

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA,
LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA

Corso di Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Vegetali – XXVIII Ciclo

**Studio della risposta a *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*
(PSA) di selezioni di *Actinidia deliciosa* e di *Actinidia chinensis*
ottenute da miglioramento genetico non convenzionale**

(AGR/07)

Tesi di dottorato di

Dott. Daniele Bevilacqua

Coordinatore del corso
Prof. Stefania Masci

Tutore

Prof. Guido Cipriani

Co-tutore

Dott. Emilia Caboni

09 giugno 2017

INDICE

INTRODUZIONE AL LAVORO

PARTE PRIMA

1. IL GENERE ACTINIDIA

1.1 Classificazione botanica

1.2 Ciclo vegetativo e produttivo

1.3 Biologia fiorale

1.4 Struttura del frutto

1.5 Cultivar nel mondo

1.6 Il campo sperimentale di *Actinidia deliciosa* ed *Actinidia chinensis* presso il CREA-FRU di Roma e la selezione C8 dell'Università di Udine

2. LA COLTURA NEL MONDO E IN ITALIA

2.1 Il kiwi nel mondo, produzione e mercato

2.2 Il kiwi in Italia, produzione e mercato

2.3 Il kiwi Latina IGP

3. *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE* (PSA)

3.1 Struttura genomica

3.2 Popolazioni batteriche ed epidemie

3.3 Ciclo della malattia

3.4 Sintomi e danni da PSA

3.5 Misure di prevenzione e contenimento

4. L'IMPATTO DEL PSA NEI CAMPI ITALIANI

5. IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLE PIANTE DA FRUTTO

5.1 Il miglioramento genetico del kiwi

5.2 Le basi molecolari delle mutazioni

6. LA COLTURA IN VITRO

6.1 Breve storia della coltura in vitro dei vegetali

6.2 La micropropagazione

6.3 Metodi della micropropagazione

6.4 Propagazione per germogli ascellari

6.4.1 Stadi della micropropagazione per germogli ascellari

6.5 Propagazione per morfogenesi indiretta tramite formazione di callo (rigenerazione avventizia)

6.6 Applicazioni della coltura in vitro

PARTE SECONDA

7. OSSERVAZIONI FENOLOGICHE DELLA RISPOSTA AD INFEZIONE DA PSA DEI GENOTIPI PRESENTI NEL CAMPO SPERIMENTALE DEL CREA-FRU DI ROMA E DI ALCUNE CULTIVAR DI INTERESSE COMMERCIALE

Materiali e metodi

Risultati e discussioni

8. INDUZIONE VARIABILITA' GENETICA TRAMITE APPLICAZIONE MUTAGENE EMS *IN VIVO*

8.1 Applicazione dell'EMS ai semi

Materiali e metodi

Risultati e discussioni

8.2 Applicazione dell'EMS al polline

Materiali e metodi

Risultati e discussioni

9. SOPRAVVIVENZA AD INOCULO ARTIFICIALE CON PSA DEGLI INDIVIDUI OTTENUTI *IN VIVO*

Materiali e metodi

Risultati e discussioni

10. LA CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DELLA PLOIDIA IN ACTINIDIA

Materiali e metodi

Risultati e discussioni

11. INDUZIONE VARIABILITA' GENETICA TRAMITE APPLICAZIONE MUTAGENE EMS *IN VITRO*

11.1 Allestimento di *A. deliciosa* cultivar Hayward e di *A. chinensis* cultivar Soreli e Zespri Gold

Materiale e metodi

Risultati

11.2 La moltiplicazione in vitro del kiwi

Materiale e metodi

Risultati

11.3 Realizzazione di protocolli per la rigenerazione avventizia

Materiale e metodi

11.4 Realizzazione di protocolli per la rigenerazione avventizia *dell'A. deliciosa* cultivar Hayward

Materiale e metodi

Risultati

11.5 Realizzazione di protocolli per la rigenerazione avventizia *dell'A.* *chinensis* cultivar Soreli

Materiale e metodi

Risultati

11.6 Realizzazione di protocolli per la rigenerazione avventizia *dell'A.* *chinensis* cultivar Zespri Gold

Materiale e metodi

Risultati

11.7 Considerazioni conclusive sulla rigenerazione avventizia di 3 cultivar commerciali

11.8 Applicazione dell'EMS alle cultivar Soreli e Hayward utilizzando i protocolli di rigenerazione avventizia

Materiale e metodi

Risultati

11.9 Considerazioni conclusive sull'applicazione dell'EMS sulla cv. Soreli e sulla cv. Hayward

12. INOCULO CON PSA DEI RIGENERANTI OTTENUTI DA CALLI TRATTATI CON EMS

Materiale e metodi

Risultati

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

SITOGRAFIA

ABBREVIAZIONI

ELENCO DELLE PRODUZIONI EFFETTUATE DURANTE IL DOTTORATO DI RICERCA

RINGRAZIAMENTI

Introduzione al lavoro

L'attività di *breeding* sul kiwi (*Actinidia* spp.) nel mondo è stata orientata per anni all'individuazione di nuove selezioni (maschili/femminili) con caratteristiche commerciali valide dal punto di vista dei classici caratteri fenologici e carpologici (ad es. epoca di fioritura, epoca di raccolta, colore della polpa, conservabilità del frutto, sapore, forma, scarsa tomentosità, ecc...), puntando anche a caratteri di forte innovazione sul frutto (vedi tutte le nuove recenti introduzioni di frutti a polpa gialla). Tutto questo anche perché fino agli anni 2009-2012 il kiwi risultava una pianta di "semplice" coltivazione, poco esigente e soprattutto poco suscettibile alle malattie che per lo più si limitavano a qualche attacco fungino (spesso visibile sui frutti in conservazione) ed a qualche eccessiva presenza di cocciniglia, specie sui frutti.

Da quel triennio invece, con l'affacciarsi in tutto il mondo dello *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* (PSA), le coltivazioni ed il panorama varietale mondiale sono stati ridimensionati e in alcuni casi sconvolti (vedi praticamente la scomparsa dalla coltivazione della cultivar Hort-16A).

Il presente lavoro ha preso avvio dall'attività di miglioramento genetico svolto presso il CREA-FRU nella sezione di pomologia e miglioramento genetico e ha avuto l'obiettivo sia di valutare la risposta a PSA di genotipi disponibili presso il CREA-FRU (cultivar commerciali e genotipi in selezione) sia di ottenere nuovi genotipi mediante il miglioramento genetico non convenzionale (tramite applicazione di un mutagene chimico *in vivo* e *in vitro*) da valutare, anch'essi, per la risposta a PSA.

PARTE PRIMA

1 Il genere *Actinidia*

Le prime notizie sull'*Actinidia* giunte in occidente si fanno risalire a Robert Fortune nel 1845 quando di ritorno da un suo viaggio in Cina, durante uno dei suoi viaggi per conto della Royal Horticultural Society, riportò materiale vegetale che permise a Planchon di descrivere la specie nel 1847. La pianta è originaria della valle dello Yong-Tze nella Cina meridionale. Come noto in Nuova Zelanda la prima introduzione risale al 1906 quando A. Allison ricevette dei semi (sembra dal professor James Mc Gregor di ritorno dalla Cina) e ne iniziò la coltivazione raccogliendo i primi frutti nel 1919. Da questo primo inserimento derivarono le cultivar attualmente ancora diffuse, basti pensare che Hayward, la cultivar più coltivata nel mondo, fu ottenuta dal vivaista neozelandese R. W. Hayward nel 1920 (Eynard, 1986).

In tutti gli altri paesi l'interesse per l'*Actinidia* è arrivato sull'onda del successo neozelandese (Youssef e Bergamini, 1989).

Al Primo Convegno Nazionale sull'actinidicoltura in Italia, a Torino nel 1978, si riporta come le prime coltivazioni risalgono al 1971 con un impianto a Latina e uno a San Michele all'Adige (TN) (Cacioppo, 2015).

1.1 Classificazione botanica

REGNO	Plantae
DIVISIONE	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDINE	Ericales
FAMIGLIA	Actinidiaceae
GENERE	Actinidia

Il genere *Actinidia* fa parte della famiglia delle *Actinidiaceae*, sono arbusti rampicanti.

La pianta è tomentosa con foglie pelose sulla pagina inferiore per la presenza di peli stellari (Porcelli, 1973). Le radici sono grosse e rampicanti ed è stato osservato come i fattori climatici e podologici (Youssef *et al.*, 1983) influenzano l'attività, la conformazione e lo sviluppo dell'apparato radicale. I rami sono di due tipi: rami

vegetativi (solo gemme a legno) e rami misti (gemme a legno e gemme a fiore). I giovani germogli sono erbacei, pelosi, verdastri (Youssef e Bergamini, 1980).

I fiori sono riuniti in fascetti ascellari e sono costituiti da cinque petali, cinque sepal. Quelli femminili hanno 5 o più stili e l'ovario supero, quelli maschili almeno dieci stami. Il frutto è una bacca con numerosi semi, senza arillo, con grande embrione e molto endosperma ed il peso varia da 30 grammi nella cultivar Monty a 120/150 grammi nella Hayward, se diradati (Palmer e Clinch, 1974). L'epidermide è color marrone più o meno scuro e più o meno coperta di peluria (secondo la specie). La polpa è posta intorno alla columella centrale e, nelle varietà commerciali, va dal verde scuro al giallo pallido. Risulta dura a maturazione commerciale ma sorbevole a maturazione fisiologica. I semi, ellissoidali e piatti, sono nerastri, situati su due file, concentricamente attorno alla columella e il loro numero varia da poche centinaia ad oltre il migliaio (Palmer e Clinch, 1974).

La pianta è dioica, ossia esistono piante in grado di generare frutti ed altre che producono solo polline. Infatti, i fiori di kiwi sono apparentemente e strutturalmente ermafroditi (stami/antere e pistilli/ovari in uno stesso fiore) ma fisiologicamente dioici (è soprattutto valido per le attuali cultivar in commercio ove il tasso di ermafroditismo è insignificante ma anche per altre specie). È possibile parlare di piante femminili (fiori pistilliferi) ove il fiore produce polline non vitale e di piante maschili (fiori staminiferi) ove c'è un'alta produzione di polline ma l'ovario è rudimentale e non in grado di progredire in frutto. Questo generalmente comporta (anche se ultimamente con l'impollinazione artificiale è parzialmente diverso) che nelle coltivazioni di kiwi vada inserita una pianta maschile ogni 8/10 piante femminili. L'impollinazione naturale avviene quasi esclusivamente per opera dei pronubi (Pinzauti, 1991).

Ad oggi sono stati identificati 49 *taxa* di cui 39 diploidi, 21 tetraploidi, 5 esaploidi e 1 ottaploide. La conta dei cromosomi di più di 150 genotipi (Ferguson e Huang, 2007) a diversa ploidia ha mostrato come il numero base cromosomico è 29.

La conta cromosomica risulta spesso lunga e tediosa essendo i cromosomi molti e molto piccoli (Ferguson *et al.*, 2009). Per questo, ma anche per la possibilità tecnica di applicarla, ottenendo dati attendibili e ripetibili, la valutazione del numero cromosomico delle accessioni di *Actinidia* viene eseguita con la citofluorimetria a flusso. Questo metodo è molto utilizzato in Nuova Zelanda nei programmi di breeding per la verifica del numero cromosomico di nuovi individui ottenuti da incroci tra piante madri di differente ploidia.

1.2 Ciclo vegetativo e produttivo

L'*actinidia* è una pianta caducifoglia e quindi al termine del riposo vegetativo invernale torna a germogliare per il ciclo vegetativo dell'anno seguente. Sul germogliamento influiscono vari fattori tra cui molto importante è la temperatura media dell'aria; lo zero vegetativo del kiwi è intorno agli 8 gradi. Tra gli altri fattori influenti sul germogliamento vi sono: la latitudine, le cultivar, il vigore, il freddo invernale e la potatura; la non potatura può provocare il mancato germogliamento di un certo numero di gemme che restano latenti.

In via generale si può affermare che nell'ambiente laziale il germogliamento inizia tra metà e fine marzo (con le cultivar di *A. chinensis* più anticipate di quelle di *A. deliciosa*). Come detto esistono gemme a legno o miste con quest'ultime che contengono un ramo preformato con mazzetti di fiori all'interno. La differenziazione delle gemme inizia nei giorni precedenti il germogliamento e si completa nel corso di esso (Brundell, 1975; Zuccherelli, 1981).



Fig. 1: germogliamento kiwi

I germogli crescono molto rapidamente, e si dividono in germogli fioriferi e vegetativi. Questi ultimi derivano da gemme basali di rami che hanno fiorito l'anno precedente o da gemme pronte (dette femminelle) dell'anno in corso. I germogli fioriferi derivano da gemme miste.

Il kiwi presenta fioritura scalare, più evidente nelle piante maschili, e questo può, congiuntamente al periodo di fioritura che spesso non è simile tra piante femminili e maschili, portare a problemi di impollinazione.

1.3 Biologia fiorale

Il kiwi, come la maggior parte delle specie appartenenti al genere *Actinidia*, è una pianta funzionalmente dioica. Si hanno piante femminili portanti fiori femminili (pistillifere) e piante maschili (staminifere) portanti soli fiori maschili. Il fiore del kiwi è lungo da 5 a 7 cm. (Ferguson, 1984).

Ogni fiore maschile libera granuli pollinici, la cui germinabilità è considerata soddisfacente per valori superiori all'80% (Cipriani *et al.*, 2009). La più ovvia differenza tra fiori pistilliferi e staminiferi è nello sviluppo del gineceo. Sia i fiori pistilliferi che quelli staminiferi emanano un distintivo profumo ma non secernono nettare (Schmidt, 1978).

Per avere una buona produzione, con frutti d'adequate dimensioni è necessaria un'elevata impollinazione (Hopping, 1980; Ferguson, 1984) e effettuare un adeguato diradamento (Pinzauti, 1991; Burge *et al.*, 1987). Vi è, infatti, una forte correlazione tra il numero dei semi e le dimensioni del frutto (Hopping, 1976; Costa e Ryugo, 1978), ed un frutto per avere dimensioni commerciali deve contenere più di 1000 semi (Hopping, 1976). La causa più comune della produzione di frutti piccoli e non commerciabili è una inadeguata impollinazione (Ferguson, 1984).

Infatti, si è visto che, se si impedisce agli insetti di raggiungere i fiori si ha una riduzione delle dimensioni dei frutti, ed in alcuni casi una diminuzione dell'allegagione (Palmer-Jones, 1974; Hopping, 1976; Marletto, 1980; Pinzauti e Vannozzi, 1988).

Per comprendere l'importanza dell'impollinazione entomofila si deve ricordare che per avere un frutto con almeno 1000-1200 semi, che sono quelli necessari per raggiungere una dimensione commerciale è necessario che arrivino sullo stigma di un fiore femminile non meno di 2000-3000 granuli pollinici (Hopping, 1976).

Il fiore del kiwi è largo, con le diverse parti fiorali ben in vista, profumato e con le antere di un giallo brillante è quella tipicamente preferita dagli insetti impollinatori (McGregor, 1976; Schmid, 1978). In realtà questo fiore non è molto attrattivo: non produce nettare ed il polline tende ad agglutinarsi in masse piuttosto secche che vengono ad esempio trasportate con difficoltà dai pronubi (Sale, 1978). Il polline di kiwi è più attrattivo per gli insetti il mattino, quando vi è la rugiada e dopo una pioggia, in ogni caso quando vi è

un'alta umidità (Palmer-Jones e Clinch, 1974; Palmer-Jones *et al.*, 1976). Sembra, anche che gli insetti siano confusi dal polline non vitale e poco attrattivo prodotto dai fiori pistilliferi (Schmid, 1978).

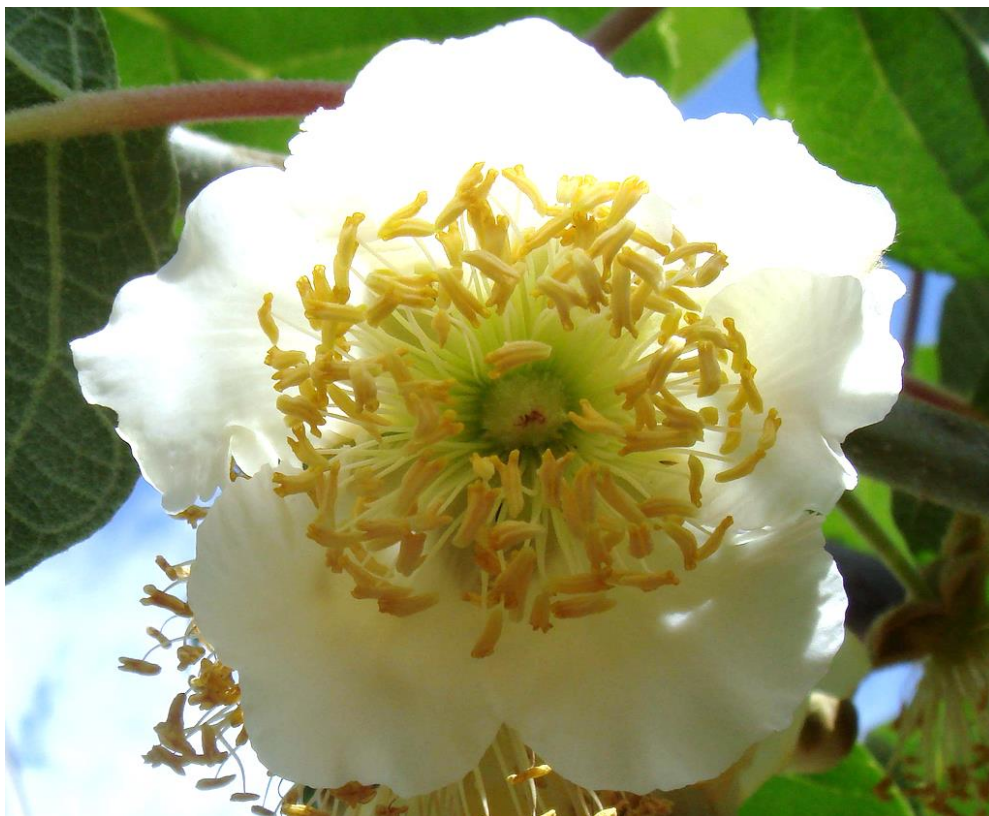


Fig. 2: fiore maschile di *Actinidia deliciosa*

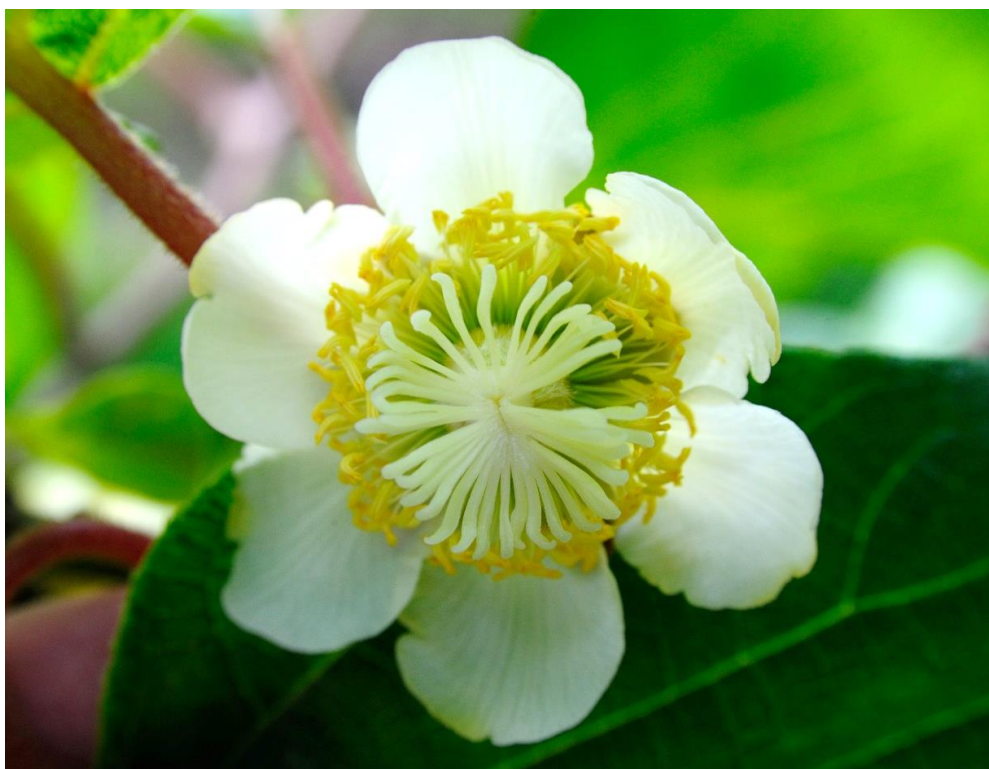


Fig. 3: fiore femminile di *Actinidia deliciosa*

1.4 Struttura del frutto

Visto l'immensa differenza nel genere, come precedentemente illustrato, le considerazioni seguenti sono riferite per lo più alle varietà commerciali sia di *A. deliciosa* che di *A. chinensis*.

