconoscimento di molecole del patogeno (prodotti dei geni *Avr*) implicate nella soppressione delle risposte di difesa o in modificazioni del metabolismo dell'ospite a favore del patogeno. Questi componenti del patogeno sono definiti come effettori e sono riconosciuti tramite recettori della pianta (prodotti dai geni *R*), generalmente intracellulari; il riconoscimento causa una risposta immune definita come *Effector Triggered Immunity* o ETI. Poiché questo meccanismo garantisce il riconoscimento di molecole del patogeno estremamente diverse fra loro, anche i recettori delle piante implicate nell'ETI si sono diversificati nel tempo. Generalmente le risposte di difesa sono simili nelle piante ma ETI

rappresenta una risposta qualitativamente e quantitativamente più consistente e temporalmente più veloce che implica una risposta di ipersensibilità. Tale risposta HR, causando la morte delle cellule, priva i patogeni della loro fonte di nutrimento e di conseguenza determina un blocco del processo di infezione.

2.4 TIPI DI RESISTENZA

Le resistenze possono essere (a) assolute o totali o specifiche (se lo sviluppo dell'agente patogeno è bloccato e l'infezione non avviene) oppure (b) parziali o aspecifiche (se il patogeno infetta la pianta ma il suo sviluppo è rallentato).

Dal punto di vista molecolare, il primo tipo di resistenza risulta dalla percezione di una singola molecola attiva del patogeno (effettore *Avr*) da parte di un gene di resistenza *R* della pianta (Fig. 2.8). Essendo monogenica o oligogenica, la resistenza totale o specifica è trasmessa alla progenie in modo Mendeliano semplice e non è facilmente influenzabile dalle condizioni ambientali (Zhang *et al.*, 2013).

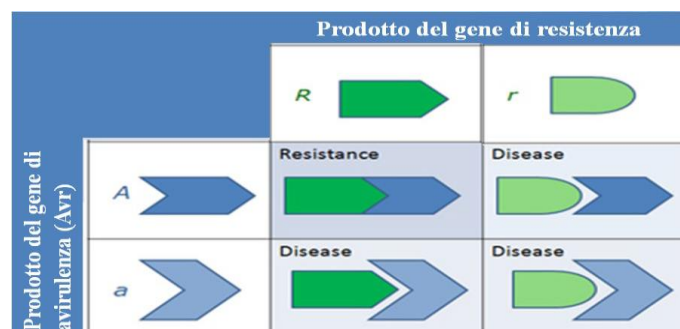


Fig. 2.8 - Modello di resistenza totale o specifica

La resistenza parziale o aspecifica non riduce la possibilità di contatto tra ospite e agente patogeno ma indica l'abilità della pianta a sopportare severi attacchi da parte del patogeno senza conseguenze serie sulla crescita, aspetto, produttività e qualità del prodotto. Questo tipo di resistenza è dato dall'integrazione di molti *pathways* di percezione attivati simultaneamente, ognuno dei quali rappresenta un piccolo contributo alla resistenza globale al patogeno. Non determina nell'ospite una risposta ipersensibile ma una serie di effetti che limitano la gravità dei sintomi. Pur essendo generalmente più

durevole della resistenza specifica, è anche meno efficace e difficile da trasferire; è inoltre di natura poligenica ed è complicato individuare i geni coinvolti.

La resistenza assoluta o specifica è stata osservata soprattutto nei confronti di patogeni biotrofi mentre quella aspecifica o parziale è implicata nella risposta di difesa verso tutti i patogeni biotrofi, emibiotrofi e necrotrofi (Fig. 2.9).



Fig. 2.9 - Sfruttamento dell'ospite da parte del patogeno (da Pieters *et al.*, 2009)

La resistenza assoluta è razza-specifica e quindi in grado di contrastare solo una o poche razze del patogeno (Fig. 2.10) (Flor, 1971). Interazioni di questo tipo permettono di distinguere

nuove razze fisiologiche del patogeno e specifici geni di resistenza dell'ospite; di solito si tratta di geni ad azione dominante (es. nelle interazioni pomodoro-*Cladosporium fulvum* e

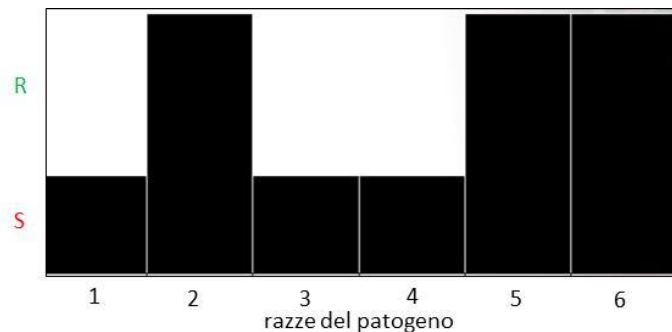


Fig. 2.10 – Resistenza specifica alle razze 2, 5 e 6

frumento-*Puccinia striiformis*). In altri sistemi, le resistenze sono determinate da alleli multipli quali, ad esempio, gli alleli al locus *Rag1* per la resistenza ad oidio in orzo, i geni *Tm-1*, *Tm-2* e *Tm-2²* e i geni *L1*, *L2*, *L3* e *L4* che determinano resistenza a diversi ceppi del virus TMV o Tobacco Mosaic Virus e del ToMV o Tomato Mosaic Virus rispettivamente in pomodoro e in peperone (Saccardo, 1993). In alcuni sistemi, la resistenza specifica può dipendere dallo stadio di sviluppo e dalle condizioni ambientali. Ad esempio, il gene *Sr2* conferisce la resistenza alla ruggine dello stelo e

non a quella della foglia, mentre i geni *Lr2* e *Lr2b* si comportano in modo opposto. Il gene *Sr* determina invece resistenza a *P. recondita* solo quando la temperatura è inferiore a 26°C. Inoltre, la stabilità nel tempo delle resistenze assolute può essere molto variabile (Michelmore *et al.*, 2013) ed è possibile valutare la durata di una resistenza solo dopo molti anni dal suo impiego. E' stato accertato che, per alcuni patogeni, l'insorgenza di nuove razze fisiologiche è molto più rapida rispetto ad altri. In molte piante esistono resistenze di lunga durata, anche se non necessariamente permanenti. Una resistenza durevole non può essere individuata con sicurezza *a priori* ma soltanto dopo averla esposta all'infezione per diversi anni, su superfici estese e in diverse aree geografiche dove le condizioni pedoclimatiche sono favorevoli al patogeno. La durata della resistenza è strettamente legata all'abilità parassitica del consumatore, cioè alla capacità di aggredire o eliminare gli effetti dovuti a meccanismi di difesa messi in atto dalla pianta ospite. La causa principale della variabilità patogena è costituita da mutazioni che interessano i geni di virulenza.

A differenza della resistenza specifica, quella aspecifica o parziale si manifesta in piante adulte ed è caratterizzata da manifestazioni variabili, da livelli di resistenza parziale e non è razza-specifica (Fig. 2.11); ha il vantaggio di limitare la comparsa di nuove varianti virulente perché il patogeno dovrebbe mutare o ricombinare contemporaneamente per una molteplicità di geni (Balin-Kursti e Johal, 2009). Tuttavia, tale resistenza poligenica è più difficile da trasferire nella progenie rispetto a quella monogenica. La resistenza aspecifica coinvolge più processi fisiologici dell'ospite che agiscono come meccanismi di difesa e rappresentano ostacoli impossibili da superare

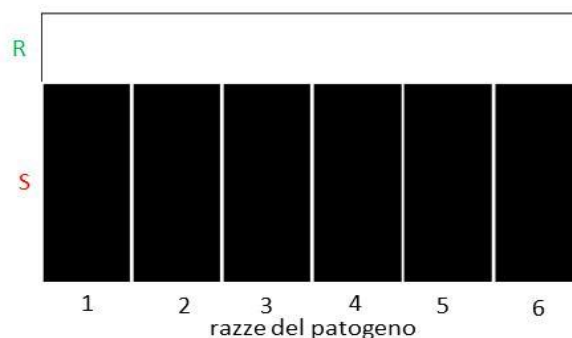


Fig. 2.11 - Resistenza aspecifica non razza-specifica.

per il patogeno. Le piante con la resistenza aspecifica rimangono resistenti più a lungo ma con minore intensità.

Il germoplasma con resistenza specifica è spesso infettato all'improvviso da nuove razze del patogeno determinando delle vere e proprie epidemie. Per evitare lo svantaggio dell'inefficienza della resistenza, oggi sono usate le multilinee o la piramidizzazione. Le multilinee sono una miscela di varietà individuali agronomicamente simili ma che differiscono nei loro geni di resistenza. La piramidizzazione consiste nell'uso di linee che sono derivate dall'incrocio di molte risorse genetiche con geni *R* diversi, selezionando da queste solo quelle che contengono una miscela di tutti i geni *R*.

2.5 GENI DI RESISTENZA

I genomi vegetali hanno molti geni con potenziale funzione di resistenza e finora ne sono stati clonati più di 100. La ricerca mediante approcci bioinformatici di nuovi geni candidati viene velocizzata dall'aumento esponenziale di informazioni nelle banche concernenti le sequenze nucleotidiche e proteiche e dalle annotazioni funzionali di geni e genomi delle principali specie di interesse agrario (Michelmore *et al.*, 2013).

Nella maggior parte dei casi, i geni *R* sono organizzati in cluster genici, probabilmente originati da eventi di duplicazione *in tandem*. Nonostante l'origine di questi cluster non sia chiara, la distribuzione dei geni *R* nel genoma non appare casuale. La maggior parte dei loci *R* contiene geni paraloghi molto simili a quelli funzionali *R*, per i quali non è stata ancora associata alcuna funzione, probabilmente perché non sono stati determinati gli elicitori su cui interagirebbero i loro prodotti (Balin-Kurti e Johal, 2009). I membri delle famiglie geniche *R* presentano, in alcuni casi, mutazioni che portano ad una interruzione della sequenza traducibile o a delezioni. Tuttavia anche le sequenze prive della parte terminale del gene risultano essere attive, come accade con il gene tronco *XA21D*, che conferisce resistenza a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

2.6 PRINCIPALI MALATTIE DEL FINOCCHIO E BASILICO

2.6.1 FINOCCHIO

Tra i patogeni che attaccano il finocchio, il fungo *Sclerotinia sclerotium* riveste una certa importanza. Si tratta di un patogeno estremamente polifago in grado di infettare diverse specie dicotiledoni e di causare danni sulle più svariate colture erbacee, ortensi ed industriali. Le infezioni sono favorite soprattutto da umidità elevate e temperature comprese tra i 12 ed i 15°C, scarsa ventilazione e coltivazione continua (Choi *et al.*, 2016).

Il fungo è in grado di attaccare tutti gli organi della pianta producendo un marciume molle nei tessuti parenchimatici che necrotizzano e assumono una colorazione giallo-bruna. Il marciume spesso interessa gli organi di sostegno che si sfilacciano esponendo il tessuto vascolare. Le parti colpite si possono talvolta rivestire di una muffa bianca, da cui il termine *white mold* con il quale la malattia è nota a livello internazionale. Se l'infezione avvolge completamente le strutture di sostegno, le piante possono avvizzire e spezzarsi. L'infezione può interessare le parti basali o comunque prossime alla superficie del suolo dove è responsabile del marciume del colletto (Fig. 2.12). Il patogeno produce un feltro cotonoso di micelio bianco che differenzia delle masserelle irregolarmente globose, dapprima grigiastre e molli e successivamente nere e consistenti dette sclerozi.

L'infezione di *Sclerotinia* si diffonde direttamente nel terreno mediante germinazione degli sclerozi ma anche tramite ascospore (Fig. 2.12). Dopo un periodo di condizionamento in ambiente umido con temperature di 10-15°C, gli sclerozi possono produrre, a fine inverno, degli apotecii a forma di coppa portati su uno stipite su cui si trovano aschi cilindrici contenenti 8 ascospore ialine e ovoidali. Ciascun apotecio sviluppatosi in prossimità del suolo può rilasciare milioni di ascospore nell'aria che, trasportate dal vento, possono raggiungere le piante ospiti anche a chilometri di distanza. Le ascospore possono mantenersi vitali per 2-3 settimane. Le infezioni di radici e colletto sono dovute per lo più alla germinazione miceliare.

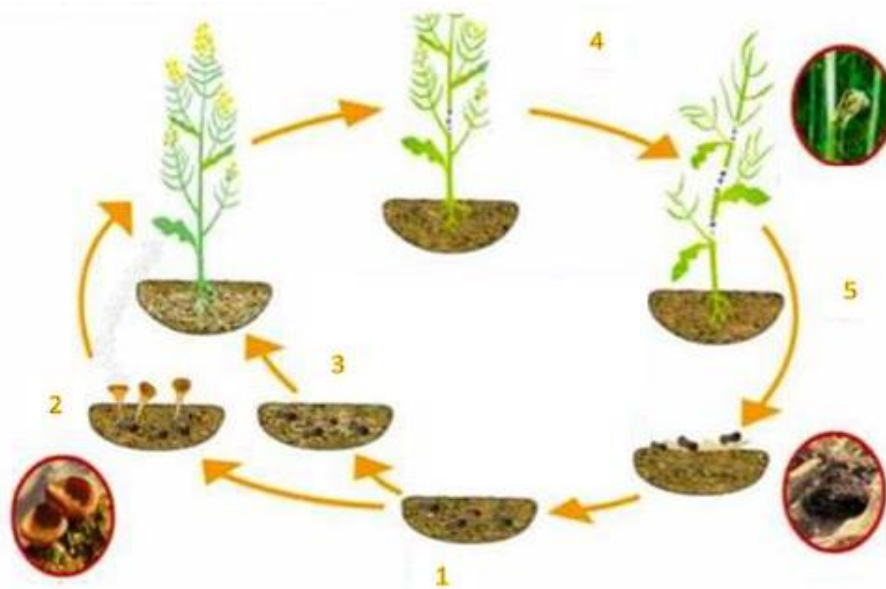


Fig. 2.12 – Ciclo biologico della Sclerotinia

Nel processo di infezione da *Sclerotinia* in generale, l'attività macerante è dovuta all'azione degradativa della parete cellulare per azione soprattutto di pectinasi secrete dal patogeno; queste sono favorite dall'abbassamento del pH dei tessuti in seguito alla produzione di acido ossalico. Si tratta di un fattore di patogenicità con molteplici funzioni tra cui quella di indurre la morte cellulare modulando la produzione di ROS nei tessuti dell'ospite.

Non sono state sinora riportate resistenze genetiche a *S. sclerotiorum* in finocchio.

2.6.2 BASILICO

In basilico, *P. belbahrii* provoca sintomi a carico dell'intero apparato fogliare, con clorosi internervali nella pagina superiore della foglia che, con il progredire dell'infezione, necrotizzano provocando la morte delle piante e presenza di abbondante sporulazione di colore grigio sulla pagina inferiore dovuta alla fuoriuscita dei rami sporangiofori dagli stomi (Fig. 2.13). Gli sporangi sono prodotti quando le condizioni ambientali sono favorevoli allo sviluppo della malattia (umidità elevata, temperature miti, scarsa circolazione dell'aria; Cohen *et al.*, 2017).

P. belbahrii è un patogeno biotrofo obbligato che si riproduce prevalentemente per via agamica, mediante zoospore di colore marrone-scuro violaceo che germinano producendo uno stiletto di penetrazione 3-6 giorni dopo avere instaurato il contatto con l'ospite suscettibile (Zhang *et al.*, 2020). Per la germinazione delle zoospore sono richieste almeno 2 ore di bagnatura fogliare e temperature comprese tra 15-20°C (Cohen e Ben Naim, 2016); alcuni lavori riportano invece una bagnatura fogliare di almeno 6 ore (Garibaldi *et al.*, 2007).



Fig. 2.13 – Foglie di basilico infette da *P. belbahrii* con lesioni clorotiche tra nervature (a) e con abbondante sporulazione nella parte inferiore (b) e particolare di sporangiofori (c) e sporangi (d).

La penetrazione nell'ospite avviene sia direttamente che attraverso gli stomi (Cohen *et al.*, 2017). Come le altre peronosspore, *P. belbahrii* presenta una colonizzazione dell'ospite di tipo biotrofo con sviluppo micelico intercellulare e invio di austori nelle cellule per l'assorbimento dei nutrienti. Sei-quattordici giorni dopo la penetrazione, si possono osservare le strutture propagative del fungo costituite da rami sporangiofori che fuoriescono prevalentemente dagli stomi nella pagina inferiore

delle foglie e sporadicamente anche dalla pagina superiore (Zhang *et al.*, 2020). La sporulazione (fuoriuscita dei rami sporangiofori dagli stomi) è inibita dalla presenza di lampade incandescenti o del tipo fluorescenti *cool white* (Cohen *et al.*, 2017).

Come già riferito, le condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia sono una temperatura compresa tra 15-22°C, un'elevata umidità relativa e una scarsa circolazione dell'aria (Cohen *et al.*, 2017), tanto è vero che spesso i danni più gravi si rilevano in tarda primavera, fine-estate, inizio- autunno in coltura protetta. Il fungo tollera il clima fresco.

È importante sottolineare che la scarsa presenza di varietà commerciali di basilico completamente resistenti al patogeno continua a rendere difficile il controllo (Pyne *et al.*, 2015; 2017; Wyenandt *et al.*, 2015). Per il controllo del fungo non esiste una soluzione unica che ne garantisca il successo e al momento è consigliabile l'integrazione tra tecniche agronomiche, fisiche, chimiche e genetiche (v. *Tab. 1.1.2 Parte Sperimentale*).

Anche *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* (FOB), è uno dei principali patogeni che interessano il basilico sia in condizioni di pieno campo che di coltura protetta. Tale agente patogeno è considerato specifico per il basilico (Keinath, 1994; Garibaldi *et al.*, 1997; Reuveni *et al.*, 1997). Si è diffuso nelle maggiori aree di coltivazione del basilico attraverso l'esportazione di seme infetto (Elmer, 2001) ed è attualmente presente in molti paesi.

Si tratta di un fungo saprofita che sopravvive nel terreno come micelio o come spore asessuate nei residui colturali di piante infette tra i vari cicli del raccolto. E' caratterizzato da un micelio lasso o fioccoso, feltroso nelle colonie adulte (*Fig. 2.14 a*) e formato da ife ialine settate; inizialmente si presenta incolore per assumere successivamente una colorazione rosata o giallo chiara. Produce tre tipi di spore asessuali: microconidi, macroconidi e clamidospore. I macroconidi sono settati, falcati ed appuntiti all'estremità e si trovano comunemente sulla superficie dei tessuti di piante morte (*Fig. 2.14 b*). I microconidi sono ialini, uni o bicellulari e sono prodotti abbondantemente dal fungo in tutte le circostanze da singole fialidi portate da ife indifferenziate o da conidiofori corti o poco ramificati (*Fig. 2.14 c*). Le clamidospore

con parete ispessita, di forma sferoidale, uni o bicellulare o disposte in brevi catenelle, sono prodotte terminalmente o intercalaramente su ife adulte (Fig. 2.14 d).

L'attacco del fungo, come per tutti i *Fusarium*, avviene attraverso le radici per

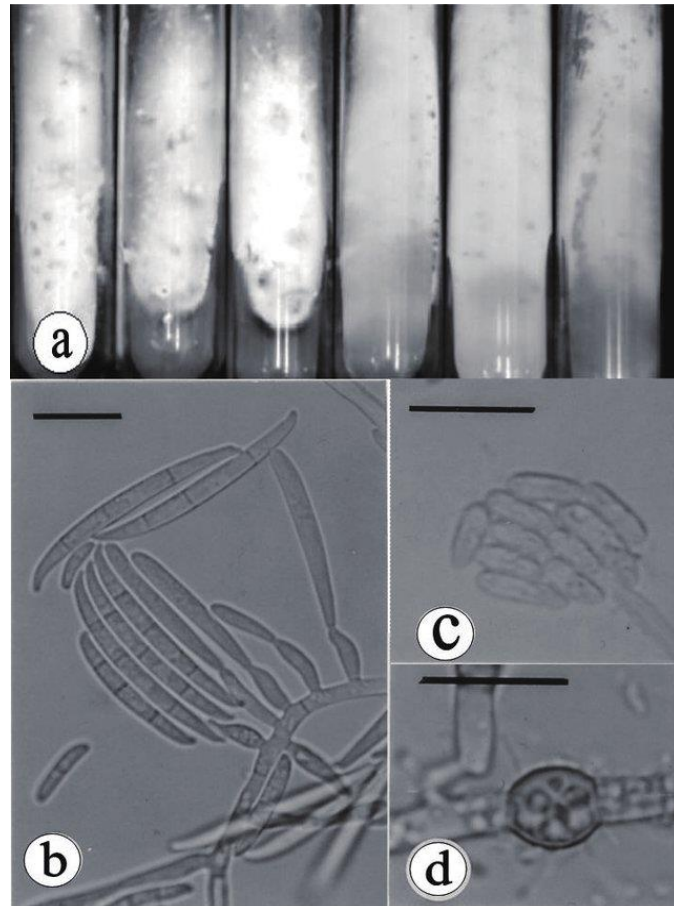


Fig. 2.14 – Morfologia di *F. oxysporum* f.sp. *basilici*. (a) Caratteristiche delle colonie su substrato PDA e morfologia di (b) macroconidi, (c) microconidi e (d) clamidospore. Bar = 10 μ m (da Chen *et al.*, 2017)

penetrazione attiva o per mezzo di microferite. Dopo aver raggiunto i vasi xilematici, si diffonde sistematicamente nella pianta, ramificando e producendo i microconidi che germinano all'interno del tessuto vascolare, impedendo il rifornimento idrico e nutrizionale della pianta e provocando appassimenti fino alla morte della pianta.

Le temperature favorevoli allo sviluppo di questo patogeno sono piuttosto elevate (circa 27 °C). I sintomi sono diversi e riguardano essenzialmente l'appassimento delle

piantine, il ritardo della crescita, le clorosi fogliari seguite da necrosi, l'epinastia fogliare, l'imbrunimento dei tessuti vascolari e il disseccamento degli apici vegetativi. Le piante malate hanno come primo sintomo l'arresto dello sviluppo, seguito dallo scolorimento dei fasci vascolari (Fig. 2.15 a), successivamente i teneri germogli iniziano ad avvizzire e le radici marciscono (Fig. 2.15 b e c). Le piante infette rimangono defogliate con avvizzimenti laterali e marcescenza del fiore seguiti da eventuale morte delle piante (Fig. 2.15 d, e, f). Le giovani piantine avvizziscono e muoiono in pochi giorni (Fig. 2.15 f). In alcuni casi il micelio e le masse di spore ricoprono le parti malate.

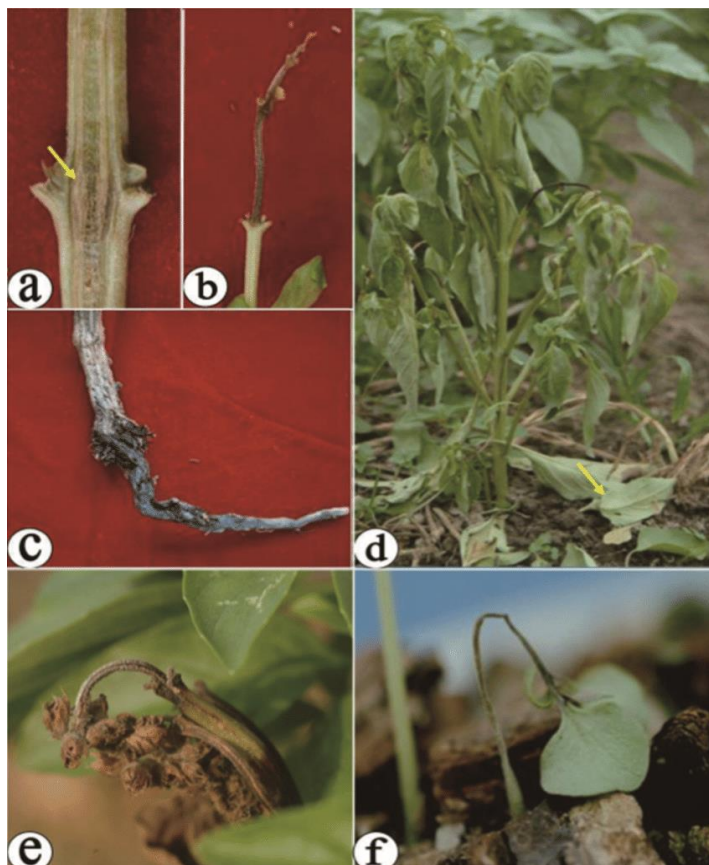


Fig. 2.15 – Sintomi da FOB su piantine di basilico (da Chen *et al*, 2017)

Nei Fusarium in generale, l'avvizzimento

è dovuto alla ridotta quantità d'acqua ed elementi nutritivi trasportata dallo xilema che risulta ostruito sia dalle strutture prodotte dal patogeno sia da composti originatisi a seguito dell'attività degradativa del fungo nonché da tille; queste rappresentano un tentativo della pianta di contrastare la colonizzazione da parte del patogeno. Il patogeno, oltre a svilupparsi all'interno del sistema vascolare, è in grado di sintetizzare una notevole quantità di enzimi implicati nella degradazione delle pareti dell'ospite, in particolare poligalatturonasi e pectatoliasi che agiscono sulle pectine presenti principalmente nelle lamelle mediane e xilanasi ritenute

responsabili della degradazione delle emicellulose. L'attività svolta da questi enzimi induce la formazione di metaboliti che vengono liberati nella corrente traspiratoria e possono contribuire a rendere difficoltoso il flusso idrico. La pianta stessa può reagire all'infezione producendo gomme che hanno un effetto analogo. Le cellule perivasali possono diventare ipertrofiche o moltiplicarsi disordinatamente; la pressione che esercitano sui vasi adiacenti determinano un'ulteriore riduzione del diametro degli elementi dello xilema o addirittura una loro completa occlusione (Belli, 2012).

CAPITOLO 3

MASCHIO STERILITÀ PER PRODUZIONE DI SEME IBRIDO

3.1 CARATTERI GENERALI E IMPORTANZA

La maschio sterilità, comunemente presente in natura, consiste nell'incapacità di una pianta a produrre polline funzionale, antere deiscenti o gameti maschili vitali (Chen e Liu, 2014); questa situazione può essere totale, parziale e interessare l'uno o l'altro sesso. Può essere causata da fattori ambientali, da specifici alleli (sterilità genica), da fattori genetici extranucleari (sterilità citoplasmatica), da incompatibilità tra embrione ed endosperma, da una condizione ibrida dello zigote (sterilità ibrida), da poliploidia e da aneuploidia. In questi casi, la fertilità femminile è completamente o pressappoco intatta. Dei due tipi di sterilità, quella maschile prevale su quella femminile in quanto i microsporofiti ed i microgametofiti sono più vulnerabili all'azione di forze intrinseche (es.: situazioni di aneuploidia) ed estrinseche (es. fattori ambientali) rispetto ai sacchi embrionali e/o agli ovuli che sono invece più protetti. Inoltre, a causa della facile reperibilità di una grande quantità di polline nelle antere e della semplice determinazione della sua fertilità, mediante colorazione con carminio acetico, l'individuazione della maschio sterilità è più facile rispetto al reperimento della sterilità femminile. Per essere provata, quest'ultima richiede incroci e studi di sviluppo durante l'antesi e la formazione del seme in modo da selezionare eventuali individui con aberrazione durante lo sviluppo del seme.

Il sistema più idoneo e affidabile per sviluppare e produrre sementi ibride si basa sull'impiego di linee maschio sterili (MS). In tal caso, sono evitate le laboriose operazioni di emasculazione per impedire la produzione di polline da parte della linea porta-seme o la competizione tra i diversi pollini. In questi casi, l'uso della maschio sterilità consente di (a) ridurre i costi per la produzione di seme ibrido permettendone la produzione su larga scala; (b) velocizzare i programmi di

ibridazione; (c) sfruttare l'effetto dell'eterosi. Le specie come il finocchio, che presentano fiori con antere e stigmi più o meno intimamente associati (*Fig. 3.1*) o tali da rendere impossibile l'emasculazione manuale, devono necessariamente beneficiare dell'impiego della maschio sterilità per realizzare gli ibridi F_1 .



Fig. 3.1 – Fiore di finocchio

3.2 CLASSIFICAZIONE

La maschio sterilità La maschio sterilità genetica (*Genetic Male Sterility* o *GMS*) è dovuta ad alterazione di geni presenti nel genoma nucleare mentre, in quella citoplasmatica (*Cytoplasmic Male Sterility* o *CMS*) le alterazioni sono a carico del DNA mitocondriale e in quella genetico-citoplasmatica sono presenti entrambe le forme (Bohra *et al.*, 2016); in particolare quest'ultima è regolata da geni mitocondriali ma può essere superabile con la presenza di geni nucleari detti "ristoratori". Secondo Yourong e Qifa (2018), esistono inoltre forme di maschio sterilità genetica sensibile a particolari condizioni ambientali (*Environment Sensitive Genic Male Sterility* o *EGMS*) quali ad esempio la temperatura (*Thermosensitive Genic Male Sterility* o *TGMS*) o il fotoperiodo (*Photoperiod Sensitive Genetic Male Sterility* o *PGMS*). Kaul, nel 1988, aveva già proposto una classificazione della maschio sterilità basata sia sul genotipo (genetica, citoplasmatica e genetico-citoplasmatica) che sul fenotipo delle piante maschio sterili (strutturale, quando gli stami o i fiori maschili sono deformi o assenti; sporigena, quando il polline non si forma o è completamente sterile; funzionale,

quando il polline è fertile ma non viene rilasciato dalle antere) (Fig. 3.2). Oltre alla maschio sterilità di origine genetica, controllata da geni nucleari, da soli o in combinazione con geni citoplasmatici, questa classificazione considerava anche quella non genetica causata da stress fisiologici, agenti chimici e fattori ambientali.

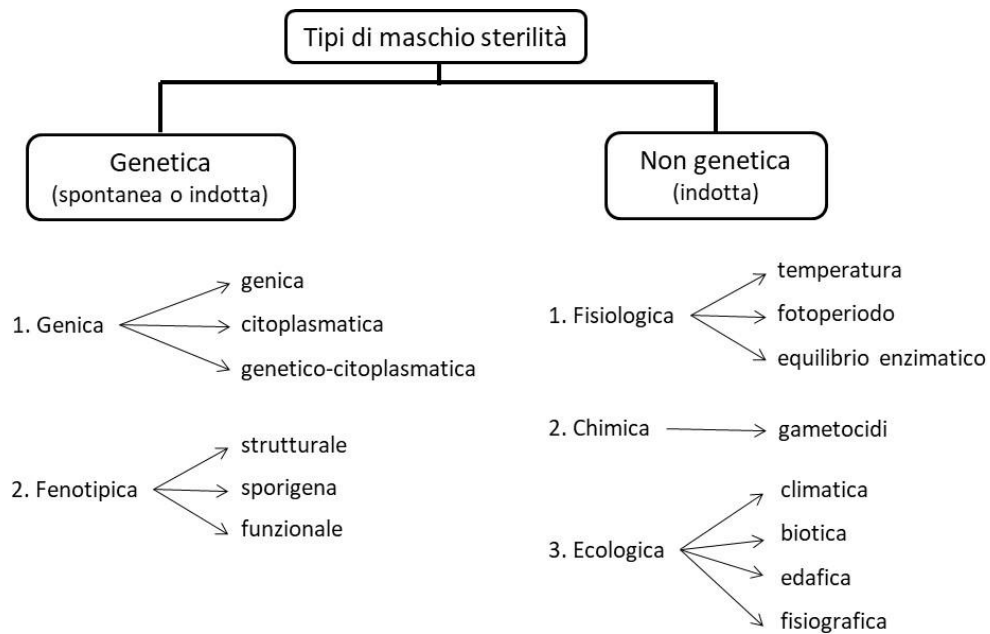


Fig. 3.2 – Classificazione generale della maschio sterilità secondo Kaul (1988)

3.3 TIPI DI MASCHIO STERILITÀ

3.3.1 GENETICA

La maschio sterilità genetica o GMS è generalmente controllata da un singolo gene nucleare allo stato recessivo (*ms*) anche se a volte, come in cartamo (Anhani K, 2005; Kammili, 2013), è determinata da un gene dominante (*MS*). L'eredità e l'espressione della maschio sterilità genetica sono inoltre di tipo mendeliano. Sono stati individuati mutanti maschio sterili monofattoriali in numerose specie di interesse agrario come pomodoro, peperone, melone, fagiolo, girasole, orzo, mais, erba medica (Barcaccia e Falcinelli, 2011).

L'utilizzo di mutanti nucleari presenta tuttavia un inconveniente che limita il pieno sfruttamento di questo tipo di maschio sterilità per la produzione di seme ibrido. Infatti, le piante maschio sterili hanno generalmente un genotipo *msms* e possono essere mantenute unicamente mediante impollinazione incrociata con piante portatrici del gene della maschio sterilità allo stato eterozigote *Msms*. L'incrocio *msms* x *Msms* determina la produzione del 50% di piante omozigoti recessive, quindi sterili ed utilizzabili ai fini dell'incrocio controllato, e del 50% di piante eterozigoti fertili invece da eliminare (Fig. 3.3).

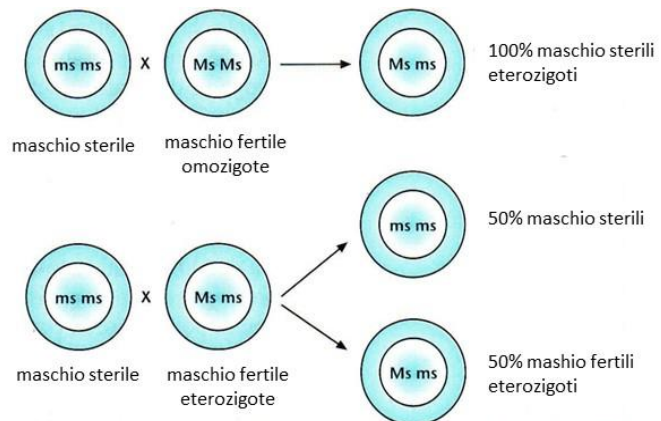


Fig. 3.3 – Maschio sterilità genetica

L'incrocio di piante maschio sterili *msms* con piante maschio fertili *MsMs* consentirà invece di ottenere unicamente piante maschio fertili eterozigoti (Fig. 3.3). Questo ultimo tipo di incrocio risulta quindi non utilizzabile per il mantenimento della maschio sterilità genetica. Sarebbe auspicabile poter distinguere le piante maschio sterili prima della fioritura; ciò è attuabile solo in specie in cui il gene della maschio sterilità è pleiotropico o strettamente associato ad un marcatore molecolare o ad un gene che si esprime prima della fioritura come, ad esempio, quello che determina il colore rosso dell'ipocotile nelle foglie cotiledonari di girasole.

La maschio sterilità genetica si può conservare soltanto se la specie si propaga vegetativamente oppure attraverso la condizione eterozigote.

3.2.2 MASCHIO STERILITÀ CITOPLOSMATICA

La maschio sterilità citoplasmatica (CMS) può essere definita come l'inefficienza, ad eredità materna, a produrre polline fertile. In questo caso, le piante maschio sterili hanno un particolare citoplasma sterile (S) e possono produrre seme solo se impollinate da piante con citoplasma normale (N) (Fig. 3.4). Si tratta di una maschio

sterilità controllata da geni mitocondriali e trasmessa secondo le leggi dell'eredità extracromosomica. Nelle piante, come negli animali, esistono caratteri che sono determinati da fattori citoplasmatici connessi al DNA localizzato nei mitocondri e nei cloroplasti.

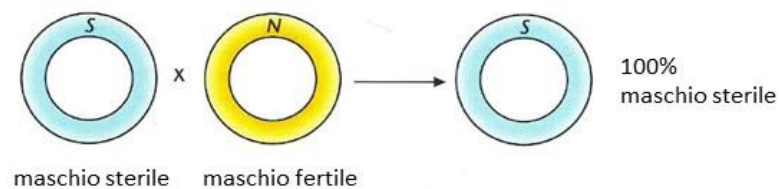


Fig. 3.4 –Maschio sterilità citoplasmatica

Nelle piante il genoma mitocondriale viene spesso rappresentato con una struttura circolare. Tale descrizione tuttavia, secondo Kozik *et al.* (2019), non sarebbe accurata essendo il DNA mitocondriale delle piante costituito da una miscela di forme complesse e dinamiche.

Il numero di copie dei genomi contenuti nei mitocondri è molto variabile in relazione alla specie, mentre le dimensioni dei genomi mitocondriali variano tra 160 Kb e 2540 Kb, indipendentemente dalla complessità dell'organismo. Le specie vegetali solitamente sono caratterizzate da genomi mitocondriali molto più grandi rispetto alle specie animali e agli eucarioti inferiori quali lieviti, alghe verdi e funghi. Questo perché, nei genomi mitocondriali delle specie vegetali, i geni presentano introni e sono più spazati tra di loro a causa della presenza di sequenze ripetute, a differenza dei genomi cloroplastici che hanno invece dimensioni piuttosto costanti ed una organizzazione molto simile in tutte le specie vegetali.

La maschio sterilità citoplasmatica fu scoperta per la prima volta in una *landrace* peruviana di mais da Rollins A. Emerson nel 1931. In seguito, Rhoades (1931), mediante una serie di incroci, accertò che il carattere non era associato a nessuno dei 10 cromosomi del corredo base di questa specie e concluse che la sterilità del polline in mais era ad eredità materna. In seguito venne dimostrato che la maschio sterilità citoplasmatica delle piante è controllata da geni mitocondriali anche se esistono delle eccezioni, soprattutto nelle gimnosperme, dove è stata riscontrata un'eredità

paterna. I primi loci mitocondriali correlati con il carattere CMS sono stati identificati in mais (*Zea mays*) portatore del citoplasma CMS-T (Dewy *et al.*, 1987).

La CMS, sfruttata in diverse colture di interesse agrario come girasole, mais, cipolla, barbabietola, sorgo, carota, finocchio, petunia, colza, fagiolo comune, riso, cotone e grano (Schenable e Wise, 1998; Kubo *et al.*, 2011), è largamente utilizzata dal momento che questo carattere ereditato per via materna può essere applicato e preservato in modo efficiente (Wang *et al.*, 2019; Budar *et al.*, 2001).

La CMS è stata frequentemente osservata come risultato d'ibridazioni interspecifiche (Horn, 2002; Kofer *et al.*, 1991) ma può anche verificarsi in seguito a mutazioni spontanee all'interno di una stessa specie. Nella maggior parte dei casi è dovuta a riorganizzazioni di porzioni non codificanti del genoma mitocondriale e all'inserimento nello stesso di nuove "*open reading frame*" o ORF (sequenze putativamente codificanti per qualche prodotto genico) che determinano un diverso *pattern* di espressione genica, provocando di conseguenza l'inefficienza a produrre o a rilasciare polline funzionale (Schenable e Wise, 1988; Hanson e Bentolila, 2004; Horn, 2006; Chase 2007; Chen e Liu 2014).

Per cercare di capire come possano essersi evoluti i geni della CSM, bisogna considerare che il genoma mitocondriale delle piante è altamente variabile, essendo molto attivo dal punto di vista della ricombinazione. Questi processi di ricombinazione possono determinare nuove ORF, tra cui anche geni coinvolti nella CMS (Russell, 2020). Inoltre, i genomi mitocondriali delle piante sono soggetti a numerose invasioni di sequenze di DNA provenienti dal nucleo, dai plastidi o di origine sconosciuta (SUO, *Sequences of Unknown Origin*); molti geni CMS contengono infatti sequenze di altra origine al loro interno (es. la CMS-Sprite in fagiolo comune contiene una porzione del DNA plastidiale). La formazione e la stabilizzazione di geni CMS richiedono più passaggi. In primo luogo dei frammenti di DNA di diversa origine devono integrarsi nel genoma mitocondriale attraverso eventi di ricombinazione e devono creare una nuova ORF; questa deve essere sotto il controllo di un promotore mitocondriale per poter essere espressa. Inizialmente è probabile che il numero di sequenze di geni CMS sia molto basso e che di conseguenza abbia solo un basso livello

di trascrizione che previene l'espressione del fenotipo CMS; questo consente di evitare la rapida eliminazione iniziale dei geni mediante selezione negativa. Quando poi, nel corso dell'evoluzione, il numero di molecole di DNA mitocondriale con geni CMS aumenta, anche il livello di espressione di questi geni cresce e il fenotipo CMS può manifestarsi.

Nel corso degli anni, in diverse specie di interesse agrario, sono stati identificati numerosi geni coinvolti in alterazioni e/o riarrangiamenti del genoma mitocondriale, responsabili dell'insorgenza della CMS. La loro identificazione è stata notevolmente facilitata dall'avvento del *Next Generation Sequencing* (NGS). Secondo il National Center for Biotechnology Information (2020), geni correlati alla CMS sono stati identificati e depositati per diverse specie vegetali tra cui *Triticum aestivum* (Liu *et al.*, 2006), *Oryza sativa* (Huang *et al.*, 2014), *Zea mays* (Gabay-Laughnan *et al.*, 1994), *Brassica juncea* (Heng *et al.*, 2018), *Allium cepa* (Kim *et al.*, 2019), *Capsicum annuum* (Wang *et al.*, 2019), *Raphanus sativus* (Park *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020), *Helianthus annuus* (Köhler *et al.*, 1991) *Daucus carota* (Nakajima *et al.*, 2001). La maggior parte di questi codifica per proteine transmembrana, spesso implicate nella catena di trasporto degli elettroni del mitocondrio. Alterazioni a carico di geni quali *COX1*, *ATP6*, *ATP8* e *ATP9* sono state riportate da Jia *et al.* (2007); Horn *et al.* (2014) e Palumbo *et al.* (2020). Accanto a geni a cui è stato possibile assegnare una funzione, molte sequenze associate alla CMS e isolate in varie specie (es. riso, sorgo e mais) non hanno al momento una funzione nota.

Un aspetto interessante da investigare nello studio della maschio sterilità è capire perché i geni CMS influenzano unicamente la fertilità maschile. Questa specificità maschile può risultare da uno dei tre possibili modelli di espressione dei geni CMS: 1) espressione dei geni e accumulo delle proteine corrispondenti specificamente nelle antere; 2) espressione costitutiva dei geni e accumulo delle proteine in tutti i tessuti vegetali; 3) espressione costitutiva dei geni in tutti i tessuti e accumulo delle proteine specifico o preferenziale nelle antere. Al momento non ci sono sistemi CMS noti che mostrino espressione antere-specifica dei geni. Ad oggi, la maggior parte dei sistemi

CMS noti ricade nel terzo tipo, con espressione costitutiva e accumulo preferenziale negli organi riproduttivi. (Russell, 2020).

Riguardo al meccanismo che è alla base della CMS, gli studi effettuati supportano 4 modelli (Russell, 2020): 1) citotossicità; 2) carenza di energia; 3) anomala morte cellulare programmata (PCD, *Programmed Cell Death*); 4) regolazione retrograda. Nel modello “citotossico”, le proteine CMS determinano la morte diretta delle cellule; si ipotizza che l’attività di queste proteine induca un malfunzionamento dei mitocondri nelle cellule sporofitiche o gametofitiche delle antere portando alla sterilità maschile. Ad esempio, nel sistema CMS-T del mais, si ritiene infatti che i mitocondri mutati accumulino una molecola tossica, probabilmente un’aldeide, e il gene *Rf* (gene ristoratore della fertilità) codificante un’aldeide deidrogenasi possa prevenire la morte delle cellule impedendo l’accumulo di qualche aldeide tossica (Russel, 2020). Nel modello “carenza di energia” si ritiene che alcuni casi di CMS possano essere riconducibili ad una insufficiente produzione di energia nelle antere in formazione ascrivibile ad alterazioni nell’integrità della membrana mitocondriale o alla formazione di complessi enzimatici (ATP sintasi) meno efficienti. I mitocondri sono organelli cellulari essenziali per la produzione di energia e, considerando che lo sviluppo del polline è fortemente dipendente da un alto apporto energetico, disturbi nella funzione mitocondriale potrebbero avere effetti inibenti sulla fertilità pollinica (Chen e Liu, 2014; Luo *et al.*, 2013). Nel modello “morte cellulare programmata”, le mutazioni CMS inducono un’aberrazione del ciclo cellulare per cui le cellule del tappeto delle antere entrano in meiosi in anticipo rispetto a quello che accade in condizioni normali. Questi eventi anomali inducono una rapida degenerazione delle cellule del tappeto delle antere e il conseguente aborto del polline, soprattutto in seguito all’accumulo di ROS. A basse concentrazioni le ROS agiscono come segnali di stress ma, se prodotte ad alta concentrazione, inducono la morte cellulare programmata o PCD (Làzaro *et al.*, 2013) mediante il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri al citoplasma (Balk e Leaver, 2001). Disfunzioni mitocondriali possono portare inoltre ad una eccessiva riduzione dell’ubiquinone e a sua volta determinare un aumento nella produzione delle ROS che successivamente interferiscono con lo

sviluppo del polline, come mostrato in riso (Peng *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2013) e in peperone (Deng *et al.*, 2012). Comunque, le ROS fanno parte di una complessa rete di percorsi di segnalazione all'interno della cellula e tra cellule che deve essere ulteriormente chiarito (Mittler *et al.*, 2011). Nel modello "regolazione retrograda", ci sono evidenze di una segnalazione retrograda del mitocondrio che regola l'espressione dei geni nucleari; questi inducono la conversione degli stami in formazione in carpelli (*carpeloid* CMS) o in certi casi in petali (*petaloid* CMS).

3.2.3 MASCHIO STERILITÀ GENETICO-CITOPLASMATICA

La maschio sterilità genetico-citoplasmatica è determinata dall'interazione di fattori citoplasmatici e nucleari. E' stata descritta ed interpretata per la prima volta in lino (*Linum usitatissimum*) da Bateson e Garndener (1921); la sua prima applicazione risale a 23 anni dopo in cipolla (*Allium cepa*) da parte di Jones e Clark (1943). In questa forma di maschio sterilità, le piante delle discendenze con citoplasma sterile (*S*) e nucleo con il gene della maschio sterilità allo stato omozigote recessivo (*rr*) non sono necessariamente sterili poiché la presenza nell'impollinante di geni ristoratori (*R*) con sede nucleare può ripristinare del tutto o in parte la fertilità maschile. Infatti, gli impollinanti dotati di geni *R* ristoratori della maschio sterilità in forma omozigote dominante o in forma eterozigote permettono la produzione di polline funzionale (Fig. 3.5), sovrapponendosi all'azione sterilizzante del citoplasma. Le piante della progenie avranno quindi un comportamento riproduttivo diverso a seconda della situazione nucleare dell'impollinante, indipendentemente dalla sua natura citoplasmatica (*S* o *N*). Quindi saranno (a) 100% maschio sterili, qualora l'impollinante sia dotato del gene ristoratore allo stato recessivo omozigote *rr*; (b) 100% maschifertili, qualora l'impollinante sia dotato del gene ristoratore allo stato dominante omozigote *RR*; (c) 50% maschio sterili e 50% maschio fertili, qualora invece l'impollinante sia dotato del gene ristoratore in forma eterozigote *Rr*.

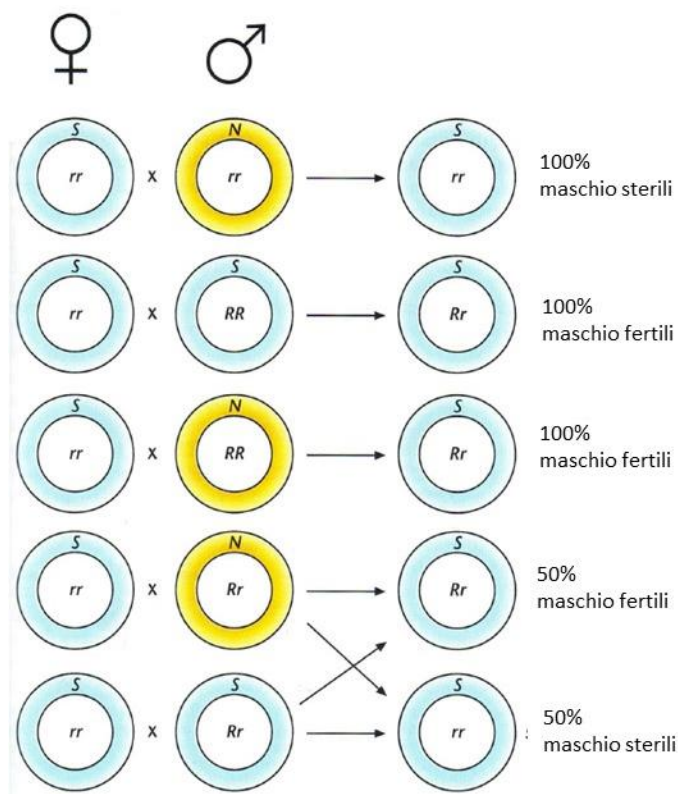


Fig. 3.5 – Maschio sterilità genetico-citoplasmatica

Il ripristino della fertilità è fondamentale in quelle specie dove il prodotto commerciale è rappresentato dal seme o dal frutto. In questi casi, il mantenimento delle linee maschio sterili da utilizzare nella produzione del seme ibrido richiede, oltre alla linea CMS, una linea detta di mantenimento (*maintainer line*) caratterizzata dallo stesso genoma nucleare della CMS e dal citoplasma fertile. Per la produzione di ibridi, invece, la linea CMS viene incrociata con una linea ristoratrice della fertilità (*restorer line*) che possiede uno o più geni ristoratori *Rf* funzionali in grado, nelle piante F_1 , di ripristinare la fertilità maschile. Nella maggior parte dei casi i meccanismi molecolari di ripristino della fertilità sono però unici per ogni CMS e possono avvenire a differenti livelli: genomico, trascrizionale o post-trascrizionale, trasduzionale o post-trasduzionale e metabolico. Nel corso degli ultimi anni sono stati isolati e caratterizzati diversi geni ristoratori *Rf* in specie vegetali, quali *Rf1* e *Rf3* in frumento per la maschio sterilità citoplasmatica del tipo *Triticum timopheevii* o T-CMS (Melonek *et al.*, 2021); *rf1* e *rf2* in mais (Skibbe *et al.*, 2002); *Rf-PPR592* in petunia

(Alfonso *et al.*, 2003); *Rfo* (*Rfk1*) in ravanello (Yamagishi *et al.*, 2021); *Rf1a* (*Rf5*), *Rf1b* e *Rf17* in riso (Ponnuswamy *et al.*, 2020); due o tre *Rf* e un numero di geni modificatori in sorgo (Anisimova *et al.*, 2017); *Rf1* (*bvORF20*) in barbabietola da zucchero (Arakawa *et al.*, 2020). Alcuni di questi geni (*Rf-PPR592*, *Rfo*, *Rf1a* e *Rf1*) codificano per proteine PPR (*pentatricopeptide repeat*) (Aubourg *et al.*, 2000; Small *et al.*, 2000; Dahan e Mireau, 2013), un gruppo di proteine che interagiscono con gli RNA messaggeri; la maggior parte di queste agisce negli organelli come il mitocondrio, assistendo la maturazione post-trascrizionale degli mRNA quali l'*editing*, lo *splicing*, la degradazione e la traduzione. Questo meccanismo è ancora in parte sconosciuto, dal momento che le proteine PPR non hanno siti di legame con gli acidi nucleici e, di conseguenza, è probabile che possano agire assieme ad altri cofattori nella maturazione degli RNA. Altri geni ristoratori invece codificano per proteine differenti. A livello metabolico, il caso tipico è quello del sistema CMS-T di mais con il gene ristoratore *Rf2* (Cui *et al.*, 1996) che codifica per una aldeide deidrogenasi senza alcun effetto diretto sull'espressione del gene mitocondriale *T-urf13* associato al sistema CMS-T; la sua azione si esplica indirettamente attraverso l'eliminazione di un certo numero di aldeidi che si accumulano per effetto della sequenza codificante *urf13* che induce CMS-T (Liu *et al.*, 2001).

3.2.4 GENETICA SENSIBILE ALLE CONDIZIONI AMBIENTALI (EGMS o *Environment Sensitive Genic Male Sterility*)

Le condizioni ambientali quali la temperatura e il fotoperiodo possono indurre nelle specie squilibri fisiologici tali da determinare la comparsa di mutanti maschio sterili (El-Namaky e van Oort, 2017). In questi mutanti sensibili alle condizioni ambientali il carattere maschio sterilità è reversibile (Ahmed *et al.*, 2001). Per esempio, nel mutante di riso Nogken 58S (*NK58S*) (*Oryza sativa* ssp. *japonica*), scoperto nel 1973, la fertilità del polline è dipendente dal fotoperiodo. Il genotipo è completamente sterile in condizioni di giorno lungo e fertile in condizioni di giorno corto; si ha quindi una maschio sterilità definita *Photoperiod Sensitive Genetic Male Sterility* (PGMS). Un altro mutante di riso Annong S-1 (*Oryza sativa* ssp. *indica*) è invece sterile ad alte temperature ma fertile se cresciuto a basse temperature (Wang *et al.*, 2011), avendo

in questo caso una *Thermo Sensitive Genic Male Sterility* (TGMS). Sempre in riso sono stati studiati quattro differenti mutanti, arrivando all'identificazione di quattro geni coinvolti nella risposta della fertilità maschile alle condizioni ambientali (Zhou *et al.*, 2012). Dei quattro geni coinvolti nell'insorgenza del fenomeno, due determinano la produzione di *long non coding RNA*, un gene codifica per un fattore di trascrizione MYB, e l'ultimo per una UDP-glucosio pirofosforilasi. I *long non coding RNA* rappresentano un gruppo di trascritti ampiamente diffuso nelle specie vegetali che non sono tradotti in proteine ma che servono tra l'altro come fattori di regolazione epigenetica a livello di DNA o RNA; questi sono coinvolti nella mediazione di molti processi biologici. L'identificazione di mutanti sterili dovuti a RNA non codificanti suggerisce che queste molecole possono avere un ruolo importante nel regolare lo sviluppo della fertilità maschile in risposta a stimoli ambientali. In sintesi, le alterazioni ambientali come il fotoperiodo e/o la temperatura e l'umidità regolano la sterilità maschile nelle linee EGMS tramite cambiamenti genetici ed epigenetici, la regolazione degli RNA non codificanti e il metabolismo dell'RNA inclusi i fattori trascrizionali (Furqan Ashraf *et al.*, 2020).

3.2.5 NON GENETICA

La maschio-sterilità non genetica è indotta dall'uso di sostanze ad effetto maschio-sterilizzante. Diverse sostanze chimiche come per esempio l'idrazide maleica sono state saggiate su numerose specie vegetali per verificare l'attività gametocida. I risultati dell'applicazione di questi prodotti sono alquanto deludenti, non tanto per l'efficacia maschio-sterilizzante, che comunque risulta essere poco soddisfacente, ma per i numerosi effetti collaterali negativi introdotti sulle piante trattate quali la riduzione della fertilità femminile, i sintomi di citotossicità e le anomalie della crescita. L'induzione della maschio sterilità non genetica dovrebbe richiedere inoltre un ridotto numero di trattamenti ed essere efficiente indipendentemente dalle condizioni ambientali.

La scalarità della fioritura in molte specie vegetali, come il finocchio, e quindi la contemporanea presenza sulla pianta di fiori in diversi stadi di sviluppo, rende difficile stabilire il momento ottimale in cui eseguire il trattamento chimico. I gametocidi, che

attualmente non hanno ancora raggiunto un reale interesse pratico, sono utilizzati pertanto solo per scopi sperimentali.

CAPITOLO 4

MIGLIORAMENTO GERMINATIVO DEL SEME

4.1 PRIMING

Per molte colture erbacee ed orticole la tecnica di coltivazione inizia con la semina in pieno campo o in vivaio. Questo implica l'importanza di poter disporre di semente di qualità sia in termini di potenzialità genetica che di energia germinativa, fattori che influiscono significativamente sulle prestazioni germinative, sull'insediamento e sullo sviluppo delle plantule, soprattutto in condizioni sub-ottimali di crescita. Uno dei maggiori inconvenienti in cui può incorrere l'agricoltore nel corso della sua attività è affidare al terreno semente non vitale o comunque non in grado di fornire piante con le caratteristiche attese.

Oltre a lavorare sul miglioramento genetico, è pertanto necessario sviluppare trattamenti innovativi sulla capacità germinativa del seme tra cui il *priming*. In pratica, tale metodo prevede l'idratazione controllata dei semi, fino ad innescare le prime fasi del processo germinativo (metabolismo pre-germinativo), senza arrivare alla protrusione della radichetta (Fig. 4.1) (Marthandan *et al.*, 2020). Prima che perdano la tolleranza all'essiccazione, i semi vengono di nuovo disidratati e possono essere conservati fino alla semina.



Fig.4.1 –Fasi del processo del *priming*

Il metodo *priming* (Fig. 4.2) include diverse tipologie basate sulla scelta delle sostanze impiegate come agenti di *priming* di cui le più importanti sono l'acqua (*hydropriming*) (Pill, 1995) o le soluzioni osmotiche con sali inorganici (*osmopriming*), gli ormoni

(*hormopriming*), i materiali solidi come la vermiculite e la leonardite (*matric-priming*), i microrganismi o le sostanze naturali (*biopriming*) (Farooq *et al.*, 2007; Chen, 2011). Ad oggi, le specie orticole in cui viene applicato il *priming* sono la carota, il porro, la cipolla, il sedano, la lattuga, l'indivia, il peperone e il pomodoro (Paparella *et al.*, 2015).

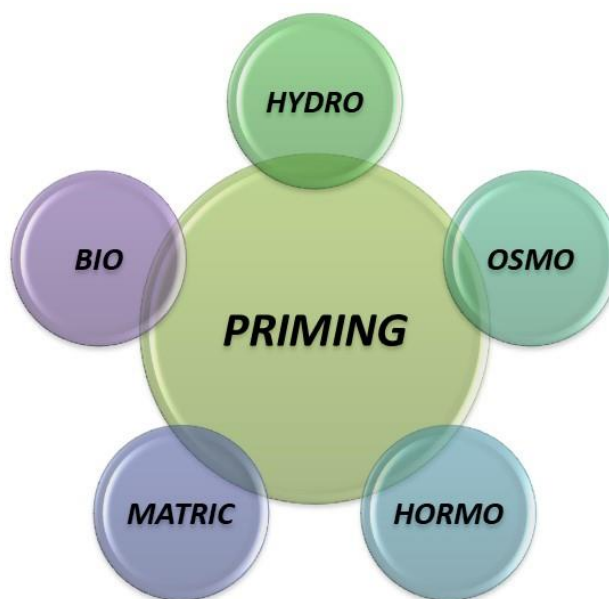


Fig. 4.2 – Alcuni tipi di *priming*

Nel caso delle soluzioni osmotiche, l'assorbimento dell'acqua è regolato dal diverso potenziale delle soluzioni stesse mentre con l'*hydropriming* la velocità di assorbimento dell'acqua dipende esclusivamente dalla sua affinità con le caratteristiche del seme (Taylor *et al.*, 1998). L'*hydropriming* ha anche un minor impatto ambientale ed è più economico; è risultato efficace in cece, mais, grano, senape, colza, girasole, riso, fagiolo, peperone e grano duro (Lutts *et al.*, 2016).

L'*osmopriming* implica invece un minor potenziale dell'acqua per la presenza di agenti osmotici (Jisha *et al.*, 2013) per cui l'acqua è meno disponibile; si utilizzano agenti di natura inorganica (MgSO_4 , KNO_3 , KH_2PO_4 , NO_3) e organica (es. mannitolo, glicole polietilenico). Il KNO_3 è il sale più comunemente utilizzato; in grano tenero e in colza ha aumentato il tasso di germinazione rispetto agli altri trattamenti di *priming*.

(Ajirloo *et al.*, 2013; Saber *et al.*, 2012). Il glicole polietilenico è inerte e non causa problemi di fitotossicità sull’embrione (Cantliffe, 1983), sebbene abbia un limitato impiego a livello industriale a causa dei problemi di smaltimento che fanno aumentare i costi e dei quantitativi necessari [circa 300 grammi di glicole polietilenico per litro d’acqua per ottenere una pressione osmotica di -15 bar a 15°C (Giulianini *et al.*, 1992)]. Il glicole polietilenico (PEG) come agente di *priming* è risultato far aumentare la percentuale di germinazione in *Bromus secalinus* (Tavili *et al.*, 2011), in *Trifolium alexandrinum* (Rouhi *et al.*, 2010), in spinacio (Chen e Arora, 2011). Anche l’applicazione dei regolatori di crescita (es. acido salicilico, acido abscissico, gibberelline, auxine, citochinine, poliammine) attraverso l’*ormopriming* possono determinare il miglioramento della germinazione e la crescita delle plantule. In grano, le gibberelline hanno favorito la crescita e la produzione in condizioni di stress salino (Iqbal *et al.*, 2010) mentre, in riso, le poliammine hanno incrementato significativamente la tolleranza alla siccità (Farooq *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda il *matric-priming*, sono disponibili molti tipi di materiali solidi per il trattamento al seme, tutti caratterizzati da basso potenziale di matrice, minima solubilità in acqua, elevata capacità di ritenzione idrica, nessuna tossicità nei confronti dei semi e capacità di aderire alla superficie del seme; tra questi ci sono la leonardite, la vermiculite, il silicato di calcio sintetico, l’argilla calcinata espansa. Questi materiali sono miscelati all’acqua in proporzioni definite in modo da mettere a disposizione del seme il quantitativo di acqua necessario al *priming* (Ermiş *et al.*, 2016). I semi si idratano lentamente, simulando il processo di imbibizione naturale che si verifica nel terreno (McDonald *et al.*, 2000). In cipolla e in mais, il *matric-priming* ha migliorato la percentuale di germinazione, l’emergenza e la crescita delle piantine in condizioni ottimali e di bassa temperatura (Kępczyńska *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007).

Quando i semi sono trattati con sostanze naturali e/o microrganismi benefici si parla di *biopriming*. Nel miglio perlato, il *biopriming* con *Pseudomonas fluorescens* ha incrementato la crescita delle piantine e la resistenza nei confronti della *Peronospora* (Raj *et al.*, 2004) mentre, in ravanella, il *biopriming* con batteri promotori della

crescita (*Agrobacterium rubi*, *Burkholderia gladii*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*) ha migliorato la germinazione in condizioni di stress salino (Kaymak *et al.*, 2009).

4.2 GERMINAZIONE DEL SEME

4.2.1 NON PRIMING

La germinazione è un processo vitale che prevede diverse fasi, la cui durata varia con la specie e le condizioni ambientali. Le fasi principali sono: imbibizione del seme, attivazione degli enzimi ed idrolisi delle riserve del seme, inizio della crescita dell'embrione, rottura del tegumento seminale, fuoriuscita dell'apice caulinare e di quello radicale (germinazione in *sensu stricto*). Seguono l'emergenza dal terreno e l'affrancamento della plantula dalle sostanze di riserva del seme (inizio dell'attività fotosintetica).