I frutti di kiwi, hanno forma che in sezione longitudinale varia dalla cilindrica all'ellissoidale fino ad arrivare all'ovata ed in sezione trasversale passa dalla rotonda all'ellittica. I sepali sono persistenti durante l'accrescimento del frutto, aumentano il loro contenuto in tannini ed eventualmente disseccano (Schmid, 1978). Anche, le vestigie disseccate degli stili sono persistenti fino alla raccolta. La buccia è tomentosa (peli più presenti in *A. deliciosa* e meno, a volte assenti, in *A. chinensis*), la polpa è mediamente succosa, di colore verde o giallo (solo in *A. chinensis*) più o meno intenso, profumata, acidula o zuccherina con la parte centrale di color bianco crema (columella) e con molte file di semi marroni-neri. Sulla superficie del frutto ci possono essere due tipi di peli. Uno è costituito da peli multiseriati, rigidi, di colore marrone ruggine che possono superare i 3 mm di lunghezza. L'altro tipo è costituito da peli uniseriati, corti, di morfologia irregolare (Schmid, 1978).

1.5 Cultivar nel mondo

Il miglioramento genetico dell'*Actinidia* che è alla base delle introduzioni di nuove cultivar commerciali è di fatto iniziato dal 1980. Infatti, al 2007, di 300 cultivar del genere ben il 96% è stato costituito dal 1980 (Fideghelli e Della Strada, 2007). Le specie più rappresentate (Fig.4) come varietà commerciali costituite sono *A. deliciosa* (37%) e *A. chinensis* (31%) e sono in relazione alla loro importanza colturale (Fideghelli, 2012).

VARIETA' DI KIWI CLASSIFICATE PER SPECIE

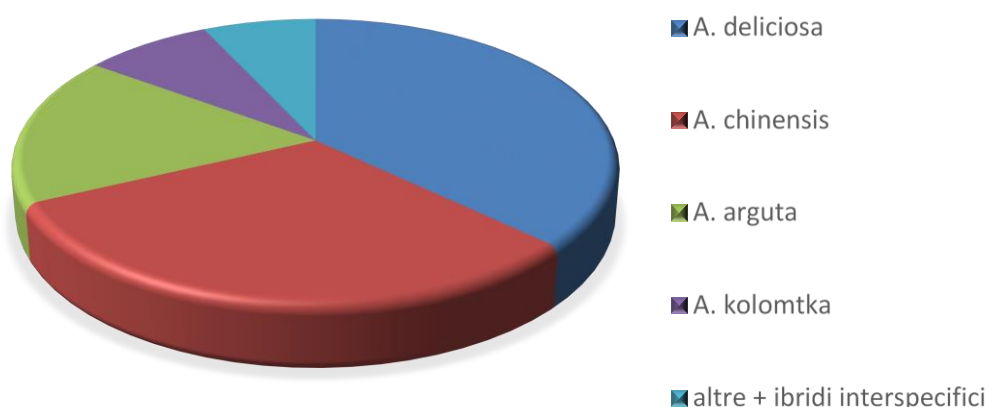


Fig. 4: specie più rappresentative in base al numero di varietà commerciali.

Le varietà sono state costituite (Fideghelli, 2012) per lo più da libera impollinazione (66%), in minor misura con incroci controllati (14%), selezione clonale (9%) e mutazioni (3%).

Di seguito le varietà commerciali di *A. deliciosa* e di *A. chinensis* degni di maggior nota, con evidenza delle caratteristiche varietali salienti. La descrizione prende spunto dagli articoli del Prof. Testolin (2008, 2013, 2014), del Dr. Agr. Cacioppo (2013), di Bucci e Costa (2006), di Spada e Spada (2005), di Cipriani e Testolin (2007), di Testolin e Cipriani (2008), di Huang *et al.* (2004).

Le varietà pistillifere (ad. Es. Tomuri, Matua, Belen) non sono qui descritte anche se non meno importanti sia per gli agricoltori (è richiesta temporaneità di fioritura tra cv maschili e femminili) e sia per il miglioramento genetico tramite progeny test (Testolin, 2009).

La cultivar di riferimento per le epoche di maturazione è Hayward anche se per quelle a pasta gialla può essere riportato su Hort 16A.

1. HAYWARD (*A. deliciosa*). Frutto che ha caratterizzato per anni la produzione mondiale e che da solo copre ancora circa il 90% del kiwi coltivato. Caratterizzato da elevata frigo conservabilità. È generalmente piuttosto grosso, sopra i 100 g, di forma ellissoidale-ovata in sezione longitudinale, ellittica in sezione trasversale. La buccia è di colore bruno con fondo verde-grigio, ricoperta da pochi peli non molto coriacei, mentre la polpa è di colore verde paglierino brillante, mediamente succosa e dal sapore tendente all'acidulo. Buona tolleranza a PSA.



2. SUMMER 3373 (*A. deliciosa*). Pezzatura più piccola rispetto a quella del kiwi Hayward, si tratta di una varietà frutto di incroci realizzati con Hayward a Faenza (Ossani 2002), a partire dall'ormai lontano 1984. È una varietà molto precoce (-45) che matura naturalmente anche sulle piante. Commercializzata come Summerkiwi®



3. GREEN LIGHT® (*A. deliciosa*). Mutazione di Hayward caratterizzata da precocità di maturazione (-30) che consentono un ingresso nel mercato anticipato ma al contempo caratterizzata, negativamente, da maturazione scalare e quindi cascola pre-raccolta, ripetuti passaggi di raccolta, difficoltà conservazione e commercializzazione. La produttività è nella media, con frutti medi da 100 gr.

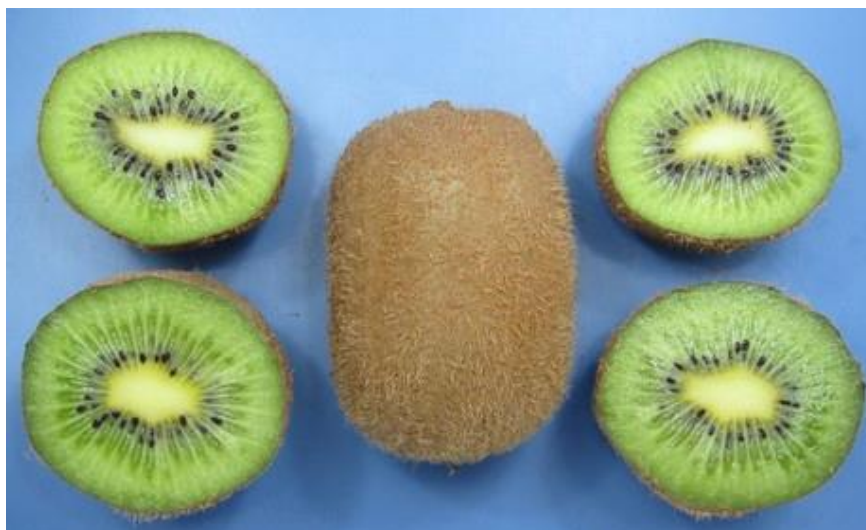


4. EARLIGREEN® (*A. deliciosa*). Praticamente analoga a Green Light.

5. BO-ERICA® (*A. deliciosa*). E' una mutazione di Hayward diffusa dal 2006 ed è una selezione della famiglia Bovo, oggi in mano a Kiwigold. Similare ad Hayward come epoca di maturazione, peso medio dei frutti poco superiore a 100 grammi caratterizzati da buona conservabilità e da una forma allungata e attraente.



6. Z5Z6 della Jingold® è l'ultima new entry in fatto di kiwi a polpa verde: è stato introdotto nel 2014 direttamente dalla Cina. Il frutto ha una forma irregolare e un peso medio di 100 gr. E' una varietà tardiva che matura nella seconda metà ottobre. Ha un alto contenuto zuccherino, la "tipica varietà coltivata per i mercati asiatici, dove il consumatore preferisce un kiwi a bassa acidità e alto contenuto zuccherino". La conservabilità dei frutti è buona.



7. TSECHLIDIS (*A. deliciosa*). Varietà di origine greca che si distingue per la pezzatura elevatissima (peso medio 170g). Il frutto è cilindrico, regolare, con polpa verde brillante. Rispetto ad Hayward tutte le fasi fenologiche sono leggermente anticipate. Costituita e licenziata da AGROHARA.



8. HORT 16A (*A. chinensis*). Prima vera introduzione commerciale di kiwi a polpa verde ha riscosso immediato ed importante successo. Costituita presso il Plant&Food Research con il nome commerciale di Zespri® Gold è un'ottima varietà (diploide) a maturazione tardiva con eccellenti caratteristiche organolettiche (dal gusto "tropicale") e di conservazione. La pianta è molto vigorosa e matura precocemente (-30). Purtroppo ha visto un immediato declino essendo così sensibile alla PSA da veder distrutti gli impianti coltivati nel giro di poco tempo. Sostituita dalla G3.



9. JINTAO (*A. chinensis*). Ottenuta agli inizi degli anni 2000 dall'attività di miglioramento genetico in partnership tra Europa e Cina e ora distribuita dal consorzio Kiwigold®, brand Jingold®, è una varietà tetraploide ottenuta da piante selvatiche in Cina. I frutti sono allungati, cilindrici, molto regolari e di buona pezzatura (100g). La polpa è gialla e la maturazione anticipa di circa 30 gg Hayward ed i frutti hanno elevata conservazione.



10. SORELI (*A. chinensis*). Cultivar selezionata dall'Università di Udine, in sezione trasversale è tondo e di colore giallo intenso mentre in sezione longitudinale appare come un'ellissi leggermente schiacciata ai poli. Matura circa 1 mese prima di Hayward ed è più produttiva (anche se c'è da dire come in generale l'*A. chinensis* è più produttiva dell'*A. deliciosa*). I frutti sono grandi (110-120 g) ma hanno ridotta conservabilità (3/4 mesi).



11. SUNGOLD® (*A. chinensis*). Nome commerciale di ZESY002 anche nota come G3 è varietà ottenuta da Zespri ed il Plant&Food Research. Introdotta per sostituire per i motivi precedentemente detti la HORT 16A sembra avere molta più tolleranza a PSA. Si può coltivare solo in esclusiva stipulando un contratto con la società Zespri. Il frutto è molto apprezzato e di elevata pezzatura (120 g). Anticipa rispetto ad Hayward sia come vegetazione che fioritura che maturazione (30-40 gg). Ha di positivo, specie per gli areali più freddi, la precocità di viraggio della polpa al giallo. Rispetto la sua predecessora non ha l'umbone, risultando di più semplice manipolazione.



12. DORI' (*A. chinensis*). Kiwi a polpa gialla a maturazione precoce (-35 giorni da Hayward). Frutto di ottima pezzatura (circa 100 grammi), forma allungata e uniforme, colore dell'epidermide marrone chiaro, polpa di colore giallo intenso. Ottima la capacità di conservazione dei frutti in frigorifero.



13. HONGYANG (*A. chinensis*). Conosciuta anche come RED SUN (RS1). Una delle prime varietà a polpa rossa (al cuore) presentate al mondo. Ottenuta da una popolazione di semenzali diploidi di *A. chinensis* var. *rufopulpa* ha maturazione precoce, frutti piccoli (<80g), cilindrici, con calice incavato e con polpa verde-giallastro ma loci ovarici color rosso. Poco consistente a maturazione e poco conservabile. Ignoto il grado di suscettibilità a PSA. La commercializzazione in Europa è affidata alla neozelandese Enza con il marchio EnzaRed® e la moltiplicazione delle piante a Summerfruit®. La prima varietà rossa in polpa. Frutto piccolo (<60g) Ottenuta da semi collezionati in aree selvatiche della Cina.



14. JINYAN (*A. chinensis*). Anche questa varietà è originaria della Cina e distribuita da Kiwigold. E' un incrocio che produce frutti singoli da oltre 100 grammi l'uno. Matura prima di Hayward (-15/20) e i frutti hanno caratteristiche organolettiche eccellenti. La conservabilità è elevata. Introdotta recentemente in Italia (2014) ancora non si registrano grandi produzioni.



15. Altre varietà.

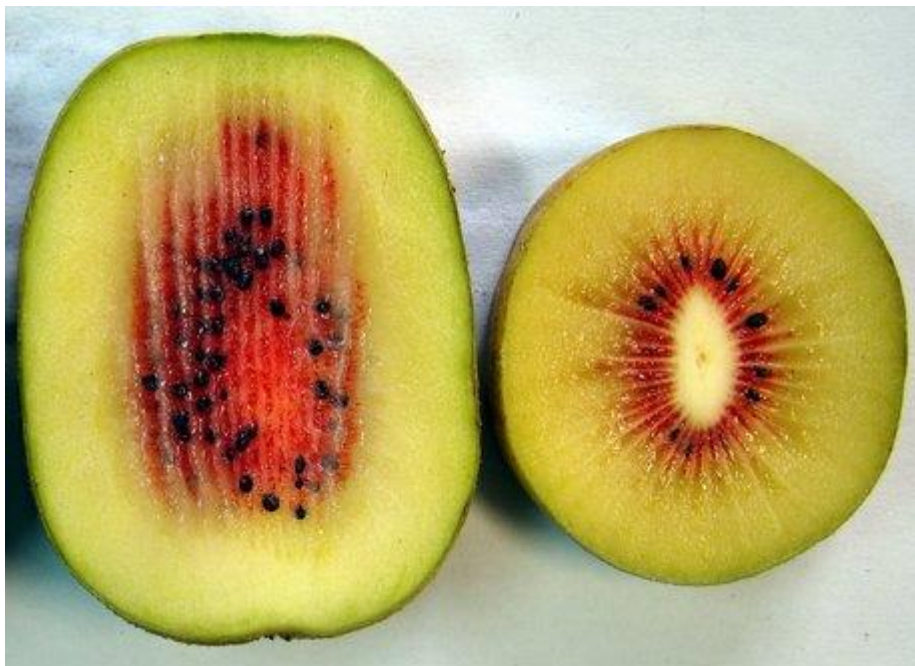
HFR18 (*A. chinensis*). Ottenuta dal prof. Li presso il Deyang Professional Academy of Kiwifruit nel 2007. Incrocio tra Hongyang (Red Sun) e SF0612M. Sicuramente il suo interesse è nella colorazione della polpa. I rilievi sono ancora agli inizi ma sembra avere un'infiorescenza simile ad Hayward ed elevata fertilità. I frutti di 80-100 g sono di forma ovoidale, leggermente appiattita e glabri. Nell'area centrale la polpa è rossa per 1/3, la restante parte è giallo-verde. In Cina evidenziano una buona conservabilità. Sembra non essere molto suscettibilità a PSA.



ENZA GOLD (SKELTON A19) (*A. chinensis*). Ottenuta da un privato neozelandese, Don Skelton. Vigoria media, matura 15 gg prima di Hort 16A, frutti ovoidali con leggero umbone di circa 100 g e di colore giallo intenso. Dati sulla suscettibilità a PSA non sono noti. La commercializzazione in Europa è affidata alla neozelandese Enza con il marchio EnzaRed® e la moltiplicazione delle piante a Summerfruit®.



DONG HONG (*A. chinensis*). Ultima arrivata delle varietà bicolori è in mano al consorzio Kiwigold e diffusa in Italia nel 2013. Peso intorno agli 80 grammi, maturazione intermedia, a metà ottobre, di colore giallo brillante con inoculi rosso brillante, molto vicino alla columella centrale. La conservabilità risulta forse la migliore tra le bicolori.



1.6 Il campo sperimentale di *Actinidia deliciosa* ed *Actinidia chinensis* presso il CREA-FRU di Roma e la selezione C8 dell'Università di Udine

Come precedentemente detto i campi sperimentali del CREA-FRU di Roma erano formati da 1741 genotipi ottenuti da semi di libera impollinazione raccolti da frutti ottenuti a vario titolo sia in coltivazioni italiane che estere, Cina compresa. Quindi questi individui rappresentano diversi gruppi di “fratelli” in quanto. Di questi 1000 appartenenti ad *A. deliciosa* e 741 ad *A. chinensis*.

Questa popolazione, come descritto nel Cap. 2.1, è stata largamente decimata dagli eventi di PSA del 2011-2012. Tra gli esemplari vitali ci sono anche piante in valutazione da diverso tempo e meritevoli di essere considerate “selezioni avanzate” in quanto con caratteristiche fenologiche e pomologiche molto interessanti. Oltre alcune di queste, riconoscibili per la sigla “R”, è stato utilizzato un individuo messo a disposizione dal Prof. Guido Cipriani dell'Università di Udine e denominato C8.

Dei genotipi del CREA-FRU impiegati in questo lavoro e della C8 si riporta una breve descrizione.

C8 (*A. chinensis*). Selezionato dal Fruit&Tea Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, da ceppi raccolti in regioni Fang in provincia di Hubei nel 1980. Il peso medio del frutto è di 78 g (massimo 100 g), in sezione trasversale risulta di forma rotonda, trasversalmente semi-ellittico. La buccia leggermente verde-marrone, molto liscia, visivamente bello. La polpa è di colore giallo-verde, dolce e di buon profumo. Buoni i parametri di SS (12,5%) e di Vitamina C (114mg / 100g).



R I 17 (*A. chinensis*). Frutto ellittico. Epidermide di colore marrone scuro, presenta poca peluria. La polpa è gialla. Frutto di discreta pezzatura (75 g), matura precocemente (-40) e dal sapore molto buono.



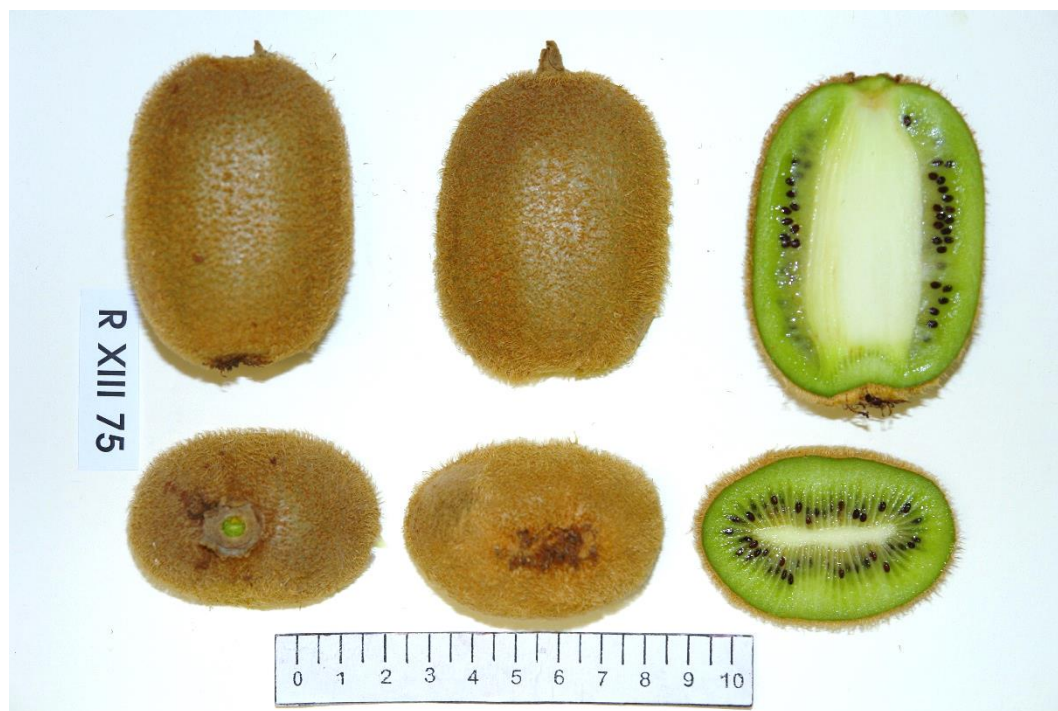
R II 28 (*A. chinensis*). Frutto ellittico. Epidermide di colore marrone-verde, presenta una leggera peluria e può manifestare segni di sfregamento con frutti/rami dovuti al vento. La polpa è gialla (rimane verde chiaro se raccolta troppo precocemente). Frutto di buona pezzatura (88 g), matura molto precocemente (-50) e dal sapore molto buono.



R II 26 (*A. chinensis*). Frutto “gemello” ma inferiore a R II 28. Forma ellittica, epidermide di colore marrone-verde, presenta una folta peluria. La polpa è verde chiaro e il sapore buono.



R XIII 75 (*A. deliciosa*). Maturazione prima di Hayward (-30), pezzatura buona (93). Forma longitudinale e trasversale cilindrica. Ottimo sapore, polpa verde. Molto tomentoso.



R XVI 131 (*A. deliciosa*). Frutto cilindrico leggermente costoluto. Ottima pezzatura (120 g), discreta tomentosità ma di facile eliminazione con la spazzolatura. Buona produzione. Frutto simile ad Hayward per alcune caratteristiche ma anticipa la raccolta (-20). Buona la conservazione in frigo.



2 La coltura nel mondo e in Italia

2.1 Il kiwi nel mondo, produzione e mercato

L'*actinidia* evidenzia, secondo i dati FAO, un trend di crescita tra i più rilevanti nell'ambito delle principali specie frutticole mondiali. La Cina rappresenta il primo produttore al mondo per superfici e volumi di prodotto (dati interni non ufficiali indicano in circa 70.000 ettari le superfici coltivate e circa 500.000 tonnellate le produzioni ottenute) ma viene spesso non inclusa nelle valutazioni a livello mondiale in quanto ancora oggi la coltivazione è di tipo estensivo (ridotte rese/ettaro) ed il prodotto è rivolto per la quasi totalità al consumo interno.