L'intero processo di germinazione si basa sul potenziale idrico delle cellule del seme e dell'embrione (Hartmann e Kester, 2010). Le variazioni del potenziale idrico sono la forza trainante della germinazione. La maggior parte dei semi sono caratterizzati da condizioni di umidità interna molto bassa (meno del 10%). Ciò si traduce in un potenziale idrico molto basso, circa -100/-350 MPa (Shaykewich, 1973). In generale, la germinazione dei semi segue il modello trifasico riportato in *Fig. 4.3*, dove la prima fase è caratterizzata da una rapida imbibizione prevalentemente passiva, dovuta in gran parte a forze matriciali esercitate dal seme in seguito all'idratazione delle componenti secche e di macromolecole come amido e proteine. L'acqua assorbita in questa prima fase (acqua di imbibizione) non è rilevante come quantità ma ha un notevole significato biologico. Durante questa fase avvengono infatti la riparazione del DNA e dei mitocondri preesistenti e la sintesi di proteine utilizzando l'mRNA già esistente. Segue una fase stazionaria (seconda fase) in cui il potenziale idrico del seme è in equilibrio con l'ambiente circostante e si ha la sintesi di nuovi mitocondri e di proteine da parte di un mRNA neo-trascritto, oltre al metabolismo delle molecole di

riserva. Nella terza fase si ha un rapido assorbimento di acqua con la distensione cellulare e quindi la fuoriuscita della radichetta dal tegumento.

4.2.2 PRIMING

Con il *priming*, la seconda fase della germinazione viene prolungata (Fig. 4.3) rispetto ad un normale processo germinativo (Varier *et al.*, 2010).

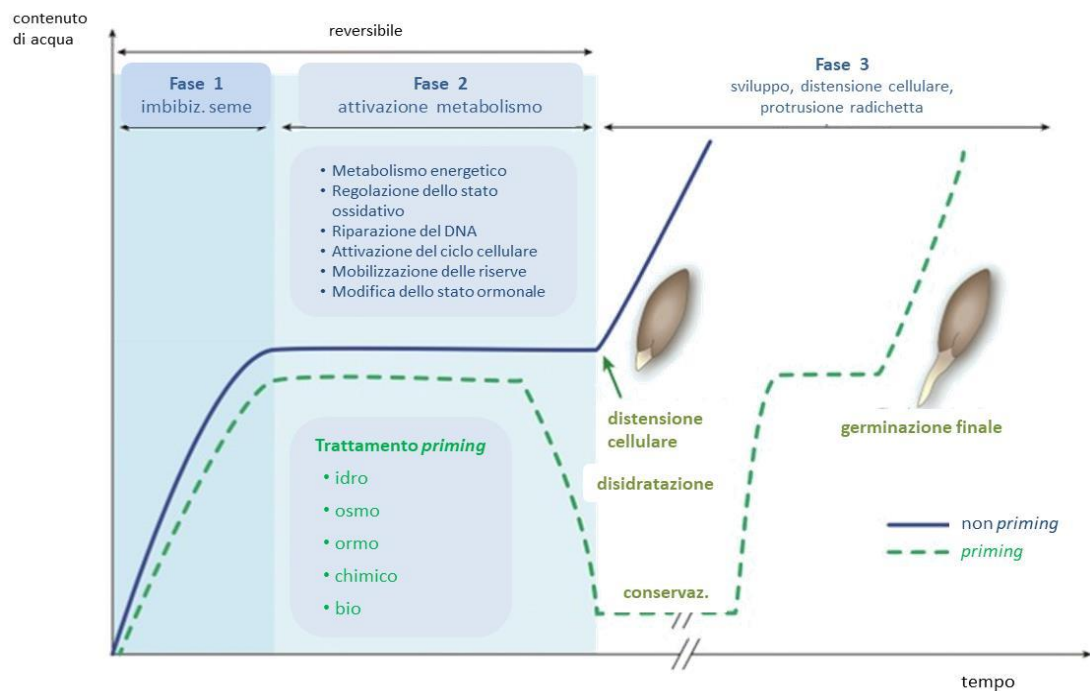


Fig. 4.3 – Curve di idratazione del seme e fasi della germinazione in semi sottoposti a trattamento *priming* e non (Lutts, 2016)

La quantità di acqua assorbita è sufficiente ad attivare i processi metabolici ma non a permettere l'emergenza della radichetta. Si ha l'attivazione del metabolismo pre-germinativo che comporta la rottura della dormienza, l'idrolisi delle sostanze di riserva e la mobilitazione degli inibitori della germinazione, l'imbibizione del seme e l'attivazione degli enzimi (Khalil *et al.*, 2010). In questa fase si verificano importanti cambiamenti a livello fisiologico quali la replicazione anticipata del DNA, l'aumento dell'RNA e della sintesi proteica, la maggiore disponibilità di ATP, l'attivazione delle vie di riparazione del DNA e del sistema enzimatico per preservare l'integrità del

genoma (Paparella *et al.*, 2015) oltre all'avvio dei processi di riparazione e riattivazione dei mitocondri già preesistenti e della biogenesi di quelli nuovi (Sun *et al.*, 2011).

Il *priming* può quindi offrire in tempi brevi un elevato livello di energia per sostenere la germinazione (Nascimento *et al.*, 2013). E' stato dimostrato inoltre che il *priming* aumenta anche il rapporto gibberelline/acido abscissico (El-Araby *et al.*, 2006) favorendo il miglioramento del processo germinativo.

E' necessario comunque considerare che, oltre la seconda fase del processo germinativo, il seme perde la tolleranza all'essiccazione per cui è indispensabile interrompere il trattamento di imbibizione in prossimità di questa fase, quando tutti i semi sottoposti a trattamento *priming* raggiungono lo stesso stadio fenologico di incipiente protrusione della radichetta.

4.3 VANTAGGI E LIMITAZIONI DEL *PRIMING*

Il principale vantaggio del trattamento di *priming* consiste nel migliorare le prestazioni germinative con una più veloce fuoriuscita della radichetta rispetto al seme non trattato. In questo modo si ha la riduzione del tempo medio di germinazione (TMG) e spesso una emergenza più uniforme (Khan, 1992). Il risultato positivo consiste anche in una maggiore competitività delle plantule nei confronti delle specie infestanti, come dimostrato da Jalali e Salehi (2013) in barbabietola da zucchero. Il *priming* riduce anche il deterioramento dei semi durante la conservazione attraverso una maggiore attivazione di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi, glutathione reduttasi) in grado di contrastare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si producono durante la conservazione (Bailly *et al.*, 2004), come dimostrato in *Arabidopsis thaliana* (Gallardo *et al.*, 2001), girasole (Kibinza *et al.*, 2011) e soia (Posmyk *et al.*, 2001). I semi sottoposti a *priming* hanno inoltre evidenziato una maggiore tolleranza agli stress abiotici quali salinità, alte temperature, stress idrico (Krishan *et al.*, 2018) e biotici come *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in pomodoro (Krol *et al.*, 2015), peronospora in miglio perlato (Anup

et al., 2015) ed un miglioramento della produzione in mais (Muhammad *et al.*, 2015; Priya *et al.*, 2013), cipolla (Patil *et al.*, 2013), gombo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) (Sharma *et al.*, 2014), barbabietola da zucchero (Jalali *et al.*, 2013).

I vantaggi del *priming* ricadono soprattutto a livello vivaistico in quanto la possibilità di ridurre il tempo di emergenza delle giovani plantule si traduce in una riduzione dei costi di gestione e consente di migliorare la risposta delle colture.

Un altro vantaggio del trattamento *priming* scaturisce inoltre dalla possibilità di poter essiccare i semi precedentemente imbibiti fino al contenuto iniziale di acqua, senza che essi perdano i benefici acquisiti durante il trattamento. Grazie a questo aspetto, il trattamento *priming* si presta per poter essere applicato a livello industriale da parte di aziende sementiere che hanno quindi la possibilità di conservare semente precedentemente trattata e di commercializzarla in maniera differita nel tempo. A riguardo è però necessario considerare che, in alcune specie, la risposta all'essiccazione dei semi sottoposti a *priming* non è positiva. Gli aspetti tecnologici del *priming* sono chiari ma non altrettanto lo sono le conoscenze dei processi fisiologici che avvengono all'interno del seme e di come questi contribuiscano a migliorare le capacità germinative. Le difficoltà sono accresciute dal fatto che sicuramente non esiste una spiegazione unica per i semi delle diverse specie. E' stato infatti accertato che i cambiamenti all'interno dei semi, durante il *priming*, possono variare da specie a specie. Sarebbe importante approfondire la conoscenza della curva di imbibizione relativa ad ogni specie da sottoporre a trattamento *priming* per individuare il momento giusto in cui interrompere il trattamento e ottimizzare quindi lo sviluppo di tecniche pre-germinative volte a migliorare la qualità tecnologica del seme (Lopes *et al.*, 2000).

Il principale svantaggio del metodo *priming* riguarda infatti proprio la risposta variabile tra specie, cultivar e lotti di seme. Tale variabilità rappresenta la principale limitazione di impiego a livello industriale poiché, sono necessarie numerose prove per identificare la strategia più appropriata per ogni situazione. Non c'è una regola generale sulle modalità di applicazione e non c'è nemmeno una chiara indicazione

sulla risposta del trattamento *priming* in base alla posizione tassonomica della specie (Lutts *et al.*, 2016).

L'altro svantaggio che contribuisce a limitarne l'applicazione a livello industriale riguarda il fatto che alcune volte il *priming* riduce la longevità dei semi trattati comportando costi elevati (Chiu *et al.*, 2002; Schwember *et al.*, 2005) (v. paragrafo successivo).

4.4 FATTORI CHE INFLUENZANO IL PRIMING

Affinché il *priming* sia efficace, è necessario comprendere per ogni tipo di seme i tempi ottimali di imbibizione, gli agenti efficaci da utilizzare in soluzione con l'acqua, la disidratazione, i tempi successivi di conservazione (Lopes *et al.*, 2000). Anche l'aereazione, la luce e la temperatura influiscono sul trattamento.

La durata del trattamento di *priming* dipende, oltre che dalla specie, anche dal tipo di soluzione utilizzata, dal potenziale osmotico e dalla temperatura. Si ritiene ottimale un periodo variabile tra 8 ore (in girasole con soluzione salina, Wahid *et al.*, 2008) e 14 giorni (in quattro specie ornamentali Finch-Savage *et al.*, 1991). Per quanto riguarda l'essiccazione, è preferibile una temperatura prossima a valori ambientali (25°C) in modo che l'essiccazione avvenga lentamente e garantisca al meglio l'efficacia del trattamento (Gurusinghe e Bradford, 2001).

L'aereazione consente la respirazione del seme (Bujalski e Nienow, 1991) di cui garantisce il mantenimento della vitalità e la sincronizzazione dell'emergenza attraverso la creazione di un *habitat* più idoneo al seme. In cipolla l'aereazione del seme ha fatto incrementare la percentuale di germinazione rispetto al controllo non areato (Bujalski *et al.*, 1989) mentre in lattuga non sono state osservate differenze tra le due condizioni (Cantliffe, 1981).

Anche l'effetto della luce può variare in funzione della specie considerata. Khan *et al.* (1978) hanno rilevato che l'applicazione dell'illuminazione durante il trattamento *priming* può ridurre la dormienza in sedano. In lattuga, Cantliffe *et al.* (1981) hanno invece confermato l'efficacia del trattamento *priming* al buio.

La temperatura è un'altra importante variabile poiché influenza la velocità delle reazioni chimiche. La temperatura di trattamento varia tra 15 (in molti casi) e 30°C (in riso in *hydropriming*; Basra *et al.*, 2005). Temperature più basse hanno rallentato i processi di germinazione, richiedendo tempi più lunghi per ottenere gli stessi risultati (McDonald, 2000).

La risposta al trattamento è strettamente variabile con la specie, la cultivar e il lotto di seme considerato (Lutts *et al.*, 2016). Un seme vigoroso, privo di patogeni è un requisito essenziale per ottenere un buon risultato del trattamento *priming* (Cantliffe *et al.*, 1987), in contrasto con la convinzione che questa tecnica possa migliorare le prestazioni di semi di bassa qualità. Altre caratteristiche dei semi possono essere influenzate dal trattamento *priming*. Per esempio, l'*osmopriming* con PGE non è adatto a trattare i semi di sorgo i quali contengono un elevato contenuto in tannini; questi possono essere rimossi dalla soluzione durante il trattamento riducendo di conseguenza le *performance* germinative (Patanè *et al.*, 2008). Infatti, i tannini riducono la suscettibilità dei semi nei riguardi degli insetti dannosi, degli uccelli, dei funghi patogeni e li proteggono da agenti atmosferici avversi (Beta *et al.*, 1999).

Inoltre, in alcuni casi, è stata riscontrata una riduzione della longevità dei semi trattati con *priming* (Chiu *et al.*, 2002; Schwember *et al.*, 2005). Questo dipende dal fatto che, dopo il trattamento di imbibizione, i semi vengono essiccati fino al loro contenuto di umidità iniziale più rapidamente di quanto avviene durante il processo di maturazione naturale; per questo può verificarsi una modificazione del contenuto in carboidrati solubili e una riduzione della tolleranza all'essiccazione (Gurusinghe e Bradford, 2001). L'adozione di tempi di essiccazione molto lunghi può invece migliorare la longevità dei semi (Butler *et al.* 2009), come nel caso dei semi di cavolo in cui una lenta essiccazione durata sei giorni è stata associata ad un aumento dell'espressione dei geni *EM6* e *RAB18* che codificano per proteine della tarda embriogenesi (*Late Embryogenesis Abundant*) coinvolte nella tolleranza all'essiccazione durante la maturazione del seme (Soeda *et al.*, 2005).

Fabrissin *et al.* (2021) suggeriscono comunque che gli effetti negativi sulla longevità del seme potrebbero essere ridotti al minimo manipolando vari parametri del *priming* quali l'imbibizione, la temperatura e le condizioni di conservazione successiva.

Nella maggior parte dei casi, le tecniche di *priming* più utilizzate sono di proprietà delle aziende sementiere. In *Tab. 4.1* si riportano i principali trattamenti di *priming* brevettati.

Tab. 4.1 – Trattamenti del *seed priming* brevettati e disponibili in commercio (da Paparella *et al.*, 2015)

Brevetto del protocollo (<i>trading name</i>)	Ditta	Descrizione del metodo <i>priming</i> e piante target
EasyPrime EasyDormex	ATLAS s.r.l. (Italia)	Miglioramento della germinazione del seme (più rapida, uniforme, ridotte piantine anormali). <i>Targets</i> : pomodoro, peperone, melanzana, melone, porro, <i>Brassica</i> .
Advantage® Xbeet® Emergis®	Germain's Seed Technology (Regno Unito)	Rimozione della termo- e foto-dormienza del seme. <i>Targets</i> : lattuga, indivia. Emergenza più sicura delle colture, stabilità precoce delle piante, miglioramento della forma/dimensione della radice e maggiore tolleranza/resa allo stress. <i>Target</i> : barbabietola da zucchero. Migliore velocità di germinazione, emergenza uniforme e pianta più forti. <i>Targets</i> : tutte le ortive e floricole.
Thermocure™ SPLITKOTE®SPECIAL PROMOTOR™ IMPROVER™	INCOTEC Europe BV (Olanda)	Rimozione della termo-dormienza del seme. <i>Target</i> : lattuga Riduzione della foto-dormienza del seme in varietà fotosensibili, aumento della tolleranza alla temperatura, miglioramento della germinazione per ottenere piantine uniformi. <i>Targets</i> : lattuga, indivia, scarola, radicchio. Miglioramento dell'efficienza/uniformità germinativa in condizioni di stress. <i>Targets</i> : cipolla, carota, pomodoro, <i>Brassica</i> .

Selezione dei semi sottoposti a *priming* secondo l'immagine a raggi X dell'interno del seme. *Targets*: pomodoro.

A causa della complessità dei fattori fisici, chimici e molecolari che contribuiscono alla vitalità dei semi, è necessario comunque acquisire una migliore conoscenza della risposta al danno durante la loro germinazione. Le piattaforme tecnologiche altamente competitive e con caratteristiche multidisciplinari saranno in grado di fornire informazioni che, mediante strumenti molecolari avanzati, potranno essere tradotte in protocolli di *priming* innovativi e affidabili a vantaggio dell'industria di produzione delle sementi. La disponibilità di nuovi indicatori potrà facilitare anche le indagini su molecole o materiali innovativi da inserire in formulazioni industriali studiate per migliorare la qualità dei semi.

PARTE SPERIMENTALE

OBIETTIVO GENERALE DELLA RICERCA

Gli obiettivi perseguiti attraverso il dottorato di ricerca sono stati molteplici e il filo conduttore che li ha legati ha riguardato la possibilità di apportare innovazioni alle filiere produttive del finocchio e del basilico mediante l'applicazione di interventi ecosostenibili.

Nonostante l'attuale importanza economica che le colture del finocchio e basilico rivestono in ambito nazionale rispettivamente con circa 19.000 ha e 32.000 are coltivate in Italia (*Fig. 1.4 e 1.5*), queste colture presentano importanti criticità, già riferite nel § 1.4, che ne limitano un'ulteriore affermazione. Ricordo che le criticità sono di ordine fitosanitario, sia per il finocchio che per il basilico, essendo rispettivamente altamente suscettibili a *S. sclerotiorum* e a *P. belbahrii* e *F. oxysporum* f. sp. *basilici*. Inoltre, per il finocchio, le criticità sono anche rappresentate dalla ridotta capacità dei semi di fornire una emergenza rapida ed uniforme e dalla ridotta conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della maschio sterilità citoplasmatica; tale conoscenza potrebbe essere utile per la realizzazione di ibridi F₁.

Entrambe le colture necessitano pertanto di innovazione per far sì che possano fronteggiare le criticità descritte ed esprimere al meglio le potenzialità produttive, anche in virtù di importanti sfide globali come il cambiamento climatico. Nello specifico, la strategia adottata per perseguire i suddetti obiettivi è stata riportata in *Fig. 1* e ha riguardato:

- a. per l'aspetto fitosanitario, l'individuazione di fonti di resistenza all'interno della variabilità naturale sia di finocchio che di basilico e il successivo trasferimento di queste in germoplasma sviluppato presso l'azienda LA SEMIORTO Sementi;
- b. per la caratterizzazione molecolare della maschio sterilità in finocchio, il sequenziamento del DNA mitocondriale di due linee isogeniche maschio sterile (MS) e maschio fertile (MF);

- c. per il miglioramento della germinazione del seme di finocchio, l'applicazione di sostanze biostimolanti al seme mediante il metodo *biopriming*.

Le attività sono state svolte in stretta collaborazione con l'Azienda LA SEMIORTO Sementi s.r.l. (Sarno, Salerno) che, assieme all'Università della Tuscia, ha cofinanziato il dottorato di ricerca. La Divisione BIOAG dell'ENEA C.R. Casaccia ha concesso l'ospitalità al dottorando per svolgere presso i suoi laboratori le attività sperimentali relative alla resistenza a malattie in finocchio e basilico e allo studio della maschiosterilità per la produzione di seme ibrido di finocchio.

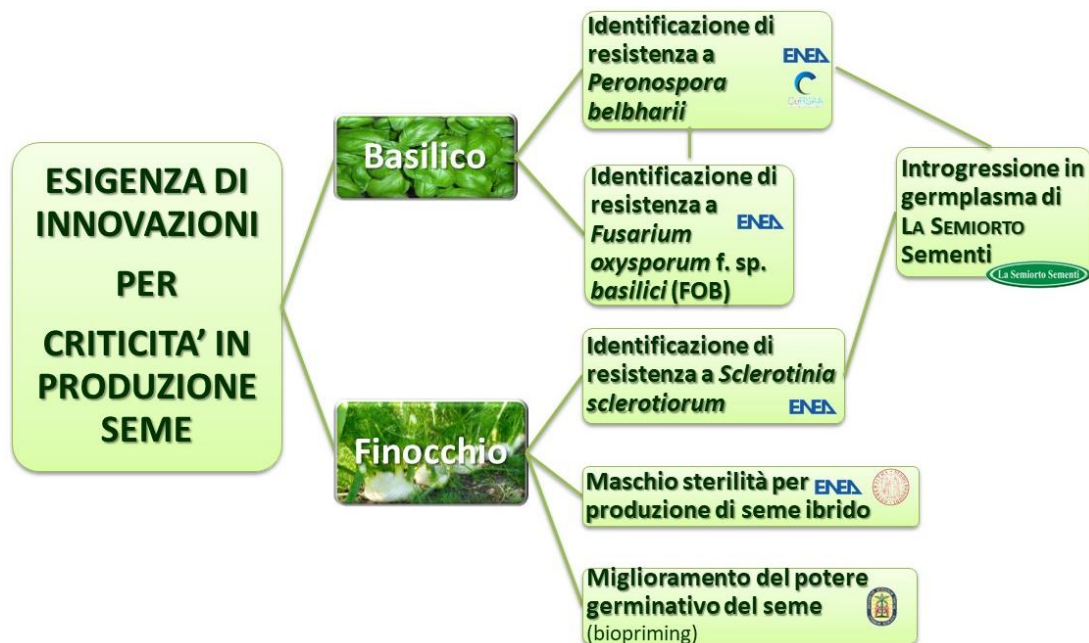


Fig. 1 - Strategia seguita durante il corso del dottorato di ricerca

Si è trattato di un'attività che ha affrontato tematiche diverse, tutte finalizzate a dare innovazioni all'industria di produzione del seme di finocchio e basilico. Oltre alla collaborazione con il Laboratorio della Banca del Germoplasma dell'Università della Tuscia, Dott.ssa S. Magrini e Dott.ssa M.T. Cardarelli (quest'ultima dipendente del CREA-Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo di Pontecagnano, Salerno) sulla tecnologia del seme in finocchio, per lo svolgimento delle attività sono state instaurate altre collaborazioni sia all'interno di ENEA (Laboratorio BIOAG-BIOTEC,

Dott.ssa D. Giorgi e Dott. G. Aprea) sia all'esterno con l'Università di Padova (Dott. F. Palumbo) per l'analisi molecolare della maschio sterilità in finocchio e inoltre con il Centro di Sperimentazione e Assistenza Agricola (CeRSAA) di Albenga, Savona (Dott.ssa A. Lanteri) per la fornitura dell'inoculo di *P. belbahrii* e per lo sviluppo delle metodologie di inoculazione artificiale con il fungo. Le inoculazioni con i patogeni *S. sclerotiorum*, *P.belbahrii*, *F. oxysporum* f.sp. *basilici* sono state effettuate presso le strutture del Laboratorio BIOAG-PROBIO di ENEA C.R. Casaccia, anche utilizzando le esperienze e competenze dei Dottori Alfredo Ambrico e Ugo De Corato su *S. sclerotiorum* in altre specie vegetali.

Le ibridazioni per trasferire le resistenze all'interno di materiali genetici di pregio sono state realizzate presso l'Azienda LA SEMIORTO Sementi (Dott.ssa Mina Formisano) che tra l'altro ha messo a disposizione il germoplasma da valutare nei saggi di resistenza a malattie.

CAPITOLO 1

RESISTENZE GENETICHE

1.1 INTERAZIONE FINOCCHIO/*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

1.1.1 INTRODUZIONE

Come già riferito nel § 2.7, *S. sclerotiorum* è un patogeno tellurico necrotrofo, diffuso in numerose parti del mondo dove provoca ingenti danni economici alle coltivazioni. In particolare, il finocchio è una specie molto suscettibile a questo agente patogeno (Fig. 1.1.1) dal momento che il prodotto commerciale è il grumolo stesso particolarmente esposto.



Fig. 1.1.1 – Gravità dei danni provocati da *S. sclerotiorum* su finocchio

Il controllo della *Sclerotinia* risulta essere molto difficoltoso per la scarsa efficacia sia dei prodotti chimici che delle misure agronomiche; essendo un patogeno altamente polifago, anche l'introduzione di rotazioni con specie diverse dal finocchio ne vanifica il contenimento. Il controllo è essenzialmente basato su pratiche preventive (sistemazioni idrauliche agrarie atte a prevenire ristagni idrici, impiego di antagonisti microbici) oltre che su interventi chimici. Una buona pratica consiste nell'estirpare le piante attaccate per evitare la persistenza del fungo nel terreno.

La costituzione di varietà resistenti si configura come un metodo alternativo al controllo chimico. Sono state avviate quindi delle prove di resistenza a *S. sclerotiorum* in finocchio in considerazione del fatto che al momento non sono presenti varietà commerciali né risorse genetiche in generale resistenti a tale patogeno. In bibliografia non risultano esserci lavori a riguardo, eccetto quello eseguito in Corea da Choi e Kim (2016) il cui obiettivo non era di individuare eventuali fonti di resistenza bensì di mettere a punto il protocollo di inoculazione artificiale in condizioni controllate. L'individuazione di eventuali fonti di resistenza e il loro trasferimento rappresenta un obiettivo molto ambito da parte delle aziende sementiere. In stretta collaborazione tra ENEA e LA SEMIORTO Sementi, è stato pertanto avviato un programma di ricerca volto all'individuazione di eventuali resistenze a *S. sclerotiorum* all'interno del germoplasma aziendale di finocchio.

1.1.2 MATERIALI E METODI

Inizialmente sono stati reperiti isolati di *S. sclerotiorum* in campi infetti di finocchio, prezzemolo, lattuga e, dalla micoteca ENEA, è stato reso disponibile anche un isolato di *S. minor*. Come germoplasma vegetale da valutare, sono stati utilizzati sei diversi genotipi sviluppati dall'Az. LA SEMIORTO Sementi. Per lo sviluppo della tecnica di inoculazione è stato utilizzato l'ibrido F₁ di finocchio denominato Karino sempre fornito dalla ditta LA SEMIORTO Sementi.

Preliminarmente sono state effettuate delle prove atte a valutare il grado di virulenza degli isolati di *S. sclerotiorum* reperiti. Una volta individuato l'isolato caratterizzato da una buona virulenza, si è proceduto a re-isolarlo da piantine infette di finocchio.

La coltura *in vitro* dell'isolato fungino è stata effettuata per 2-3 settimane in condizioni controllate, alla temperatura di $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, all'interno di capsule Petri da 90 mm (Fig. 1.1.2), utilizzando il substrato PDA (Potato Destrosio Agar) con aggiunta di acido lattico 1% per evitare lo sviluppo di eventuali inquinamenti batterici.

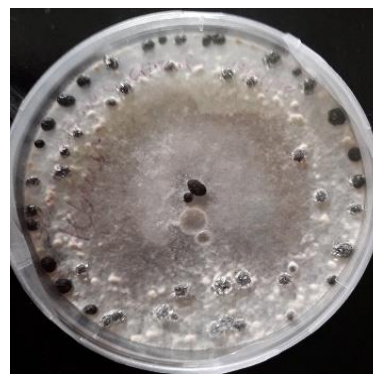


Fig.1.1.2– Sviluppo di *S. sclerotiorum* su PDA

Su suggerimento dei patologi ENEA dei centri Trisaia e Brindisi e seguendo le indicazioni fornite

dalla letteratura, si è proceduto allo sviluppo del protocollo di moltiplicazione del fungo e a quello successivo di inoculazione artificiale delle piantine di finocchio, sempre in condizioni controllate di temperatura e umidità. Allo scopo di garantire l'ottenimento di una quantità di inoculo adeguata a inoculare il terriccio su cui trapiantare le piantine, dopo la coltura del fungo su PDA, si è proceduto alla sua moltiplicazione all'interno di bottiglie da 1 litro, utilizzando un substrato costituito da 150 grammi di miglio + 50 ml di acqua (Fig. 1.1.3); tale substrato è stato autoclavato per due volte in due giorni consecutivi al fine di ottenere una sterilizzazione ottimale. Si è quindi provveduto all'introduzione,



Fig. 1.1.3 – Moltiplicazione del fungo in bottiglia

all'interno di ogni bottiglia, di 10 dischi di PDA ($\varnothing$ 1cm) colonizzati dal fungo. Dopo 10 giorni, quando il substrato di moltiplicazione è stato completamente colonizzato e

quindi il fungo moltiplicato, si è proceduto all'inoculazione del terriccio torboso commerciale BRILL precedentemente inumidito (*Fig. 1.1.4*).



Fig. 1.1.4 – Inoculazione artificiale del terriccio 2 gg prima del trapianto delle piantine

La concentrazione dell'inoculo è stata pari al 3,5% in volume rispetto al substrato di coltivazione. A distanza di due giorni dall'inoculazione del terriccio, su questo è stato effettuato il trapianto delle piantine allo stadio di terza foglia vera.

Le prove di inoculazione sono state condotte all'interno di serre in polietilene con struttura di acciaio (lunghezza 182 cm x larghezza 92 cm x altezza 92 cm) per mantenere controllate soprattutto le condizioni di umidità relativa >90% (*Fig. 1.1.5*). E' stato possibile mantenere la temperatura ai valori di 23/18°C, rispettivamente giorno/notte, mediante l'impiego di due condizionatori installati nell'ambiente.

Nelle inoculazioni, ogni genotipo fornito dall'Azienda LA SEMIORTO Sementi è stato replicato 3 volte con 8 piante per replica per un totale di 24 piante saggiate per genotipo, adottando un disegno sperimentale a randomizzazione completa.



*Fig.1.1.5 – Serrette utilizzate per le infezioni artificiali delle piantine di finocchio con *S. sclerotiorum**

E' stato valutato l'indice di malattia secondo una scala 0-3 (0=assenza sintomi, 1=moderato avvizzimento, 2=elevato avvizzimento e 3=morte della piantina) che ha permesso di evidenziare il decorso temporale dello sviluppo dei sintomi, e l'indice di mortalità delle piantine (numero di piante morte/numero di piante saggiate). I dati ottenuti sono stati elaborati secondo la formula proposta da McKinney (Chester, 1959):

$$\sum (G \cdot F) \cdot N^{-1}$$

Questa formula è stata applicata per ciascuna accessione inoculata allo scopo di esprimere in forma numerica l'incidenza della malattia per genotipo (G=classe di appartenenza dei sintomi; F= numero piante appartenenti alla categoria; N=numero totale di piante esaminate per genotipo).

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con software SPSS versione 22 applicando l'analisi ANOVA e il test di Duncan, quest'ultimo per determinare le differenze significative tra le medie.

1.1.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Tra gli isolati reperiti di *S. sclerotiorum*, quello da lattuga è risultato il migliore in quanto ha infettato molto rapidamente e in maniera uniforme il terriccio causando la morte delle piantine (Fig. 1.1.6); è stato pertanto scelto per i saggi di resistenza.