Quindi, escludendo la Cina le cui superfici non sono rilevate a dato certo dalla FAO, nel corso del decennio 2003-12, le superfici coltivate, sono passate da poco più di 60.000 a quasi 100.000 ettari (Palmieri A. e Pirazzoli C., 2014). La diffusione mondiale della specie resta piuttosto concentrata in pochi paesi (Fig. 5, Fonte <http://www.kiwifruitpsa.com>).



Fig. 5: kiwi. Diffusione commerciale nel mondo del kiwi

I primi 4 paesi produttori ed esportatori del mondo (Italia, Nuova Zelanda, Cile e Grecia) concentrano praticamente il 90% della produzione totale (propria elaborazione dati FAO 2014) (Fig. 6).

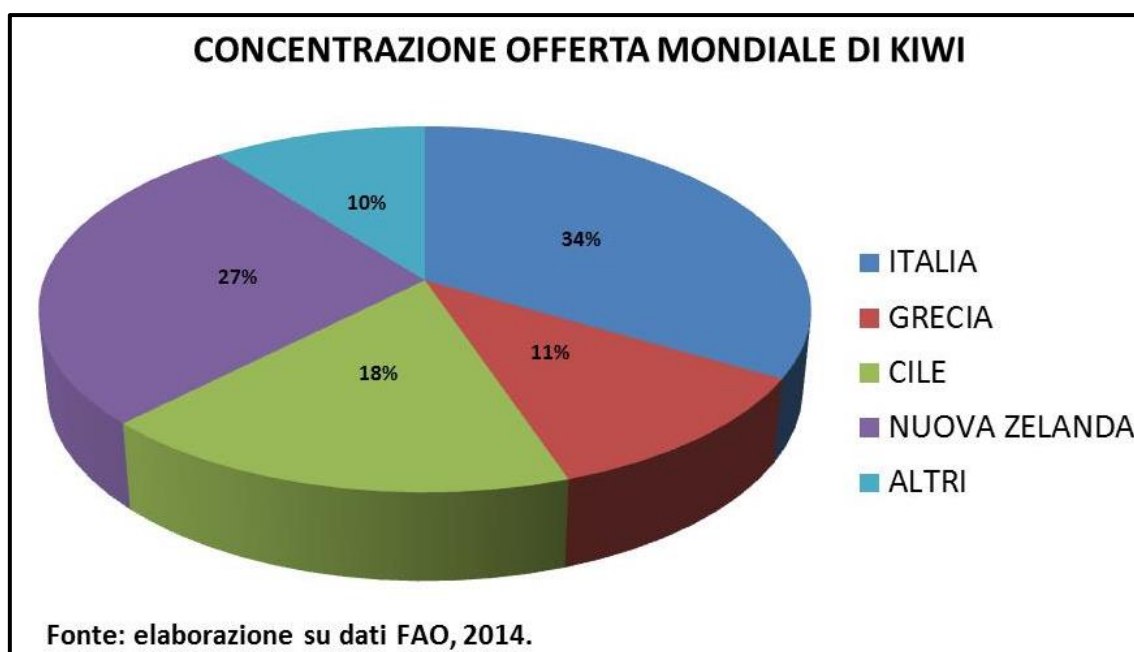


Fig. 6: maggiori paesi produttori di kiwi e relativa % sul totale commercializzato

Nel decennio 2003-2012, al netto dei raccolti cinesi, l'offerta è salita da meno di 1 milione a quasi 1,5 milioni di tonnellate (+52%), tanto da raggiungere il 22% della produzione frutticola mondiale (Palmieri A. e Pirazzoli C., 2014).

Relativamente all'Ue negli ultimi anni (2008-2014), significativi aumenti degli investimenti si rilevano in Grecia e, secondariamente, in Portogallo, Spagna e Italia. Nei paesi extra-UE è da segnalare la Turchia mentre per l'emisfero sud il Cile (Tab. 1).

Dati FAO (superfici, ettari)	2008	2012	2014
FRANCIA	4.163	3.952	3.790
GRECIA	4.800	7.300	7.880
ITALIA	22.417	24.327	24.828
PORTOGALLO	1.464	1.695	2.255
SPAGNA	1.187	1.413	1.469
TURCHIA	1.800	2.040	2.219
U.S.A. (CALIFORNIA)	1.700	1.497	1.659
TOT EMISFERO NORD	37.531	42.224	44.100
CILE	8.700	11.916	10.632
NUOVA ZELANDA	12.400	12.757	12.081
TOT EMISFERO SUD	21.100	24.673	22.713
TOTALE MONDIALE	58.631	66.897	66.813

Tab. 1: andamento della superficie coltivata a kiwi nel periodo 2008-2014

Relativamente ai singoli Paesi (Tab. 2), l'Italia è il primo produttore mondiale, con un volume medio di circa 500.000 t/annue, seguita dalla Nuova Zelanda con poco più di 400.000 t/a e dal Cile con circa 250.000 t/a. Di rilievo sono i volumi realizzati in Grecia (superiori a 170.000 t), in grado oggi di esercitare un'apprezzabile pressione competitiva sull'offerta italiana nel medesimo periodo dell'anno, a differenza di quella dei grandi produttori dell'Emisfero Sud (in quanto come logico la produzione è concentrata in mesi differenti).

Dati FAO (produzione, ton.)	2008	2012	2014
FRANCIA	65.670	65.253	62.000
GRECIA	84.300	161.400	171.510
ITALIA	473.955	384.844	506.958
PORTOGALLO	15.506	20.545	18.150
SPAGNA	17.709	18.804	20.881
TURCHIA	19.530	37.247	31.795
U.S.A. (CALIFORNIA)	20.865	29.600	25.855
TOT EMISFERO NORD	697.535	717.693	837.149
CILE	187.214	286.082	266.017
NUOVA ZELANDA	382.000	376.400	410.746
TOT EMISFERO SUD	569.214	662.482	676.763
TOTALE MONDIALE	1.266.749	1.380.175	1.513.912

Tab. 2: produzioni mondiali nel periodo 2008-2014

L'export è realizzato per quasi il 70% da Italia, Nuova Zelanda e Cile, mentre l'import, che nel 2012 ha interessato quasi 150 Paesi, è chiaramente più eterogeneo. I principali mercati di destinazione includono anche Paesi attivi riesportatori e sono rappresentati, nell'ordine, da Belgio, Spagna, Germania, Russia, Paesi Bassi, Giappone e USA.

L'export italiano, sebbene in lieve calo nei volumi ha toccato, invece, un record in valore, con 385 milioni di Euro nel 2013 con Germania e Spagna, che insieme ricevono 1/3 circa dei volumi complessivi (Fig. 7) (Palmieri A. e Pirazzoli C., 2014).

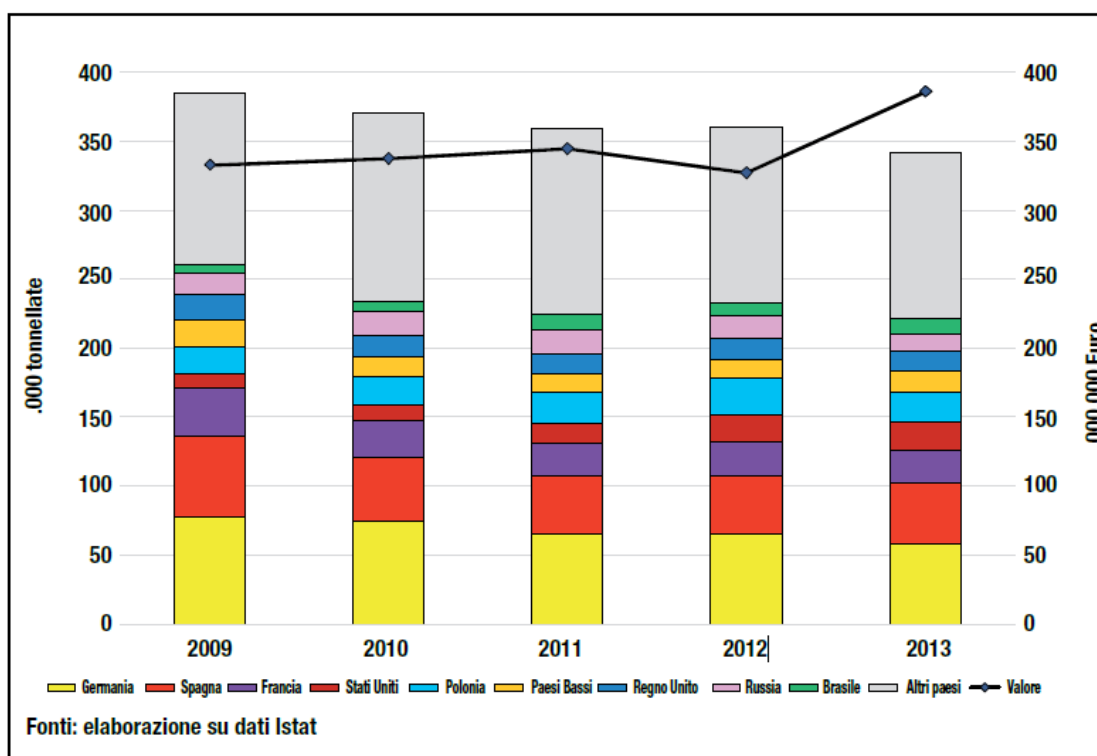


Fig. 7: valore e volume delle esportazioni di kiwi italiano verso i principali paesi mondiali

2.2 Il kiwi in Italia, produzione e mercato

L'Italia è senza dubbio uno dei paesi in grado di influenzare sia sul piano produttivo che commerciale la coltivazione del kiwi nel mondo, rappresentandone il primo paese produttore, se si esclude la Cina e concentrando quasi il 70% della produzione totale dell'emisfero Nord.

Negli anni più recenti la produzione commercializzabile italiana ha messo in evidenza un grosso potenziale produttivo. Naturalmente l'impulso alla maggior produzione è derivato dalla progressiva messa a dimora di nuovi impianti che hanno determinato un innalzamento del potenziale produttivo nelle diverse aree di coltivazione nazionali.

Come a livello mondiale, anche in Italia l'*actinidia* presenta una diffusione piuttosto concentrata in poche aree quali Lazio, Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte (insieme circa l'80% della superficie italiana, vedi Fig. 8, Fonte: <http://www.kiwifruitpsa.com>) ed ultimamente Calabria.

In Italia nel 2014 sono stimati complessivamente circa 24.800 ettari in produzione coltivati a kiwi, pari a -2% sul 2013 (Macchi E., 2014)

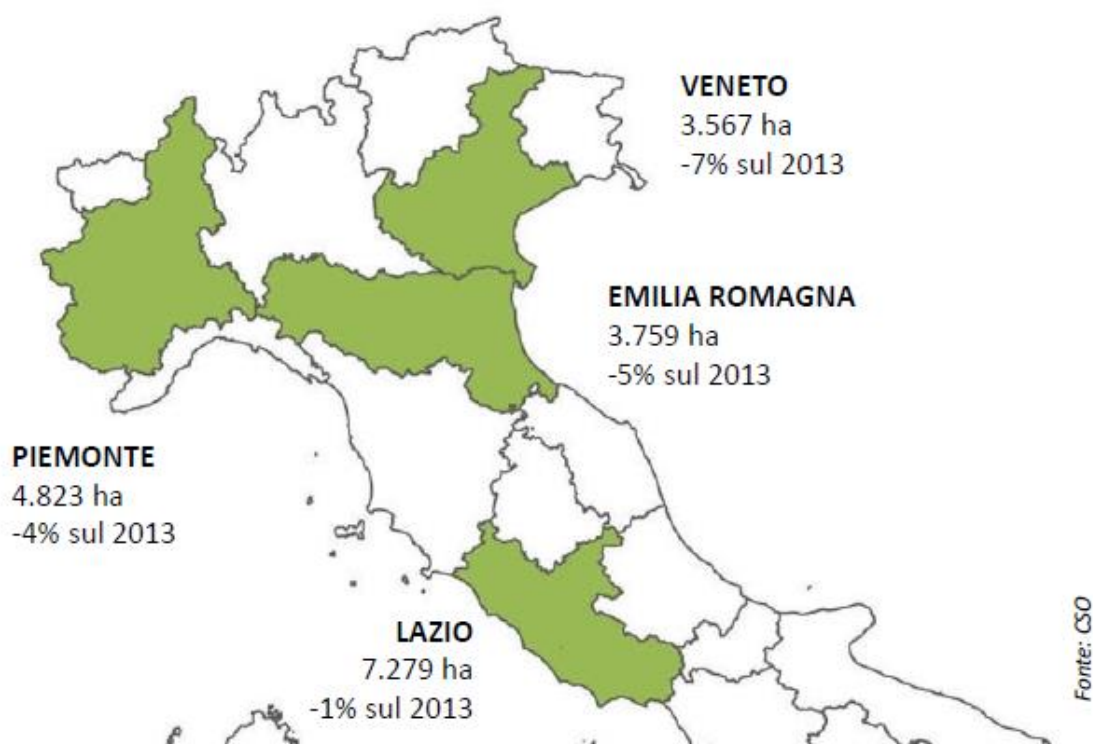


Fig. 8: principali regioni produttive italiane

Il Dossier KIWI 2013 (Fonte <http://www.csoservizi.com>) evidenzia come nel nostro paese la coltivazione è incentrata su 4 importanti regioni produttrici: Lazio, con oltre il 30% degli investimenti, Piemonte con circa il 20%, Emilia Romagna, con il 16% e Veneto con il 15%. Seguono altre importanti regioni come Calabria, Campania e Friuli.

Per la commercializzazione il Dossier KIWI 2013 indica come l'Italia mediamente destina quasi il 70% della sua produzione ai mercati esteri, che negli anni si sono ampliati notevolmente. L'export italiano rappresenta inoltre quasi il 60% dell'export complessivo dei paesi dell'emisfero Nord, come conseguenza della prevalenza sul piano produttivo.

I paesi dell'Unione Europea continuano ad assorbire quasi il 70% del kiwi italiano, ma sono importanti anche altre aree come i paesi europei extra UE, in primis la Russia, ed il Nord America (Tab. 3).

Italia, kiwi: esportazioni	2011/12		2012/13	
DESTINAZIONE	Tonnellate	%	Tonnellate	%
UE (28)	245.282	69%	211.108	68%
EXTRA UE (28)	28.050	8%	21.463	7%
NORD AMERICA	25.781	7%	28.984	9%
ALTRO	57.706	16%	50.570	16%
TOTALE	356.819	100%	312.125	100%
Fonte: elaborazioni dati CSO su dati Istat				

Tab. 3: esportazione kiwi italiano. Fonte Dossier KIWI 2013

Sempre il medesimo Dossier KIWI 2013 evidenzia come anche nell'ambito del mercato interno (Fig. 9) la specie appare in salute. Infatti nei primi anni duemila la dimensione del mercato al dettaglio del kiwi in Italia si aggirava sulle 77.000 tonnellate, oggi si pone stabilmente su oltre 124.000 tonnellate, questo grazie ad una notevole espansione. Ci si mantiene pertanto su livelli decisamente più elevati rispetto ai primi anni duemila, ma si conferma una sostanziale stabilità ormai da diversi anni. A questi dati non va attribuita una lettura necessariamente negativa, in quanto va considerato che nello stesso periodo la maggior parte dei prodotti frutticoli hanno subito una forte crisi dei consumi, situazione che non ha interessato il kiwi.



Fig. 9: mercato interno del kiwi. Fonte: elaborazioni CSO su dati GFK Italia

Infine il Dossier ci rappresenta l'indice di penetrazione di mercato (Fig. 10), che si può leggere come la popolarità di un brand o di una categoria ed è definita come il numero di persone o una categoria che compra un oggetto di un particolare brand o di una particolare categoria diviso la grandezza di popolazione interessata, definendolo, al pari del consumo medio annuo per famiglia acquirente, abbastanza stabile.

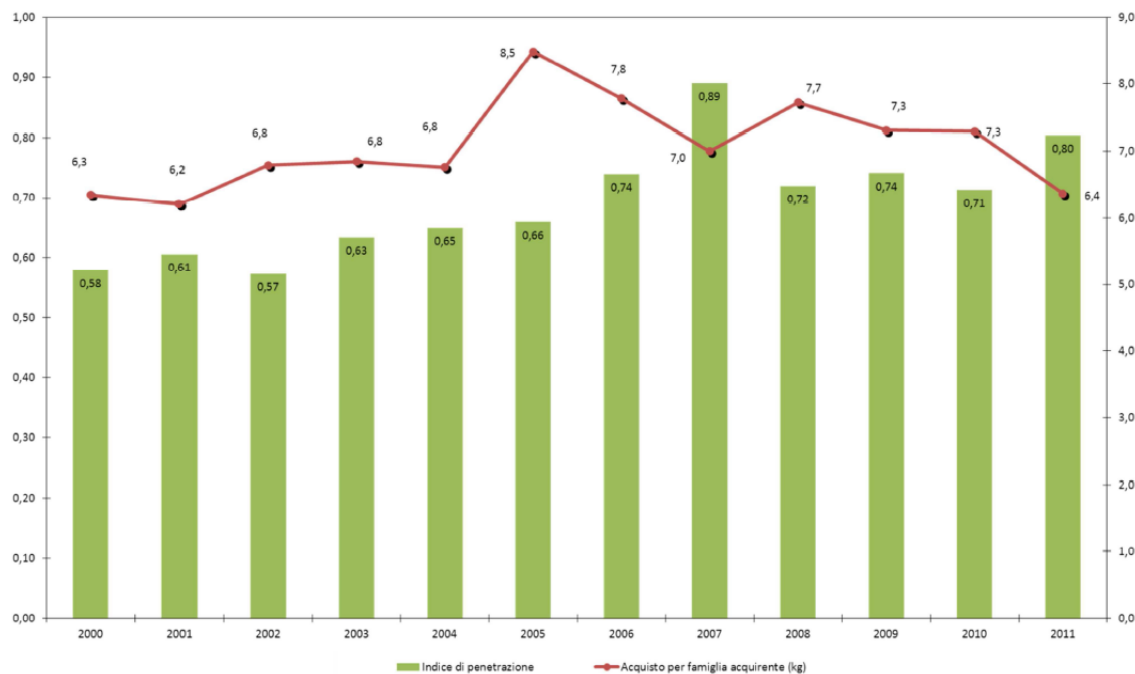


Fig. 10: penetrazione nel mercato del kiwi. Fonte Dossier KIWI 2013

2.3 Il kiwi Latina IGP

Da anni il mercato dei prodotti agricoli ed agroalimentari è contraddistinto dalla creazione di “loghi” identificativi in grado di conferire al prodotto delle caratteristiche estrinseche ben definite e in grado di differenziarlo da prodotti di medesima tipologia e che in assenza di questa diversa identificazione sarebbero del tutto analoghi. In pratica le certificazioni di produzione (ad es. BIO ed Agricoltura Integrata) piuttosto che quelle di origine geografica (DOP e IGP su tutte) dei prodotti agricoli e dei prodotti agricoli trasformati acquisiscono sempre più importanza in un contesto di maggior apertura del mercato, rendendo i prodotti identificabili e distinguibili agli occhi del consumatore informato.

In quest’ambito l’Italia è il Paese europeo con il maggior numero di prodotti agroalimentari a denominazione di origine e a indicazione geografica riconosciuti dall’Unione europea. Un’ulteriore dimostrazione della grande qualità delle nostre produzioni, ma soprattutto del forte legame che lega le eccellenze agroalimentari italiane al proprio territorio di origine. Il sistema delle Indicazioni Geografiche dell’Ue, infatti, favorisce il sistema produttivo e l’economia del territorio; tutela l’ambiente, perché il

legame indissolubile con il territorio di origine esige la salvaguardia degli ecosistemi e della biodiversità; sostiene la coesione sociale dell'intera comunità. Allo stesso tempo, grazie alla certificazione comunitaria si danno maggiori garanzie ai consumatori con un livello di tracciabilità e di sicurezza alimentare più elevato rispetto ad altri prodotti.

In quest'ottica nel Lazio esiste il kiwi Latina IGP soggetto all'egida ed il controllo del MiPAAFF che, ad oggi, ha delegato la Camera di Commercio di Latina.



Il disciplinare dell'IGP Kiwi Latina (Fonte: <http://cameradicommerciolatina.it>) definisce con precisione:

- La specie botanica e la varietà: *Actinidia deliciosa* varietà Hayward
- Zona di produzione: comprende 24 comuni nelle provincie di Roma e Latina (Sabaudia, Latina, Pontinia, Priverno, Sezze, Cori, Sermoneta, Cisterna di LatinaAprilia), nella Regione Lazio.
- Metodo di produzione: rapporto maschi/femmine, periodo di diradamento e numero di frutti/pianta, epoca di raccolta
- Aspetto e sapore: forma cilindrico-elissoideale con diametro inferiore all'altezza. La buccia è di colore bruno e fondo verde chiaro: la polpa è di colore verde smeraldo chiaro, con columella biancastra e morbida, circondata da una corona di piccoli e numerosi semi neri. La consistenza è soda, il sapore presenta una sapidità tipica, dolce-acidula gradevole che si raggiunge a completa maturazione.
- Storia
- Gastronomia
- Commercializzazione
- Nota distintiva

3 *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* (PSA)

Gli *Pseudomonas syringae* sono batteri gram negativi, aerobi facoltativi, ossidasi positivi, catalasi positivi ed hanno flagelli polari che permettono loro di muoversi. Questi batteri si trovano nel terreno e nelle acque ma anche sulle piante. Producono pigmenti come la piocianina che permette di alterare la funzione ciliare, stimolare la risposta infiammatoria e provocare danno ai tessuti. Alcuni ceppi sono capsulati. La specie include oltre 50 “pathovars” ossia ceppi che condividono gli stessi ospiti. Tre di questi sono patogeni dell’*actinidia* e sono geneticamente diversi. Ciò ci permette di identificarli utilizzando tecniche molecolari.