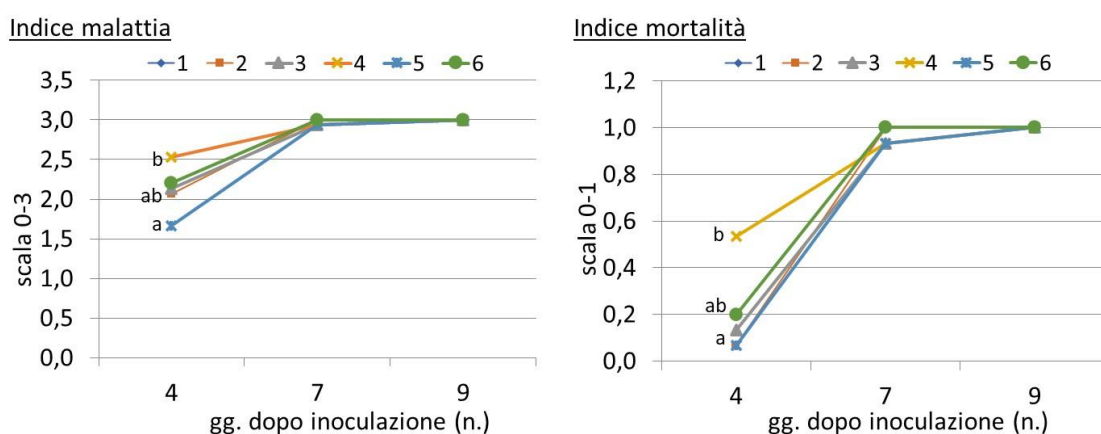
Fig. 1.1.6 – Comportamento dei diversi isolati dopo (a) moltiplicazione del fungo in bottiglia e (b) infezione del terriccio (a sinistra terrina con terriccio infettato dall'isolato fungino di lattuga)

Il terriccio è stato infettato il 16/10/2018 e su questo, dopo due giorni, sono state trapiantate 6 piantine dell'ibrido F₁ Karino per ogni isolato. Il 22 ottobre è stato effettuato il rilievo della percentuale di sopravvivenza da cui è risultato che le piantine trapiantate su terriccio inoculato con l'isolato da lattuga erano morte. Applicando questa tecnica con l'isolato fungino selezionato, i sei genotipi inoculati sono stati caratterizzati da una elevata suscettibilità al fungo chiaramente visibile in Fig. 1.1.7.



Fig. 1.1.7 – Reazione suscettibile di linee di finocchio inoculate artificialmente con *S. sclerotiorum* rispetto ai controlli non inoculati (in alto a destra, particolare della piantina infettata).

In dettaglio, nei grafici della Fig. 1.1.8 sono riportate le curve relative agli indici di incidenza della malattia e di mortalità per ogni linea da cui si evince che, dopo 4 gg. dall'inoculazione, i sei genotipi valutati erano già ammalati e al 7° giorno erano addirittura morti.



Secondo il test di Duncan, lettere diverse corrispondono a differenze significative tra le medie per $P \geq 0,05$

Fig. 1.1.8 -Reazione delle linee di finocchio all'inoculazione artificiale con *S. sclerotiorum*.

Il risultato ottenuto era stato previsto, considerata l'elevata polifagia e la modalità di attacco molto specializzata e aggressiva che caratterizza questo patogeno. Tra l'altro in letteratura, come già riferito, non esistono dati confortanti riguardo la resistenza a *S. sclerotiorum*. Il presente lavoro di tesi è stato il primo tentativo per valutare la reazione al fungo da parte dei migliori genotipi aziendali di finocchio.

Visto l'effetto del fungo sulle piantine durante l'inoculazione artificiale, il reperimento di fonti di resistenza sembra piuttosto difficile. Inoltre, trattandosi di un patogeno necrotrofo, le resistenze sarebbero per lo più di carattere quantitativo ed eventualmente complicate da trasferire (Zhang *et al.*, 2013). Tra i metodi di controllo, potrebbe essere tenuta in considerazione la coltivazione per almeno tre anni di *Graminaceae*, specie non particolarmente suscettibili a *Sclerotinia*, in modo da fare esaurire la vitalità della maggior parte degli sclerozi eventualmente presenti nel terreno (Belli, 2012).

1.2 INTERAZIONE BASILICO/*PERONOSPORA BELBAHRII*

1.2.1 INTRODUZIONE

P. belbahrii si è diffusa in numerose parti del mondo compromettendo le coltivazioni di basilico sia in pieno campo che in coltura protetta; in entrambi i casi sono riportati ingenti danni economici (Fig.

1.2.1). Solo negli Stati Uniti si stima che le perdite subite a causa di *P. belbahrii* raggiungono i dieci milioni di dollari (Wyenandt *et al.*, 2015).

Ciò dipende dal suo difficile controllo, anche in considerazione della resistenza sviluppata dal fungo al principio attivo



Fig.1.2.1 – Danni da *P. belbahrii* su basilico

mefenoxam che sta aggravando ulteriormente la situazione (Garibaldi *et al.*, 2016). L'approccio integrato per la difesa del basilico è oggi un'esigenza imprescindibile, anche a causa della scarsa efficacia delle singole tecniche di lotta (Cohen *et al.*, 2013). In Tab. 1.2.1 è riportato lo scarso contributo delle differenti tecniche di difesa antiperonosporica applicate o applicabili.

Tab. 1.2.1 - Contributo di differenti tecniche di difesa antiperonosporica in basilico (da CIA Liguria, la difesa del basilico dalla peronospora. Prontuario di buone pratiche)

Tecnica di difesa	Efficacia (%)		Aspetti critici
	pieno campo	serra	
Concia del seme	10	10	non eradicante e non elimina le infezioni fogliari successive alla germinazione
Trattamenti fisici (termici) della semente	15	15	potenzialmente eradicanti, potenzialmente dannosi al seme, non eliminano le

			infezioni fogliari successive alla germinazione
Gestione ambientale (°C e U.R.)	0	10	non eradicante e limitata efficacia sul “tappeto” fogliare
Densità di coltivazione	10	15	non eradicante, limitata efficacia successivamente all'accrescimento
Irrigazione localizzata al posto dell'irrigazione a pioggia	10	20	non eradicante e deprimente sulla produzione
Impiego di mezzi chimici	60	50	non eradicante e rischi di resistenza a fungicidi
Impiego di sanitizzanti fogliari	5	10	non eradicante, assenza di prodotti autorizzati, assenza di efficacia residuale, efficacia limitata dalla forma delle foglie e dalla densità colturale, profilo residuale da verificare
Pulizia degli ambienti di coltivazione	10	10	non eradicante
Varietà tolleranti o resistenti	50-100 ?	50-100 ?	pochi studi

Tra le strategie di controllo del fungo, la migliore e più efficace sarebbe rappresentata dalla possibilità di coltivare varietà resistenti a *P. belbahrii*. A riguardo, sono state individuate valide fonti di resistenza nell'accessione PI 500945 di *Ocimum americanum* var. *americanum* (Ben-Naim *et al.*, 2018) e nella cv. Mrihani di *Ocimum basilicum* (Pyne *et al.*, 2015); entrambe però presentano caratteristiche fenotipiche e chemiotipiche poco apprezzate dal consumatore italiano (Fig. 1.2.2) e difficili da eliminare in programmi convenzionali di miglioramento genetico. L'accessione PI 500945 è inoltre sessualmente incompatibile se ibridata con *O. basilicum* a meno che non sia applicata l'embricoltura. In entrambi i genotipi la resistenza è dovuta a geni/alleli dominanti (Ben-Naim *et al.*, 2018; Pyne *et al.*, 2015).



Fig. 1.2.2 – Prime fonti disponibili di resistenza a *P. belbahrii* in *Ocimum* spp.

Recentemente sono state rese disponibili varietà commerciali dichiarate resistenti a *P. belbahrii* tra cui Prospera F₁ (Fig. 1.2.3), Basilio F₁, Gervaso F₁, FX 1878 F₁ (https://www.fenixseeds.com/wp-content/uploads/2021/02/Catalogo-2021-WEB_ITA.pdf) e altre dichiarate tolleranti alla malattia quali le var. Gemini (<https://professionale.saissementi.it/it/events/basilico-gemini-da-sais-unalternativa/>) ed Eleonora (<https://www.enzazaden.com/it/products-and-services/our-products/Erbe%20aromatiche/Eleonora>) (Fig. 1.2.3).



Fig. 1.2.3 – Materiali commerciali di basilico dichiarate resistenti/tolleranti a *P. belbahrii* attualmente disponibili in Italia

Alla Rutgers University (USA), mediante ibridazioni tra la cv. Mrihani e una linea inbred di *O. basilicum*, sono state realizzate nuove varietà dichiarate resistenti alla peronospora denominate Devotion DMR, Obsession DMR, Rutgers Passion DMR e Rutgers Thunderstruck DMR (Fig. 1.2.4) (<https://sebsnjaesresearch.rutgers.edu/2018/11/rutgers-obsession-devotion-and-thunderstruck-basil/>). Commercializzate dalla ditta VDF Specialty Seeds, queste non sono tuttavia facilmente reperibili.



Fig. 1.2.4 – Varietà di basilico costituite dalla Rutgers University (USA) e dichiarate resistenti a *P. belbahrii*

In considerazione dell'importanza di sviluppare germoplasma di basilico della tipologia genovese, apprezzato dal consumatore italiano e resistente a *P. belbahrii*, nell'ambito della collaborazione ENEA–LA SEMIORTO Sementi, sono state svolte le attività suddivise nei seguenti punti:

- a) mantenimento dell'inoculo;
- b) messa a punto della tecnica di inoculazione artificiale in condizioni controllate e di valutazione dei sintomi;
- c) realizzazione dei saggi di resistenza mediante infezione a diverse concentrazioni di inoculo.

1.2.2 MATERIALI E METODI

Il materiale vegetale utilizzato è stato fornito dalla ditta LA SEMIORTO Sementi. Si è trattato di germoplasma sviluppato a livello aziendale mediante programmi di

ibridazioni, eccetto l'accessione PI 500945 di *O. americanum* e la cv. Mrihani che sono state reperite presso la banca del germoplasma dell'USDA.

1.2.1.1 Inoculo

Per quanto riguarda l'inoculo, una volta reperito da piante infette di basilico, sono stati effettuati diversi tentativi per conservarlo in laboratorio mediante congelamento o liofilizzazione di foglie infette o ancora mantenimento di infezione su piantine *in vivo*.

1.2.1.2 Tecnica di inoculazione

La prima tecnica d'inoculazione artificiale adottata è stata quella di porre poche piantine infettate da peronospora vicino a piantine da valutare all'interno di una camera di crescita (temperatura: $22\pm 1^{\circ}\text{C}$) in condizioni di luce artificiale. Le prove successive sono state invece condotte all'interno di serre in polietilene con struttura in acciaio (lunghezza 182 cm x larghezza 92 cm x altezza 92 cm) in condizione di luce naturale, applicando il protocollo di inoculazione artificiale di seguito descritto (Fig. 1.2.5) e suggerito dal CeRSAA di Albenga (Savona):

- spennellamento delle foglie con sporulazione e raccolta degli sporangi in acqua distillata (Fig. 1.2.5 a, b);
- osservazione della sospensione fungina al microscopio per la determinazione della concentrazione richiesta (500.000 sporangi/ml) mediante utilizzo del contaglobuli di Bürker;
- nebulizzazione dell'inoculo su piantine, precedentemente inumidite, allo stadio di terza/quarta foglia vera (Fig. 1.2.5 c);
- incubazione delle piante inoculate in un *range* di temperature compreso tra 20-24°C e di umidità relativa elevata del 95% (Fig. 1.2.5 d, e), in condizioni di buio per le prime 14-16 ore per favorire la germinazione dei corpi fruttiferi.

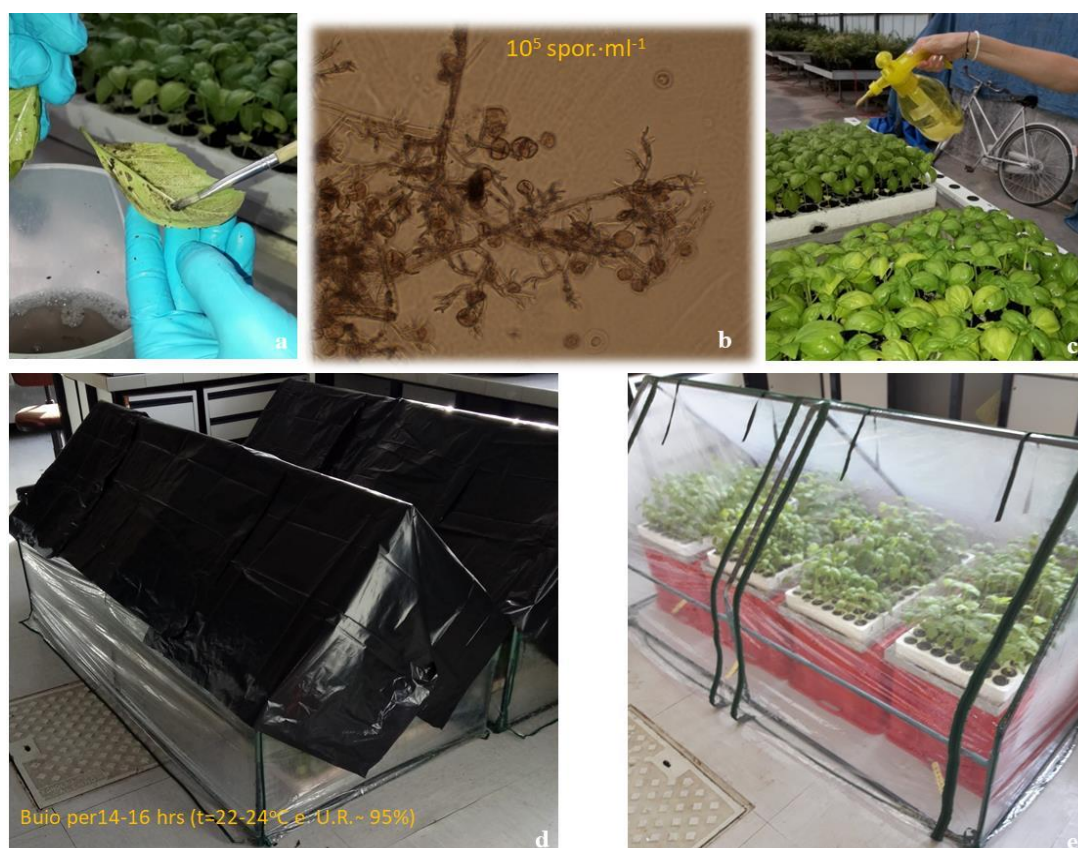


Fig. 1.2.5 - Tecnica di inoculazione artificiale applicata

La concentrazione di inoculo adottata nei saggi di resistenza condotti è stata quella standard di 500.000 sporangi/ml; solo un saggio è stato condotto a bassa concentrazione di inoculo (150.000 sporangi/ml) per valutare il livello di resistenza dei genotipi valutati sia alla concentrazione standard che a quella più bassa. Inoltre, quando si sono verificate le condizioni favorevoli per il fungo nella serra aziendale di LA SEMIORTO Sementi, è stato possibile valutare alcuni genotipi di interesse anche in condizioni di infezione naturale.

L'incidenza della malattia è stata analizzata attraverso l'impiego di due tipologie di rilievi (*Fig. 1.2.6*). Il primo e il più adottato è stato il rilievo a diffusione che consiste nella determinazione della percentuale di foglie con evidente sporulazione considerando 20 foglie/replica scelte casualmente. Il secondo tipo di rilievo è stato invece basato su una scala 0-3 di incidenza dei sintomi, dove (0) rappresenta assenza

dei sintomi, (1) clorosi internervale delle foglie, (2) necrosi delle foglie, (3) morte della pianta. I dati sono stati trasformati con la formula proposta da McKinney (Chester, 1959). L'incidenza della malattia è stata valutata mediante 4 rilievi a diffusione eseguiti generalmente 9, 14, 15, 20 giorni dopo l'inoculazione. La prova è stata ritenuta finita quando i primi genotipi hanno mostrato quasi il 100% di sporulazione.

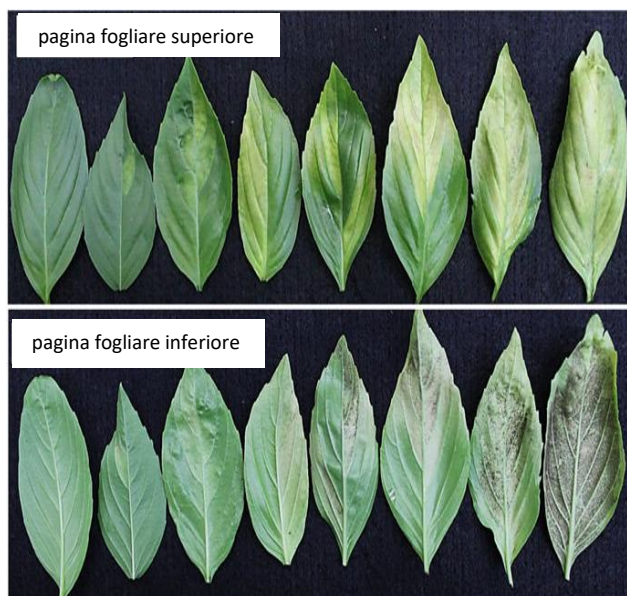


Fig. 1.2.6 - Sintomi della malattia nella pagina superiore della foglia e sporulazione nella pagina inferiore.

In tutte le prove di inoculazione artificiale condotte, i genotipi saggiati sono stati replicati 3 volte con 21 piantine per replica per un totale di 63 piante per genotipo più i rispettivi controlli non inoculati. E' stato adottato un disegno sperimentale a randomizzazione completa.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con software SPSS versione 22 applicando l'analisi ANOVA e il test di Duncan, quest'ultimo per determinare le differenze significative tra le medie.

1.2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

1.2.3.1 Inoculo

La scarsa reperibilità dell'inoculo e la difficoltà nel suo mantenimento hanno rappresentato l'aspetto critico dei saggi di resistenza. I tentativi di conservazione del fungo in laboratorio, dopo il suo reperimento da piante infette, sono stati vani in quanto, effettuando il congelamento o la liofilizzazione di foglie infette, le nuove

piantine inoculate non hanno mostrato alcun sintomo di espressione della malattia. Anche il mantenimento dell'infezione su piantine *in vivo* è risultato impossibile da effettuare in quanto il patogeno infetta le piantine con un processo molto rapido e in condizioni ambientali ben precise ed è inoltre necessario disporre di piantine giovani da tenere sempre pronte; è stato difficile mantenere in maniera continuativa tutte le condizioni ottimali per lo sviluppo della malattia.

L'unica alternativa possibile per disporre dell'inoculo è stata quella di instaurare una collaborazione con il CeRSAA di Albenga (Savona) e ricevere direttamente l'inoculo via corriere espresso, immediatamente prima di procedere con l'inoculazione. Presso il CeRSAA è facile mantenere l'inoculo dal momento che la Liguria è una zona endemica per la peronospora. L'inoculo inviato consisteva in piantine infette con foglie che presentavano evidente sporulazione (Fig.1.2.7).



Fig.1.2.7 – Inoculo (piantine infette) inviato periodicamente dal CeRSAA.

1.2.3.2 Metodo di inoculazione

I primi tentativi per mettere a punto il metodo di inoculazione in camera climatica non hanno avuto successo dal momento che la ventilazione e le lampade incandescenti a luce bianca e fredda inibivano lo sviluppo della sporulazione, come già riferito da Cohen *et al.* (2013). I risultati negativi, senza chiara espressione dei sintomi e assenza di sporulazione (Fig. 1.2.8), sono stati attribuiti sia alla tecnica di inoculazione (solo vicinanza di una pianta infetta e quindi scarsità di inoculo) poco adatta ad infettare nuove piante



Fig. 1.2.8 – Piantine di basilico inoculate in camera di crescita.

sia alle condizioni ambientali non idonee allo sviluppo del fungo (ventilazione e luce bianca e fredda). In seguito, grazie ad una ricerca bibliografica accurata ma soprattutto grazie alla collaborazione intrapresa con il CeRSAA di Albenga, è stata sviluppata la tecnica d'inoculazione artificiale in ambiente controllato descritta nella *Fig. 1.2.5* del paragrafo MATERIALI E METODI. L'assenza di ventilazione e di lampade a incandescenza a luce bianca e fredda hanno creato le condizioni favorevoli allo sviluppo del fungo. Anche le condizioni ambientali, in particolar modo l'umidità fogliare e la sua durata, possono influenzare l'incidenza della malattia per cui il successivo impiego di serrette in plastica atte a mantenere elevata l'U.R., assieme al buio prolungato per le 14-16 h successive all'inoculazione, hanno consentito di assicurare le condizioni idonee alla sporulazione del fungo. La concentrazione di inoculo utilizzata e la valutazione dell'incidenza dei sintomi e della sporulazione sono state suggerite sempre dal CeRSAA e hanno consentito di ottenere buoni risultati. L'indice di malattia basato sulla percentuale di foglie con sporulazione è risultato il rilievo più attendibile da utilizzare nelle nostre prove.

Durante la messa a punto della tecnica d'inoculazione artificiale, è stato effettuato anche il tentativo di disporre le piante inoculate in serra, dove era presente abbondante fonte di inoculo (*Fig. 1.2.9*). In tali condizioni, è comparsa la sintomatologia della malattia anche sulle piante del controllo non inoculato che sono risultate tutte suscettibili al fungo. Si trattava quindi di condizioni con eccessiva pressione di inoculo e la prova non ha dato risultati interessanti.



Fig. 1.2.9 – Incubazione delle linee inoculate ad Albenga all'interno di una serra con elevata pressione di inoculo (piante infette intorno)

1.2.3.3 Saggi di resistenza

Una volta sviluppata la tecnica di inoculazione artificiale e di valutazione dell'incidenza della malattia soprattutto legata alla presenza di sporulazione, nel periodo settembre 2018-gennaio 2020 sono stati effettuati i saggi di resistenza su risorse genetiche sempre fornite dalla ditta LA SEMIORTO Sementi.

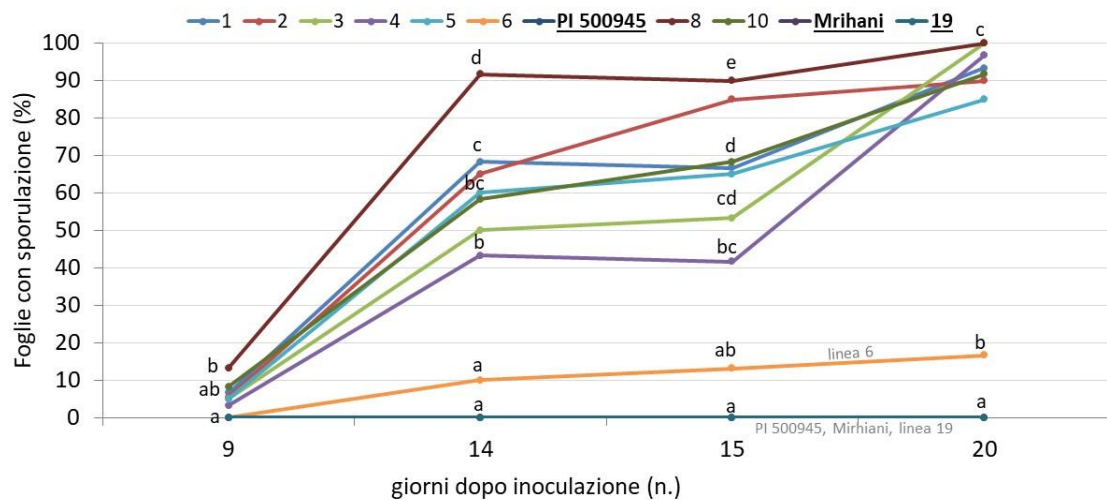
Sono stati condotti diversi saggi di resistenza a *P. belbahrii*, alla concentrazione standard di 500.000 sporangi/ml, a quella più bassa di 150.000 sporangi/ml e in condizioni di infezione naturale. Per brevità e per evitare ripetizioni, saranno descritti e commentati solo i saggi ritenuti più significativi riguardo all'individuazione delle fonti di resistenza.

➤ Concentrazione di inoculo standard (500.000 spor./ml.)

Utilizzando la concentrazione di inoculo di 500.000 sporangi/ml, è stato analizzato il comportamento di undici genotipi forniti dalla ditta LA SEMIORTO Sementi e identificati con la numerazione 1-2-3-4-5-6-8-10-19 assieme a quello dell'accessione PI 500945 di *O. americanum* e della cv. Mrihani.

Dalla prova è emersa la resistenza dell'accessione PI 500945, della cv. Mrihani e della linea 19, tutte con assenza completa di sporulazione sulle foglie (*Fig. 1.2.10*). Il genotipo 6 ha evidenziato un comportamento intermedio tra la resistenza e la suscettibilità nei confronti del fungo con una sporulazione < 20%; fino al 15°gg dopo l'inoculazione, questa reazione non era significativamente diversa da quella dei genotipi resistenti. Anche il genotipo 4 ha mostrato una reazione intermedia nei confronti di *P. belbahrii*, con circa il 40% di sporulazione al 15° giorno dopo l'inoculazione per raggiungere però, alla fine della prova, una sporulazione prossima al 100% analogamente ai genotipi che si sono dimostrati altamente suscettibili quali le linee 1, 2, 3, 5, 8 e 10 (*Fig. 1.2.10*). E' stato evidente l'ottimo stato sanitario delle piantine appartenenti alla linea 19, alla cv. Mrihani e all'accessione PI 500945 in confronto a quello dei genotipi parzialmente resistente (linea 6) e suscettibili. Il genotipo 4, con comportamento intermedio nei confronti del fungo, ha destato un

certo interesse, ovviamente da confermare anche a concentrazione più bassa di inoculo.



Secondo il test di Duncan, lettere diverse corrispondono a differenze significative tra le medie per $P \geq 0,05$

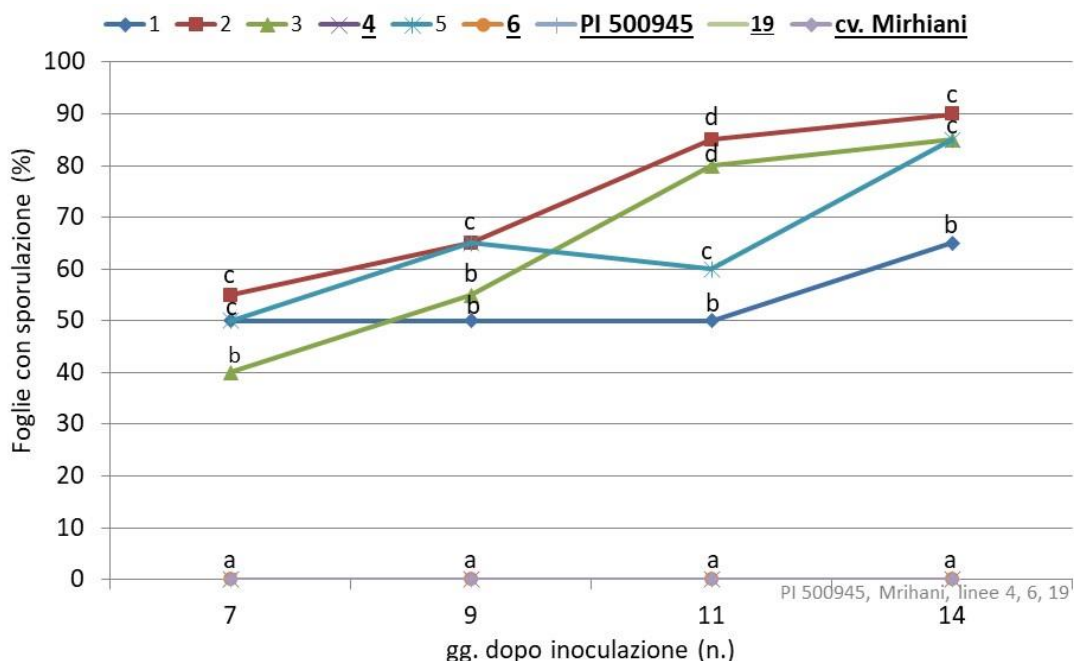
Fig. 1.2.10 – Reazione a *P. belbahrii* nelle linee di basilico fornite da LA SEMIORTO Sementi e inoculate artificialmente con una sospensione di 500.000 spor./ml.

➤ Bassa concentrazione di inoculo (150.000 spor./ml.)

I genotipi 1-2-3-4-5-6, 19, cv. Mrihani e PI 500945 sono stati inoculati artificialmente con una concentrazione di inoculo più bassa, pari a 150.000 sporangi/ml, per verificare l'eventuale comportamento delle linee 4 e 6 ad una concentrazione di inoculo ridotta. L'incidenza della malattia è stata valutata, anche in questo caso, mediante 4 rilievi a diffusione eseguiti a 7, 9, 11 e 14 gg. dopo l'inoculazione, dopodiché la prova è stata considerata conclusa in quanto i genotipi suscettibili avevano raggiunto quasi il 100% di sporulazione.

I risultati ottenuti in questa prova hanno riguardato la conferma della resistenza della linea 19, dell'accessione PI 500945 e della cv. Mrihani, ma hanno anche

evidenziato il buon comportamento dei genotipi 6 e 4 con assenza o quasi di sporulazione sulle foglie (Fig. 1.2.11).



Secondo il test di Duncan, lettere diverse corrispondono a differenze significative tra le medie per $P \geq 0,05$

Fig. 1.2.11 – Reazione dei genotipi di basilico inoculati in condizioni controllate a bassa concentrazione di sporangii di *P. belbahrii* (150.000 spor./ml)

E' risultato interessante il comportamento delle linee 6 e 4, intermedio rispetto a quello dei genotipi resistenti e suscettibili, se inoculate a basse concentrazioni di inoculo (150.000 spor./ml).

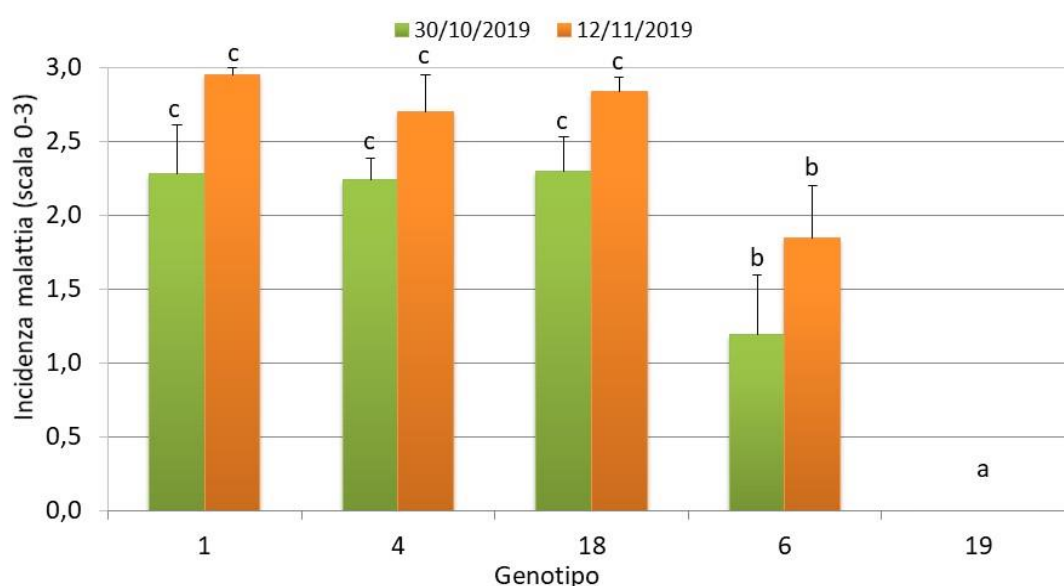
➤ Infezione naturale

Il 30 ottobre e il 12 novembre 2019, è stato possibile valutare in condizioni di infezione naturale, verificatesi nella serra dell'Azienda LA SEMIORTO Sementi a Sarno (Salerno), il comportamento delle linee 1, 4, 6 e delle linee indicate come 18 e 19, quest'ultima già valutata nei saggi precedenti. Nella prova era casualmente presente il genotipo denominato 18 in quanto il gruppo di genotipi era stato predisposto per l'inoculazione artificiale con *F. oxysporum* f.sp. *basilici* (v. § successivo 1.3).

Si è aggiunta casualmente la linea 18 Per la valutazione dell'incidenza della malattia sono stati effettuati due rilievi, il 10° e il 22° giorno dalla comparsa dei primi sintomi,

secondo la scala 0-3 (0=assenza di sintomi; 3=pianta morta) e applicando la formula di McKenney; le piante presentavano uno stadio avanzato della malattia che inficiava la scelta arbitraria delle foglie su cui fare il rilievo a diffusione basato sulla quantità di sporulazione sulla foglia.

I risultati ottenuti attraverso questa prova ad infezione naturale riguardano la resistenza del genotipo 19 che si è distinto rispetto agli altri per la totale resistenza mostrata (Fig.1.2.12), evidenziata chiaramente nelle tre repliche (Fig. 1.2.13).



Secondo il test di Duncan, lettere diverse corrispondono a differenze significative tra le medie.

Fig. 1.2.12 - Risposta dei genotipi saggiati per resistenza a *P. belbaharii* in condizioni di infezione naturale: incidenza della malattia

Anche in condizioni di infezione naturale, la linea 6 ha confermato la risposta ottenuta nel saggio precedente di resistenza intermedia tra quella completa della linea 19 e la suscettibilità delle altre linee.

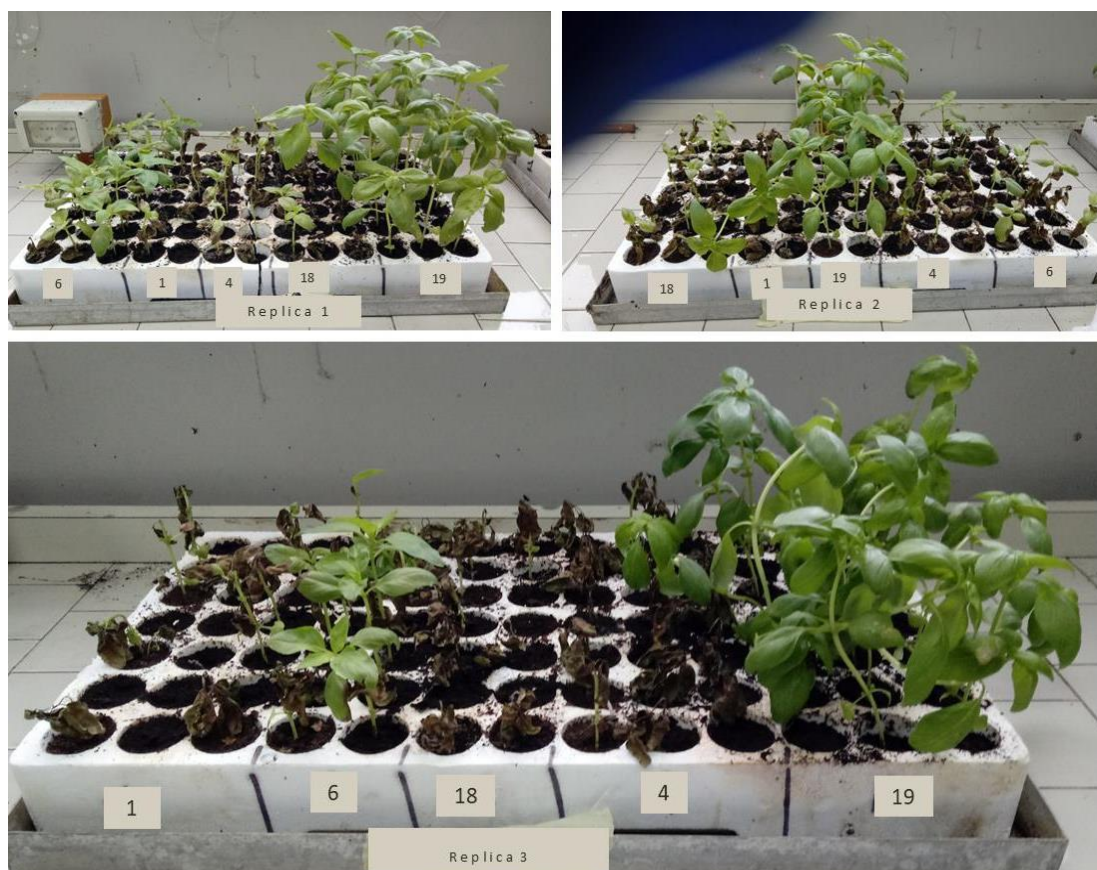


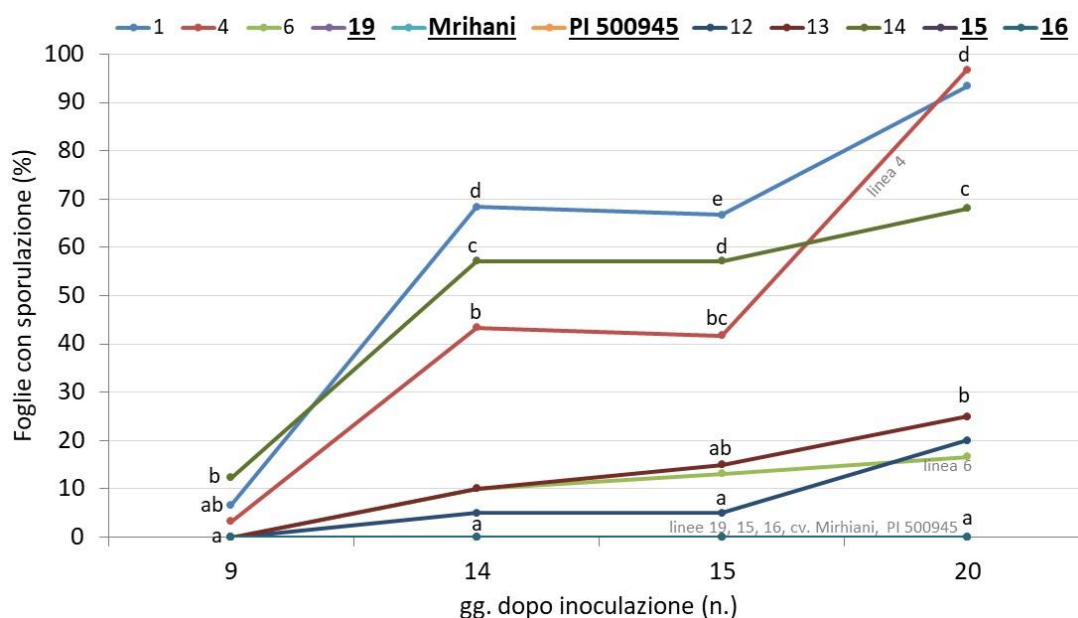
Fig. 1.2.13 – Identificazione della resistenza a *P. belbaharii* nella linea denominata 19 e comportamento intermedio della linea 6 in condizioni di infezione sviluppatasi naturalmente in serra

➤ Inoculazioni su prime introgressioni (500.000 spor./ml)

Sono stati valutati nuovamente come controlli sei genotipi differenti (1, 4, 6, 19, Mrihani, PI 500945) a cui sono state aggiunte le discendenze F₁ denominate 12, 13, 14 e 15 e la 16 ottenute da introgressione della resistenza rispettivamente dai genotipi 6 e 19 in parentali appartenenti al germoplasma di LA SEMIORTO Sementi. La concentrazione di inoculo utilizzata nel corso della prova è stata di 500.000 sporangi/ml. La valutazione dell'incidenza della malattia è stata effettuata mediante i soliti 4 rilievi a diffusione eseguiti il 9°, il 14°, il 15° il 20° giorno dopodiché la prova è stata considerata conclusa con l'infezione completa dei genotipi suscettibili.

I risultati ottenuti da questo saggio riguardano, oltre alla conferma della resistenza dei genotipi 19, Mrihani e PI 500945 e della resistenza parziale del genotipo 6, anche

la resistenza completa delle discendenze ibride 15 e 16 derivate dalla linea 19 e quella parziale delle progenie 12, 13 e 14 provenienti dalla linea 6 (Fig. 1.2.14). Come atteso, i genotipi 1 e 4 hanno confermato la risposta di suscettibilità.



Secondo il test di Duncan, lettere diverse corrispondono a differenze significative tra le medie per $P \geq 0,05$

Fig. 1.2.14 – Reazione di ibridi F_1 ottenuti per introgressione della resistenza dalle linee 6 e 19.

È importante sottolineare che la mancanza di resistenza genetica a *P. belbahrii* nelle varietà coltivate continua a rendere difficile il controllo del fungo nelle coltivazioni di basilico genovese. La difesa della coltura riguarda gli agricoltori e le ditte sementiere che devono adottare tutte le misure fitosanitarie per la corretta gestione delle aree di coltivazione.

Le fonti di resistenza USDA (PI 500945 e Mrihani), confermate e reperite all'interno della variabilità naturale del basilico durante le attività del dottorato di ricerca, non sono di facile utilizzo. Queste assieme alla linea 19 hanno evidenziato, anche nel lavoro di tesi, un livello molto elevato di resistenza anche se solo il genotipo 19 può dare un ottimo contributo all'introgressione della resistenza nel germoplasma di *O. basilicum* in quanto appartenente alla stessa specie. La resistenza sarebbe quindi di

facile trasferimento senza deprimere le caratteristiche del nostro basilico italiano. Come nell'accessione PI 500945 e nella cv. Mrihani (Ben-Naim *et al.*, 2018; Pyne *et al.*, 2015), i risultati dei saggi di resistenza sembrano confermare che, anche nel genotipo 19, la resistenza sarebbe conferita dalla presenza di geni dominanti in quanto gli ibridi F₁ ottenuti dalla linea 19 sono totalmente resistenti come il parentale da cui sono stati ottenuti. E' quindi necessario sfruttare l'azione degli eventuali geni dominanti proseguendo nelle strategie di *breeding* intraprese e volte all'introggressione di tale resistenza nel germoplasma di *élite* dell'Azienda LA SEMIORTO Sementi.

L'accessione PI 500945 di *O. americanum* ha lo svantaggio di essere filogeneticamente distante dal basilico coltivato in Italia. La distanza filogenetica determina un'incompatibilità sessuale post-zigotica (sterilità somatoplastica con aborto precoce dell'embrione) che rende difficile il trasferimento della resistenza. L'introggressione della resistenza nell'allotetraploide *O. basilicum* (2n=4x=48) è possibile solo applicando l'embriocoltura con tutte le implicazioni negative di tempo, fatica e insuccesso che ne possono derivare. La resistenza di PI 500945, dovuta ad una coppia di geni dominanti, Pb1A e Pb1A' localizzati su due cromosomi omeologhi (Ben-Naim *et al.*, 2018), sarebbe il risultato di un blocco dello sviluppo del patogeno, associato alla risposta di ipersensibilità che si verifica durante la sua penetrazione attraverso le cellule dell'epidermide che producono un cuscinetto di callosio (Ben-Naim *et al.*, 2018).

La cv. Mrihani, pur appartenendo alla specie *O. basilicum* di interesse per il nostro Paese e quindi sessualmente compatibile, comporta la necessità di procedere con numerose generazioni di reincrocio per recuperare i caratteri del genotipo ricorrente ed essere apprezzata dai nostri consumatori.

La linea 6 non ha evidenziato una reazione di resistenza stabile nei riguardi del fungo per cui è stata ritenuta trascurabile nei programmi di miglioramento genetico. Durante i saggi è stato infatti verificato che era costituita da piantine suscettibili e da altre che rispondevano meglio nei confronti del fungo.

In generale, la comprensione delle basi molecolari della resistenza a *P. belbahrii* in basilico contribuirà a far luce sul controllo della malattia sinora ancora difficile da gestire e controllare. Grazie all'utilizzo delle TEA (Tecnologie di evoluzione assistita), si è riusciti ad inattivare alcuni geni di suscettibilità, non consentendo a *P. belbahrii* di colonizzare i tessuti del basilico (<https://agronotizie.imagelinenetwork.com/difesa-e-diserbo/2021/01/25/basilico-con-le-tea-piante-resistenti-alla-peronospora/69126>). Molto recentemente Hasley *et al.* (2021), inoltre, non solo hanno prodotto via CRISPR/Cas9 piante con una migliore resistenza alla peronospora ma hanno anche contribuito alla comprensione delle interazioni molecolari basilico-*P. belbahrii*.

La Commissione Europea ha ancora elaborato la “EU Regulation 1143/2014” per risolvere il problema delle specie aliene invasive (chiamate così perché si tratta di patogeni portati da seme o da altro materiale vegetale non autoctoni del nostro Paese) e proteggere la biodiversità e gli ecosistemi, minimizzando anche l’impatto sulla salute dell’uomo, degli animali, delle piante e sull’economia del Paese. La direttiva riguarda sistemi di allerta e risposta rapida, prevenzione e gestione dell’emergenza. A riguardo, potrebbe essere interessante il deumidificatore specifico per le serre messo a punto per agire direttamente sul controllo dell’umidità ambientale fermando sul nascere l’insorgere della malattia in modo efficace, economico e naturale (<https://www.fral.it/news/rivoluzionario-sistema-per-combattere-la-peronospora-del-basilico/>).

1.3 INTERAZIONE BASILICO/*FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *BASILICI*

1.3.1 INTRODUZIONE

F. oxysporum f.sp. *basilici* (FOB) è stato segnalato per la prima volta nel 1956 nella Russia meridionale (Vergovskii, 1956; Kvartskhava, 1957) dopodiché, in breve tempo, si è diffuso in tutto il

mondo attraverso la commercializzazione di seme contaminato (Reuveni *et al.*, 1997).

Attualmente la fusariosi del basilico può causare gravi danni economici alle

coltivazioni (Xie *et al.*,



Fig. 1.3.1 – Danni da fusariosi su basilico

2015) (Fig. 1.3.1), soprattutto nelle regioni dove il basilico è una fonte di reddito (Pasquali *et al.*, 2006) se non vengono attuate adeguate misure di controllo della malattia. Ciò dipende dal fatto che il controllo chimico risulta essere molto difficile in considerazione sia della messa al bando del bromuro di metile che dei diversi fungicidi convenzionali che determinano fitotossicità, inclusa la riduzione dell'altezza delle piante o il peso delle foglie, con scarso controllo dell'agente patogeno (Ambrico *et al.*, 2017). La strategia di controllo più efficace ed economica è rappresentata dall'impiego di resistenze genetiche in cultivar commerciali che tra l'altro sono già disponibili in diversi paesi e anche in Italia (Garibaldi *et al.*, 1997; Reuveni *et al.*, 1997; Chaimovitsh *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2008). La costituzione di varietà resistenti si configura pertanto come un metodo efficace, ecosostenibile e alternativo al controllo chimico. Dudai *et al.*, nel 1995, avevano costituito e registrato la cv. Nufar resistente a FOB e hanno anche dimostrato che la resistenza è controllata da un gene dominante rendendo la varietà una valida candidata per trasferire il carattere in nuovi ibridi o varietà di basilico (Chaimovitsh *et al.*, 2006).

Attualmente in bibliografia sono presenti diverse accessioni della specie *Ocimum* resistenti a FOB (Reis *et al.*, 2008) con caratteristiche fenotipiche e chemiotiche non sempre però gradite dal consumatore. Lo sviluppo di nuove varietà resistenti che possiedono anche le caratteristiche richieste dal consumatore rappresenta un obiettivo delle aziende sementiere. In considerazione dell'importanza della resistenza a *F. oxysporum*, nell'ambito della collaborazione tra ENEA e l'Azienda LA SEMIORTO Sementi, l'obiettivo è stato quello di verificare il livello di resistenza in germoplasma di LA SEMIORTO Sementi della tipologia genovese con la prospettiva aziendale di combinare insieme in un unico genotipo questa resistenza con quella a *P. belbahrii*. Il germoplasma era stato precedentemente selezionato da Švecová (2010).

1.3.2 MATERIALI E METODI

Come materiali, nei saggi di resistenza sono stati valutati 4 diversi genotipi denominati 1, 4, 18 e 19, sempre forniti dall'Azienda LA SEMIORTO Sementi. Per il patogeno, sono stati utilizzati isolati di *F. oxysporum* f.sp. *basilici* conservati nella micoteca dell'ENEA C.R. Casaccia.

Prima di avviare le prove con il germoplasma da sottoporre a valutazione, sono stati effettuati dei saggi preliminari finalizzati a valutare il grado di virulenza degli isolati di *F. oxysporum* f.sp. *basilici* in collezione. Inoltre, una volta individuato l'isolato caratterizzato da una buona virulenza e in grado quindi di indurre la malattia, si è proceduto a re-isolarlo (Fig. 1.3.2) prima della moltiplicazione *in vitro*. Di seguito sono riportate le fasi del protocollo di inoculazione artificiale adottato (Švecová, 2010):

- a. coltura del fungo (Fig. 1.3.2) per 2-3 settimane su substrato PDA (Potato Destrosio Agar) più aggiunta di acido lattico 1%, per evitare lo sviluppo di eventuali inquinamenti batterici, in capsule Petri da 90 mm poste all'interno di un incubatore (temperatura: 24±1°C e fotoperiodo: 12 h luce + 12 h buio);
- b. preparazione della sospensione fungina omogeneizzando in acqua distillata per 4-5 secondi la porzione di substrato in cui era presente la colonia del fungo e

filtrando poi tale sospensione attraverso 2-3 strati di garza sterile (Fig. 1.3.3 a, b) posizionati all'interno di un imbuto; la concentrazione finale dei propaguli infettivi (microconidi) nella sospensione, pari a 500.000 con./ml, è stata stabilita mediante contaglobuli di Bürker;



Fig. 1.3.2 – Isolamento di *F. oxysporum* f.sp. *basilici* da pezzetti di stelo (a sinistra) e successiva coltura *in vitro* su substrato PDA (a destra)

- c. una volta preparata la sospensione conidica, lavaggio delle radici in acqua per eliminare il pane di terra e successivo taglio di queste per circa 1 cm, in modo da creare delle ferite che facilitino l'ingresso del fungo patogeno nel sistema vascolare della pianta;
- d. immersione delle radici per 15 minuti nella sospensione conidica (Fig. 1.3.3 c) e successivo trapiantate in terrine contenenti terriccio torboso Brill precedentemente inumidito. Sono stati condotti tre saggi di resistenza presso i laboratori ENEA C.R. Casaccia Roma, in ambiente controllato (camera di crescita) ad una temperatura di circa $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ed un'umidità relativa pari al 60%.

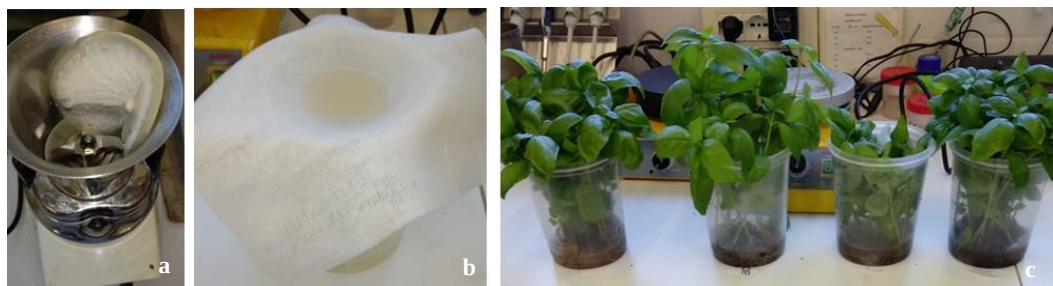


Fig.1.3.3 – Tecnica di inoculazione con (a) omogenizzazione della colonia fungina in acqua, (b) filtrazione della sospensione ottenuta su garza, (c) immersione delle piantine nella sospensione conidica dopo il taglio delle radici

In tutti e tre i saggi effettuati, ogni genotipo è stato replicato 3 volte con 5 piante per replica per un totale di 15 piante saggiate per genotipo, adottando un disegno sperimentale a randomizzazione completa.

I rilievi effettuati hanno permesso di evidenziare il decorso temporale dello sviluppo della malattia, attraverso un indice di malattia calcolato mediante una scala 0-3 riguardo alla manifestazione dei sintomi, dove (0) rappresenta l'assenza dei sintomi, (1) una lieve epinastia fogliare e/o la clorosi apicale, (2) l'epinastia fogliare e l'arresto della crescita della pianta, (3) la morte della pianta (Reuveniet *al.*, 2002). I dati ottenuti sono stati elaborati secondo la formula proposta da McKinney (Chester, 1959):

$$I = \sum (G F) N^{-1}$$

Questa espressione è stata applicata per ciascuna accessione inoculata allo scopo di esprimere la quantità di malattia in forma numerica (G=classe di appartenenza dei sintomi; F= numero piante appartenenti alla categoria; N=numero totale di piante esaminate).

L'indice di mortalità è stato calcolato come numero di piante morte sul numero totale di piante saggiate. Anche questa espressione è stata applicata per ciascuna accessione inoculata allo scopo di esprimere la quantità di malattia in forma numerica.

In tutti e tre i saggi effettuati le valutazioni dell'indice di malattia e dell'indice di mortalità sono state effettuate cinque volte dal 14° al 24° gg. dopo l'inoculazione.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con software SPSS versione 22 applicando l'analisi ANOVA e il test di Duncan, quest'ultimo per determinare le differenze significative tra le medie.

1.3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Con i quattro genotipi forniti da LA SEMIORTO Sementi sono stati effettuati tre saggi di resistenza che hanno sempre confermato gli stessi risultati evidenziando la resistenza del genotipo 18 e la suscettibilità dei genotipi 1, 4 e 19, come si evince dai grafici della Fig. 1.3.4.

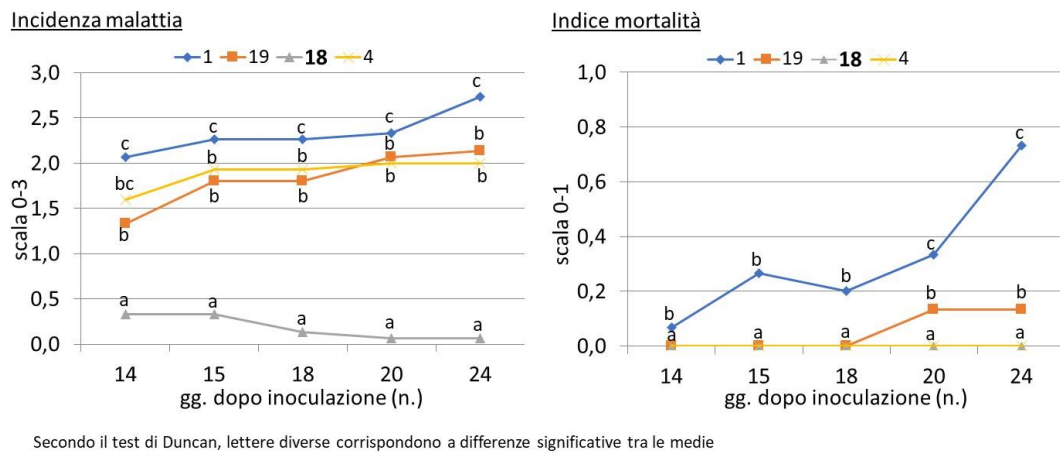


Fig. 1.3.4 – Risposta delle linee di basilico inoculate artificialmente con *F. oxysporum* f.sp. *basilici*

Le piante delle linee 4 e 19, pur avendo mostrato i sintomi della malattia, sono comunque sopravvissute all'inoculazione. In tutti e tre i saggi di resistenza effettuati, nelle prime fasi anche il genotipo 18 ha manifestato lievi sintomi riconducibili a *F. oxysporum* f. sp. *basilici* come l'appassimento delle foglie basali ma, con il progredire dei giorni, questi lievi sintomi sono andati progressivamente scomparendo. Questo non si è mai verificato nei genotipi suscettibili dove invece i sintomi indotti dal patogeno sono andati progressivamente aumentando sino a provocare, nella linea 1, quasi la morte delle piantine (Fig. 1.3.4 e 1.3.5).

La linea 18 individuata nel corso di questo elaborato risulta essere molto vantaggiosa in quanto caratterizzata da una resistenza elevata e stabile a FOB e da un fenotipo e un chemiotipo simile rispetto a quelli dei genotipi appartenenti al germoplasma di LA

SEMIORTO Sementi. E' potenzialmente utilizzabile come parentale in un programma mirato all'introgessione della resistenza in altri genotipi di interesse.



Fig. 1.3.5 – Reazione delle linee fornite da LA SEMIORTO Sementi all'inoculazione artificiale con FOB in confronto agli stessi genotipi non inoculati (terrina a destra).

In prospettiva, il genotipo 18 può essere inoltre ibridato con il n. 19, altamente resistente a *P. belbahrii*, per ottenere una resistenza multipla a entrambe le malattie, fusariosi e peronospora. Entrambi i genotipi sono tra l'altro interessanti in quanto posseggono le caratteristiche del basilico apprezzato dal mercato italiano.

CAP. 2

MASCHIO STERILITÀ PER LA PRODUZIONE DI SEME IBRIDO DI FINOCCHIO

2.1 INTRODUZIONE

In finocchio non è stato mai riportato alcun sistema di maschio sterilità genetica o GMS mentre sono stati individuati mutanti CMS utilizzati sin dagli anni '60 per lo sviluppo di ibridi F₁ (Quagliotti *et al.*, 1968; Ramanujam e Tewari, 1970), che oggi rappresentano il 95% delle sementi commercializzate per la produzione di finocchio coltivato (<https://european-seed.com/2015/10/modernising-fennel/>).

I primi studi volti alla caratterizzazione della maschio sterilità in finocchio sono stati effettuati da Colla (1995) che ha individuato un mutante maschio sterile proveniente dalla zona di Tarquinia (Viterbo). L'analisi istologica delle antere del mutante ha evidenziato una maschio sterilità sporigena post-meiotica mentre la ereditarietà materna del carattere ha consentito di classificarla come maschio sterilità citoplasmatica (*Fig. 2.1*). Il secondo lavoro riguarda la tesi di dottorato di Gargiulo 2008, dove è stata effettuata un'analisi del genoma totale con marcatori AFLP, ma non sono stati trovati polimorfismi associati al carattere della maschio sterilità (*Fig. 2.1*).



Fig. 2.1 – Stato dell'arte sulla maschio sterilità in finocchio.

Tuttavia, il meccanismo molecolare alla base della CSM in linee maschiosterili di finocchio è stato analizzato solo recentemente da Palumbo *et al.* (2020) in un lavoro pubblicato durante il periodo del presente Dottorato di Ricerca (*Fig. 2.1*). Gli autori, per identificare la presenza di varianti potenzialmente responsabili della CMS, hanno messo a confronto la sequenza dei genomi mitocondriali di un genotipo maschio sterile e di uno maschio fertile ricostruita a partire da *reads* presenti in banca dati. Tra le diverse varianti identificate è stata osservata la presenza di una delezione di circa 300 bp nel gene *atp6* della linea maschio sterile oggetto di studio; la delezione era assente nel maschio fertile. L'approccio basato sull'analisi comparativa tra genomi mitocondriali in linee maschio fertili e maschio sterili è stato ampiamente usato da vari autori in specie diverse (Heng *et al.* 2014; Li *et al.* 2018; Kim *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019; Palumbo *et al.* 2020).

Il medesimo approccio è stato utilizzato nel presente lavoro di dottorato, nel corso del quale è stato ottimizzato un metodo di estrazione del DNA mitocondriale (mtDNA) applicato all'isolamento del mtDNA da una linea maschio sterile e da una maschio fertile di finocchio sottoposto poi a sequenziamento, assemblaggio ed analisi delle varianti.

La comprensione delle basi genetico-molecolari della maschio sterilità assieme alla possibilità di sviluppare eventuali marcatori molecolari associati a tale carattere potrebbe fornire importanti e utili strumenti per la produzione di ibridi F₁ e consentire la selezione di nuove fonti di maschio sterilità, qualora determinate dallo/dagli stessi gene/i individuato/i.

2.2 MATERIALI E METODI

Nel corso del presente lavoro sperimentale sono state utilizzate due linee isogeniche di finocchio, una maschio sterile e una maschio fertile, fornite dall'azienda sementiera LA SEMIORTO Sementi e regolarmente utilizzate dalla ditta per la produzione di seme ibrido. La linea maschio sterile deriva da un genotipo locale isolato a Tarquinia e sviluppato dal Prof. Saccardo e successivamente studiato dal

Prof. Colla nella sua tesi di laurea. Trattandosi di linee isogeniche differiscono esclusivamente per il carattere maschio sterilità che si manifesta per la sola assenza del polline (Fig. 2.2).

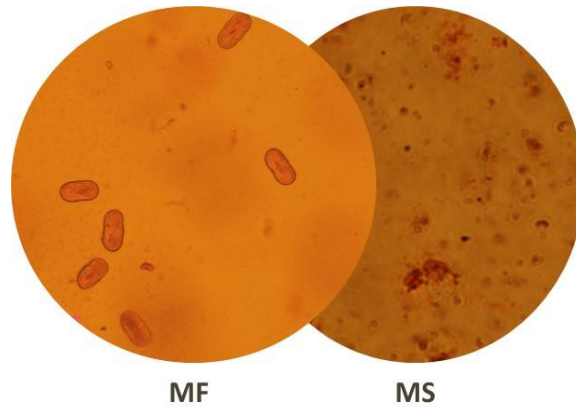


Fig. 2.2 – Vitalità del polline dopo colorazione con il carminio acetico (polline vitale nel genotipo MF e assente nel MS)

2.2.1 ESTRAZIONE DNA MITOCONDRIALE

Per l'estrazione del DNA mitocondriale è stato sviluppato un nuovo protocollo ottenuto dalla combinazione del metodo descritto da Ahnmed *et al.* (2015) e da Chaudhary *et al.* (2015); il protocollo si compone di una prima fase di isolamento dei mitocondri seguita dall'estrazione del DNA mitocondriale.

➤ Separazione mitocondri

L'estrazione dei mitocondri è avvenuta a partire da tessuto fogliare fresco. Due grammi di tessuto fogliare per campione sono stati pestellati in un mortaio in azoto liquido e successivamente, a ciascun campione, sono stati aggiunti 20 ml di tampone d'estrazione EB (Extraction Buffer: 0,4 M saccarosio, 50 mM EDTA, 50 mM Tris HCl, 1% di BSA, 10 mM β -mercaptoetanol pH 7.5). La sospensione è stata quindi trasferita in un tubo Falcon da 50 mL e centrifugata a 1000 g a 4°C per 6 minuti, per favorire il "pellettamento" dei nuclei.

Il surnatante è stato poi recuperato, filtrato con Miracloth (cat. n. 475855, Darmstadt, Germany), trasferito in una nuova Falcon e sottoposto a centrifugazione a 3.000 g a 4°C per 6 minuti, per favorire la separazione dei cloroplasti. Dopo un secondo

recupero del surnatante e una nuova centrifugazione a 3000 g a 4°C per 6 minuti, il surnatante è stato suddiviso in circa 10 tubi Eppendorf da 2 mL e centrifugato a 14.000 rpm a 4°C per 15 minuti. Il pellet contenente i mitocondri è stato risospeso in 43,7 µl di tampone GM (Grinding Medium: 0,5 M saccarosio, 1mM EDTA, 70mM KH₂PO₄, 0,8% di BSA, pH 7,5). I campioni sono stati riuniti 4 a 4 in modo da ridurre il numero dei tubi ed ottenere un volume finale pari a 175 µl/campione per poi essere sottoposti alla digestione del DNA nucleare utilizzando il kit della Quiagen (cat. N°. 79254). Seguendo le indicazioni del produttore, a ciascun campione sono stati aggiunti 30 µl di una soluzione composta da 20 µl di tampone RDD e 10 µl di DNase e, dopo incubazione a 30°C per 30 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 17.200 g a 4°C per 20 minuti.