3.1 Struttura genomica

Al fine di mettere in evidenza le caratteristiche genetiche del patogeno è stato fatto, mediante sequenziamento (Illumina Genome Analyzer IIx), un approfondito studio sul genoma di tre ceppi del batterio rappresentativi di epidemie e rinvenimenti segnalati 20 anni fa in Giappone ed in Italia centrale, nonché della recente e più distruttiva pandemia (Marcelletti *et al.*, 2011).

Dallo studio del genoma (Scortichini e Cipriani, 2012) si mette in evidenza come il patogeno sia dotato di set di geni che lo rendono fortemente competitivo nell’ambiente-pianta. Possiede, numerosi gruppi siderofori con fortissima affinità per lo ione Ferro. Questo consente al batterio di “catturare” tale microelemento fondamentale per il proprio metabolismo e, potenzialmente, di sottrarlo ad altri microrganismi presenti nella pianta, sfavorendo, così, la loro moltiplicazione. Possiede, inoltre, geni per la degradazione delle strutture della pianta contenenti lignina (rami, cordoni, tronco). Inoltre, ha una serie di geni in grado di espellere dalla propria cellula antibiotici prodotti da batteri sia gram-negativi che gram-positivi. PSA possiede anche geni per la resistenza al rame (*copA* e *copB*). Tali geni consentono al batterio di introdurre all’interno della propria cellula ioni rame senza subire effetti deleteri. Questo fa pensare che una somministrazione eccessiva di rameici nell’ambiente di coltivazione del kiwi potrebbe accentuare fenomeni di resistenza. Si ricorda, infatti, che gli stessi geni di resistenza al rame sono presenti anche nei ceppi di PSA isolati in Giappone nel 1984 ed in Corea nel 1992 e per i quali è stata già accertata la resistenza al rame (Goto *et al.*, 1994, Nakajima *et al.*, 2002). Lo studio accurato sugli effettori (molecole proteiche responsabili della patogenicità/virulenza del batterio e della sua eventuale specificità patogenetica) ha rivelato che le popolazioni del batterio si differenziano tra di loro per la presenza/assenza di otto effettori. Altri aspetti

molto interessanti evidenziati dalla studio riguardano l'acquisizione da parte della popolazione del patogeno che attualmente sta causando danni rilevanti in tutto il mondo di nuovi elementi genomici quali un megaplasmide di circa 160 kb e di una struttura profagica. È verosimile che tali elementi possano contenere ulteriori fattori di virulenza non ancora decifrati. Inoculazioni artificiali su foglie di kiwi verde e di kiwi giallo hanno confermato la maggiore aggressività della popolazione pandemica, nei confronti delle due specie, rispetto alla popolazione precedente che risulta più adattata per il kiwi verde.

3.2 Popolazioni batteriche ed epidemie

Saggi molecolari hanno evidenziato tre principali popolazioni di PSA di diversa origine. La prima “giapponese/coreana” di media virulenza, una “europea” ad alta virulenza ed una “cinese” sempre ad alta virulenza (Balestra *et al.*, 2012). Numerosi lavori sulla struttura genetica del batterio agente causale della malattia hanno ripetutamente evidenziato la presenza di quattro biovar principalmente associate ad altrettante macroaree geografiche (Mazzaglia *et al.*, 2011; Chapman *et al.*, 2012; Mazzaglia *et al.*, 2012; Balestra *et al.*, 2013; McCann *et al.*, 2013).

Ci sono diversi ceppi di PSA trovati in tutto il mondo, alcuni dei quali causano danni moderati (biovar 1 e 2) e altri causano danni importanti (biovar 3) (McCann *et al.*, 2013). La biovar 4 è associata ad una scarsa forma di virulenza poi ricondotta ad una nuova patovar con il nome di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (Cunty *et al.*, 2014). La biovar 3 è l'agente causale di cancro batterico del kiwi, che sta causando significativi danni alle piante di *actinidia* anche in Nuova Zelanda, dove è stato comunemente indicato come PSA-V (Vanneste *et al.*, 2013).

I primi paesi a riferire i sintomi di cancro batterico in frutteti di kiwi sono stati il Giappone nel 1984 (Takikawa *et al.*, 1989) causati da biovar 1 (Ferrante e Scortichini, 2015), la Corea alla fine del 1980 (Koh *et al.*, 2010) causata da biovar 2 (Ferrante e Scortichini, 2015), seguita dall'Italia nel 1992 (Scortichini, 1994) (biovar 1). I risultati di uno studio di 5 anni su PSA in Cina hanno indicato che il cancro batterico del kiwi è stato un problema in Cina già nel 1996 (Li *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2004) e che il cancro batterico era uno dei fattori più gravi limitanti la coltivazione del kiwi nell'area dello Sichuan cinese (Liu *et al.*, 2012). Recenti ceppi isolati provenienti dalla Cina si inseriscono all'interno della popolazione biovar 3 (Ferrante e Scortichini 2015).

Il ceppo di PSA biovar 3 rinvenuto in Nuova Zelanda (McCann *et al.*, 2013;.. Vanneste *et al.*, 2013) ha causato una pandemia globale (Scortichini *et al.*, 2012) ed è stato

inizialmente segnalato in Italia nel 2008 (Balestra *et al.*, 2008; 2009b) e in Turchia nel 2009 (Bastas e Karakaya, 2012), seguiti da Nuova Zelanda nel 2010 (Everett *et al.*, 2011). Utilizzando sia l'analisi "MultiLocus Sequence Typing" (MLST), sia la PCR di sequenze ripetute e unitamente al rilevamento della possibile presenza nei vari ceppi batterici di fitotossine (Scortichini e Cipriani, 2012) si è accertato che la popolazione che negli ultimi anni sta causando notevoli danni in Italia e in Nuova Zelanda è diversa da quelle che hanno causato ingenti perdite economiche in Giappone e in Corea del Sud negli '80 e '90 dello scorso secolo, ma che risultarono, nello stesso periodo, non aggressive in Italia (Ferrante e Scortichini, 2009; Ferrante e Scortichini, 2010; Chapman *et al.*, 2011; Marcelletti e Scortichini, 2011; Marcelletti *et al.*, 2011). Tali aspetti mettono in evidenza come l'ambiente di coltivazione della pianta (clima, caratteristiche del terreno, tecniche agronomiche e colturali), a parità di germoplasma coltivato, possa giocare un ruolo fondamentale nel contribuire o meno ad esaltare la virulenza del patogeno.

Vale a dire che le epidemie riscontrate nelle diverse regioni italiane sono tutte causate da ceppi del batterio geneticamente molto simili tra loro, molto virulenti e caratterizzati da forte espansione epidemica. Tale caratteristica lascia ipotizzare una singola o pochissime introduzioni di materiale infetto latentemente in un'unica o in poche aree della penisola ed una rapidissima diffusione del batterio in tutte le zone in cui è stato rinvenuto (Scortichini e Cipriani, 2012).

Oltre alle tre popolazioni (giapponese/italiana anni 1980-'90; coreana anni '90, pandemica attuale) molto virulente, ne esisterebbe una quarta, isolata finora solamente in Nuova Zelanda e caratterizzata da scarsa virulenza nei confronti del kiwi verde e del kiwi giallo. Infatti, questa popolazione, geneticamente piuttosto differente dalle altre, sembra indurre solamente maculature fogliari e mai cancri ai rami e/o al tronco (Chapman *et al.*, 2011).

3.3 Ciclo della malattia

È stato dimostrato che temperatura e precipitazioni sono associate alla crescita della popolazione batterica (Serizawa e Ichikawa 1993b/c; Serizawa *et al.*, 1994; Tyson *et al.*, 2012).

Gelate autunno-invernali unite ad eventi meteorici particolarmente avversi, come grandine e persistenti o forti piogge, sono fattori fortemente predisponenti alla malattia (Scortichini, 2015). È stato visto come gli eventi di gelo durante l'inverno (2007-2008) associati ai forti eventi di PSA della seguente primavera e autunno su kiwi a polpa gialla

(Ferrante *et al.*, 2012) ed a polpa verde (Ferrante e Scortichini 2014). È stato messo in evidenza come i danni da gelo permettono la facile e più rapida colonizzazione del patogeno nella pianta attraverso il tessuto danneggiato e come *A. deliciosa* risulta più freddo tollerante di *A. chinensis* (Ferrante e Scortichini 2014). È comunque importante notare come PSA non è un batterio troppo “amico” del gelo come invece il genere *Pseudomonas syringae* (Rees-George *et al.*, 2010).

Uno studio ha messo in evidenza come le piante sane di un campo sono state infettate tutto l'anno, soprattutto in primavera, e che gli eventi di infezione sono fortemente associati alle precipitazioni (Tyson *et al.*, 2014b), concludendo così che la pioggia e il vento sono stati i principali meccanismi di diffusione naturale localizzata all'interno dei campi della Nuova Zelanda.

Altri eventi di infezione sono gli strumenti di potatura, attrezzi e macchinari vari, animali e insetti, il suolo e le persone (Everett *et al.*, 2012). In generale sembra che la diffusione localizzata di PSA (<10 km) è probabile che sia prevalentemente a causa della pioggia e del vento mentre la disseminazione di lunga distanza (> 10 km) è probabile che sia prevalentemente a causa di fattori umani piuttosto che attraverso materiale vegetale infetto (Froud *et al.*, 2015).

La caratteristica principale di PSA è la sua notevole capacità infettiva e di diffusione che può esplicare durante tutto l'arco dell'anno, con la sola possibile eccezione, nei climi tipicamente mediterranei, del periodo estivo. Tuttavia, anche in piena estate, per non dar luogo alla colonizzazione, devono essere presenti, comunque, elevate temperature (superiori ai 35°C) e assenza totale di precipitazioni. Altra peculiarità che lo rende tra i batteri fitopatogeni più distruttivi finora osservati è la possibilità di essere veicolato molto efficacemente tra le piante mediante i copiosi essudati che fuoriescono dai cancri lungo tutto il periodo autunno-invernale. Durante tale periodo le gemme possono essere raggiunte dalle cellule del batterio. Successivamente, il patogeno causa immediatamente l'avvizzimento delle gemme in fase di apertura o, attraverso le aperture stomatiche, colonizza le foglie in accrescimento. Il patogeno può anche raggiungere i fiori e causare, in pochissimi giorni, il loro rapido disseccamento.

Evidenze sperimentali indicano come condizioni ottimali per la moltiplicazione del batterio sono le temperature comprese tra 12 e 18°C soprattutto in concomitanza di periodi umidi (Serizawa e Ichikawa, 1993b/c). Una fase fondamentale del ciclo della malattia di PSA è la capacità di migrare dalle foglie, mediante le nervature, ai germogli e

da qui raggiungere il ramo. Questa migrazione endofitica determina il caratteristico ripiegamento ad “uncino” del germoglio e il suo successivo avvizzimento.

In primavera il batterio può essere veicolato efficacemente dalla pioggia soprattutto se accompagnata da forti venti. In questo modo PSA penetra anche nelle lenticelle. Una volta raggiunto il ramo, il cordone o il tronco principale, il batterio inizia a moltiplicarsi attivamente, rallentato o inibito solamente dalle temperature molto elevate. In autunno, con la ripresa delle piogge, il batterio può dare luogo a nuove infezioni a carico delle foglie e penetrare nelle cicatrici che vengono provocate nel peduncolo in seguito alla raccolta del frutto. Dal peduncolo, durante il periodo autunno-invernale il batterio può migrare endofiticamente e raggiungere il ramo (Scortichini e Cipriani, 2012).

Esiste la possibilità di colonizzazione anche mediante penetrazione dalle cicatrici fogliari durante la caduta delle foglie. I tagli di potatura, le gelate, le grandinate possono contribuire moltissimo, nel periodo invernale, all’ulteriore diffusione del patogeno nel frutteto. Il batterio può colonizzare e sopravvivere anche nel polline (Gallelli *et al.*, 2011, Stefani e Giovanardi, 2001; Vanneste *et al.*, 2011), anche se ancora mancano evidenze che accertino la possibilità che PSA possa causare infezioni in pieno campo attraverso l’impollinazione. È verosimile, invece, che il batterio possa risiedere latentemente nel materiale di propagazione utilizzato per i nuovi impianti.

3.4 Sintomi e danni da PSA

Cancro batterico del kiwi è stato descritto come una malattia ciclica. I sintomi del cancro si esprimono da inverno a primavera sui rami e tronchi infetti seguita da lesioni dei tessuti verdi in primavera e all’inizio dell’estate (Serizawa *et al.*, 1994).

PSA è stato rilevato sulle foglie, tralci, tronco, germogli, fiori, parti interne di frutta, polline, essudati linfatici e radici (Takikawa *et al.*, 1989, Serizawa e Ichikawa 1993a, Balestra *et al.*, 2009b; Everett *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011a; Abelleira *et al.*, 2014). PSA è stato isolato dal tessuto di fiori apparentemente sani, germogli, foglie e materiale legnoso (Gallelli *et al.*, 2011; Tyson *et al.*, 2014a/b; Taylor *et al.*, 2015) e piccole colonie batteriche sono state trovate su parti del fiore in campioni di polline (Spinelli *et al.*, 2011). Ci sono prove sufficienti che PSA può essere presente e vitale nel polline raccolto da regioni infette. Vi sono prove che il polline può essere infetto anche se raccolto da fiori apparentemente asintomatici.

La trasmissione del cancro batterico da polline contaminato è possibile e quindi l’importanza di avere pollini analizzati e sani, soprattutto per gli eventi di impollinazione

artificiale, è chiara. Tuttavia non è stata chiarita l'importanza del polline infetto, usato per l'impollinazione artificiale, in relazione alla gestione della malattia in frutteti (Froud *et al.*, 2015).

Il batterio agisce a livello vascolare e una volta penetrato all'interno dell'ospite è difficile da contrastare, così come il suo processo infettivo e i danni da esso derivanti.

Vi è una notevole variazione nella predisposizione delle diverse cultivar commerciali al cancro batterico. La Hort 16A e altre cultivar di *A. chinensis* dimostrano una maggiore suscettibilità alla malattia rispetto a cultivar di *A. deliciosa* (Balestra *et al.*, 2009a, b). L'impatto della PSA, sempre su Hort 16A rispetto ad Hayward, è risultato più rapito e più forte (Froud *et al.*, 2014).

I sintomi di questa batteriosi vascolare si caratterizzano per:

- Imbrunimento dei fiori e dei boccioli e la loro successiva cascola (Fig. 11 e 12);
- Presenza di necrosi fogliari di forma regolare di color marrone scuro contornate da un alone di colore giallo (Fig. 13);
- Formazione di cancri su tronco e tralci con abbondante produzione di un essudato di colore rosso scuro (Fig. 14, 15 e 17);
- Avvizzimento dei nuovi germogli (Fig. 16);
- Collasso/avvizzimento dei frutti;
- Morte della pianta (Fig. 18)

3.5 Misure di prevenzione e contenimento

La recente epidemia di “cancro batterico” del kiwi, che sta interessando tutte le maggiori aree di produzione di kiwi del mondo, è particolarmente problematica sia per la virulenza del patogeno che per le difficoltà di contenimento legate alla mancanza di prodotti dotati di specifica attività battericida e alla ridotta disponibilità di principi attivi registrati sulla coltura. La difesa deve basarsi innanzitutto su interventi di tipo preventivo e comunque in caso di piante infette queste vanno rimosse e distrutte, come anche parti delle stesse (Gullino *et al.*, 2012), compreso l'intero apparato radicale, e il reimpianto deve essere effettuato solo nella stagione seguente (Balestra *et al.*, 2012).

La difesa fitosanitaria da batteriosi per l'*actinidia* si basa essenzialmente sull'applicazione di buone pratiche agronomiche-colturali e sull'impiego costante e tempestivo di formulati rameici (Balestra, 2004).

In particolare si è rilevato come un'equilibrata gestione vegeto-produttiva del frutteto, senza eccessivi apporti di concimazione azotata, per non favorire il lussureggiamento vegetativo (Costa *et al.*, 2012), sia in grado di ridurre in maniera significativa la suscettibilità dell'actinidio alle infezioni di PSA.

Lo stress legato a sbagliati o eccessivi interventi agronomici, siano essi relativi alle concimazioni e all'irrigazione, riduce, infatti, le difese della pianta contro PSA. In particolare, un'eccessiva irrigazione, una potatura squilibrata o eseguita in periodi impropri (es. fase del pianto) e gli errori nell'apporto di acqua sembrano essere fattori predisponenti alla malattia (Costa *et al.*, 2012). Altre tecniche, invece, quali ad esempio la coltivazione sotto tunnel, modificando i parametri ambientali del microclima attorno alla pianta (UR, T, bagnatura fogliare), possono ridurre la crescita epifita del batterio e minimizzare quindi i rischi d'infezione.

Una ricerca (Tomassini *et al.*, 2015) ha interessato l'individuazione di antagonisti a PSA andando a selezionare, in alcuni impianti di kiwi giallo gravemente colpiti, piante senza sintomi dalle quali sono stati isolati numerosi ceppi batterici endofiti. Almeno 15 di essi hanno mostrato una marcata attività anti PSA in prove di laboratorio. Tassonomicamente tali ceppi sono ascrivibili ai generi *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Kluyvera*. Un isolato di *Pseudomonas* è stato usato per prove di lotta in campo in un impianto sperimentale con risultati incoraggianti.

È stata valutata l'efficacia di diversi prodotti rameici e formulati alternativi al rame per scongiurare la nascita di resistenze a tale metallo, possibili anche a basse dosi (Aiello *et al.*, 2014). Questi sono spesso autorizzati come fertilizzanti, antagonisti, disinfettanti, biostimolanti, induttori di resistenza, utilizzati o potenzialmente utilizzabili contro questa emergenza fitosanitaria.

Al fine di prevenire e controllare la fitopatologia i diversi autori (Cit. precedenti) e diversi consigli tecnici raccomandano di:

- Effettuare analisi del suolo e fogliari per evitare squilibri nutrizionali;
- Evitare i sistemi di irrigazione per aspersione;
- Assicurare un buon drenaggio ed assenza di ristagni idrici;
- Evitare di determinare ferite accidentali;
- Disinfettare tutti gli utensili impiegati nelle operazioni di potatura;
- Chiudere i tagli di potatura superiori ai 2-3 cm con mastici ecologici miscelati a sali di rame;

- Distruggere tramite bruciatura ed all'esterno dell'impianto i residui di potatura;
- Effettuare trattamenti idonei ed autorizzati per ridurre/prevenire l'infezione;
- Identificare, segnalare e distruggere le piante sintomatiche da PSA;

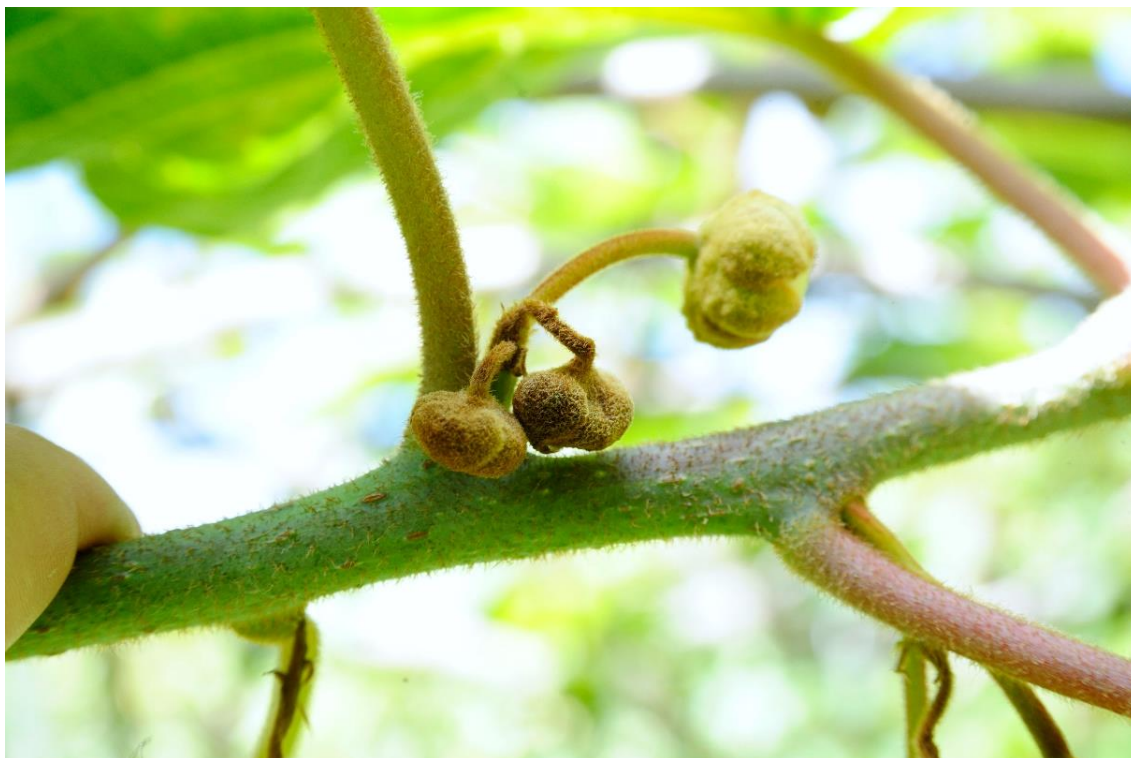


Fig. 11: Imbrunimento dei fiori.