➤ Isolamento DNA mitocondriale

L'estrazione del DNA mitocondriale è stata effettuata con piccole modifiche utilizzando il kit della Qiagen QIAamp DNA mini kit (Cat N°. 51304) seguendo il protocollo relativo alla "Purificazione di DNA da tessuti" (3° edizione giugno 2012). Il pellet ottenuto dopo l'ultima centrifugazione è stato risospeso in una soluzione costituita da 80 µl di PBS e 100 µl di tampone ATL fornito dal kit. Quindi, dopo l'aggiunta di 20 µl di Proteinasi K per campione, i campioni sono stati lasciati in incubazione a 56°C per tutta la notte. Il giorno successivo, dopo un rapido trattamento (2 minuti a temperatura ambiente) con RNase A (Qiagen, cat. no. 19101), i campioni sono stati diluiti con 200 µl/campione di buffer AL e posti in incubazione a 70°C per 10 minuti. Quindi sono stati aggiunti 200 µl di etanolo al 96% e si è proceduto a caricare i campioni sulle *Mini Spin Column* fornite dal Kit seguendo le indicazioni del produttore per il recupero del DNA mitocondriale. Allo scopo di aumentare la resa del DNA, l'eluizione finale è stata ripetuta 3 volte caricando in sequenza sulle colonnine 80µl, 60µl e 60 µl di acqua sterile (microfiltrata) *nucleasi free*, procedendo, tra una aggiunta e l'altra, ad una incubazione dei campioni a temperatura ambiente per 5 minuti e alla loro centrifugazione a 6.000 g a 14°C per 1 minuto.

2.2.2 ANALISI DNA

La quantità di DNA estratto è stata determinata attraverso analisi fluorimetrica al Qubit (Invitrogen), seguendo le indicazioni del costruttore e utilizzando il kit Qubit™ ds DNA HS Assay Kit (Cat. N° Q32851) specifico per la misurazione di basse concentrazioni di DNA. La qualità del DNA, limitatamente alla sua integrità, è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% (p/v) in tampone TBE 1x (0.045M Tris-Borato, 0.001M EDTA, pH 8) per circa 40 minuti a 80V.

2.2.3 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La presenza di DNA mitocondriale e l'eventuale contaminazione da DNA nucleare e plastidiale nel DNA estratto è stata analizzata qualitativamente mediante amplificazione PCR con *primers* specifici per geni localizzati, rispettivamente sul genoma mitocondriale, nucleare e cloroplastico. I geni e i *primers* utilizzati sono quelli descritti da Ahnmed *et al.* (2015) e riportati in *Tab. 2.1*.

Tab. 2.1 – Geni-genoma specifici e *primers* utilizzati

Organello	Gene	Simbolo	Forward (5' to 3') / Reverse (5' to 3')
Mitocondrio	Citocrome C ossidasi I	COX1	TTTCATCTTCGGTGCCATTGCAGG /ACCTATCATCGCCGGCATAACCAT
Cloroplasto	Rubisco- grande subunità	RBCL	ACGATGCTATCACATCGAGCCTGT /AACGTAGAGCACGTAGGGCTTTGA
Nucleo	Actina	Actina	GAATCCATGAGACCACTAC /AATCCAGACACTGTACTTCC

Le reazioni di amplificazione del DNA mediante PCR sono state eseguite in un volume finale di 25 µl utilizzando 12,5 µl di una “master mix” già pronta contenente il tampone, i nucleotidi e la Taq polimerasi (2x PCR Master Mix, abm) alla quale sono stati aggiunti (a) i *primers* specifici, per i diversi geni indicati in tabella ad una concentrazione 10 µM; (b) 40ng di DNA mitocondriale a reazione e infine (c) acqua al raggiungimento del volume finale. Le reazioni di amplificazione sono state condotte

in un *thermal cycler Eppendorff*, alle seguenti condizioni: 5min a 95°C per la denaturazione iniziale dei filamenti, 30 cicli 95°C per 30sec, 55°C (per actina) o 60°C (per COX1 e RBCL) per 30 sec e 72°C per 1 min, seguito da 7 min finali a 72°C per l'allungamento dei filamenti. I prodotti generati dall'amplificazione PCR sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% (p/v) in tampone TBE 1X, a 80V per 50min. I prodotti di amplificazione colorati con GelRed (Biotium) sono stati visualizzati mediante trans-illuminatore ad illuminazione ultravioletta e fotografati.

2.2.4 SEQUENZIAMENTO DNA MITOCONDRIALE

Il sequenziamento del DNA mitocondriale è stato eseguito dalla ditta Biodiversa s.r.l. di Rovereto (Trento) alla quale sono stati inviati circa 0,8 µg di mtDNA per la linea maschio sterile e 1 µg di mtDNA per la linea maschio fertile.

La ditta ha utilizzato la piattaforma Illumina HiSeq e Novaseq per l'analisi di "*reads pair end*" 2x150 bp. La rimozione degli adattatori è stata eseguita mediante il software TRIMMOMATIC mentre l'assemblaggio delle *reads* è stato realizzato utilizzando il software NOVOPLASTY, un software specifico per assemblare genomi corti e circolari. Per l'assemblaggio sono stati utilizzati, inoltre, come "*seed*", il genoma mitocondriale di carota (*Daucus carota* L.) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_017855.1) e, come riferimento, la sequenza del genoma mitocondriale di una linea maschio sterile di finocchio pubblicata da Palumbo *et al.* (2020). La ridondanza nell'assemblaggio è stata ridotta e la qualità incrementata utilizzando il programma CAP3 (CONTIG ASSEMBLY PROGRAM) (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>).

La statistica generale per la valutazione dell'assemblaggio è stata effettuata mediante il software QUAST (<https://sourceforge.net/projects/quast/>).

2.2.5 ANNOTAZIONE E CHIAMATA DELLE VARIANTI

Per l'annotazione dei genomi è stato utilizzato il software GeSeq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>) sviluppato per una rapida e accurata annotazione del genoma degli organelli.

La “chiamata delle varianti” è stata condotta mettendo a confronto l’annotazione del campione maschio fertile, usato come *reference*, con la linea maschio sterile, utilizzando il software PLATYPUS, progettato per il rilevamento efficiente ed accurato di SNPs, MNPs, indels, sostituzioni e delezioni fino a diversi kb (<https://www.well.ox.ac.uk/research/research-groups/lunter-group/lunter-group/platypus-a-haplotype-based-variant-caller-for-next-generation-sequence-data>). Le *reads* del campione maschio sterile sono state mappate contro l’assemblaggio del campione maschio fertile per ottenere il file BAM e individuare le diverse tipologie di varianti.

Le analisi comparative tra sequenze nucleotidiche corrispondenti a regioni/geni d’interesse sono state eseguite utilizzando lo strumento disponibile sul sito NCBI “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLASTN) o il programma GENEIOUS PRIME della Biomatters LTD (<https://www.geneious.com/prime/>). Il programma GENEIOUS PRIME 2021.1.1 è stato utilizzato anche per la ricerca di possibili Open Reading Frame (ORF) nelle regioni di interesse. A tal fine sono stati usati tutti e tre gli “start codon” ATG, CTG e TTG.

2.2.6 GENOMA PLASTIDIALE

L’assemblaggio delle *reads* di DNA cloroplastico, presenti come “contaminanti” nei campioni di DNA mitocondriale, è stato eseguito utilizzando il software NOVOPLASTY 4.2, adottando sia come *seed* che come *reference* la sequenza del DNA cloroplastico di finocchio (NC-029469.1) reperita sul sito del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sono stati inoltre specificati i seguenti parametri: rilevamento automatico della dimensione dell’inserito, intervallo di dimensioni del genoma da 120.000 a 180.000 bp e un valore di K-mer pari a 39.

Il genoma cloroplastico è stato annotato utilizzando il software GeSeq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>) e come riferimento la sequenza identificata con NC_029469.1. Il software OGDRAW (*Organelle Genome Draw*) è stato infine impiegato per la visualizzazione grafica del DNA circolare.

La comparazione del genoma mitocondriale con quello plastidiale disponibile in NCBI (NC-029469.1) è stata eseguita con BLAST (NCBI) e con il programma D-GENIES

(<http://dgenies.toulouse.inra.fr/>) mentre per la rimozione delle sequenze plastidiali dai contig del DNA mitocondriale è stato utilizzato il programma GENEIOUS PRIME <https://www.geneious.com/prime/>

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1 ESTRAZIONE DEL DNA

Il metodo di estrazione di DNA, sviluppato nel corso del presente dottorato, ha consentito di ottenere una quantità media di DNA mitocondriale pari a circa 100 ng, partendo da 2 g di tessuto fogliare fresco sia per il campione maschio sterile che per quello maschio fertile. L'analisi elettroforetica del DNA estratto ha evidenziato l'assenza di degradazione nella maggior parte dei campioni analizzati.

2.3.2 PCR E ANALISI PUREZZA DEL DNA MITOCONDRIALE

Allo scopo di confermare l'avvenuta estrazione del DNA mitocondriale e valutare la presenza di DNA "contaminante" (di origine nucleare e/o cloroplastica), sono state eseguite amplificazioni PCR sul DNA isolato utilizzando *primers* specifici per geni localizzati sul genoma nucleare, cloroplastico e mitocondriale.

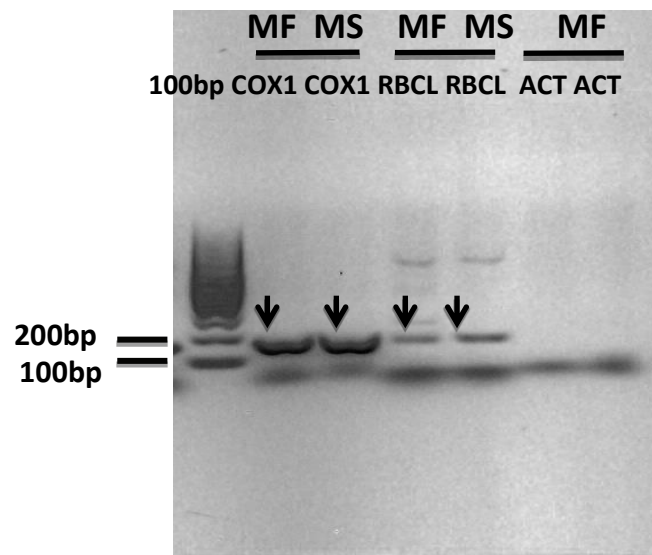


Fig. 2.3 - Gel di agarosio 1,5% su cui sono stati frazionati i prodotti di amplificazione del DNA mitocondriale ottenuti con gli oligonucleotidi disegnati sui geni *COX1* (genoma mitocondriale), *RBCL* (genoma plastidiale), *ACT* (genoma nucleare). MF= maschio fertile, MS= maschio sterile. Le frecce indicano i prodotti di amplificazione attesi.

Come mostrato in *Fig 2.3*, la presenza di mtDNA è confermata dalle intense bande amplificate con i *primers* per il gene *COX1* localizzato sul DNA mitocondriale. Ampliconi di minore intensità sono visibili anche per il DNA cloroplastico (gene *RBCL*) mentre il DNA nucleare appare assente o non rilevabile nei campioni analizzati.

2.3.3 SEQUENZIAMENTO E ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE

I dati generali relativi al sequenziamento del DNA mitocondriale isolato dalle due linee di finocchio, maschio sterile (MS) e maschio fertile (MF), sono riportati in *Tab. 2.2*.

Tab. 2.2 - Dati di sequenziamento e assemblaggio

Linee	MS	MF
<i>Raw Reads Pairs</i>	90,005,509	86,372,957
No. of <i>contig</i>	9	4
GC (%)	45,15	42,45
N50	85,272	335,011
<i>Longest contig</i>	169,035	335,011
"Genome size" bp	420,068	438,840

I risultati relativi all'annotazione sono riportati in *Tab. 2.3* da cui si evince che nella linea maschio-sterile sono stati individuati 258 geni e 167 Open Reading Frames (ORFs) mentre nella linea maschio-fertile 251 geni e 125 ORFs.

Tab. 2.3 - Geni e ORFs

Annotazione	MS	MF
Numero di geni	258	251
Numero di ORFs	167	125

La comparazione tra i dati relativi ai materiali oggetto di studio e quelli riportati in letteratura da Palumbo *et al.* (2020) ha rivelato una notevole differenza nelle dimensioni dei genomi mitocondriali e nel numero di geni individuati. In Palumbo *et*

al. (2020), infatti, il genoma della linea maschio sterile assemblato dagli autori in una molecola circolare è composto da 296.483 bp e presenta 58 geni annotati e 26 ORFs, mentre le linee fornite da LA SEMIORTO Sementi presentano “genomi”, per altro non completi, composti da 420.000 bp e 438.000 bp, rispettivamente per il MS e il MF, un numero di geni intorno a 250 e oltre 100 ORFs. Per approfondire le ragioni delle differenze osservate è stata intrapresa una collaborazione con lo stesso Dott. Fabio Palumbo (Università di Padova) e con il Dott. Giuseppe Aprea (ENEA), grazie alla quale è stato possibile confrontare gli assemblaggi dei diversi genomi mitocondriali o *drafts* disponibili. L’analisi comparativa ha rivelato che, nelle nostre linee, il DNA cloroplastico era stato erroneamente “assemblato” dalla ditta BIODIVERSA insieme al DNA mitocondriale. In Fig. 2.4 l’analisi “BLAST” tra il genoma plastidiale di finocchio presente in banca dati e il *contig 3*, derivante dall’assemblaggio del nostro campione maschio fertile e utilizzato nelle diverse comparazioni perché presenta un assemblaggio migliore rispetto alla linea maschio sterile, conferma l’errore.

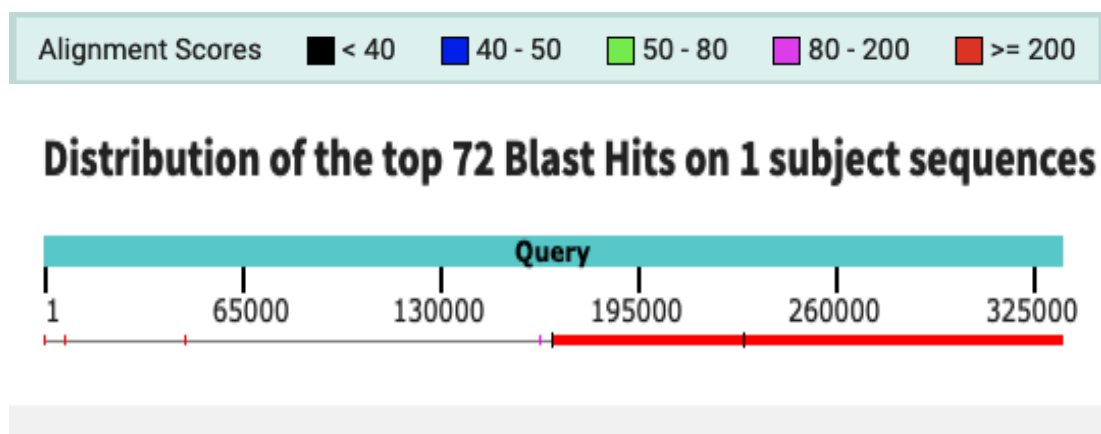


Fig. 2.4 - Allineamento del *contig 3* della linea MF (Query) con la sequenza del DNA cloroplastico di finocchio NC_029469.1 disponibile in banca dati (NCBI). (in rosso è indicata la regione di massima omologia (100%) tra la Query e la sequenza plastidiale).

Dopo aver rimosso dal *contig 3* (linea MF) la sequenza del DNA cloroplastico (cpDNA) composta da 153,626 bp e localizzata nella porzione terminale del *contig 3* (dalla posizione 167,162 a 335,000 circa), come si evince dalla Fig. 2.4, la dimensione del DNA mitocondriale risulta di circa 285.214 bp, un dato simile alle 296.483 bp riportate

2.3.4 ANALISI DELLE VARIANTI

Dopo l'eliminazione della regione corrispondente al DNA cloroplastico, i *contigs* della linea MS sono stati allineati a quelli della linea MF, utilizzata come *reference*, allo scopo di identificare polimorfismi tra le due linee nella sequenza del DNA mitocondriale. Sono stati identificati 45 *Single Nucleotide Variants* (SNVs), 12 *Multiple Nucleotide Variants* (MNVs), 7 Inserzioni/delezioni (INDELS) di singoli nucleotidi e infine 12 delezioni e 3 inserzioni di brevi sequenze nucleotidiche, la maggior parte delle quali ricadono in regioni inter-geniche. A differenza di quanto riportato da Palumbo *et al.* (2020), che descrivono una delezione di 300 bp a carico del gene *atp6* nella linea maschio sterile analizzata, i dati ottenuti per le nostre linee non mostrano alcuna delezione in questo gene, come si evince in Fig. 2.6 dall'analisi "BLAST" delle diverse sequenze disponibili del gene *atp6* di finocchio.

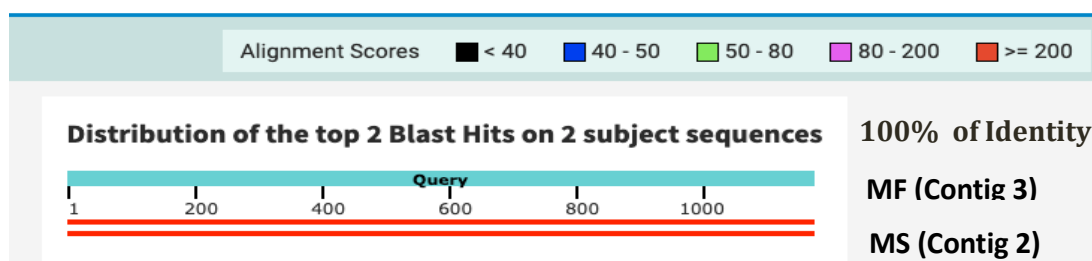


Fig. 2.6 - Allineamento tra la sequenza del gene *atp6* riportata da Palumbo (*et al* 2020) (Query) e la sequenza, per lo stesso gene, individuata nel *contig* 3 della linea maschio fertile e nel *contig* 2 della linea maschio sterile fornite dalla ditta LA SEMIORTO Sementi.

Tra i polimorfismi di potenziale interesse riguardo la maschio sterilità citoplasmatica, un'inserzione di 7 bp, con sequenza GTTTTTA, è stata individuata nella nostra linea maschio sterile, localizzata nella regione a monte del gene *COX1*.

In Fig. 2.7 è riportato l'allineamento di parte della regione a monte del gene *COX1*, tra i nostri materiali, le accessioni sequenziate da Palumbo *et al.* (2020) e le sequenze disponibili in banca dati per specie affini al finocchio, quali *Daucus carota* e *Bupleurum falcatum*. Tale allineamento ha evidenziato la presenza dell'inserzione

GTTTTTA solamente nelle 2 linee maschio sterili analizzate mentre è totalmente assente in tutte le linee/specie maschio fertili esaminate finora.



Fig. 2.7 – Nel riquadro l’allineamento della regione a monte del gene *COX1*. Nell’ordine dall’alto verso il basso: sequenza consenso, contig 2 della linea maschio sterile MS di LA SEMIORTO Sementi; sequenza linea maschio sterile MS di Palumbo *et al.* (2020); sequenza linea maschio fertile MF di LA SEMIORTO Sementi, sequenza NC_017865.1:190328 -191824_COX1 di *Daucus carota*; sequenza NC_035962.1 273620-275203 di *Bupleurum falcatum*

Un’analisi bioinformatica più dettagliata ed estesa a 5000 bp a monte del gene *COX1* ha consentito di individuare una inserzione di circa 1000 bp e la presenza di nuove ORF nelle sole linee maschio sterili (sia in quella appartenente alla ditta LA SEMIORTO Sementi che quella usata da Palumbo *et al.*, 2020); una elevata omologia tra tutte le linee è di nuovo presente tra i geni *rsp7*, a monte della regione oggetto di studio (Fig. 2.8).

COX1 è un gene che codifica per una delle 3 catene fondamentali che compongono la citocromo-c ossidasi, un enzima appartenente al complesso IV della catena di trasporto degli elettroni e coinvolto nel metabolismo energetico della cellula. Alterazioni a carico del gene *COX1* sono state associate alla maschio sterilità citoplasmatica in alcune specie come il *Sorghum bicolor* o il *Raphanus sativus* (Horn *et al.*, 2014). Ikeda e Tunesaky (1996), in piante di grano con citoplasma proveniente da *Aegilops columnaris*, riportano riarrangiamenti nelle regioni fiancheggianti il gene

COX1 che possono modificare la sua trascrizione e conseguentemente l'attività della citocromo-c ossidasi.

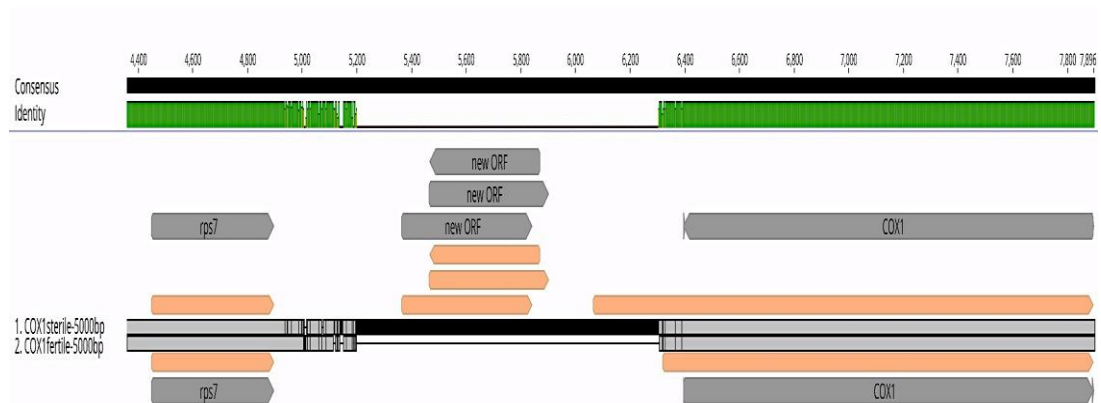


Fig. 2.8 - Allineamento tra le sequenze dei geni *COX1* e *rps7* e della regione compresa tra i due geni, linea MS (1) e MF (2) della ditta LA SEMIORTO Sementi. Una inserzione di circa 1000 bp e nuove ORFs sono visibili nella linea maschio sterile.

L'ipotesi che alterazioni a carico di geni coinvolti nella catena respiratoria possano portare alla sterilità maschile è stata verificata da Shaya *et al.*, (2012) attraverso l'espressione transgenica di geni mitocondriali troncati (*atp4*, *cox1* e *rps3*) all'interno delle cellule del *tapetum* di tabacco, i quali in effetti inducevano la sterilità maschile. Tali osservazioni suffragano l'ipotesi che l'alterazione osservata nella regione fiancheggiante e, presumibilmente promotrice del gene *COX1*, possano essere all'origine della maschio sterilità citoplasmatica osservata sia nella linea MS di finocchio fornita da LA SEMIORTO Sementi che in quella analizzata da Palumbo *et al.* (2020), aventi una probabile origine comune. Essendo il gene *COX 1* coinvolto nel metabolismo energetico, infatti, una sua possibile alterazione o una variazione nel livello della sua espressione, potrebbero comportare una riduzione dell'energia prodotta e disponibile per la cellula. Considerando che lo sviluppo del polline è fortemente dipendente da un alto apporto energetico, disturbi nella funzione mitocondriale potrebbero avere effetti inibenti sulla fertilità pollinica (Chen *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2013), attraverso la prematura degenerazione del tappeto delle antere e la conseguente comparsa di mutanti maschio sterili. Futuri studi relativi

all'espressione del gene *COX1* nelle diverse fasi dello sviluppo dell'infiorescenza, potrà fornire ulteriori chiarimenti sui meccanismi alla base della CMS in finocchio.

CAP. 3

MIGLIORAMENTO DEL POTERE GERMINATIVO DEL SEME DI FINOCCHIO

3.1 INTRODUZIONE

Il seme del finocchio ha una maturazione scalare per cui, con la raccolta meccanizzata (effettuata in un'unica soluzione), si ottengono generalmente lotti di seme con un diverso grado di maturazione e quindi con una germinazione non uniforme. Con l'obiettivo di migliorare tale uniformità di germinazione, è stata considerata la possibilità di effettuare dei trattamenti di *priming*. Il *priming* infatti innesca il metabolismo pre-germinativo e può uniformare i semi allo stesso stadio fenologico di incipiente protrusione della radichetta, eliminando eventuali differenze legate al diverso stadio di maturazione raggiunto dal seme. Ci sono diversi agenti di *priming* attraverso i quali è possibile raggiungere il suddetto obiettivo e, tra questi, recentemente esiste un grande interesse nei confronti delle matrici a base di sostanze naturali in grado di fornire una soluzione innovativa, conveniente ed ecologica per migliorare la qualità dei semi e la salute delle colture.

Su queste basi è stata avviata una sperimentazione nell'ambito della collaborazione tra l'azienda LA SEMIORTO Sementi e il Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali dell'Università della Tuscia, applicando biostimolanti appartenenti alla categoria degli idrolizzati proteici. Questi sono stati ottenuti in seguito ad idrolisi enzimatica di sostanze naturali derivate da piante e/o parti di pianta; contengono polipeptidi a basso peso molecolare, peptidi e, in quantità minore, amminoacidi e ammoniaca.

3.2 MATERIALI E METODI

Sono state realizzate due prove, la prima *in vitro* e la seconda *in vivo* rispettivamente presso il laboratorio della Banca del Germoplasma della Tuscia (BGT) e presso l'Azienda Agraria Didattico Sperimentale "Nello Lupori" dell'Università degli Studi

della Toscana, dove sono stati effettuati i diversi trattamenti al seme della varietà di finocchio Di Sarno selezione Precoce, lotto TVS 166 campagna 2019/20, fornito dalla ditta LA SEMIORTO Sementi. Si tratta di una varietà produttiva con grumolo compatto di forma rotonda e media pezzatura, con guaine spesse, carnose e internamente bianche (Fig. 3.1) e foglie a portamento eretto; la semina viene effettuata tra il 10 e il 20 luglio per la raccolta in novembre-dicembre.

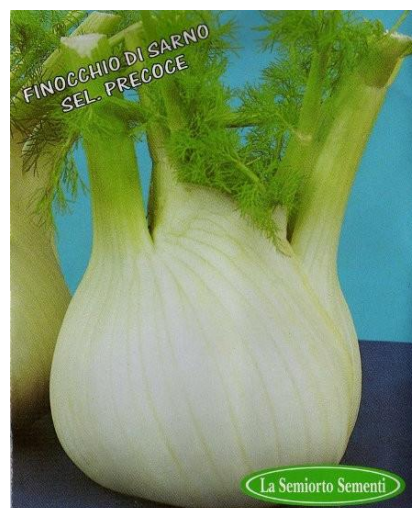


Fig. 3.1 – Varietà di finocchio utilizzata per il trattamento di *priming*.

Da febbraio a novembre 2019 è stata condotta la prova *in vitro* con l'obiettivo di valutare l'effetto, in termini germinativi, di 14 diverse tipologie di idrolizzati proteici (Tab. 3.1), tutti ottenuti attraverso il procedimento di idrolisi enzimatica. Questi sono stati applicati sui semi di finocchio a sei differenti concentrazioni e in condizioni controllate, a confronto con un trattamento di *hydropriming* (immersione dei semi in acqua distillata per 24 ore a 20°C con aereazione continua).

Tab. 3.1 – Indicazioni sulla famiglia botanica e sulla specie vegetale utilizzata per la produzione degli idrolizzati proteici impiegati nelle prove di *priming*

Trattamento	Provenienza dell'idrolizzato proteico	Specie
To	Leguminose	pisello
Tr	Leguminose	fava
A	Leguminose	cece
B	Leguminose	fagiolo
C	<i>Solanaceae</i>	residui di pomodoro
D	<i>Solanaceae</i>	residui di patata
E	Leguminose	erba medica
F	Cereali	mais
G	<i>Brassicaceae</i>	colza
H	Leguminose	lupino
I	Leguminose + micronutrienti	lupino

L	Leguminose + micronutrienti	fagiolo
M	Leguminose + micronutrienti	pisello
N	Leguminose + urea	fagiolo

La prova *in vivo* è stata invece eseguita ad ottobre 2020 all'interno di una serra in polietilene con l'obiettivo di validare l'effetto degli idrolizzati proteici risultati migliori nello *screening in vitro*. Nelle stesse condizioni, in serra, sono stati messi a confronto semi trattati 20 giorni e 210 giorni prima della semina.

Sia per la prova *in vitro* che per quella *in vivo*, i diversi idrolizzati proteici sono stati applicati alle seguenti concentrazioni: 62,5 mg/L, 125 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L, 2000 mg/L. Per ogni concentrazione erano previste 5 repliche di 20 semi ognuna, per un totale di 100 semi per concentrazione, adottando un disegno sperimentale a randomizzazione completa. Anche in questo caso è stato considerato un trattamento di *hydropriming* con immersione dei semi in acqua distillata per 24 ore a 20°C ed aereazione continua.

Il protocollo relativo all'applicazione del trattamento di *biopriming* è stato il seguente:

- immersione dei semi in sospensioni di idrolizzato proteico per 24 ore a 20°C, utilizzando tubi Falcon da 50 ml posti in rotazione su un rotatore Thermo Scientific in grado di garantire l'ossigenazione del seme (Fig. 3.2);



Fig. 3.2 – Trattamento dei semi di finocchio (a) con idrolizzati proteici a diverse concentrazioni, (b) immersione all'interno di tubi Falcon e (c) rotazione in rotatore.

- b. successivo passaggio dei semi al setaccio, lavaggio per 3 minuti in acqua corrente e immersione per 1 minuto in acqua distillata in modo da allontanare eventuali residui di sali;
- c. essiccamento in un incubatore Panasonic MIR-154PE contenente gel di silice alla temperatura di 22-23°C per 5 giorni (Fig. 3.3) fino al raggiungimento del contenuto idrico iniziale, pari al 9% del peso (tale valore è stato determinato utilizzando una bilancia termostatica VWR).



Fig. 3.3 - Germinazione *in vitro* dei semi dopo trattamento con idrolizzati proteici (a sinistra) e successivo essiccamento dei semi trattati in incubatore (a destra).

3.2.1 Prova *in vitro*

A due giorni dal trattamento di *priming*, i semi sono stati posti in piastre Petri su substrato contenente agar 1% (p:v) e sono stati incubati al buio, alla temperatura di 22°C in incubatore Panasonic MIR-154PE, per un periodo massimo di 2 settimane (Fig. 3.3).

I semi sono stati considerati germinati quando la lunghezza della radichetta era pari a 2/3 della lunghezza del seme. Per l'osservazione dei semi è stato utilizzato uno stereomicroscopio Nikon SMZ 1000.

3.2.2 Prova *in vivo*

I semi, trattati con idrolizzati proteici 20 e 210 giorni prima della semina, sono stati posti a germinare in contenitori da 216 alveoli su substrato di coltivazione a base di torba. La temperatura all'interno della serra era di 22°/18°C e i semi sono stati mantenuti in condizioni di fotoperiodo naturale. Per l'irrigazione si è ricorso alla nebulizzazione, garantendo la continua e uniforme bagnatura del substrato di germinazione (Fig. 3.4). L'andamento della germinazione è stato valutato per 18 giorni.



Fig. 3.4 – Prova *in vivo* nella serra dell'Azienda Agraria Didattico Sperimentale "Nello Lupori" dell'Università degli Studi della Toscana

Le *performance* di germinazione sono state misurate determinando la percentuale di germinazione finale, il tempo medio di germinazione (TMG) e il coefficiente di velocità di germinazione (CVG), secondo quanto proposto da Kadder *et al.* (2005).