Fig. 12: Cascata dei fiori successiva all'imbrunimento

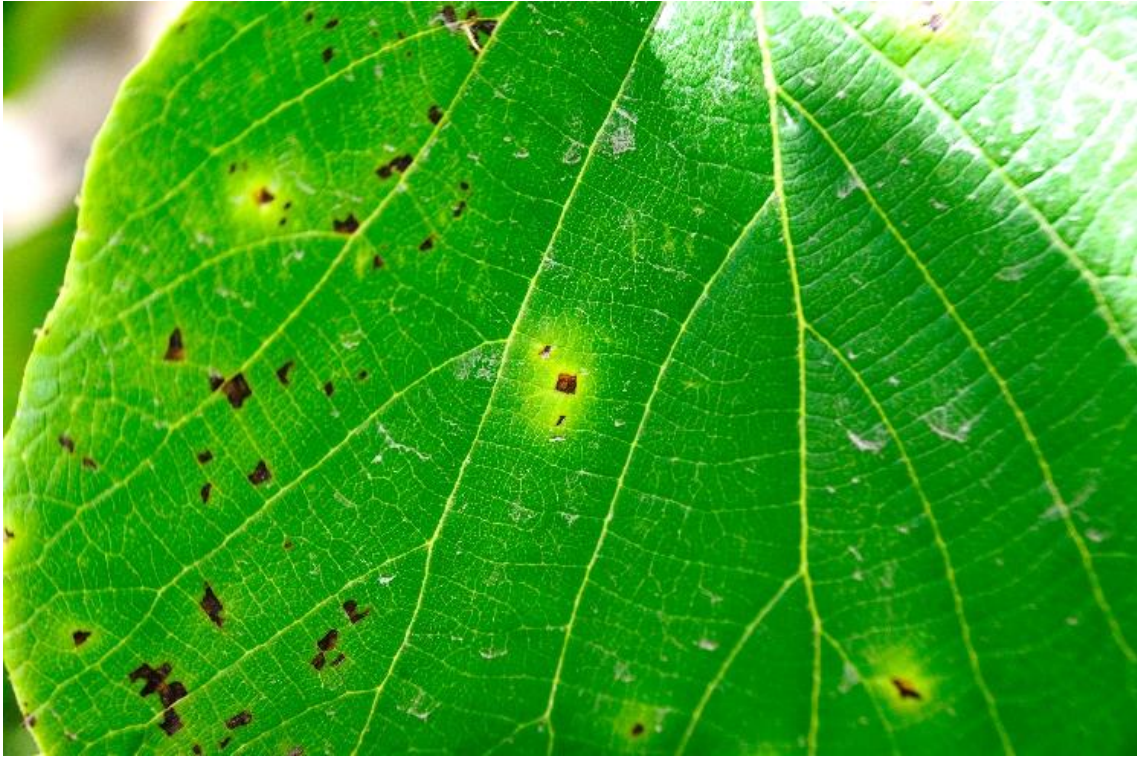


Fig. 13: Presenza di necrosi fogliari. L'alone giallo circostante è l'area di colonizzazione del batterio



Fig. 14: Essudato su giovane tralcio patate l'inverno precedente.



Fig. 15: tipica goccia di essudato batterico.



Fig. 16: Avvizzimento dei nuovi germogli



Fig. 17: formazione di cancro rameale su giovane con fuoriuscita essudato



Fig. 18: morte dell'ospite, espressione massima della malattia

4 L'impatto della PSA nei campi coltivati

L'avvento del PSA nei campi coltivati è definibile come il classico “fulmine a ciel sereno” in quanto fino al 2008/2009 il kiwi era ritenuto una pianta rustica e poco esigente di cure fitosanitarie. Infatti, dagli anni '70, momento in cui nel Lazio fu avviata l'introduzione nei campi a fine produttivo (Cacioppo, 1989) l'*actinidia* non aveva manifestato problemi particolari.

Si era avuta qualche segnalazione di batteriosi, putativamente già PSA, in Italia (Scortichini e Simeoni, 1993), California (1983), Giappone (1989) e Corea (1994) e si sospetta che fosse presente nei campi di Latina e provincia dal 1980 (Cacioppo, 2012) ma in una forma poco aggressiva e quindi senza nessun impatto rilevante sulla produzione. Nel 1989 è stata anche individuata la batteriosi da *Pseudomonas viridiflava* (Cacioppo e Scortichini, 1990) che si è manifestata con alterazioni fiorali.

Questo fino al 2008/2009 quando, inizialmente in campi di *A. chinensis* (soprattutto HORT 16A e Jin Tao), si è manifestata una forma molto grave ed aggressiva di PSA che ne ha determinato delle forti riduzioni di superfici e produzione commercializzabile (Fig. 19, fonte www.csoservizi.com), anche perché di lì a poco gli attacchi si sono manifestati anche sulle cultivar a “polpa verde” che avevano inizialmente mostrato una suscettività minore.

KIWI – ITALIA: Superfici Totali – altre varietà

ettari							
Italia	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Jin Tao	480	530	580	650	580	500	510
Zespri - Hort 16A	600	700	800	600	200	130	80

KIWI – ITALIA: Produzione commercializzabile – altre varietà

tonnellate						
	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Jin Tao	380	2.570	4.625	5.782	5.294	6.345
Zespri - Hort 16A		14.200	15.000	10.000	3.600	4.000

Fig. 19: forte impatto iniziale (superfici e produzione) della PSA nei campi di cultivar “polpa gialla” quali Jin Tao e Zespri Gold.

Il comparto produttivo del kiwi ha comunque e fortunatamente reagito, anche per effetto di immediate attività di ricerca. Questo ha portato inizialmente alla sostituzione delle *cultivar* “gialle” con le “verdi” (anche passando dalla capitozzatura “a raso” con lo scopo di far sviluppare il portainnesto che in genere è una cv. Hayward). Subito dopo sono stati messi a dimora nuovi actinidi di *A. deliciosa* ma anche di *A. chnensis* per effetto di una forte spinta commerciale della nuova varietà G3, ritenuta molto tollerante, ad opera della stessa Zespri Italia.

Oltre l'appena descritto impatto di tipo fisico sui campi coltivati va anche preso in considerazione l'impatto di tipo economico. Infatti, da un lato la situazione appena descritta ci ha fatto assistere ad anni in cui a fronte di un incremento di superfici investite non si ha un analogo aumento di produzione (solo dal 2014 si sta assistendo ad un aumento produttivo) e dall'altro lato l'affacciarsi della PSA in forma così aggressiva sta costringendo gli agricoltori a prendere una serie di misure di monitoraggio e gestione agronomica che vanno ad incidere negativamente sul reddito colturale in quanto generano un aumento diretto dei costi di produzione. A questo si può aggiungere una possibilità intermedia ossia che in alcuni frutteti, in alcuni anni, si può assistere ad attacchi batterici che riducono il potenziale produttivo (cascola fiorale, cascola frutti allegati, avvizzimento rami con frutti ecc) e quindi la resa ettaro e quindi aumento indiretto dei costi di produzione per unità di prodotto raccolto.

Le misure di gestione agronomica sono attuate in molteplici forme ma nella maggior parte dei casi impegnano l'impresa con specifici e molteplici trattamenti fitosanitari (rameici e battericidi), modifiche negli apporti nutritivi e potature più attente ed accurate. A ciò si aggiunge il tempo necessario per il controllo e sorveglianza dell'impianto.

Uno studio svolto dal CSO (Macchi, 2014) evidenzia il cambiamento dei costi di produzione del kiwi delle aziende agricole nella situazione di: assenza della batteriosi, presenza di batteriosi (maggiori costi per la prevenzione/difesa) e presenza batteriosi associata ad una riduzione di resa unitaria (5, 10 e 15%).

L'aggravio di costo nelle diverse situazioni va da un minimo di 400 €/ha in Calabria ad un massimo di 2.000 €/ha in Emilia Romagna per l'Hayward e fino a 2.500 €/ha per le varietà a polpa gialla.

Il costo per unità di prodotto è invece influenzato dalla resa/ha e questo consente al Lazio, che prima aveva il 3° costo di produzione per ettaro, ove le rese unitarie sono le più alte d'Italia, di avere un'incidenza di costo sul prodotto superiore solo alla Calabria (che però ha i più bassi costi di produzione) (Fig. 20).

	Costo di produzione (€/ha)	Rese (kg/ha)	Costo produzione (€/kg)
Cuneo	14.939	23.000	0,65
Verona	18.182	28.000	0,65
Rovigo	14.806	24.000	0,62
Ravenna	16.089	28.000	0,57
Latina	15.695	32.500	0,48
Reggio Calabria	10.660	28.000	0,38
Fonte: elaborazioni dati CSO, 2014			

Fig. 20: stima dei costi di produzione ad ettaro ed a kg di prodotto

In uno studio precedente (Pirazzoli e Palmieri, 2013) si prende in considerazione l'evoluzione dei costi di gestione in assenza/presenza di PSA per singolo areale di produzione. Infatti, nel confronto tra senza/con PSA si ha un incremento di costo primo di coltivazione da circa il 5% della Calabria a circa il 16% dell'Emilia Romagna, passando dai 288 €/ton della Calabria ai 526 €/ton del Piemonte. Secondo lo studio nel Lazio si produce con 372 €/ton (senza PSA) a 424 €/ton (con PSA).

Chiaramente la situazione italiana, che ricordiamo è il primo paese produttore escludendo la Cina, non è diversa da quella di altri importanti paesi nel mondo. Infatti, anche la Nuova Zelanda (Macchi, 2014/2) ha subito forti cali di produzione del "giallo" (da 30 a 9 milioni di vassoi, 2011-2012) e in parte del "verde" (da 10.000 ha del 2009 a 8.500 del 2013).

5 Il miglioramento genetico delle piante da frutto

Sono trascorsi poco meno di cent'anni dalla nascita del miglioramento genetico (MG) delle piante agrarie, la scienza che applica le leggi della genetica alla selezione delle piante coltivate. Gregor Mendel il monaco che pubblicava nel 1866 le leggi fondamentali della genetica, non poteva certamente immaginare che avrebbe generato profondi effetti sulle scienze agrarie ma non solo.

Il MG inizialmente è avvenuto con l'uomo che era selezionatore, ossia sceglieva in modo inconsapevole ed empirico i fenotipi considerati migliori, per poi passare in tempi recenti (XIX secolo) ad essere combinatore tramite esecuzione di incroci controllati (intra o inter-specifici o auto-incroci) e ad oggi essere generatore di nuova variabilità genetica, quindi di nuovo DNA vegetale, con l'applicazione di tecniche di mutazione indotta o di ingegneria genetica (OGM).

In questi 150 anni il bilancio nel campo agrario ha all'attivo molti risultati positivi come l'aumento della produttività delle colture, l'aumento generalizzato delle dimensioni e delle caratteristiche qualitative dei frutti, la modellizzazione dell'habitus vegetativo della pianta, l'adattamento delle specie a climi e suoli ritenuti un tempo inadatti ecc. Questo ha portato però anche a delle situazioni che oggi possono rivelarsi limitanti per la frutticoltura come l'erosione del patrimonio genetico e la perdita dei caratteri di resistenza alle malattie.

Quindi se da un lato è vero che il MG dei vegetali si basa soprattutto sulla variabilità dei caratteri, che vengono manifestati sia dalla diversità fra le specie, sia da quella all'interno di loro, è anche vero che lo stesso, inteso come la selezione di progenie con caratteristiche superiori ai parentali per un determinato carattere, comporta necessariamente l'erosione genetica, ossia la perdita dei caratteri non desiderati.

Per il rischio di erosione genetica basta pensare che il pesco, originario della Cina e trasferito nel mediterraneo e da qui negli U.S.A., intorno al 1850 contava più di 400 cultivar nei soli Stati Uniti. Però in pochi anni, per effetto dell'importazione di una nuova varietà (Chinese cling) più gradita ai produttori si intrapresero piani di miglioramento ristretti a solo questa tipologia di prodotto e che portarono a restringere il panorama varietale in maniera drastica. Infatti uno studio (Scorza *et al.*, 1985) ha dimostrato che ben 547 cultivar di pesco su 798 analizzate (68%) avevano sangue di Chinese cling.

Un aspetto legato alla restrizione della base genetica e all'uso ripetuto nei programmi di miglioramento genetico di pochi genotipi ricorrenti, scelti sulla base delle sole caratteristiche qualitative dei frutti, è la perdita della resistenza alle principali malattie.

Molti problemi epidemiologici sono legati al commercio mondiale, allo spostamento di persone e merci da un continente all'altro e al trasporto con esse di patogeni dai centri in cui convivono in un delicato equilibrio con le piante ospiti a luoghi dove essi trovano nuove specie non preparate a fronteggiarli. Le specie che convivono dal punto di vista evolutivo con i loro patogeni hanno sviluppato nel tempo meccanismi di resistenza, che le piante di zone dove il patogeno non esiste non hanno sviluppato. Il contatto tra il patogeno e questi nuovi soggetti è sempre drammatico. La via del ritorno è iniziata, ma è difficile, perché molte resistenze a malattie sono state perse e bisogna tornare nei centri di origine delle specie per cercare i geni perduti (Testolin, 2004) e perché i centri di origine della diversità genetica sono in pericolo ovunque nel mondo (Myers *et al.*, 2000). Detto ciò e nello specifico delle specie da frutto va evidenziato come il miglioramento genetico delle piante arboree da frutto è spesso ostacolato da numerosi aspetti connessi alle caratteristiche biologiche riscontrabili in molte specie, tra le quali il lungo ciclo riproduttivo, la prolungata fase giovanile, l'elevata eterozigosi e la complessa biologia fiorale, che rendono particolarmente lungo e oneroso il perseguimento di obiettivi specifici attraverso le tecniche convenzionali, quali l'incrocio e la selezione. Inoltre, dal momento che le specie arboree da frutto vengono propagate attraverso metodi di propagazione agamica, la diffusione di un valido nuovo individuo può avvenire rapidamente dopo la sua costituzione. Inoltre la gran parte delle specie arboree da frutto sono altamente eterozigoti, spesso sono presenti meccanismi di autoincompatibilità e, in alcuni casi, di dioicismo.

L'attuale miglioramento genetico si basa quindi su risorse genetiche, ossia le fonti (genotipi) a cui attingere per i programmi di miglioramento genetico, notevolmente diverse rispetto ai progenitori ancestrali. Le "vecchie" varietà o i genotipi locali, oggi presenti praticamente solo nei campi delle Risorse Genetiche Vegetali (vere e proprie banche del germoplasma) sono spesso ancora utili in quanto presentano caratteri di "rusticità" determinati da un adattamento alle aree di coltivazione in cui sono state un tempo selezionate e possono fungere da "serbatoio" di geni o varianti alleliche interessanti per il moderno miglioramento genetico. Viceversa questi genotipi non possiedono caratteristiche pomologiche idonee alla moderna frutticoltura.

5.1 Il miglioramento genetico del kiwi

L'*Actinidia spp.* come visto è originaria della Cina e risulta di domesticazione abbastanza recente (Ferguson, 2004). Altrettanto recentemente la terra di origine ha chiuso le

frontiere all'esportazione di materiale vegetale autoctono che non siano varietà commerciali, questo come sorta di protezionismo forse anche per la grande varietà di caratteri interessanti per il mercato che ha il genere: colori, gusti, forme dei frutti, habitat vegetativi, adattabilità a climi e suoli.

La conseguenza di ciò è che l'industria dell'*actinidia* di basa su una ristrettissima base genetica ed è pertanto esposta ai rischi di attacchi da parte di patogeni e parassiti che potrebbero risultare fatali alla coltura (Testolin, 2009).

Nel mondo materiale vegetale utile per i programmi di breeding, oltre la Cina, è presente in Nuova Zelanda (HortResearch) e in Italia (CREA-FRU, Università di Udine e di Bologna). Anche se c'è da dire come a seguito degli eventi aggressivi di batteriosi non è certo se e quanto materiale sia ancora presente *in situ*.

Da far presente come le accessioni di *actinidia* (250) siano comunque in numero molto limitato rispetto quelle di altre specie, soprattutto annuali come il frumento (47.000) (Testolin, 2009).

Analogo a quanto osservato sull'espressione della malattia da PSA dal sottoscritto e dal gruppo di lavoro della sezione di Pomologia e Miglioramento Genetico del CREA-FRU di Roma anche in Nuova Zelanda, presso i campi del germoplasma di Te Puke colpiti dal ceppo altamente aggressivo *Psa-V*, si è osservata una varia risposta al patogeno da un'alta suscettibilità ad una discreta tolleranza dei diversi genotipi di *Actinidia*, il che suggerisce che lo sviluppo di cultivar più tolleranti o resistenti dovrebbe essere possibile (Beatson *et al.*, 2014).

Nel complesso, *A. chinensis* sembra essere la specie più colpita da *Psa-V*, con molti genotipi che mostrano sintomi secondari come fiore appassito, fusto e l'avvizzimento dei rami/branche fino alla morte dell'intera pianta. Diversamente *A. deliciosa* appare in generale più tollerante mostrando essenzialmente macchie fogliari (*spotting*) e minor frequenza di sintomi secondari come sopra descritti (anche se l'appassimento del fiore o dei piccoli frutti allegati è stato osservato).

In *A. eriantha* e *A. arguta*, gli unici sintomi osservati che possono essere causa di *Psa-V* sono gli *spotting* e rarissimi appassimenti del fiore. Test fatti su numero più ampio di individui mediante biosaggi *Psa-V* dovrebbero consentire l'identificazione di genotipi tolleranti, e l'applicazione di mappatura genetica di popolazioni segreganti dovrebbe consentire geni di resistenza *Psa-V* per essere identificati. Il breeding dovrebbe poi consentire il trasferimento di resistenza tra le diverse specie/genotipi (Beatson *et al.*, 2014).

Per il materiale vegetale presente in commercio (cultivar commerciali), utilizzabile ai fini della costituzione di nuove varietà, si rimanda alla descrizione delle specie e varietà principalmente coltivate (Cap. 1.5) mentre per le risorse genetiche utilizzate nel presente lavoro e conservate nei campi sperimentali del CREA-FRU e dell'Università di Udine ed si rimanda al capitolo 1.6.

Le tecniche di miglioramento genetico, per l'induzione di nuova variabilità, nel caso del kiwi possono ricondursi a metodi convenzionali (incrocio intra-specifico, incrocio inter-specifico); a metodi non convenzionali (varianti somaclonali da attività *in vitro*, trattamento con agenti mutageni, tecnologia del DNA ricombinante).

Tra l'altro nel kiwi, che è pianta prevalentemente dioica (i pochi eventi di ermafroditismo anche se studi sono in corso, come in Nuova Zelanda, ad oggi non sono rilevanti), è da escludersi la possibilità dell'autoimpollinazione o del reincrocio.

Tralasciando gli OGM in quanto in Italia non ne è possibile allo stato attuale la coltivazione seppure a fini scientifici, emblematica è la distruzione del campo sperimentale di kiwi imposta dal Ministero dell'Ambiente all'Università degli Studi della Tuscia (Rugini, 2012); tralasciando anche la descrizione delle attività di incrocio (comunque descritta con immagini nei capitoli successivi) e rimandando la descrizione delle possibilità di MG dovute alle varianti somaclonali al paragrafo della coltura *in vitro*, si procede ad un focus sul trattamento con agenti mutageni in quanto è la tecnica di miglioramento genetico applicata nelle attività sperimentali del seguente dottorato.

5.2 Le basi molecolari delle mutazioni

La mutagenesi, ossia la creazione di mutazioni, è un fenomeno strutturalmente e naturalmente presente, anche se con frequenze molto basse, negli esseri viventi.

Nei programmi di miglioramento genetico si utilizzano vari tipi di agenti mutageni chimici (molecole che interagiscono col DNA modificandolo) e fisici (radiazioni ionizzanti e non) per aumentare artificialmente la frequenza delle mutazioni (mutagenesi indotta) e favorire la comparsa di fenotipi voluti.

In generale nelle piante a riproduzione gamica i trattamenti mutageni si effettuano principalmente su seme o su polline. L'utilizzo del polline offre alcuni vantaggi quali la possibilità di lavorare con grandi quantità di materiale in spazi ridotti e di utilizzare anche le radiazioni ultraviolette (U.V.). Inoltre, fecondando una pianta portaseme coi granuli pollinici mutagenizzati, si possono ottenere piante interamente eterozigoti per la mutazione. Un limite è che il trattamento va effettuato in loco, o non a grandi distanza, in

quanto il trasporto e la conservazione del polline risulta in genere abbastanza complesso. Il seme al contrario può essere facilmente inviato a centri appositi per la mutagenesi e conservato per un certo periodo prima di essere impiegato, inoltre è una struttura più resistente del polline e subisce quindi meno danni fisiologici in seguito a certi trattamenti. Gli organismi il cui genoma è stato modificato mediante tecniche di mutagenesi indotta, che non sono state incluse nella definizione data dalla normativa di riferimento, non sono considerati OGM. Per questo motivo la mutagenesi chimico-fisica è accettata universalmente, ponendo quindi molti meno problemi in ogni ambito inerente alla modifica di varietà vegetali.

Uno degli ambiti più interessanti è lo sfruttamento di mutageni chimici per indurre modificazioni casuali all'interno del genoma.

I composti chimici, sebbene siano efficaci nell'indurre mutazioni, provocano contemporaneamente un'elevata letalità, riducendo l'efficienza del trattamento. In generale si distinguono tre classi principali di mutageni chimici in base al loro meccanismo d'azione:

- Analoghi di base, in questa classe rientrano come composti il 5-bromouracile e la 2-aminopurina;
- Agenti intercalanti, in cui ritroviamo come composti le acridine o il bromuro d'etidio;
- Agenti alchilanti, nell'ambito di questa classe si ritrovano alcune delle sostanze più usate per la mutagenesi delle piante coltivate quali: l'etilmetansulfonato (EMS), il dietilsolfato (DES), l'etilenimina (EI), la nitrosoguanidina (NG), l'etilenitrosourea (ENU) e la metilnitrosourea (MNU).

I mutageni chimici includono sia sostanze naturali che sintetiche. Questi mutageni possono essere raggruppati in due classi diverse in base al loro meccanismo di azione.

Le mutazioni indotte dagli analoghi delle basi e dagli agenti intercalanti dipendono dalla replicazione, mentre agenti modificatori delle basi possono indurre mutazioni ad ogni stadio del ciclo cellulare.

Il "danno" prodotto dai mutageni chimici rientra nell'ambito di due classi principali:

1. Mutazioni per sostituzione, in cui una coppia di basi sostituisce un'altra e si definiscono di tipo puntiforme. Queste sono:

- Transizioni, in cui una purina/pirimidina sostituisce un'altra base dello stesso tipo.
 - Trasversioni, in cui una purina è rimpiazzata da una pirimidina o viceversa.
2. Mutazioni per inserzione/delezione, in cui una o più coppie nucleotidiche vengono inserite o eliminate nel DNA

Uno degli agenti mutageni maggiormente utilizzato è l'ethyl-methane-sulfonate (EMS) (Fig. 21, <http://www.sigmaaldrich.com>) che è un composto chimico alchilante di tipo organico, mutageno, teratogeno e cancerogene spesso usato anche per la realizzazione di popolazioni di TILLING (Till *et al.*, 2007).

Questo composto è stato utilizzato anche nel presente studio nei modi e nelle forme in seguito descritte, sia per agire su tessuti vegetali poliploidi (semi) che aploide (antere/polline) che con tecniche di applicazione *in vitro*.

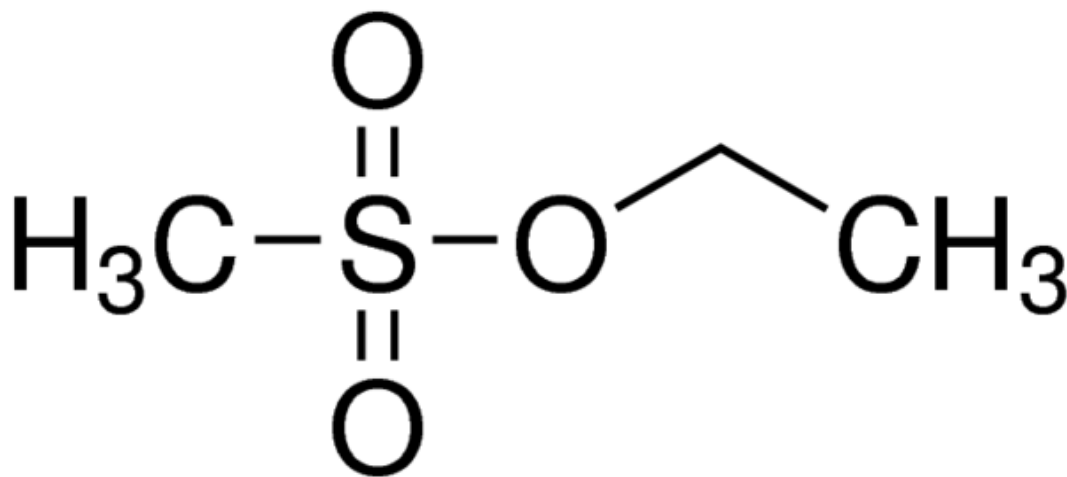


Fig. 21: struttura dell'EMS

L'EMS produce mutazioni random di tipo puntiforme nel materiale genetico introducendo sostituzioni nucleotidiche tramite l'alchilazione di un residuo di guanina, provocando maggiormente transizioni G→A e C→T (Greene *et al.*, 2003; Slade *et al.*, 2005). Infatti, il gruppo etile dell'EMS reagisce con la guanina formando una base anomala. Durante la replicazione del DNA, la DNA polimerasi, può inserire una timina (T) al posto della citosina (C) normalmente attesa con una frequenza relativamente elevata (rapporto O6/N7 con alchilazione della guanina pari al 3%, 1 mutazione ogni 300 kb) (Vogel *et al.*, 1995; Till *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2009). I successivi cicli di replicazione portano alla mutazione completa. Dalla coppia originale G:C si passa ad A:T.

Ciò determina una modifica dell'informazione genetica, che risulta spesso dannosa per le cellule in quanto ha una probabilità relativamente alta di provocare la formazione di codoni non senso (Fig. 22).

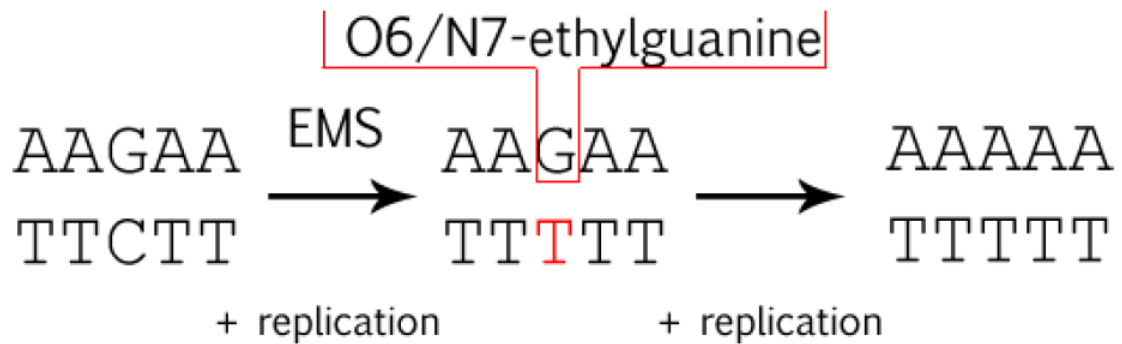


Fig. 22: meccanismo di azione dell'EMS

6 La coltura *in vitro*

La coltura *in vitro* delle piante è un approccio biotecnologico che consiste nella coltivazione *in vitro* di cellule, tessuti ed organi vegetali in un ambiente sterile ed artificiale e quindi in condizioni controllate.

La coltura *in vitro* si basa sulla capacità delle piante di produrre nuovi individui da singole cellule o tessuti. Questo concetto fu introdotto nel 18° secolo dai due biologi tedeschi Schleiden (1838) e Schwann (1839).

6.1 Breve storia della coltura *in vitro* dei vegetali

La tecnica della coltura *in vitro* progredì rapidamente nel 1900 grazie a successive scoperte che ne permisero gradualmente una evoluzione e quindi l'ampia diffusione dei nostri giorni. Tra le scoperte fondamentali possiamo annoverare i vari approcci che permisero di effettuare dal 1902 al 1904 colture *in vitro* di mesofillo fogliare e di cellule del capillizio radicale (Haberlandt, 1902) ma anche di embrioni di semi di numerose crucifere e meristemi radicali in terreno coltura composto da minerali (Hanning, 1904). Nel 1934 (White) si ottenne la crescita *in vitro* di apici radicali di pomodoro e la successiva subcoltura in un mezzo composto da sali inorganici ed estratto di lievito.

Un primo passo decisivo nell'evoluzione della coltura *in vitro* ci fu nel 1937 (Went e Thimann) con la scoperta del primo ormone vegetale, l'acido indol-acetico (IAA) e con la dimostrazione nel 1939 da parte di White, di Gautheret e di Nobécourt, tutti in via indipendente, che lo stesso risultava fondamentale per ottenere una crescita illimitata *in vitro* da tessuti non meristemati, sia che fosse negli espianti (White) che nel terreno di coltura (Gautheret e Nobécourt).

Successivamente Folke Skoog dell'Università del Wisconsin sperimentò numerose sostanze per valutare la loro capacità di iniziare e mantenere la proliferazione di tessuti coltivati di midollo di tabacco. Egli osservò che il DNA dello sperma di aringa autoclavato possedeva un potente effetto sulla divisione cellulare. Questa sostanza fu identificata, nel 1955 da Miller, come la 6-furfurilamminopurina e denominata chinetina. La chinetina non è un regolatore di crescita vegetale naturale ma è un sottoprodotto della degradazione del DNA indotta da calore. La scoperta della chinetina suggerì che molecole naturali con una struttura simile potevano avere un ruolo nel regolare l'attività della divisione cellulare nella pianta.

Solo anni dopo, Carlos Miller (1967) negli Stati Uniti e D.S. Letham (1964) in Australia dimostrarono indipendentemente che estratti di endosperma immaturo di mais (*Zea mais*)

contenevano una sostanza che aveva lo stesso effetto biologico della Chinetina, cioè stimolava le cellule adulte vegetali a dividersi quando veniva aggiunta ad un terreno di coltura insieme ad auxina. Letham, nel 1973, ne isolò la molecola e la identificò come la 6-(4-idrossi-3-metilbut-trans-2-enilammino) purina, che chiamò appunto Zeatina.

Nel frattempo Skoog e Miller (1957) dimostrarono in tabacco che il differenziamento *in vitro* di radici e germogli da colture di tessuti fogliari era legato a rapporti ben precisi tra auxine e citochinine e nel 1962, Murashige e Skoog misero a punto il terreno MS che è ancora oggi la formulazione di sali più usata nel campo delle colture *in vitro* di cellule vegetali.

6.2 La micropropagazione

Tra le esigenze della moderna frutticoltura riveste particolare importanza la disponibilità di varietà caratterizzate da 4 requisiti fondamentali: uniformità, stabilità, identificabilità ed elevato valore agronomico. Quindi nelle specie arboree, indipendentemente dal sistema di propagazione, la perfetta omogeneità genetica si ottiene attraverso la produzione di cloni per propagazione vegetativa.

Nelle piante la propagazione può essere sessuata o gamica (vera e propria riproduzione) o asessuata, agamica o vegetativa (si parla di moltiplicazione). La prima passa per il seme. La seconda può essere *in vivo* (es. per pollone, talea, innesto ecc...) o *in vitro* (micropropagazione).

Per micropropagazione si intende una tecnica di propagazione *in vitro* che consiste nella moltiplicazione vegetativa di piante attraverso la coltura di loro parti, dette espianti, in condizioni di sterilità, ricorrendo a substrati nutritivi artificiali, contenenti sali minerali (macro e micro elementi), carboidrati, e, solitamente fitoregolatori, di composizione nota in condizioni ambientali controllate di luce e temperatura.

La micropropagazione ha diversi vantaggi anche pratici, rispetto alle tradizionali tecniche di propagazione vegetativa, tra cui la ridotta quantità di materiale richiesto per avviare la coltura *in vitro*, l'elevato tasso di moltiplicazione e ottenimento di un elevato numero di piantine complete di apparato radicale e caulinare con sviluppo uniforme, geneticamente omogenee (clone) e con elevata qualità fitosanitaria. Inoltre, con questa tecnica è possibile, a volte, propagare piante di specie difficilmente propagabili con i metodi tradizionali. Inoltre, un numero elevato di piantine può essere ottenuto in spazi limitati (camere di coltura).

La micropropagazione, tuttavia richiede costi iniziali consistenti per l'avvio dei laboratori e la disponibilità di personale specializzato.

6.3 Metodi della micropropagazione

I metodi per propagare *in vitro* le piante variano, a seconda della specie e delle condizioni di coltura. Nel campo frutticolo la propagazione per germogli ascellari è il sistema più diffuso.

6.4. Propagazione per germogli ascellari

E' il sistema di clonazione *in vitro* maggiormente utilizzato nell'attività vivaistica per un gran numero di specie (Kurtz *et al.*, 1991). Si basa inizialmente sull'annullamento della dominanza apicale e lo stimolo allo sviluppo delle gemme ascellari addizionando al terreno di coltura le citochinine per ottenere la proliferazione dei germogli e successivamente sostituendole con auxine quando si intende indurre la loro radicazione (George, 1993).

Una volta stabilizzata, la coltura di germogli ascellari consente dei tassi di moltiplicazione affidabili e duraturi, ed una minore suscettibilità a variazioni genetiche.

6.4.1 Stadi della micropropagazione per germogli ascellari

Nella micropropagazione, è possibile individuare varie fasi che si caratterizzano per le procedure metodologiche applicate (Miller e Murashige, 1976).

Scelta della pianta madre e allestimento della coltura *in vitro*

La qualità dell'espianto e la successiva risposta *in vitro* sono significativamente influenzate dalle condizioni fitosanitarie e fisiologiche della pianta madre (Debergh e Maene, 1981; Read, 1988).

La scelta della pianta madre è quindi un fattore molto importante infatti, con la micropropagazione è possibile produrre, da una sola gemma, in un anno, centinaia di migliaia di piantine. È pertanto essenziale una corretta valutazione iniziale delle caratteristiche genetiche e sanitarie della pianta madre per non influire negativamente su tutto il materiale clonale propagato con gravi conseguenze economiche e fitosanitarie.

L'allevamento di piante madri in condizioni controllate è il modo più semplice per favorire l'allestimento della coltura *in vitro* in quanto consente di effettuare trattamenti di

sterilizzazione più blanda sugli espianti iniziali e di avere maggiori possibilità di sopravvivenza e di ricrescita *in vitro*.

Gli espianti sono sottoposti a sterilizzazione della superficie esterna poiché la presenza di contaminazioni da microrganismi influisce negativamente sulla sopravvivenza dei germogli, sulla loro crescita e sulla successiva proliferazione. La sterilizzazione al tempo stesso deve permettere di mantenere la vitalità delle cellule vegetali.

La sterilizzazione può essere eseguita con diverse sostanze come quelle di Fig. 23 anche se le più comunemente utilizzate sono l'ipoclorito di sodio (NaOCl), l'alcool etilico e il sodio mertiolato.

Agente sterilizzante	Concentrazioni	Tempo di esposizione
Ipoclorito di calcio (CaCl_2O_2)	5-10%	10-30 min
Ipoclorito di sodio (NaOCl)	1-6%	10-30 min
Alcool etilico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	70-95%	30 sec - 2 min
Sodio mertiolato ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$)	0.5-2%	10-30 min
Cloruro di mercurio (HgCl_2)	0.5-2%	15-30 min
Acqua ossigenata (H_2O_2)	10-12%	5-10 min

Fig. 23: esempi di agenti sterilizzanti, concentrazioni e tempi di esposizione suggeriti per la sterilizzazione

Alla soluzione sterilizzante vengono di solito aggiunte alcune gocce di detergente o tensioattivo (es. Tween), che permette una maggiore efficacia del prodotto chimico. La scelta del tipo di prodotto sterilizzante e del tempo di impiego dipenderà dal materiale di partenza. Ad espianti erbacei in genere corrispondono somministrazioni di soluzioni sterilizzanti più blande di quelle a cui in genere sono sottoposti i tessuti lignificati, spesso con gemme dormienti.

Dopo aver mantenuto gli espianti a contatto con la soluzione sterilizzante occorre sciacquarli con acqua distillata sterile per 2-3 volte. Il risciacquo serve ad eliminare l'agente sterilizzante che, altrimenti, diventerebbe fitotossico.

Qualora l'espianto manifesti fenomeni ossidativi di imbrunimento è opportuno aggiungere all'acqua dell'ultimo risciacquo dell'acido ascorbico o acido citrico come antiossidanti (Bharadwaj e Ramawat, 1993).

Naturalmente il prelievo si esegue sotto cappa a flusso laminare, facendo uso di strumenti quali pinze e bisturi continuamente sterilizzati. Per il prelievo da piante arboree le parti vegetali più comunemente usate sono meristemi, gemme ascellari con o senza porzione di rametto e/o apici vegetativi.

Non esiste un terreno valido per l'impianto della coltura asettica di qualunque specie e formulazioni vanno valutate sia in base alla specie che, a volte, al genotipo. Tuttavia, i terreni maggiormente utilizzati derivano da modificazioni della formulazione di base del terreno di Murashige e Skoog (1962). Le citochinine e le auxine sono aggiunte frequentemente ai terreni di coltura utilizzati in questa fase per favorire la sopravvivenza degli espianti e lo sviluppo dei germogli (Hu e Wang, 1983). La citochinina maggiormente usata in questa fase ma anche nella successiva per il suo basso costo e la sua elevata efficienza è la 6-benziladenina (BA) (Gaspar *et al.*, 1996).

Proliferazione di germogli ascellari

In questa fase vengono effettuati ripetuti cicli di proliferazione di germogli in un terreno di coltura contenente citochinina così da inattivare la dominanza apicale. Le colture sono regolarmente suddivise in germogli di minori dimensioni utilizzati per ulteriore proliferazione.

Quindi, ottenuto l'espianto sterile, viene stimolata la formazione di nuove gemme per proliferazione da germogli ascellari che consente di ottenere un elevato numero di germogli in breve tempo.

Le operazioni di subcoltura (trasferimento periodico in terreno fresco) dei germogli sono effettuate sotto cappa a flusso laminare, avendo cura di sterilizzare gli strumenti (bisturi, pinze ecc) passandoli prima in alcool e poi alla fiamma di un becco-bunsen o con altri strumenti di sterilizzazione. I germogli vengono sub-colturati con cicli di 15-30 giorni, a seconda della specie.

Radicazione

Spesso i germogli ottenuti dalla fase di moltiplicazione presentano maggiore accostamento e minore crescita verso l'alto, portando, in alcuni casi, ad avere delle "piantine" troppo corte per essere poste a radicare.

Si procede, in questo caso, prima della radicazione, con una fase di allungamento che permette di ottenere germogli ben sviluppati con uno stelo allungato e lamina fogliare ben distesa più adatti alla radicazione.

L'allungamento viene eseguito trasferendo per 10-15 giorni i germogli in un substrato di coltura in cui viene ridotta la concentrazione di citochinine rispetto al terreno di moltiplicazione. Le citochinine non vengono eliminate del tutto perché mantengono anche la giovanilità degli espianti. Per la fase di radicazione *in vitro* i germogli sono indotti a radicare utilizzando un terreno contenente auxine. Quelle maggiormente usate sono IBA, NAA e IAA. Va comunque detto che le radici formate *in vitro* sono meno funzionali di quelle formate *in vivo* e dovranno, come del resto la pianta, adattarsi alle nuove condizioni durante l'acclimatamento.

Si può anche procedere solo all'induzione della radicazione ed effettuare la radicazione in serra (radicazione *ex vitro*). Per alcune specie, mentre la moltiplicazione è soddisfacente non lo è altrettanto la radicazione, rendendo impossibile o non economicamente vantaggioso l'intero processo di micropropagazione.

Per favorire la rizogenesi nelle specie recalcitranti si può agire sul tipo e la concentrazioni nel terreno di coltura delle auxine e sul loro tempo di applicazione, sull'agente gelificante o su altri fattori chimici o fisici (es. trattamenti di buio).

Ambientamento o acclimatamento

Le piante radicate (o solo indotte a radicare) sono trapiantate in un idoneo substrato (solitamente si tratta di combinazioni di terriccio, torba, perlite o vermiculite e mantenute. Questa è una delle fasi più critiche dell'intero processo micropropagativo. Prima del trapianto in vivaio le piante micropropagate devono trascorrere un periodo in serra sotto tunnel con film plastico in condizioni di umidità relativa elevata, ridotta intensità luminosa ed una temperatura compresa tra i 20 ed i 27°C che consentano un graduale adattamento alle condizioni *in vivo*. Le plantule prodotte *in vitro* hanno, infatti, superficie fogliare fortemente traspirante per ridotta presenza di cuticola nell'epidermide e difettosa autoregolazione di apertura e chiusura degli stomi, attività fotosintetica limitata in quanto *in vitro* sono prevalentemente eterotrofe (Martin e Gella, 1987) e sono prive di organismi simbionti che promuovano lo sviluppo radicale e l'assunzione delle sostanze nutritive.

La permanenza delle micro-talee sotto il film plastico è solitamente di 15-30 giorni. Mentre l'intera fase di ambientamento può richiedere dai 60 ai 90 giorni a seconda della specie e della stagione.

6.5 Rigenerazione avventizia (morfogenesi diretta o indiretta con formazione di callo e applicazioni per il miglioramento genetico)

La rigenerazione avventizia propriamente detta consiste nella creazione *ex novo* di centri meristematici (cellule) al fine di produrre foglie, fusti, radici (organogenesi).

Questa possibilità è dovuta alla totipotenza delle cellule vegetali differenziate che hanno la capacità di tornare allo stato indifferenziato, meristematico, per dare origine ad un nuovo punto di accrescimento.

Generalmente un alto rapporto citochinine/auxine favorisce la caulogenesi, mentre un basso rapporto determina la formazione di radici (processo noto come rizogenesi) (Fig. 24).