La percentuale di germinazione finale esprime il numero di semi germinati sul totale dei semi seminati x 100.

Il tempo medio di germinazione o TMG esprime il numero di giorni impiegati mediamente dai semi per germinare ovvero

$$TMG = \sum(n_1 \times d_1) / N_1$$

dove n_1 , è il numero di semi germinati al giorno i-esimo, d_1 il numero d'ordine del giorno i-esimo, N_1 il numero di semi germinati.

Il coefficiente di velocità di germinazione da' un'indicazione della rapidità di germinazione ovvero

$$CVG = N \times 100 / \sum (N_1 + T_1)$$

dove N è il numero di semi posti a germinare, N_1 il numero di semi germinati il giorno i-esimo e T_1 il numero d'ordine del giorno i-esimo.

I dati sono stati sottoposti ad elaborazione statistica mediante analisi ANOVA della varianza e il test di Duncan ($P \geq 0,05$), quest'ultimo per determinare le differenze significative tra le medie.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3.1 Prova *in vitro*

Dalla prova *in vitro* è emerso che, tra le 14 tipologie di idrolizzati proteici saggiati, i trattamenti B ed N sono risultati differenti rispetto al controllo trattato in *hydropriming* sia per il TMG che per il CVG. Anche i trattamenti To, Tr, D, E, H ed I hanno fornito valori significativamente diversi rispetto al controllo per il CVG. Rispetto alla percentuale di germinazione, nessuno dei trattamenti con idrolizzato proteico ha mostrato differenze significativamente diverse rispetto al controllo.

In Fig. 3.5 sono evidenti le risposte diverse rilevate per i trattamenti selezionati B e N sia in termini di TMG (Fig. 3.5a) che di CVG (Fig. 3.5b). Nei grafici, le linee orizzontali rappresentano il valore di TMG e CVG ottenuti per il controllo in *hydropriming*, rispetto al quale sono stati normalizzati i valori dei singoli trattamenti con idrolizzati proteici.

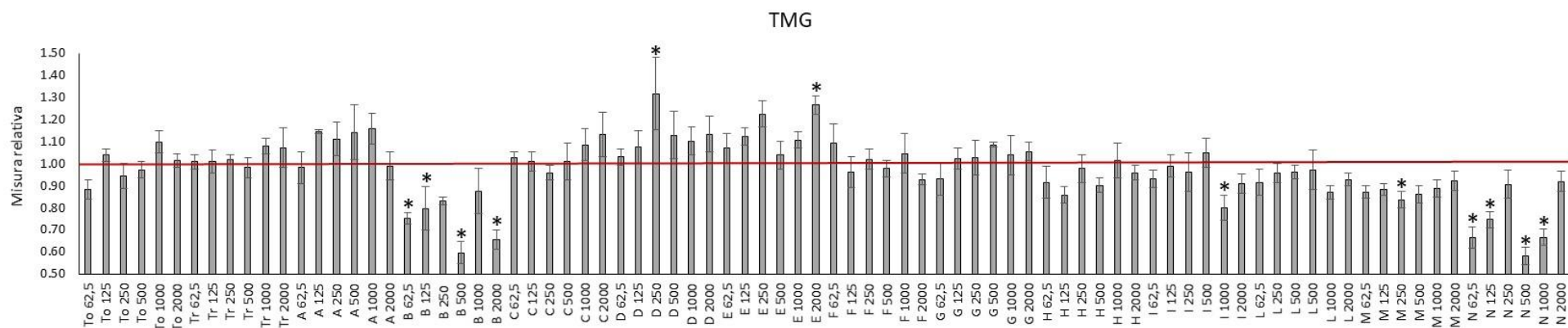


Fig. 3.5a – Effetto del trattamento *biopriming* con idrolizzati proteici diversi sulla germinazione *in vitro* di semi di finocchio (media $\pm$ errore standard). I dati sono espressi come TMG relativo rispetto al controllo trattato con H₂O (linea orizzontale). Gli asterischi indicano la significatività del trattamento rispetto al controllo.

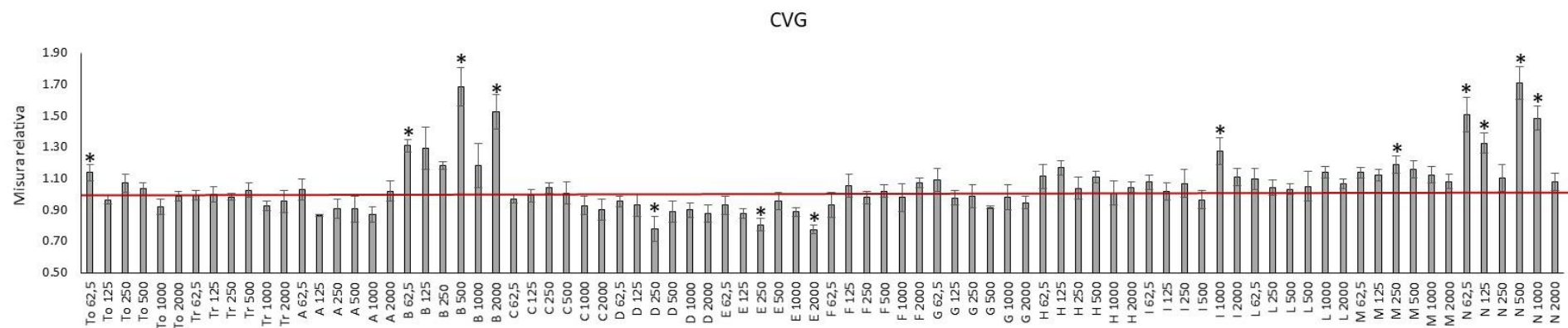


Fig. 3.5b – Effetto del trattamento *bioprimering* con idrolizzati proteici diversi sulla germinazione *in vitro* di semi di finocchio (media $\pm$ errore standard). I dati sono espressi come CVG relativo rispetto al controllo trattato con H₂O (linea orizzontale). Gli asterischi indicano la significatività del trattamento rispetto al controllo.

In Tab. 3.2 è invece riportata la percentuale di germinazione giornaliera dei trattamenti selezionati B e N e del controllo in *hydropriming* da cui si evince che i trattamenti B ed N, entrambi alla concentrazione di 500 mg/L, hanno fornito una migliore risposta germinativa con una percentuale rispettivamente del 42,39 e 48,42% già il primo giorno dopo la semina, quando il controllo in *hydropriming* era ancora caratterizzato da una percentuale di germinazione pari all'1,11%. Non sono state ottenute risposte diverse tra i trattamenti per la percentuale di germinazione finale; in quasi tutti i trattamenti, questa si era conclusa il 7° giorno dopo la semina e in alcuni casi si è prolungata fino al 13° giorno.

Tab. 3.2 – Percentuale di germinazione giornaliera dei trattamenti B e N e del controllo in *hydropriming* nella prova *in vitro*

Idrolizzato proteico	mg/l	% germinazione a giorni dalla semina (n.)								
		1	2	3	4	7	8	9	10	13
H ₂ O		1,11	46,67	81,11	93,33	98,89	0	0	0	0
B	62,5	8,42	73,68	86,31	88,42	89,47	0	0	0	0
B	125	20	73,68	82,10	86,31	89,47	0	0	91,58	0
B	250	12,50	62,50	85,23	92,05	93,19	94,33	0	0	0
B	500	42,39	84,78	91,30	92,39	93,48	0	0	0	0
B	1.000	15,29	61,17	84,70	88,23	91,76	0	0	92,94	94,12
B	2.000	41,05	76,84	87,37	93,69	0	94,74	0	0	0
N	62,5	8,42	73,68	86,31	88,42	89,47	0	0	0	0
N	125	20	73,68	82,10	86,31	89,47	0	0	91,58	0
N	250	12,50	62,50	85,23	92,05	93,19	94,33	0	0	0
N	500	42,39	84,78	91,30	92,39	93,48	0	0	0	0
N	1.000	15,29	61,17	84,70	88,23	91,76	0	0	92,94	0
N	2.000	41,05	76,84	87,37	93,69	0	94,74	0	0	0

In sintesi, il risultato ottenuto attraverso la prova *in vitro* indica che l'applicazione del *bioprimering* con idrolizzati proteici di leguminose è in grado di velocizzare il processo germinativo in finocchio ma non di incrementare la percentuale di germinazione finale.

➤ *Prova in vivo*

Dalla prova *in vivo* è emerso invece che, per quanto riguarda i semi trattati 20 giorni prima della semina, sono state osservate differenze significative per il CVG mentre i trattamenti non si sono differenziati significativamente per quanto riguarda la percentuale di germinazione e il TMG (Fig. 3.6.).

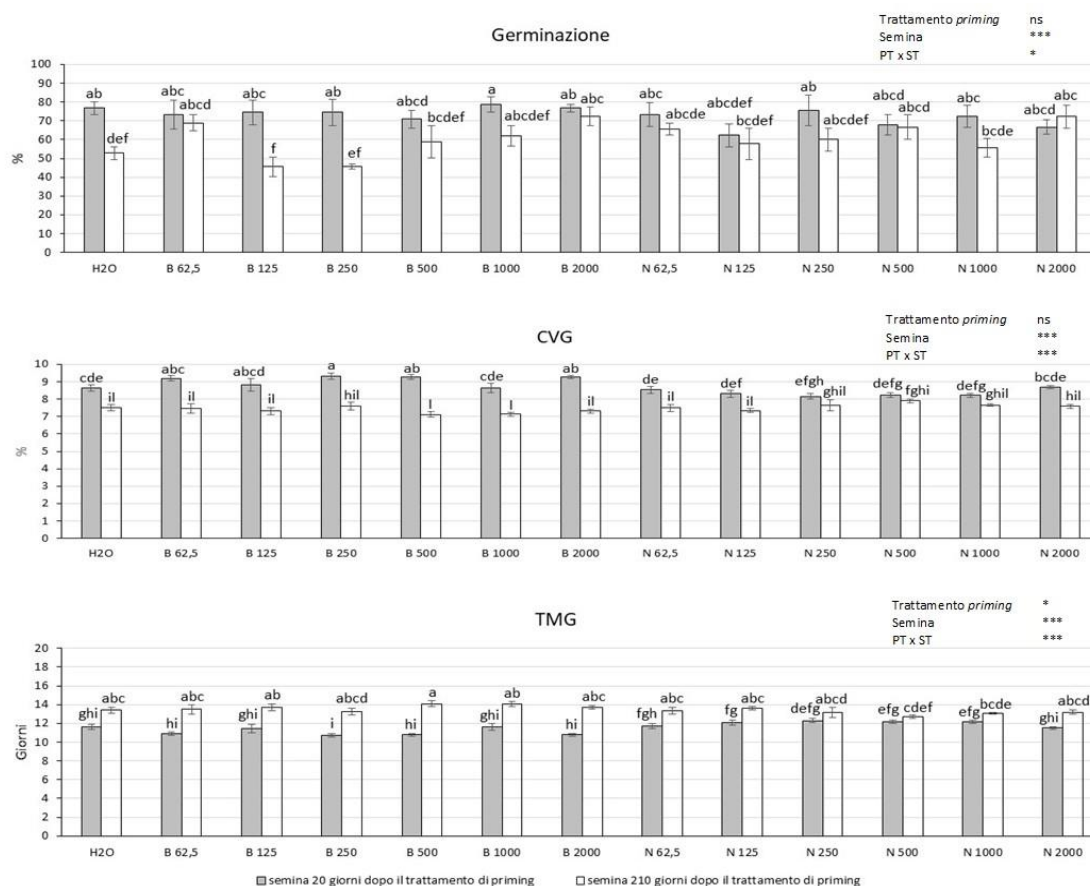


Fig. 3.6 – Prova *in vivo*: germinazione dei semi di finocchio dopo trattamento con idrolizzati proteici B e N.

Per i semi trattati 210 giorni prima della semina, ci sono state invece differenze statisticamente significative per tutti e tre i parametri presi in considerazione ossia per la percentuale di germinazione, per il TMG e per il CVG. E' pertanto risultata statisticamente significativa l'interazione fra trattamento *biopriming* ed epoca di semina.

In sostanza, i semi sottoposti a trattamento *biopriming* con idrolizzati proteici 210 giorni prima della semina hanno manifestato una migliore risposta germinativa in confronto ai semi sottoposti a trattamento *biopriming* 20 giorni prima della semina, ovviamente in considerazione dei rispettivi controlli. Per quanto riguarda la percentuale di germinazione i trattamenti B ed N alla concentrazione di 2000 mg/L sono quelli che hanno fornito una migliore risposta. Il trattamento N è stato inoltre caratterizzato da una percentuale di germinazione superiore rispetto allo stesso trattamento applicato ai semi 20 giorni prima della semina. Anche per il TMG i trattamenti che hanno risposto al meglio sono stati N 2000 mg/L ed N 500 mg/L. In merito al CVG, per i semi trattati 20 giorni prima della semina i valori più elevati sono stati forniti dal trattamento B alla concentrazione di 250, 500 e 2000 mg/L mentre, per i semi trattati 210 prima della semina, la migliore risposta è stata fornita dal trattamento N alla concentrazione di 250, 500 e 2000 mg/L, confermando in generale una maggiore efficacia per i trattamenti alle dosi più elevate.

CONCLUSIONI

Lo studio di specie minori come il finocchio e il basilico è spesso trascurato a causa della scarsa importanza economica percepita; questo rende tali colture vulnerabili ad un rapido declino anche a causa dell'introduzione di nuovi agenti patogeni e della carenza di innovazioni sia varietali che tecnologiche. Attraverso le attività del dottorato di ricerca si è cercato di sviluppare innovazioni in questo ambito atte a migliorare le filiere produttive di entrambe le specie.

Nei confronti di *S. sclerotiorum* in finocchio, tra i pochi genotipi analizzati, non sono state individuate resistenze a questo fungo fitopatogeno come tra l'altro non sono neanche riportate in letteratura. E' stato tuttavia messo a punto un idoneo metodo di inoculazione artificiale per eventuali successivi saggi di resistenza.

In basilico sono state individuate valide fonti di resistenza a *P. belbahrii* quali l'accessione PI 500945 di *O. americanum* e i genotipi di *O. basilicum* denominati Mrihani e 19 ed è stato sviluppato il sistema di inoculazione artificiale in condizioni controllate che, nei numerosi saggi effettuati, si è sempre dimostrato efficiente. I genotipi PI 500945, Mrihani e 19 hanno evidenziato e confermato una resistenza completa e stabile; in particolare, la linea 19 è risultata la migliore fonte di resistenza individuata, anche per le sue caratteristiche fenotipiche e chemiotipiche, da utilizzare nei programmi di introgressione della resistenza in altre genotipi di interesse aziendale e in tempi relativamente brevi.

L'accessione PI 500945, già riportata in letteratura, appartiene ad una specie diversa rispetto ai potenziali parentali ricorrenti di basilico genovese, e l'incompatibilità interspecifica esistente ha limitato il suo utilizzo in programmi di incrocio; sarebbe stato necessario ricorrere a tecniche di *embryo rescue* per il trasferimento di tale fonte di resistenza. Considerando la disponibilità di altri genotipi altrettanto validi per tipo e stabilità di resistenza, è stato preferito proseguire le attività con queste fonti più facilmente trasferibili. Inoltre, bisogna considerare che, anche in assenza di barriere sessuali, il trasferimento della resistenza dall'accessione PI 500945 sarebbe

stata complicata dal fatto che si tratta di un genotipo con un chemiotipo poco apprezzato dai consumatori.

Anche la varietà Mrihani, anch'essa già riportata in letteratura e caratterizzata da elevata e stabile resistenza a *P. belbahrii* alla pari dell'accessione PI 500945, sebbene appartenga alla stessa specie degli eventuali nostri potenziali parentali ricorrenti possiede un chemiotipo e un fenotipo con foglie a margine fortemente frastagliato poco apprezzati dal consumatore. Pertanto sarebbero necessarie numerose generazioni di reicrocio per recuperare i caratteri del basilico di interesse. Alla luce di ciò, è stata considerata fonte poco consigliabile per essere utilizzata in un programma di introgressione della resistenza.

Le linee 6 e 4, che si caratterizzano entrambe per la facilità nel trasferire la resistenza e per gli aspetti fenotipici e chemiotipici simili al basilico di interesse, sono invece caratterizzate da una resistenza parziale e non molto stabile al fungo riscontrata sia in seguito a diversi saggi di infezione artificiale che in condizioni di infezione naturale. Tuttavia è stata realizzata qualche ibridazione utilizzando la linea 6.

E' stata inoltre confermata una valida fonte di resistenza a FOB nel genotipo 18. Sarebbe opportuno effettuare incroci tra il genotipo 19 che presenta resistenza a *P. belbahrii* e il 18 che resiste a FOB in maniera tale da piramidare le due resistenze in unico genotipo caratterizzato da resistenza multipla ai due patogeni. La linea 18 è inoltre potenzialmente utilizzabile come parentale donatore in un programma mirato all'introggressione della fonte di resistenza individuata a FOB.

I risultati ottenuti attraverso questo lavoro di dottorato hanno inoltre riguardato l'ottimizzazione del protocollo d'estrazione del DNA mitocondriale in finocchio e il successivo sequenziamento del mtDNA isolato da una linea MS e una MF fornite dalla ditta LA SEMIORTO Sementi e solitamente utilizzate per la produzione di ibridi F₁. Nonostante le difficoltà incontrate nell'assemblaggio dei due genomi per la presenza di abbondanti sequenze ripetute e per l'erroneo inserimento delle *reads* provenienti dal DNA cloroplastico, nel genoma mitocondriale della linea maschio sterile, è stato possibile identificare un'inserzione di 7 bp nella regione a monte del gene *COX1* che potrebbe contribuire alla sterilità di questa linea. In altre specie, alterazioni a carico

del gene *COX1* sono state indicate infatti come responsabili della maschio sterilità citoplasmatica (Horn *et al.* 2014). Un'ulteriore caratterizzazione della regione fiancheggiante il gene *COX1* e l'analisi della sua espressione durante le diverse fasi fenologiche del finocchio, in particolare durante la fioritura e lo sviluppo del polline, sarebbero necessarie per avvalorare questa ipotesi. Il recente successo riportato da Kang *et al.* (2021) nel *genome editing* degli organelli (cloroplasti e mitocondri) potrebbe consentire di trovare, in tale approccio, uno strumento ulteriore per lo studio degli effetti dell'alterazione dei geni localizzati nel DNA mitocondriale sulla sterilità citoplasmatica maschile in pianta.

Nei materiali utilizzati nel presente lavoro, una volta confermato un possibile ruolo nella CSM dell'inserzione di 7 bp nella regione del gene *COX1* della linea MS, potrebbero essere sviluppati marcatori molecolari basati sulla PCR, attraverso lo sviluppo di *primers* specifici disegnati nella regione polimorfica tra la linea MS e quella MF. Tali marcatori sarebbero utili per individuare precocemente le linee maschio sterili e per facilitare l'individuazione di nuove fonti di maschio sterilità, caratterizzate dalla stessa base molecolare ma da caratteristiche fenotipiche/genotipiche potenzialmente diverse rispetto a quelle della linea maschio sterile utilizzata.

Infine, il risultato delle attività svolte durante il dottorato ha evidenziato che il trattamento di biopriming con idrolizzati proteici di leguminose applicato ai semi di finocchio si è dimostrato valido, rispetto al controllo in *hydropriming*, per accelerare la germinazione e renderla uniforme. L'effetto positivo osservato su seme trattato 210 gg. prima della semina consente di concludere che questo riduce anche il processo di deterioramento a cui è sottoposto il seme durante la conservazione, aumentandone quindi la qualità tecnologica, come già dimostrato anche con altri agenti di *priming* in *Arabidopsis thaliana* (Gallardo *et al.*, 2001), girasole (Kibinza *et al.*, 2011) e soia (Posmyket *et al.*, 2001). Questo aspetto è molto importante perché permette alle ditte sementiere di poter aumentare i tempi di conservazione della semente ma soprattutto di conservare semente con migliorate prestazioni germinative. Inoltre, grazie all'accelerazione del processo germinativo, i vantaggi del *priming* ricadono anche a livello vivaistico in quanto la possibilità di ridurre il tempo

di emergenza delle giovani plantule si traduce in una riduzione dei costi di gestione e consente di migliorare la risposta delle colture.

In considerazione, dei risultati positivi ottenuti attraverso l'applicazione del trattamento *biopriming* su finocchio, sarebbe opportuno applicare presso l'Azienda Sementiera LA SEMIORTO Sementi questo trattamento anche ad altre specie ortive, in particolar modo a quelle caratterizzate da un andamento difficoltoso della germinazione come il carciofo e il peperone. Questo con la finalità di accelerare il processo germinativo, quindi ridurre i tempi di emergenza e migliorare la qualità tecnologica del seme a tutto vantaggio sia dell'azienda sementiera che commercializza il seme che dei potenziali fruitori quali agricoltori e aziende vivaistiche.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed TA, Tsujimoto H., Sasakuma T. 2001. QTL analysis of fertility-restoration against cytoplasmic male sterility in wheat. *Genes Genet Syst* 76 (1): 33-38. doi: 10.1266/ggs.76.33
- Ahmed Z., Bi Fu Y. 2015 An improved method with a wider applicability to isolate plant mitochondria for mtDNA extraction. *Plant Methods* 11: 56. doi: 10.1186/s13007-015-0099-x.
- Alfonso A.A., Bentolila S., Hanson M.R. 2003. Evaluation of the fertility restoring ability of Rf-PPR592 in Petunia. *Philippine Agricultural Scientist* 86 (3): 303-315.
- Ambrico PF., Šimek H., Morano M., Angelini RMDM., Minafra A., Trotti P., Ambrico M., Prukner V., & Faretra F. 2017. Riduzione della contaminazione microbica e miglioramento della germinabilità dei semi di basilico dolce (*Ocimum basilicum*) tramite scarica superficiale con barriera dielettrica. *J. Phys. D. Appl. Fis.* 5030305401. doi: 10.1088/138164663/aa77c8.
- Anhani K. 2005. Development of cytoplasmic-genic male sterility in safflower. *Plant Breeding*. 124 (3): 310-312. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01089.x>
- Anisimova I.N., Ryabova D.N., Malinovskaya E.V., Alpatieva N.V., Karabitsina Y.I., Radchenko E.E. 2017. Polymorphism of grain sorghum from VIR world collection for the characters associated with the CMS-*Rf* genetic system. *Agriculture Biology* 52 (5): 952-963. ISSN 2412-0324 (*English ed. Online*).
- Anup C.P., Prasad M., Nataraj S., Mayuri N.G., Manbali J., Hussain A., Kukkundoor E.K. 2015. Proteomic analysis of elicitation of downy mildew disease resistance in pearl millet by seed priming with β -aminobutyric acid and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Proteomics* 120: 58-74.
- Ajirloo A.R., Shaban M., Moghanloo G.D., Ahmadi A., 2013. Effect of priming on seed germination characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agriculture and Crop Sciences (JACS)* 5 (15): 1670- 1674.
- Arakawa T., Matsunaga M., Matsui K., Itoh K., Kuroda Y., Matsuhira H., Kitazaki K., Kubo T. 2020. The molecular basis for allelic differences suggests *Restorer-of-fertility 1* is a complex locus in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *BMC Plant Biology* 20 (1): 503.
- Ashraf M.F., Peng G., Liu Z., Noman A., Alamri S., Hashem M., Qari SH., Al Zoubi O.M. 2020. Molecular control and application of male fertility for two-line hybrid rice breeding. *Int J Mol Sci.* 21: 7868. doi: 10.3390/ijms21217868.
- Aubourg S., Boudet N., Kreis M., Lecharny A. 2000. *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 603-613.

- Bailly C., Beneman A., Corbineau F., Côme D. 1998 Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiology Plant* 104: 646-652.
- Balk J., Leaver C.J. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 13: 1803-1818. doi: 10.1105/tpc.010116.
- Bateson W., Gairdner A.E. 1921. Male sterility in flax subject to two types of segregation. *J. Genet* 11: 269-275.
- Balint-Kurti P.J., Johal G.S. 2009. Maize disease resistance. In: J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds), *Handbook of Maize: Its Biology*. Springer Science + Business Media LLC, pp 229-250. doi: 10.1007/978-0-387-79418-1_12
- Barcaccia G., Falcinelli M. 2011. Genetica e genomica. *Miglioramento genetico* (Vol. 2). Liguori Editore. p. 716
- Basra S., Farooq M., Tabassum R., Ahmed N. 2005. Physiological and biochemical aspects of pre-sowing seed treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Sci Techno* 33: 623-628. doi: 10.15258/SST.2005.33.3.09.
- Belbahri L., Calmin G., Pawlowski J., Lefort F.. 2005. Phylogenetic analysis and real time PCR detection of a presumably undescribed *Peronospora* species on sweet basil and sage. *Mycol. Res.* 109 (11): 1276–1287. doi: 10.1017/s0953756205003928.
- Belli G. 2011. *Elementi di Patologia vegetale*. Seconda edizione. Piccin Nuova Libreria. p. 475.
- Ben-Naim Y., Falach L., Cohen Y. 2018. Transfer of downy mildew resistance from wild basil (*Ocimum americanum*) to sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Phytopathology* 108: 114-123.
- Beta T., Roney L.W., Marovatsanga L.T., Taylor R.N. 1999. Phenolic compounds and kernel characteristics of Zimbabwean sorghums. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (7): 1003-1110. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:7<1003::AID-JSFA317>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<1003::AID-JSFA317>3.0.CO;2-F)
- Bohra A., Jha U., Adhmoolam P., Bisht D. 2016 Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Reports* 35 (5): 967-993. doi: 10.1007/s00299-016 -1949-3.
- Boyd L.A. Ridout C., O’Sullivan D.M., Leach J.E., Leung H. 2012. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics* 29 (4): 233-240. doi: 10.1016/j.tig.2012.10.011.
- Bruins M. 2015. Modernising fennel. Available online: <https://european-seed.com/2015/10/modernising-fennel/>

- Budar F., Pelletier G. 2001. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus Academie des Sci. Ser. III* 324 (6), pp. 543–550. doi: 10.1016/s0764-4469(01)01324-5.
- Butler L.H., Hay F.R., Ellis R.H., Smith R.D., Murray T.B. 2009. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. *Annals of Botany*. 103 (8): 1261-1270. doi: 10.1093/aob/mcp059.
- Bujalski W., Nienow A.W., Gray D. 1989. Establishing the large scale osmotic priming of onion seeds by using enriched air. *Ann Appl Bio* 115: 171-176.
- Bujalski W., Nienow A.W. 1991. Large-scale osmotic priming of onion seeds: a comparison of different strategies for oxygenation. *Sci Hortic* 46 (1-2): 13-24. doi: org/10.1016/0304-4238(91)90088-G.
- Buscaill P, Rivas S., 2014. Transcriptional control of plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 20: 35-46. doi: 10.1016/j.pbi.2014.04.004.
- Cattivelli L., Valè G. 2017. Next Generation breeding: le conoscenze genomiche rivoluzionano il miglioramento genetico. *Bioteecnologie sostenibili. In: Galbiati M., Gentile A., La Malfa S., Tonelli C. (eds). Edagricole-New Business Media. Collana: Università & Formazione*, pp. 1-13.
- Cantliffe D.J. 1981. Priming of lettuce for early and uniform emergence under conditions of environmental stress. *Acta Horti* 122: 29-38.
- Cantliffe D.J., Shuler K.D., Guedes A.C. 1981. Overcoming seed thermodormancy in a heat sensitive romaine lettuce by seed priming. *HortScience* 16: 196-198.
- Cantliffe D.J. 1983. Sowing primed seed. *Am. Veg. Grower*. 31: 42-43.
- Cantliffe D.J., Elbala M., Guedes A.C., Odell G.B., Perkins-Veazie P., Schultheis J.R., Seale D.N., Shuler K.D., Tanne I., Watkins J.T. 1987. Improving stand establishment of direct-seeded vegetables in Florida. *Proc Fla State Hort Soc* 100: 213-216.
- Chaimovitch D., Dudai N., Putievsky E. 2006. Inheritance of resistance to Fusarium wilt in sweet basil. *Plant Disease* 90 (1): 58-60.
- Chakraborty S., Newton A. C. 2011. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60: 2–14.
- Chase CD. 2007. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trend Genet.* 23 (2): 81-90.
- Chaudhary A., Chaudhary S., Ghosh A., Vuduthala S., Singh KM., Surebdr K. 2015. A rapid, low cost and efficient method for isolation of high quality mitochondrial DNA from *Oryza sativa*. *Korean Society of Crop Science and Springer*. doi: 10.1007/s12892-014-0095-0.

- Chen K., Arora R. 2011. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination and seedling establishment in spinach (*Spinacia oleracea*). Plant Sci 180 (2):212-220.
- Chen L., Liu Y.G. 2014. Male sterility and fertility restoration in crops. Annu. Rev. Plant Biol. 65: 579–606.
- Chen Y.J., Lin Y.S., Chung W.H. 2017. Fusarium wilt of basil caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* in Taiwan. J. Plant Med. 59 (1 and 2). doi: 10.6716/JPM.201703_59(1_2).0001
- Chester R.S. 1959. How sick is plant? In: Plant Pathology vol. 1, pp 100-104.
- Choen K. 2011. Antioxidants and dehydrin metabolism associated with osmopriming-enhanced stress tolerance of germinating spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale) seeds. Graduate Theses and Dissertations, Paper 10471, Iowa State University.
- Chiu K.Y., Chen C.L., Sung J.M. 2002. Effects of priming temperature on storability of primed sh-2 sweet corn seeds. Crop Science 42: 1996-2003.
- Choi I.Y., Kim J.H., Kim B.S., Park M.J., Shin H.D. 2016. First report of sclerotinia stem rot of fennel caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Korea. Plant Disease 100 (1): 223. doi: org/10.1094/PDIS-05-15-0512-PDN.
- Cohen Y., Vaknin M., Ben-Naim Y., Rubin A.E., Galperin M., Silverman D., Bitton S., Adler U. 2013. First report of the occurrence and resistance to mefenoxam of *Peronospora belbahrii*, causal agent of downy mildew of basil (*Ocimum basilicum*) in Israel. Plant Dis. 97 (5): 692. doi: 10.1094/PDIS-12-12-1126-PDN
- Cohen Y. Ben Naim Y., 2016. Nocturnal fanning suppresses downy mildew epidemics in sweet basil. Plos ONE 11 (5). e0155330. doi: 10.1371/journal.pone.0155330.
- Cohen Y., Ben-Naim Y., Falach L., Rubin A.E. 2017. Epidemiology of basil downy mildew. Phytopathology 107: 1149-1160.
- Colla G. 1995 Caratterizzazione morfo-istologica e genetica di un mutante maschiosterile di *Foeniculum* spp. Univeristà degli Studi della Tuscia (Vt). Tesi di Laurea.
- Cui X., Wise RP, Schnable PS. 1996. The *rf2* nuclear restorer gene of male sterility T-cytoplasm maize. Science 272: 1334-1335.
- Dahan J., Mireau H. 2013. The Rf and Rf-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. RNA Biol. 10 (9):1469-1478. doi: 10.4161/ma.25568.
- Deng M.H., Wen J.F., Huo J.L., Zhu H.S., Dai X.Z., Zhang, Z.Q., Zhou H., Zou X.X. 2012. Relationship of metabolism of reactive oxygen species with cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hort. 134: 232-236.