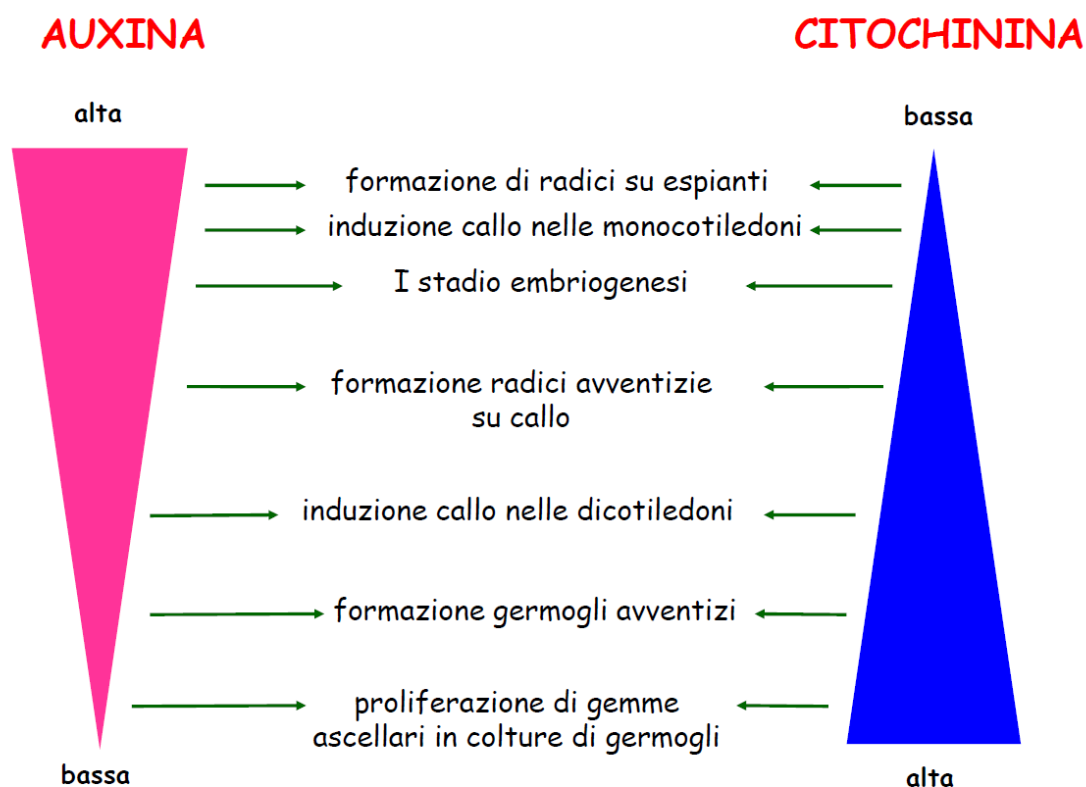


Fig. 24: effetto del rapporto citochinine/auxine

L'organogenesi può avvenire direttamente da espianti di diverso tipo (diretta) o attraverso la formazione di masse callose (indiretta). Il callo è una porzione di tessuto non differenziato, non omogeneo (può avere livelli diversi di divisione cellulare, proliferazione cellulare e organizzazione), formato da cellule che si moltiplicano in maniera disorganizzata. Queste masse cellulari possono sviluppare in organi (foglie, gemme ascellari) in particolari condizioni colturali.

Nel processo di morfogenesi attraverso la formazione di callo si distinguono diverse fasi: de-differenziazione di cellule differenziate; prime divisioni cellulari con formazione di tessuto (centro meristematico); differenziazione delle cellule con formazione di un organo; estensione ed allungamento.

Il callo può risultare instabile dal punto di vista genetico e possono verificarsi delle mutazioni che determinano la formazione di nuove piante geneticamente e fenotipicamente diverse dalla pianta madre (variazione somaclonale).

Il processo di rigenerazione avventizia può essere utilizzato per approcci di miglioramento genetico non tradizionale mediante transgenosi e mutagenesi.

Le tecniche di trasformazione genetica consentono al *breeder* di inserire negli organismi viventi, caratteri di interesse, anche agronomico. L'ingegneria genetica può risultare utile nelle piante arboree in quanto consente di accelerare i tempi di rilascio di nuove cultivar, superando l'elevato livello di eterozigosi e la lunghezza del periodo giovanile (in cui non si ha produzione). L'utilizzo di questo approccio è però limitato dai vincoli normativi nazionali.

Nella mutagenesi la coltura *in vitro* viene impiegata nel miglioramento genetico per aumentare la variabilità all'interno di una specie. La rigenerazione avventizia attraverso la formazione di callo può portare alla produzione di piante geneticamente diverse (variabilità somaclonale) per caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche rispetto alla pianta di origine ma le frequenze di mutazione sono solitamente basse. Per aumentare incidenza della variabilità genetica possono essere applicati ai sistemi rigenerativi *in vitro* mutageni fisici o chimici quali l'etilmetanosulfonato (EMS).

6.6 Applicazioni della coltura *in vitro*

Le applicazioni della coltura *in vitro* riguardano la moltiplicazione (propagazione clonale) del materiale vegetale a fini vivaistici (solitamente attraverso la micropropagazione da gemma ascellare) il miglioramento genetico (attraverso la rigenerazione avventizia) ma anche il risanamento da patogeni e la conservazione del germoplasma.

PARTE SECONDA

7 Osservazioni fenologiche della risposta ad infezione da PSA dei genotipi presenti nel campo sperimentale del CREA-FRU di Roma e di alcune cultivar di interesse commerciale

Materiale e metodi

Il campo sperimentale di *Actinidia* presente presso il CREA-FRU (ex CRA-FRU) è stato costituito sia recuperando materiale vegetale da varie missioni in Cina che procedendo ad incroci (controllati o meno) per ottenere nuove selezioni e potenziali nuove cultivar che potessero ampliare il ristretto panorama varietale mondiale. Dal 2006 è iniziata la valutazione delle piante presenti e nella primavera del 2011 il cancro batterico da PSA è prepotentemente entrato nei campi con forti impatti sulle stesse e consentendo di effettuare uno screening per la valutazione di diversi livelli di tolleranza.

Oltre questo si è proceduto ad eseguire innesti per moltiplicare delle varietà commerciali su un piede (o portainnesto) precedentemente infettato artificialmente con PSA.

I 1741 genotipi, di cui 1001 di *A. chinensis* (57,5%) e 740 *A. deliciosa* (42,5%), sono stati monitorati anche precedentemente all'avvio del presente dottorato (primavera 2011) e durante lo stesso, anche per utilizzare nelle diverse sperimentazioni (come in seguito descritto) i genotipi ritenuti a bassa sensibilità.

La valutazione è consistita nel decidere i diversi livelli di suscettibilità dimostrata al patogeno (Fig. 25) i quali corrispondono diverse azioni da attuare:

Manifestazione della sintomatologia	Classe di sensibilità a PSA attribuita	Azione intrapresa
Ad inizio ripresa vegetativa		
Presenza di essudati rossi	Piante altamente sensibili	Eliminazione
Presenza di essudati color latte	Piante molto sensibili	Capitozzatura 40 cm da terra
In stadi fenologici successivi		
Presenza di elevati sintomi secondari	Piante molto sensibili	Capitozzatura 40 cm da terra
Pochi o nessun sintomo secondario	Piante poco sensibili	Monitoraggio

Fig. 25: livelli di suscettibilità al patogeno per lo screening della risposta a PSA

I sintomi secondari considerati sono spot fogliari, avvizzimenti dei nuovi germogli, avvizzimenti delle infiorescenze, cascola precoce dei frutti.

Per quanto riguarda la valutazione delle cultivar commerciali le stesse sono state innestate a doppio spacco su piede infetto di Hayward. Le varietà utilizzate sono state 14, sia maschili che femminili, sia di *A. chinensis* che *A. deliciosa* (Tab. 4) e sono stati eseguiti 8 innesti ciascuna, per un totale di 112 piante. Di queste nessuna è sopravvissuta.

Varietà	<i>A. deliciosa/A. chinensis</i>	Maschio / Femmina	Sintomi rilevati	Piante vive
Soreli	<i>A. chinensis</i>	F	Si	NO
Chinabelle	<i>A. chinensis</i>	F	Si	NO
Jintao	<i>A. chinensis</i>	F	Si	NO
Zespry Gold	<i>A. chinensis</i>	F	Si	NO
Light Green	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
Summer 4605	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
Summer 3373	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
Early Green	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
Bruno	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
Hayward	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
TopStar	<i>A. deliciosa</i>	F	Si	NO
Autari	<i>A. deliciosa</i>	M	Si	NO
Tomuri	<i>A. deliciosa</i>	M	Si	NO
Matua	<i>A. deliciosa</i>	M	Si	NO

Tab. 4: incroci di varietà commerciali su portainnesto infetto da PSA

Risultati e discussione

Inizialmente il numero di piante altamente suscettibili (in parte eliminate e in larga parte capitozzate) è stato elevato.

Le piante capitozzate che l'anno successivo alla capitozzatura non hanno generato ricacci sani sono state circa il 90%. Se queste fossero state estirpate insieme alle altre del primo anno avrebbero portato a circa il 60% di piante altamente infette e suscettibili e quindi eliminate già da subito. Anche al secondo e terzo anno ci sono state eliminazioni, che associate alla minor carica di inoculo batterico presente (non fosse altro per aver estirpato in precedenza le piante infette), sono una probabile conferma delle capacità di latenza del PSA all'interno dei tessuti vegetali (Scortichini, 2014).

La percentuale di piante vive al primo anno rispetto quelle inizialmente presenti, categorizzata per specie, conferma quanto affermato in precedenza (Balestra *et al.*, 2009a, b), ossia che *A. chinensis* manifesta iniziale e maggiore sensibilità rispetto ad *A. deliciosa* (circa 74% contro 49%).

Il numero di piante vive si è ridotto col tempo, arrivando a circa il 6% del totale iniziale. Di questi 32 genotipi (pari a circa il 2%) non hanno manifestato alcun sintomo mentre il restante 4% circa è dato da materiale che non ha manifestato alcuna infezione secondaria, vale a dire che dopo essere stato capitozzato, i nuovi ricacci non risultano colpiti da cancro rameale (Tab. 5).

	1° osservazione (2011-2012)		2° osservazione (2012-2013)		3° osservazione (2013-2014)		2014-2011	
Semenzali	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
in osservazione	1741		1534		228		1741	
capitozzati	925	53,1%	0	0,0%	0	0,0%	925	53,1%
con ricacci sani	0	0,0%	85	0,0%	70	0,0%	70	4,0%
eliminati	207	11,9%	1306	85,1%	126	55,3%	1639	94,1%
P.te Vive	1534	88,1%	228	14,9%	102	44,7%	102	5,9%
P.te Sane	609	35,0%	143	9,3%	32	14,0%	32	1,8%

Tab. 5: lavoro di osservazione dei semenzali di *Actinidia* presso il CREA-FRU nei trienni 2011/2014

In questo gruppo di piante sane, ci sono anche delle selezioni avanzate (piante con diversi rilievi annuali) che hanno caratteri pomologici e fenologici ritenuti interessanti. Di queste cinque sono maschili, tutti appartenenti alla specie *A. chinensis*, con fioriture precoci tra il 10 e il 20 aprile con un'entità molto elevata e quattro sono femminili, di cui una di *A. chinensis* caratterizzata da polpa gialla e tre di *A. deliciosa*. Questo materiale è stato in parte utilizzato per il lavoro in seguito descritto ossia per la generazione di nuovi individui da valutare per la suscettibilità a PSA.

Gli innesti hanno avuto un successo del 100% ma le varietà commerciali che hanno inizialmente germogliato, non hanno manifestato nessuna sopravvivenza. Dal punto di innesto è spesso fuoriuscito dell'essudato bianco con i nuovi germogli che hanno iniziato a seccare, seguiti, di lì a poco, dall'intera pianta (Fig. 26).



Fig. 26: incroci di varietà commerciali su portainnesto infetto da PSA

8 Induzione della variabilità genetica tramite applicazione del mutagene EMS a materiale vegetale *in vivo*

Nelle piante da frutto l'utilizzo di mutageni fisici o chimici su tessuti vegetali col fine di creare nuovi individui per mutazione del patrimonio genetico del genitore è pratica conosciuta da molti decenni ma che non ha mai rappresentato il metodo di breeding per eccellenza.

Infatti se da un lato il MG ha continuato la propria strada attraverso l'impollinazione (autoimpollinazione, impollinazione controllata e libera impollinazione) negli anni recenti si è sviluppata la via dell'ingegneria genetica. Questa pur consentendo chiari benefici dal punto di vista del miglioratore genetico (soprattutto nelle piante da frutto), non ha avuto in molti paesi strada felice per decisioni normative atte a limitarla o a limitare l'impiego commerciale di eventuali individui ottenuti con queste tecniche. Poiché i paesi interessati dal divieto di sperimentazione e/o coltivazione di varietà OGM sono molti e molto importanti (prima tra tutti l'Europa) l'applicazione sta perdendo ad oggi di importanza.

Ultimamente, sia per le limitazioni legislative imposte all'ingegneria genetica e sia per la nascita di nuove tecniche di miglioramento genetica basate sull'applicazione di mutageni (es. TILLING), l'utilizzo di mutageni chimici sta ritrovando importanza. Infatti, nel corso degli anni, l'EMS è stato applicato anche sui semi di un notevole panorama di colture erbacee come riso, frumento, orzo, mais e soia (Tadele *et al.*, 2013), seguiti spesso da tecnica di genetica inversa basata sulla "inattivazione" del gene di interesse al fine di verificare il fenotipo associato e definire la funzione del gene stesso (Parry *et al.*, 2009; Gilchrist e Haughn, 2010).

Nel lavoro in essere, quindi, per l'introduzione di nuova variabilità genetica si è deciso di applicare l'EMS a tessuti vegetali poliploidi (semi) ed aploidi (polline) con i quali realizzare incroci controllati. Questa doppia scelta è stata dettata dal fatto che l'*Actinidia*, come già avuto modo di dire, è specie poliploide e per tanto una mutazione di un gene/i può non manifestarsi sul fenotipo in quanto soppressa del gene/i del cromosoma/i omologhi.

8.1 Applicazione dell'EMS ai semi

Sono stati eseguiti 2 diversi esperimenti di mutazione in due diversi momenti ed una prova di valutazione della dose letale (LD) per stabilire la percentuale di mutagene tale da indurre l'inattivazione dei geni che sottendono la germinabilità del seme.

Materiale e metodi

In un primo esperimento sono stati sottoposti a trattamento oltre 10.000 semi da libera impollinazione della cultivar Hayward (3540) e delle due selezioni RII28 (3300) e C8 (3240). I semi sono stati sottoposti a tre diverse concentrazioni di EMS (0,2; 0,3; 0,4%).

In un secondo esperimento sono stati sottoposti a trattamento 7.200 semi da libera impollinazione delle selezioni avanzate R II 28 (2.400), R XIII 75 (2.400) e R XVI 131 (2.400). I semi sono stati sottoposti a unica concentrazioni di EMS pari all'1%.

Nella prova di dose letale (LD) sono stati sottoposti a trattamento semi di libera impollinazione di R II 28 e di R XIII 75. Un totale di 1920 semi sono stati sottoposti alle concentrazioni di 0,5%, 1%, 2% e 4% di EMS (240 semi per trattamento per selezione) e per valutare la germinabilità di base sono stati collezionati ulteriori 120 semi per genotipo per un totale di semi da valutare di 2160.

I semi di tutti gli esperimenti sono stati raccolti da frutti a maturazione fisiologica delle selezioni e varietà in esame.

L'Ethyl methanesulfonate (EMS) utilizzato per gli esperimenti è della Sigma-Aldrich. È caratterizzato da essere in forma liquida ed ha densità di 1,206 g/ml a 20°C. La formula molecolare è riportata al Cap. 5.

L'applicazione del mutagene è stata eseguita nello stesso modo per tutti gli esperimenti. Tutti i semi dei diversi esperimenti sono stati sottoposti a pre-imbibizione in acqua distillata (~50 ml) per circa 18 ore a temperatura ambiente. Questa fase risulta importante in diverse specie come il riso (Talebi *et al.*, 2012) e non solo in kiwi ove qui può comunque rivestire una fase importante considerando la coriaccità del tegumento esterno del seme e quindi preparando lo stesso all'assorbimento in fase successiva del mutagene. Il mattino seguente l'acqua è stata eliminata ed i semi collezionati per sottoporli ai diversi trattamenti (%) previsti tramite una sospensione di EMS (g/g) in acqua (per 100 g totale) in una beuta da 200 ml. Il trattamento ha una durata di ulteriori 18 ore. Il mutagene avendo una densità maggiore ed essendo insolubile in acqua si andrà a collocare sul fondo della sospensione. Anche i semi hanno solitamente una densità maggiore dell'acqua (semi galleggianti in genere non sono vitali). Comunque per consentire un miglior contatto tra i semi e l'EMS è stato collocato all'interno della beuta un magnete e il tutto messo in agitazione a circa 200 RPM così da consentire il continuo mescolamento della mistura

ma al contempo evitare fenomeni di riscaldamento della stessa o di rottura dei semi dovuti all'azione meccanica dell'agitazione. L'EMS va applicato al buio, quindi la beuta è stata avvolta con alluminio per non far filtrare luce. Terminata la fase di trattamento i semi sono stati prelevati e risciacquati con abbondante acqua distillata (5 volte per 3 minuti) e lasciati asciugare su carta assorbente.

C'è da evidenziare come il metodo applicato è differente dalla metodiche di mutagenesi con EMS come da indicazioni presenti su C-Fern (sito: <http://www.c-fern.org/>) che essenzialmente prevedono di inserire i semi in un tampone fosfato (Fosfato di Sodio Monobasico/Fosfato di Sodio Dibasico) 0,1 M a pH 7.

Quindi i diversi trattamenti differiscono per la concentrazione del mutagene e non per il tempo di applicazione visto che l'EMS, come altri mutageni chimici, ha effetti diversi sia al variare della concentrazione che del tempo di contatto (questo parametro come in seguito descritto è stato applicato sia *in vivo* sulle antere che *in vitro* su calli).

I semi sono stati conservati in frigo a 4°C e poi sono stati seminati in plateau alveolare 53x32x6cm da 60 fori (Fig. 27) usando terriccio per substrati vivaistici (Brill Type-3) e vermiculite sullo strato superiore per garantire il giusto rapporto aria/acqua. I plateau sono stati lasciati vernalizzare da circa metà di dicembre e per circa 12 settimane a temperatura ambiente all'esterno avvolti da teli di nylon protettivi. Successivamente, sono stati spostati in serra fredda, irrigati e lasciati germinare.

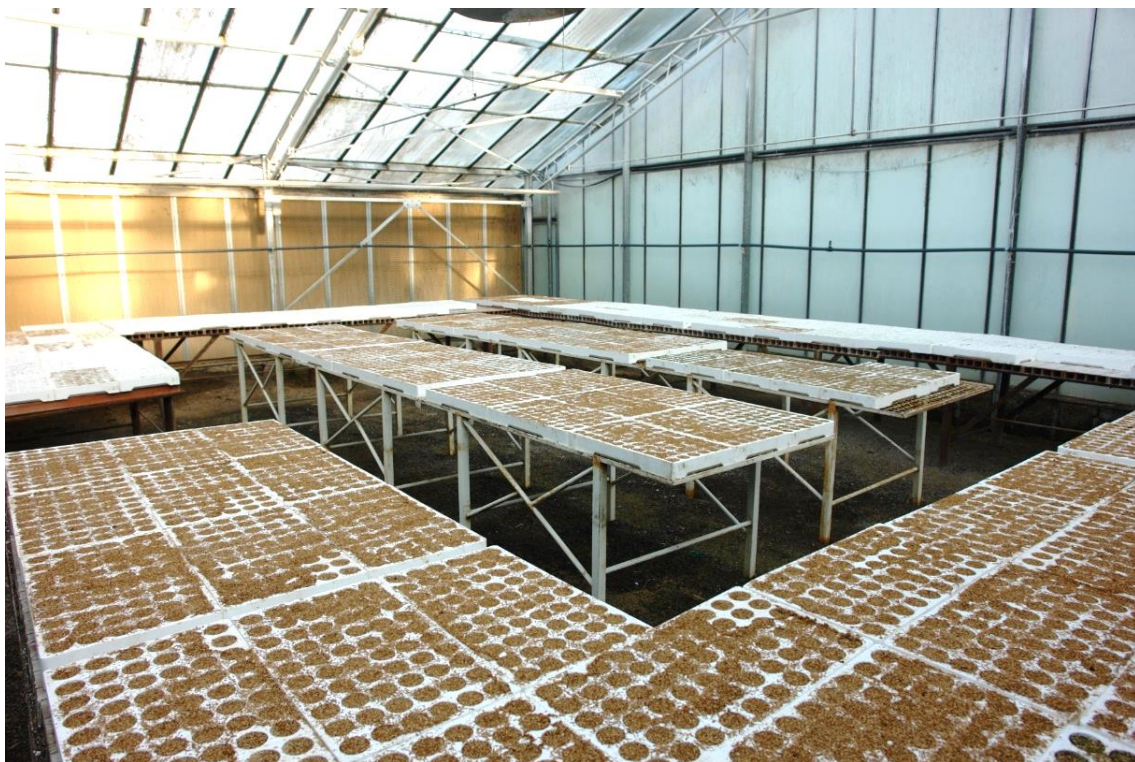


Fig. 27: semina del kiwi in serra dopo vernalizzazione

Risultati e discussioni

Si è proceduto a registrare il numero di semi iniziali e il numero di semi germinati (con calcolo del relativo tasso di germinazione). Sono stati considerati germinati i semi che, a 120 giorni dalla semina, hanno manifestato la fuoriuscita dal terreno almeno dei cotiledoni.