- Dewey R.E., Timothy D.H., Levings C.S. 1987. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (15): 5374-5378. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5374>.
- Dixon R.A., Liu C., Jun J.H. 2013. Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2): 329-335. doi: 10.1016/j.copbio.2012.07.004
- Dudai N., Reuveni R., Putievsky E. 1995. 'Nufar': A sweet basil variety, resistant to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilicum*. Application for Registration No. 2376/95. Ministry of Agriculture, Israel Plant Breeders' Rights Council. *Isr. Plant Breed. Gaz.* 42: 2.
- Dudai N., Chaimovitch D., Reuveni R., Ravid U., Larkov O., Putievsky. E. 2002. Breeding of sweet basil (*Ocimum basilicum*) resistant to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici*. *J. Herbs Spices & Med. Plants* 9 (2-3): 42-51. doi: 10.1300/j044v09n02-07.
- Elmer W.H., 2001. Seed as vehicles for pathogen importation. *Biol Invasions* 3: 263-271.
- El-Araby M.M., Moustafa S.M.A., Ismail A.I., Hegazi A.Z.A. 2006. Hormones and protein levels during germination and osmopriming of tomato seeds and associated variation in protein patterns and anatomical seed features. *Acta Agronomica Hungarica* 54 (4): 441-458. <https://doi.org/10.1556/AAgr.54.2006.4.7>
- El-Namaky R., van Oort P.A.J. 2017. Phenology, sterility and inheritance of two environment genic male sterile (EGMS) lines for hybrid rice. 2017 dec; 10 (1): 31. doi: 10.1186/s12284-017-0169-y.
- Ermiş S., Kara F., Özden E., Demir I. 2016. Solid matrix priming of cabbage seed lots: repair of ageing and increasing seed quality. *J. Agric Sci* 22: 588-595.
- Fabrissin I., Sano N., Seo M., North H.M. 2021. Ageing beautifully: can the benefits of seed priming be separated from a reduced lifespan trade-off? *Journal of Experimental Botany* 72 (7): 2312-2333. doi: 10.1093/jxb/erab004.
- Falach-Block L., Ben-Naim Y., Cohen Y. 2019. Investigation of seed transmission in *Peronospora belbahrii* the causal agent of basil downy mildew. *Agronomy* 9 (4): 205; doi: 10.3390/agronomy9040205
- Farooq M., Basra S.M.A., Khan M.B. 2007. Seed priming improves growth of nursery seedlings and yield of transplanted rice. *Arch Agron Soil Sci* 53 (3): 315-326. doi: <https://doi.org/10.1080/03650340701226166>
- Farooq M., Wahid A., Lee D.J. 2009. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiologiae Plantarum* 31 (5): 937-945. doi: 10.1007/s11738-009-0307-2

- Finch-Savage W.E., Gray D., Dickson G.M. 1991. The combined effects of osmotic priming with plant growth regulator and fungicide soaks on the seed quality of five bedding plant species. *Seed Science and Technology* 19: 495-503.
- Flor H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Gabay-Laughnan S., Laughnan J.R. 1994. Male sterility and restorer genes in maize. *In: The Maize Handbook* (Freeling M., Walbot V. Eds), Springer-Verlag, New York, NY, USA; pp. 418–423. doi: 10.1007/978-1-4612-2694-9_64
- Gallardo K., Job C., Groot S.P., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job D. 2001. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology* 126 (2): 835-848. doi: 10.1104/pp.126.2.835.
- Gargiulo F. 2008. Miglioramento genetico del finocchio: produzione di ibridi F₁ e caratterizzazione molecolare della maschiosterilità citoplasmatica. Dottorato di Ricerca in Agrobiologia ed Agrochimica. XXI Ciclo. Area 07 - Scienze agrarie e veterinarie AGR/07 - Genetica agraria. Università degli Studi di Napoli Federico II. pp. 78. doi: 10.6092/UNINA/FEDOA/3086
- Garibaldi A., Gullino M.L., Minuto G., 1997. Diseases of basil and their management. *Plant Dis.* 81 (2): 124-132.
- Garibaldi A., Minuto A., Bertetti D., Gullino M.L. 2004a. Seed transmission of *Peronospora* sp. of basil. *J. Plant Dis. Prot.* 111: 465–469, ISSN 0340-8159.
- Garibaldi A., Minuto A., Minuto G., Gullino M.L. 2004b. First report of downy mildew on basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. *Plant Disease* 88, 312.
- Garibaldi A., Bertetti D., Gullino M.L. 2007. Effect of leaf wetness duration and temperature on infection of downy mildew (*Peronospora* sp.) of basil. *J. Plant Dis. and Prot.* 114 (1): 6–8.
- Giulianini D., Nuvoli S., Paradossi A., Tognoni F. 1992: Trattamenti pre-germinativi di semi di pomodoro e peperone. *Culture protette* 6: 73-79.
- Gurisinghe S., Bradford K.J. 2001 Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. *Seed Sci. Res* 11: 121-133.
- Hansford C.G. 1933. Annual report of the mycologist. *Rev. App. Mycol.* 12: 421-422.
- Hanson MR., Bentolila S. 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16: 154-169.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R.L. 2010. Plant propagation: principles and practices. by Hartmann And Kester's (8th Edition). Pearson Education Limited. Edinburgh Gate, Harlow. pp. 915. ISBN:9780135014493.
- Hasley J.A.R., Navet N., Tian M. 2021. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of sweet basil candidate susceptibility gene *ObDMR6* enhances downy mildew

resistance. PLoS ONE 16 (6): e0253245.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253245>

- Heng S., Liu S., Xia C., Tang H.Y., Xie F., Xie F., Fu T., Wan Z. 2018. Morphological and genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (oxa CMS) in stem mustard (*Brassica juncea*). Theor. Appl. Genet. 131 (1): 59–66. doi: 10.1007/s00122-017-2985-2.
- Horn R. 2002. Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus*. Theor. Appl. Genet. 104 (4): 562-570. doi: 10.1007/s00122-001-0771-6.
- Horn R. 2006. Recombination: cytoplasmic male sterility and fertility restoration in higher plants. Progress in Botany 67: 31-52.
- Horn R., Gupta K.J., Colombo N. 2014. Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. Mitochondrion 19: 198-205. doi: 10.1016/j.mito.2014.04.004
- Huang J.Z., Guo-Zhi E., Zhang H.L., Shu Q.Y. 2014. Workable male sterility systems for hybrid rice: genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization. Rice 7 (1): 13. doi: 10.1186/s12284-014-0013-6.
- Iqbal M., Ashraf M. 2013. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. Environmental and Experimental Botany 86: 76-85. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.06.002
- Ikeda T.M., Tsunewaki K. 1996. Deficiency of cox1 gene expression in wheat plants with *Aegilops columnaris* cytoplasm. Curr Genet 30 (6): 509–514. doi: 10.1007/s002940050163.
- Jia L., Dienhart M.K., Stuart R.A., 2007. *Oxa1* directly interacts with atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase complex. Mol. Bio. Cell 18 (5): 1897-1908. doi: 10.1091/mbc.e06-10-0925.
- Jalali A.H., Salehi F. 2013. Sugar beet yield as affected by seed priming and weed control. Archives of Agronomy and Soil Science 59 (2): 281-288. doi: 10.1080/03650340.2011.608158
- Jisha K.C, Vijaykumari K., Puthur J.T 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. Acta Physiol Plant 35 :1381-1396.
- Jones H.A., Clarke A.E. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. Pro Am Soc Hortic Sci 43:186-194.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. Nature 444 :323-329
- Kader M.A. 2005. A comparison of seed germination calculation formula and associated interpretation of resulting data. Journal Proceeding of the Royal Society of New South Wales Vol. 138: 65-75. ISSN 0035-9173/05/020065–11

- Kammili A. 2013. Genetic linkage between male sterility and non-spiny trait in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Breeding 132: 180-184. <https://doi.org/10.1111/pbr.12029>
- Kayman H.C., Guvec I., Yarali F., Donmez M.F. 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 33: 173-179.
- Keinath A.P. 1994. Pathogenicity and host range of *Fusarium oxysporum* from sweet basil and evolution of disease control. Plant Dis 78: 1211-1215. doi: 10.1094/PD-78-1211.
- Kępczyńska E., Piękna-Grochala J., Kępczyński J. 2003. Effects of matricconditioning on onion seed germination, seedling emergence and associated physical and metabolic events. Plant Growth regulation 41: 269-278.
- Khalil S.K., Khan S., Rehman A., Khan A.Z. 2010. Seed priming and phosphorus application enhance phenology and dry matter production of wheat. Pakistan Journal of Botany 42(3): 1849-1856.
- Khan A.A., Tao A.L., Knypl J.S., Borkowska B., Powell L.E. 1978. Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes. Acta Hort 83:267-278.
- Khan A.A. 1992. Preplant physiological seed conditioning. Hort reviews 14: 131-181. ISSN: 0163-7851.
- Kibinza S., Bazin J., Bailly C., Farrant J.M., Corbineau F., El-Maarouf-Bouteau H. 2011. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. Plant Science 181 (3): 309-315. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.06.003.
- Kim B., Yang T.J., Kim S. 2019. Identification of a gene responsible for cytoplasmic male-sterility in onions (*Allium cepa* L.) using comparative analysis of mitochondrial genome sequences of two recently diverged cytoplasms. Theor. Appl. Genet. 132 (2): 313–322. doi: 10.1007/s00122-018-3218-z.
- Kofer W., Glimelius K., Bonnet HT. 1991. Modifications of mitochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants of tobacco. Plant Cell 3 (8): 759-769. doi: 10.1105/tpc.3.8.759.
- Köhler H.R., Horn R., Lössl A., Zetsche K. 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. Mol. Gen. Genet. 227 (3): 369–376. doi: 10.1007/BF00273925.
- Kozik A, Beth A.R., Lavelle D, Berke L, Schranz M.E, Michelmore R.W., Christensen AC. 2019. The alternative reality of plant mitochondrial DNA: one ring does not rule them all. PloS Genetics 15(8): e 1008373. doi: 10.1371/journal.pgen. 1008373.
- Krishan L.S., Kumar S., Sheri V., Mehta S., Varakumar P., Ram B., Borphukan B., James D., Fartyal D., Reddy M.K. 2018. Seed priming: an emerging technology to impart abiotic stress tolerance in crop plants. In: Advances in Seed Priming. Publisher. Springer, Singapore. p 41-50.

- Król P., Igielski R., Pollmann S., Kępczyńska E. 2015. Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemibiotroph *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. *Journal of Plant Physiology* 179: 122-132. doi: 10.1016/j.jplph.2015.01.018.
- Kubo T., Kitazaki K., Matsunaga M., Kagami H., Mikami T. 2011. Male sterility-inducing mitochondrial genomes: How do they differ? *Crit. Rev. Plant Sci.* 30 (4), 378-400. doi: 10.1080/07352689.2011.587727.
- Kvartskhava PA. 1957. On study of the infectious wilting (fusariosis) of eugenol basil. *Rev. Appl. Mycol.* 38: 101-113.
- Lanubile A., Ferrarini A., Maschietto V., Delledonne M., Marocco A., Bellin D., 2014. Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance. *BMC Genomics* 15, 710.
- Lázaro J.J., Jiménez A., Camejo D., Igleasiés –Beana I., Martí M.C., Sevilla F., Lázaro-Payo A., Barranco-Medina S. 2013. Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effects of stress and S-nitrosylation. *Front Plant Sci.* 4: 460. doi: 10.3389/fpls.2013.00460
- Li. S., Chen Z., Zhao N., Wang Y., Nie H., Hua J. 2018. The comparison of four mitochondrial genomes reveals cytoplasmic male sterility candidate genes in cotton. *BMC Genomics* 19 (1): 775. Doi: 10.1186/s12864-018-5122-y
- Liu F., Cui X., Horner H.T., Weiner H., Schnable P. 2001. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13 (5): 1063-1078. doi: 10.1105/tpc.13.5.1063
- Liu C.G., Hou N., Liu L.K., Liu J.C., Kang X.S., Zhang A.M. 2006. A YA-type cytoplasmic male-sterile source in common wheat. *Plant Breed.* 125 (5): 437–440. doi:10.1111/j.1439-0523.2006.01286.x
- Lopes H.M., Rossetto C.A.V., Carneiro V., 2000. Embebição de sementes de cenoura (*Daucus carota* L.) em diferentes potenciais osmóticos por dois métodos. *Rev Bras Sem* 22: 81-87.
- Luo D, Xu H., Liu Z., Li H., Chen L., Fang C., Zhang Q., Bai M., Yao N., Wu H., Ji C., Zheng H., Chen Y., Ye S., Li X., Zhao X., Li R., Li YG. 2013. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nature Genet.* 45: 573-577.
- Lutts S., Benincasa P., Wojtyła L., Kubala S., Pace R., Lechowska K., Quinet M., Garniczarska M. 2016. Seed priming: new comprehensive approaches for an old empirical technique. *In: Susana Araujo and Alma Balestrazzi, New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*, InTech 2016, p. 1-49 <http://hdl.handle.net/2078.1/177458> -- doi: 10.5772/64420.

- McDonald M.B. 2000. Seed priming. In: Black M, Bewley J.D. (eds). *Seed Technology and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press. pp. 287-325.
- Maekawa T., Kufer T.A., Schulze-Lefert P. 2011. NRL functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology* 12 (9): 817-826. doi: 10.1038/ni.2083.
- Marthandan V., Geetha R., Kumutha K., Renganathan V.G., Karthikeyan A., Ramalingam J. 2020. Seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 8258. doi: 10.3390/ijms21218258.
- Michelmores R.W., Christopoulou M., Caldwell C.S. 2013. Impacts of resistance gene, genetics, function, and evolution on a durable future. *Annual Review of Phytopathology* 51, 291-319.
- Melonek J., Duarte J., Martin J., Beuf L., Murigneux A., Varenne P., Comadran J., Specel S., Levadoux S., Bernath-Levin K., Torney F., Pichon J.P., Perez P., Small I. 2021. The genetic basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in wheat. *Nature Communications* 12 (1), p. 1036. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21225-0>
- Minuto A., Pensa P., Garibaldi A. 2003. Gravi attacchi di una peronospora su basilico in Liguria. *Informatore fitopatologico – La Difesa delle piante* 53 (12): 45-47.
- Minuto G., Minuto A., Gullino M.L., Garibaldi, A. 2004. Lotta chimica alla peronospora del basilico: primi risultati. *Informatore fitopatologico – La difesa delle piante* 54 (4): 54-57.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16 (6): 300-309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007.
- Muhammad I., Kolla M., Volker R., Günter N. 2015. Impact of nutrient seed priming on germination, seedling development, nutritional status and grain yield of maize. *Journal of Plant Nutrition* 38 (12): 1803-1821. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.990094>
- Nakajima Y., Yamamoto T., Muranaka T., Oeda K. 2001. A novel orfB-related gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS). *Plant Mol. Biol.* 46 (1): 99–107. doi: 10.1023/a:1010652118518.
- Nascimento W.M., Huber D.J., Cantliffe D.J. 2013. Carrot seed germination and respiration at high temperature in response to seed maturity and priming. *Seed Science and Technology* 41 (1): 164-169. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2013.41.1.19>
- National Center for Biotechnology Information. Nucleotide Database. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (accessed on 30 June 2020).

- Nawaz J., Hussain M., Jabbar A., Nadeem G.A., Sajid M., Subtain M., Shabbir I. 2013. Seed priming a technique. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6 (20): 1373-1381.
- Oerke E.C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Sciences* 144 (1): 31-43.
- Palumbo F., Galla G., Vitulo N., Barcaccia G. 2018. First draft genome sequencing of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): identification of simple sequence repeats and their application in marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 38, p. 122.
- Paparella S., Araújo S.S., Rossi G., Wijayasinghe M., Carbonera D., Balestrazzi A. 2015. Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Rep* 34: 1281-1293.
- Parera C., Cantliffe D.J. 1994. Pre-sowing seed priming. *Horticultural Reviews* 16, pp. 109-142. DOI:10.1002/9780470650561.ch4
- Park J.Y., Lee Y.P., Lee J., Choi B.S., Kim S., Yang T.J. 2013. Complete mitochondrial genome sequence and identification of a candidate gene responsible for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) containing DCGMS cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1763–1774. [PubMed] [Google Scholar]
- Pasquali M., Piatti P., Gullino M.L., Garibaldi A. 2006. Development of a Real-Time Polymerase Chain reaction for detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* from basil seeds and roots. *J. Phytopathol.* 154 (10): 632-636. doi: 10.1111/j.1439-0434.2006-01160.x
- Patanè C., Cavallaro V., D'Agosta G., Cosentino S.L. 2008. Plant emergence of PEG-osmoprimed seeds under suboptimal temperatures in two cultivars of sweet sorghum differing in seed tannin content. *J. Agron. Crop Sci* 194 (4): 304-309. [Google Scholar]
- Patil B.D., Manjare M.R. 2013. Effect of seed priming on germination and bulb yield in onion (*Allium cepa* L.). *Ecology, Environment and Conservation* 19 (1): 243-246.
- Peng X., Wang K., Hu C., Zhu Y., Wang T., Yang J., Tong J., Li S., Zhu Y. 2010. The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-Honglian rice. *BMC Plant Biol.* 10: 125.
- Pill W.G. 1995. Low water potential and presowing germination treatment to improve seed quality. *In: Seed quality, basic mechanism and agricultural implications.* Basra AS (ed.) Haworth Press, New York. pp. 41. eBook ISBN9781003075226
- Ponnuswamy R., Singh A.K., Raman M.S., Subbarao L.V., Neeraja C.N. 2020. Conversion of partial restorer Swarna into restorer by transferring fertility restorer *Rf* gene(s) through marker assisted back cross breeding (MABB) in rice. *Scientific Reports* 10 (1), pp. 1101. doi: 10.1038/s41598-020-58019-1

- Posmyk M.M., Corbineau F., Vinel D., Bailly C., Côme D. 2001. Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. *Physiologia Plantarum* 111 (4): 473-482. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110407.x.
- Priya P., Patil V.C., Aravind Kumar B.N. 2013. Effect of seed priming practices on growth, yield and economics of maize (*Zea mays* L.) based cropping systems under rainfed conditions in Northern Karnataka, India. *Plant Archives* 1: 207-213.
- Pyne R.M., Koroch A.R., Wyenandt C.A., Simon J.E. 2015. Inheritance of resistance to downy mildew in sweet basil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 140 (5): 396-403.
- Pyne R., Honig J., Vaiciunas J., Koroch A., Wyenandt C., Bonos S., Simon J. 2017. A first linkage map and downy mildew resistance QTL discovery for sweet basil (*Ocimum basilicum*) facilitated by double digestion restriction site associated DNA sequencing (ddRADseq)- Plos One <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184319>
- Quagliotti L., Accati E., Milanesio M. 1968. Preliminary report on a functional type of male-sterility in fennel. In *Proceedings of the 5th Eucarpia Congress, Milan, Italy, 30 September–2 October 1968*; pp. 359–363.
- Ramanujam S., Tewari V.P. 1970. Heterosis breeding in fennel. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 30, pp. 732–737.
- Raj N.S., Shetty N.P., Shetty H.S. 2004. Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal of Pest management* 50 (1): 41-48. <https://doi.org/10.1080/09670870310001626365>
- Reis A., Boiteux L.S., Vieira R.F. 2008. Search for sources of wide-spectrum resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* isolates in accessions of *Ocimum* species. *J Gen Plant Pathol* 74: 375–381. Doi: 10.1007/s10327-008-0111-7
- Reuveni R., Dudai N., Putievsky E., Elmer W.H., Wick R.L., 1997. Evaluation and identification of basil germplasm for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*. *Plant Disease* 81 (9): 1077-1081. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.9.1077
- Rhoades M.M. 1931. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. *Science* 73: 340–341. doi: 10.1126/science.73.1891.340
- Rouhi H.R., Afshari R.T., Moosavi S.A., Gharineh M.H. 2010. Effects of osmopriming on germination and vigour traits of bersim clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *Notulae Sci Bio* 2 (4): 59-63. [Google Scholar]
- Russell P.J., Wolfe S.L., Hertz P.E., Starr C., McMilian B. 2020. I sistemi riproduttivi delle piante (Cap. 6). In: *Genetica Agraria. Edizione integrata a cura di M. Busconi, C. Comino, G. Consonni, A. Marocco, A. Porceddu, E. Portis, R. Rao. EdiSES.* p. 181-189.

- Saber Z., Pirdashti H., Heidarzadeh A. 2012. Osmopriming and hydropriming effects on seed and seedling parameters of two rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars; Intl. J. Agric. Res. Rev. 2 (5): 547-554. Available online at <http://www.ecisi.com>
- Saccardo F. 1993. Metodi di miglioramento genetico per la resistenza a stress biotici. In: P. Crinò *et al.* (eds), Miglioramento genetico delle piante per resistenza a patogeni e parassiti. Edagricole, Bologna, pp135-170.
- Sharma A.D., Rathore S.V.S., Srinivasan K., Tyagi R.K. 2014. Comparison of various seed priming methods for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). Scientia Horticulturae 165: 75-81.
- Shaya F., Gaiduk S., Keren I., Shevtsov S., Zemah H., Belausov E., Evenor D., Reuveni M., Osteretzer-Biran O. 2012. Expression of mitochondrial gene fragments within the tapetum induce male sterility by limiting the biogenesis of the respiratory machinery in transgenic tobacco. J. Integrative Plant Biol. 54 (2): 115-129. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01099.x
- Shaykewich C.F. 1973. Proposed methods for measuring swelling pressure of seeds prior germination. J. Exp. Bot. 24: 1056-61. <https://www.jstor.org/stable/23688740>
- Schenable P.S., Wise R.P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. 3 (5): 175-180. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01235-7
- Schwember A.R., Bradford K.J. 2005. Drying rates following priming affect temperature sensitivity of germination and longevity of lettuce seeds. HortScience 40 (3): 778-781.
- Skibbe D.S., Liu F., Wen Tsui-Jung, Yandean M.D, Cui Xiangqin, Cao Jun, Simmons C.R., Schnabl P.S. 2002. Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology 48, pp. 751–764.
- Small I.D., Peeters N. 2000. The PPR motif - a TPR - related motif prevalent in plant organellar proteins. Trends Biochem. Sci. 25 (2): 1146-1147. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01520-0.
- Soeda Y., Konings M.C.J.M., Vorst O., van Houwelingen A.M.M.L., Stoppen G.M., Maliepaard C.A., Kodde J., Bino R.J., Groot S.P.C., van der Geest A.H.M. 2005. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. Plant Physiol. 137: 354-368.
- Stanca A.M., Marocco A., Pecchioni N., Valè G., Odoardi M., Faccioli P., Cattivelli L., Terzi V. 2014. Genetica Vegetale. In Genetica Vegetale (ed. S. Pimpinelli), Casa Editrice Ambrosiana Milano (Zanichelli). p 155-221
- Stergiopoulos I., van den Burg H.A.B., Ökmen B., Beenena H.G., van Liere S., Kemac G.H.J., de Wit P.J.G. M. 2010. Tomato *Cf* resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots

- and monocots. PNAS 107 (16): 7610-7615; <https://doi.org/10.1073/pnas.10029101074>
- Sun H., Li L., Wang X., Wu S., Wang X. 2011. Ascorbate-glutathione cycle of mitochondria in osmoprimed soybean cotyledons in response to imbibitional chilling injury. *Journal of Plant Physiology* 168 (3): 226-232. doi: 10.1016/j.jplph.2010.07.017.
- Švecová E. 2010. Control of phytopatogenic fungi in horticultural crops by natural plant extracts. Tesi sperimentale di Dottorato di Ricerca XXII ciclo, Università degli Studi della Tuscia.
- Tavili A., Zare S., Moosavi S.A., Enayati A. 2011. Effects of seed priming on germination characteristics of *Bromus* species under salt and drought conditions. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 10 (2):163-168.
- Taylor A.G., Allen P.S., Bennett M.A., Bradford J.K., Mishra M.K. 1998. Seed enhancements. *Seed Science Research* 8: 245-256. doi: 10.1017/S096025850000414.1
- Thines, M., Telle S., Ploch S., Runge F. 2009. Identity of the downy mildew pathogens of basil, coleus, and sage with implications for quarantine measures. *Mycol. Res.* 113 (5): 532–540. doi: 10.1016/j.mycres.2008.12.005.
- Varier A., Vari A.K., Dadlani M. 2010. The subcellular basis of seed priming. *Curr. Sci* 99 (4): 450-456. <https://www.jstor.org/stable/24109568>
- Vergovskii VI. 1956. Some peculiarities in the presence of Fusariosis in basil *Kratk. Otchet Nauchno Issied Inst. Maslichn Efiromaslichn. Kult* 7: 195-197.
- Xie H., Yan D., Mao L., Wang Q., Li Y., Ouyang C., Guo M., & Cao A. 2015- evaluation of methyl bromide alternatives efficacy against soil-borne pathogens, nematodes and soil microbial community. *PLoS ONE* 10 2 e011798 doi: 1371/ Journal. Pone. 0117980.
- Wahid A., Noreen A., Basra S.M.A., Gelani S., Farooq M. 2008. Priming induced metabolic changes in sunflower (*Helianthus annuus*) achenes improve germination and seedling growth. *Bot Stud* 49: 343-350.
- Wang W., Liu Z., Guo Z., Song G., Cheng Q., Jiang D., Zhu Y., Yang D. 2011. Comparative transcriptomes profiling of photoperiod-sensitive male sterility rice Nongken 58S during the male sterility transition between short-day and long-day. 2011 Sep 25; 12:462. Doi. 10.1186/1471-2164-12-462.
- Wang P., Lu Q., Ai Y., Wang Y., Li T., Wu L., Liu J., Cheng Q., Sun L., Shen H. 2019. Candidate gene selection for cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.) through whole mitochondrial genome sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 578.

- Wang Y., Wang Q., Hao W., Li J., Qi M., Zhang L. 2020. Mitochondrial Genome Sequencing Reveals orf463a May Induce Male Sterility in NWB Cytoplasm. *Genes* 11, p. 74.
- Wyenandt C.A., Simon J.E., Pyne R.M., Homa K., McGrath M.T., Zhang S., Raid R.N., Ma L.J., Wick R., Guo L., Madeiras A. 2015. Basil downy mildew (*Peronospora belbahrii*). *HortScience* 45, 1416-1419. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01777-y>
- Yamagishi H., Jikuya M., Okushiro K., Kashimoto A., Fukunaga A., Takenaka M., Terachi T. 2021. A single nucleotide substitution in the coding region of Ogura male sterile gene, *orf138*, determines effectiveness of a fertility restorer gene, *Rfo*, in radish. *Molecular Genetics and Genomics* 296: 705-717. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01777-y>.
- Yan Y., Christensen S., Isakeit T., Engelberth J., Meeley R., Hayward A., Emery R.J.N., Kolomiets M.V. 2012. Disruption of *ORP7* and *ORP8* reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. *Plant Cell* 24 (4): 1420-1436. doi: 10.1105/tpc.111.094151
- Yourong F, Qifa Z. 2018. Genetic and molecular characterization of photoperiod and thermo-sensitive male sterility in rice. *Plant Reproduction* 31 (1): 1-12 doi: 10.1007/s00497-017-0310-5.
- Zhang C.F., Hu J., lou J., Zhang Y., Hu W.M. 2007. Sand priming in relation to physiological changes in seed germination and seedling growth of waxy maize under high-salt stress. *Seed Science and Technology* 35 (3): 733-738. doi: <https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.3.19>
- Zhang Y., Lubberstedt T., Xu M. 2013 The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40 (1): 23-35. Agronomy at Iowa State University Digital Repository: https://lib.dr.iastate.edu/agron_pubs/458. Doi: 10.1016/j.jgg.2012.11.003
- Zhang S., Patel J.S., Mersha S., Raid RN. Roberts P.D., Raid R. 2019. Downy mildew of basil in south Florida - EDIS website at <https://edis.ifas.ufl.edu> for the currently supported version of this publication. PP271 document of a series of the Plant Pathology Department, UF/IFAS.

RINGRAZIAMENTI

I miei primi ringraziamenti vanno al Dipartimento DAFNE dell'Università degli Studi della Tuscia e all'Azienda LA SEMIORTO Sementi (Sarno, Salerno) per aver cofinanziato questo dottorato e avermi dato la possibilità di svolgerlo.

Ringrazio inoltre la Divisione BIOAG dell'ENEA C.R. Casaccia per avermi ospitato presso i suoi laboratori durante lo svolgimento delle attività di dottorato e il Dott. Roberto Balducchi per la stima dimostrata nei miei riguardi.

Ringrazio le Prof.sse Roberta Bernini e Stefania Masci per la squisita gentilezza, disponibilità e comprensione manifestate nei miei confronti.

Ringraziamenti speciali vanno alla Dott.ssa Paola Crinò, mio tutor esterno, e al Prof. Francesco Saccardo per il sostegno scientifico e morale continuo nello svolgimento del dottorato e per la possibilità che mi hanno sempre dato di accrescere le mie conoscenze. Soprattutto grazie perché vi sento ormai come componenti della mia famiglia.

Grazie al mio tutor interno Prof. Giuseppe Colla per la disponibilità e il sostegno scientifico.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Debora Giorgi che, con infinita pazienza, è sempre stata al mio fianco nonostante le mie carenze riguardo all'argomento affrontato.

Grazie tantissime alla Dott.ssa Anna Lanteri e al Dott. Minuto del CeRSAA di Albenga per la grande disponibilità, professionalità e gentilezza nel rispondere costantemente alle richieste di inoculo e supporto scientifico.

Ringrazio le Dott.sse Mariateresa Cardarelli e Sara Magrini per la grande professionalità e collaborazione mostrata durante lo svolgimento del dottorato.

Ringrazio inoltre i ricercatori della ditta LA SEMIORTO Sementi, Dott.ssa Mina Formisano, Dott. Filippo Cavallaro e il perito chimico Giuseppe Paparo per aver maturato insieme importanti esperienze circa gli argomenti affrontati.

Ringrazio i Dott. Fabio Palumbo dell'Università di Verona e Giuseppe Aprea dell'ENEA per il supporto scientifico dato, anche nei momenti di intenso lavoro per loro.

I miei più cari ringraziamenti con la mia amicizia ancora

- al Dott. Sergio Lucretti per i preziosi consigli, per l'infinita disponibilità ad accogliermi nel suo laboratorio e per le interessanti lezioni inerenti la citometria insieme ai suoi numerosi tentativi di inserirmi nel 'club' dei citometristi;
- alla Dott.ssa Valentina Tolaini, con la quale ho condiviso tutto il mio percorso di dottorato con grande piacere e affetto, dandomi consigli e supporto in ogni esperienza da intraprendere e per le sue lezioni sulla coltura *in vitro*;
- ai Dottori Ugo De Corato e Alfredo Ambrico per il cortese supporto scientifico dato all'inizio dei miei saggi di resistenza a Sclerotinia e i consigli per la messa a punto del metodo di inoculazione con Sclerotinia;
- alla Dott.ssa Anna Farina per la piena disponibilità e le interessanti e gradite lezioni di citometria;
- al Dott. Antonio Fiorillo e alla Dott.ssa Angela Valentina Ceccarelli (detta '*prosperina*') per il prezioso aiuto;
- a Lorenzo "l'operaio" per aver condiviso con lui piacevoli momenti del lavoro;
- a tutti collaboratori "Amici": Dott.sse Loretta Bacchetta, Paola Nobili, Catia Stamigna, Raffaella Tavazza, Silvia Procacci, Antonella Del Fiore, Silvia Arnone, Silvia Massa, Cristina Capodicasa e i Dottori Raffaele Sasso, Massimo Cristofaro, Sergio Musmeci, Luca Nardi, Mario Tavazza, Lorenzo Mancini detto '*Sabazio Metastasio*'.