Nel primo esperimento (Tab. 6) il tasso di germinazione medio dei semi trattati è stato del 92,8% (9.358 semi germinati su 10.080 trattati) contro il 92,2% di quelli non trattati. Questi valori evidenziano come la % di EMS applicata non è stata tale da inattivare in maniera significativa i geni deputati al germogliamento.

Nel secondo esperimento (Tab. 7) il tasso di germinazione risulta più basso per i semi mutagenizzati rispetto i semi di libera impollinazione non sottoposti a trattamento. Questo valore assume significatività maggiore in *A. chinensis* (R II 28) rispetto *A. deliciosa*. Il numero di semi germinati complessivamente ottenuti è di 5.706.

Nell'esperimento di prova di dose letale (LD) (Tab. 8) svolto per valutare appositamente l'influenza della concentrazione di EMS quando applicato ai semi sono state utilizzate 2 selezioni. In entrambi i casi la prova ha fornito risultati univoci. Infatti è evidente come la concentrazione di EMS applicata influenza il numero di semi in grado di germogliare. Risulta anche evidente, nell'esperimento condotto, come il livello di LD per concentrazione di EMS è compreso tra 1 e 2%, dove ad 1% non si ha sostanziale differenza con il non trattato mentre a 2% è prossima a zero.

Pianta femminile	% EMS	N. semi trattati	N. semi germinati	% germinazione
HAYWARD	0,2%	1200	1156	96,3
	0,3%	1200	1077	89,8
	0,4%	1140	1089	95,5
R II 28	0,2%	1140	1102	96,7
	0,3%	1080	964	89,3
	0,4%	1080	1021	94,5
C8	0,2%	1080	981	90,8
	0,3%	1080	992	91,9
	0,4%	1080	976	90,4
HAYWARD	0	120	110	93,3
R II 28	0	120	112	93,3
C8	0	120	108	90,0

Tab. 6: risultati di germinabilità del primo esperimento

Pianta femminile	% EMS	N. semi trattati	N. semi germinati	% germinazione
R II 28	1%	2400	1655	69,0
R XIII 75	1%	2400	1910	79,6
R XVI 131	1%	2400	2141	89,2
R II 28	0%	120	114	95,0
R XIII 75	0%	120	108	90,0
R XVI 131	0%	120	110	91,7

Tab. 7: tassi di germinazione rilevati nel secondo esperimento

Pianta femminile	% EMS	N. semi trattati	N. semi germinati	% germinazione
R II 28	0%	120	112	93%
	0,5%	240	215	90%
	1%	240	184	77%
	2%	240	8	3%
	4%	240	0	0%
R XIII 75	0%	120	117	98%
	0,5%	240	236	98%
	1%	240	223	93%
	2%	240	2	1%
	4%	240	1	0%

Tab. 8: prova dose letale (LD) di germinabilità

8.2 Applicazione dell'EMS al polline ed esecuzione di incroci controllati

In questa attività si è proceduto ad applicare un metodo sperimentale di mutagenesi “indiretta” del polline con il quale si è successivamente proceduto ad eseguire incroci controllati.

Materiale e metodi

Antere di *A. chinensis* di semenzali (RI8, RI14, RII13, RII33) e di *A. deliciosa* cultivar Tomuri, presenti nei campi sperimentali del CREA-FRU sono state sottoposte a

trattamenti con unica concentrazione di EMS ma a 2 diverse durate di somministrazione. Il polline estratto è stato poi utilizzato in una serie di incroci controllati con selezioni femminili di *A. chinensis* (R I 17, R II 28, R II 26) e una selezione di *A. deliciosa* (R XVI 131) ottenendo frutti dai quali sono stati collezionati oltre 13.000 semi tutti messi in condizione di germogliare.

L'Ethyl methanesulfonate (EMS) utilizzato per gli esperimenti è lo stesso già utilizzato precedentemente. In questo caso la mutazione del polline (tessuto aploide) passa per il trattamento con mutagene delle antere. Si può quindi per certi versi definire "indiretta". L'EMS è stato applicato alle antere prelevate da fiori definibili a stadio "Pop Corn" in quanto i petali sono ben visibili ma ancora non aperti (per evitare che le api possano contaminare il fiore con pollini di altre piante) (Fig. 28). Una volta in laboratorio si è proceduto ad aprire il fiore ed a prelevare le antere. Queste sono state messe in una sospensione (25 ml) di mutagene (1%) in acqua. Il flacone (Falcon) contenente il mix è stato messo in agitazione per 1 ora (T1) o per 2 ore (T2), per facilitare il contatto dell'EMS con le antere. Si è anche proceduto a rivestire con carta alluminio il tutto così da assicurare il buio necessario, come già descritto per l'esperimento fatto sui semi. Finito il tempo di trattamento le antere sono state collezionate, risciacquate con acqua distillata per 5 volte e lasciate asciugare a temperatura ambiente in una piastra "Petri" chiusa non ermeticamente.



Fig. 28: fiore di *actinidia* a stadio "pop corn" (sinistra) ed aperto (destra)

Il polline può manifestare ridotta o nulla vitalità e scarsa germinabilità per effetto del trattamento con mutageni.

Quindi per valutare la vitalità e la germinabilità del polline da utilizzare negli incroci controllati è stato prelevato polline dalle antere sottoposte a trattamento mutagene (T2) ma anche da antere sottoposte al medesimo trattamento ma in assenza di mutagene. Ai fini dello scopo prefissato non si è ritenuto importante la valutazione dello step intermedio (1 ora/T1) così come valutare la germinabilità “naturale”

La vitalità (Fig. 29) è stata valutata (Bhojwani e Razdan, 1983) visionando al microscopio ottico sotto luce UV (filtro verde) i granuli pollinici quando immersi in una soluzione di Diacetato di fluoresceina (FDA) in acetone. L’FDA è non polare e non fluorescente, permea liberamente attraverso la membrana plasmatica e nelle cellule vitali viene scisso dall’attività esterasica, rilasciando la porzione polare fluorescente di fluoresceina. Poiché la fluoresceina non permea liberamente attraverso la membrana plasmatica essa si accumula principalmente nel citoplasma delle cellule intatte e vitali, mentre viene persa dalle cellule morte o rotte. Quando viene illuminata dalla luce UV emette fluorescenza verde.

La germinabilità invece è stata valutata col metodo Cheng e Freeling (1976) modificato, procedendo al conteggio, sotto microscopio ottico, delle bozze di tubetto pollinico in popolazioni di 100 o più granuli (Fig. 30). Per far germinare i granuli pollinici bisogna realizzare un substrato con acido borico (0,025 g/l) e saccarosio (100 g/l) disciolto in acqua, il tutto aggiunto di Agar (6 g/l) per la solidificazione. Questo va messo in delle piastre “Petri” su cui va spennellato il polline. Il conteggio può avvenire dalle 24 ore successive (anche se la germinabilità inizia dalla 6° ora).

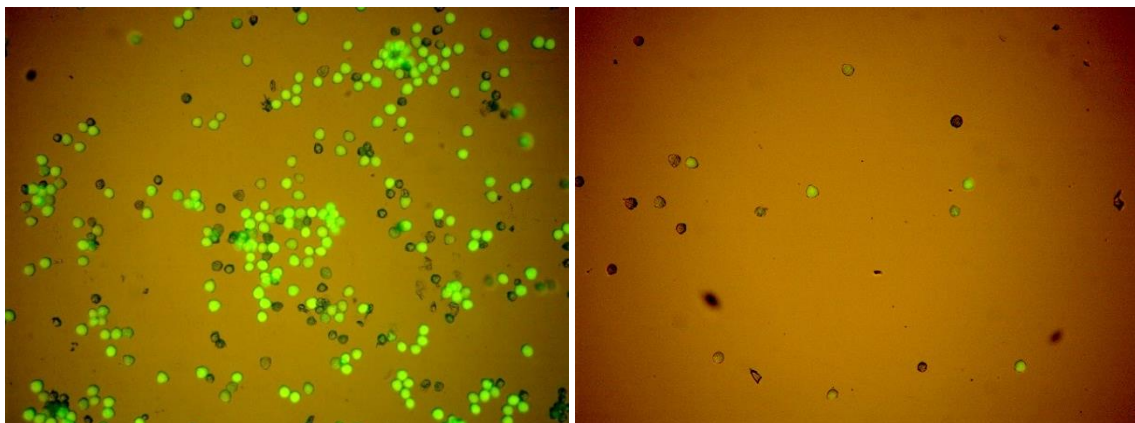


Fig. 29: esempio di vitalità del polline rilevata senza applicazione del mutagene (sinistra) e con applicazione (destra)

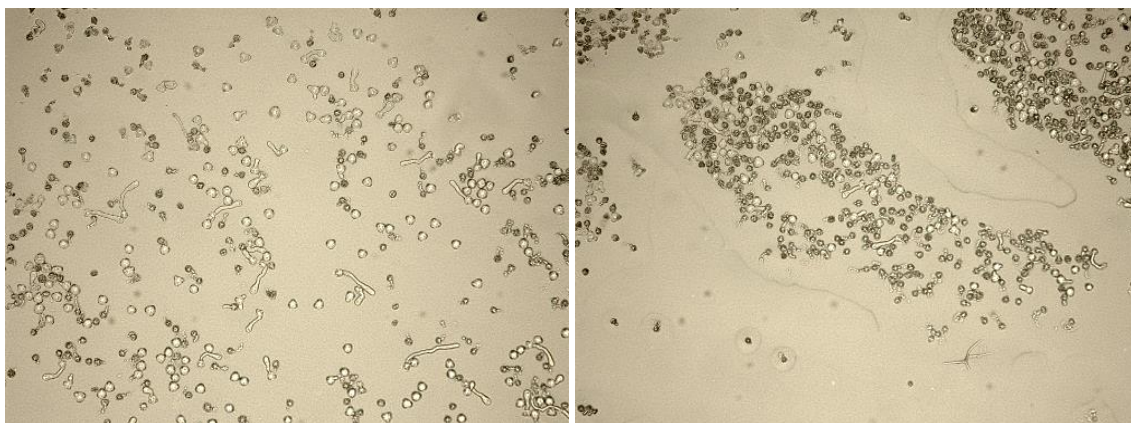


Fig. 30: esempio di germinabilità del polline rilevata senza applicazione del mutagene (sinistra) e con applicazione (destra)

Le antere sottoposte a mutagene sono state utilizzate in incroci controllati (Fig. 31a, b, c) procedendo nel seguente modo:

- Scelta dei rami fiorali femminili
- Insacchettamento degli stessi per scongiurare che i fiori venissero impollinati da insetti e/o vento
- Apertura dei sacchetti per eseguire l'impollinazione manualmente
- Chiusura del sacchetto

Le operazioni precedenti, ad eccezione della scelta del ramo florale, sono state ripetute 3 volte per consentire la completa e corretta impollinazione dei fiori ed il sacchetto è stato definitivamente aperto quando i fiori manifestavano la caduta dei petali o a volte già l'inizio di allegagione.

Similarmente a prima i semi sono stati raccolti da frutti a maturazione fisiologica di tutti gli incroci. C'è da evidenziare come alcuni frutti sono andati persi per azione della batteriosi che ha seccato i piccioli e fatto cadere i frutti o in alcuni casi ha seccato l'intero ramo florale scelto. I semi sono stati conservati in frigo a 4°C e poi sono stati seminati in plateau alveolare 53x32x6cm da 60 fori usando terriccio per substrati vivaistici (Brill Type-3) e vermiculite sullo strato superiore per garantire il giusto rapporto aria/acqua. Questi sono stati poi lasciati vernalizzare da circa metà di dicembre e per circa 12 settimane a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati spostati in serra fredda, irrigati e lasciati germinare.



Fig. 31a: insacchettamento dei rami fiorali scelti



Fig. 31b: apertura dei sacchetti contenenti i rami fiorali scelti



Fig. 31c: impollinazione controllata con polline da antere mutagenizzate

Risultati e discussioni

La germinabilità per il polline non trattato ma sottoposto a 2 ore di agitazione in acqua va da un minimo del 44% (RII33) fino ad un massimo dell'82% (RI8).

Per il polline trattato con EMS-T2 la germinabilità è stata dell'11% in RI8 e del 17% in RII33. Apparentemente quindi i dati mostrano un legame diretto tra tempo di applicazione del mutagene sulle antere e germinabilità del polline.

Il numero medio di semi per frutto sembra essere influenzato dal tempo di applicazione del mutagene alle antere.

In Tab. 9 vengono mostrati tutti gli incroci dove è stato possibile collezionare i frutti generati da incroci controllati con polline di antere mutagenizzate per il T1 e il T2 e quindi valutare l'effetto del mutagene. In alcuni casi è stato possibile raccogliere anche i frutti da incroci con polline di antere non trattate (NT). Tutti i dati mostrano una notevole riduzione del numero di semi medi per frutto al passaggio dal trattamento con EMS temporalmente più breve (1 ora) a quello più lungo (2 ore).

Si ricorda che gli incroci che non hanno dato frutti è perché per effetto dell'infezione batterica in corso gli stessi sono caduti o i rami hanno disseccato.

Il numero di semi collezionati dai frutti degli incroci sopravvissuti, e il relativo numero di germinati sono riportati nella Tab. 10.

La germinabilità non è stata alta anche negli incroci con polline non sottoposto a trattamento con EMS.

L'incrocio di R I 17 ha avuto una germinabilità prossima a zero con entrambi i pollini maschili utilizzati, anche se è vero che non è stato possibile valutare la germinabilità dell'incrocio senza effetto del trattamento.

La tendenza a ridurre la germinabilità per effetto dell'incremento del tempo di contatto tra polline ed EMS non è chiara. Infatti in alcuni incroci la stessa si riduce mentre in altri, in particolare R II 28 x R I 8, il tempo massimo di contatto del polline con il mutagene (T2) fa ottenere una germinabilità maggiore rispetto al tempo minimo (T1) (dato evidenziato in arancio).

Incrocio Controllato	Numero semi collezionati	N. medio di semi/frutto
R II 28 x NT II 13	3904	434
R II 28 x T1 II 13	715	357
R II 28 x T2 II 13	163	82
R II 28 x NT I 8	619	619
R II 28 x T1 I 8	563	563
R II 28 x T2 I 8	270	135
R II 26 X NT I 14	5437	582
R II 26 X T1 I 14	1685	562
R II 26 X T2 I 14	1941	162
R I 17 x T1 II 33	1954	244
R I 17 x T2 II 33	230	115
R I 17 x T1 I 8	1179	393
R I 17 x T2 I 8	2461	273

Tab. 9: numero medio di semi per frutto peri diversi trattamenti mutagenici

Pianta femminile	Polline utilizzato	N. semi collezionati	N. semi germinati	% di germinazione
R I 17	R II 33 - T1	1954	11	0,56
	R II 33 - T2	230	0	0,00
	R I 8 -T1	1179	0	0,00
	R I 8 -T2	2461	2	0,08
R II 28	R II 13 - NT	120*	80	66,67
	R II 13 - T1	715	445	62,24
	R II 13 - T2	163	92	56,44
	R I 8 -NT	120*	66	55,00
	R I 8 -T1	563	145	25,75
	R I 8 -T2	270	141	52,22
R II 26	R I 14 - NT	120*	29	24,17
	R I 14 - T1	1685	97	5,76
	R I 14 - T2	1941	86	4,43
R XVI 131	TOMURI - T2	69	46	66,67
*: Introdotti in numero fisso di 120 semi al solo fine di valutare la germinabilità senza applicazione di EMS alle antere/polline.				

Tab. 10: tasso di germinazione dei semi per i diversi incroci realizzati

9 Sopravvivenza ad inoculo artificiale con PSA degli individui ottenuti *in vivo*

Tutti i semi ottenuti dagli eventi di mutazione (su semi e su antere) che hanno germinato ed hanno sviluppato una plantula di almeno 2 foglie vere sono stati oggetto di infezione batterica.

Materiale e metodi

Un totale di 16.129 piantine di cui 15.064 ottenute da semi mutagenizzati e 1.065 da semi di incroci controllati con uso di polline putativamente mutagenizzato sono stati inoculati con il ceppo batterico altamente aggressivo di *Pseudomas syringae* pv. *Actinidiae* denominato CRA-FRU 8.43, alla concentrazione di 10^8 ufc/ml.

Gli inoculi sono stati svolti 2 volte durante la stagione vegetativa, ossia alla seconda voglia vera (orientativamente ad aprile/maggio) e prima del rallentamento per il riposo vegetativo (orientativamente agosto/settembre).

Sono stati provati diversi possibili metodi di inoculo tra cui:

- Irrigazione con una sospensione batterica in acqua
- La ferita sul peduncolo fogliare con un ago e conseguente deposito di colonie batteriche prelevate da una piastra Petri di crescita (Fig. 32)
- L'iniezione per pressione della sospensione batterica in acqua attraverso la pagina inferiore della foglia (Fig. 33)

Tra i diversi metodi si è ritenuto migliore, sia per efficacia che per praticità, quest'ultimo ove in pratica si è andato ad inserire il batterio direttamente nel mesofillo fogliare attraverso le aperture stomatiche ma anche attraverso gli interstizi cellulari della parete fogliare inferiore.

Le piantine sono state sottoposte ad un continuo monitoraggio ed all'insorgenza dei sintomi del cancro batterico come macchie necrotiche, disseccamenti e morte della pianta (Fig. 34 e 35) e venivano mano a mano eliminate.

Risultati e discussioni

Da tutta l'attività prima descritta, ossia dall'applicazione di EMS su semi di libera impollinazione e su antere dalle quali ottenere polline per incroci controllati, si sono ottenuti semi che hanno germinato originando piantine che sono state sottoposte a inoculo con PSA (ceppo CRA-FRU 8.43) in concentrazione di 10^8 . I tassi di germinazione sono stati rilevati a 120 giorni dalla semina, così come i sopravvissuti agli inoculi (n.2). Le

piante vive sono considerate sia quelle prima del riposo vegetativo (circa 120 giorni dagli inoculi dell'anno) che quelle vitali alla ripresa vegetativa dell'anno seguente e successivi (3 anni massimo).

I dati mostrano (Tab. 11) come la germinabilità dei semi sottoposti a mutagene è stata abbastanza costante nei diversi genotipi e superiore al 69% (RII28-EMS 1%) mentre nei semi ottenuti da incroci con polline sottoposto ad EMS è stata molto variabile e spesso non si sono avute germinazioni. In merito all'applicazione del PSA appare chiaro come le giovani piantine ottenute (circa 16.000) abbiano mostrato molta suscettività al patogeno risultando vitali, a circa 120 giorni dall'inoculo, solamente in 83 (0,5%). Alla ripresa vegetativa dell'anno seguente erano vitali solo 5 piante (0,03%), ad oggi presenti.

Specie	Origine	Trattamento EMS (Semi/Polline)	Semi ottenuti	Semi germinati	% di germinazione	N. piante vive a 120 giorni	N. piante vive 3° anno
<i>A. deliciosa</i>	HAYWARD	0,2% (S)	1200	1156	96,3	0	0
		0,3% (S)	1200	1077	89,8	1	1
		0,4% (S)	1140	1089	95,5	0	0
<i>A. chinensis</i>	C8	0,2% (S)	1140	1102	96,7	0	0
		0,3% (S)	1080	964	89,3	0	0
		0,4% (S)	1080	1021	94,5	0	0
<i>A. chinensis</i>	R II 28	0,2% (S)	1080	981	90,8	0	0
		0,3% (S)	1080	992	91,9	0	0
		0,4% (S)	1080	976	90,4	0	0
<i>A. chinensis</i>	R I 17 x R II 33	1% (p) - 1h	1954	11	0,6	0	0
		1% (p) - 2h	230	0	0,0	0	0
	R I 17 x R I 8	1% (p) - 1h	1179	0	0,0	0	0
		1% (p) - 2h	2461	2	0,1	0	0
<i>A. chinensis</i>	R II 28 x R II 13	1% (p) - 1h	715	445	62,2	8	0
		1% (p) - 2h	163	92	56,4	1	0
	R II 28 x R I 8	1% (p) - 1h	563	145	25,8	1	0
		1% (p) - 2h	270	141	52,2	2	0
	R II 26 x R I 14	1% (p) - 1h	1685	97	5,8	4	0
		1% (p) - 2h	1941	86	4,4	0	0
<i>A. deliciosa</i>	R XVI 131 x TOMURI	1% (p) - 2h	69	46	66,7	23	1
<i>A. chinensis</i>	R II 28	1% (S)	2400	1655	69,0	1	0
<i>A. deliciosa</i>	R XIII 75	1% (S)	2400	1910	79,6	19	2
<i>A. deliciosa</i>	R XVI 131	1% (S)	2400	2141	89,2	23	1
TOTALE			28.510	16.129		83	5

Tab. 11: Origine e numero di semi ottenuti da eventi mutagenizzanti e rispettivo numero di individui sopravvissuti agli inoculi artificiali con PSA



Fig. 32: inoculazione tramite ferita con ago infetto del peduncolo fogliare

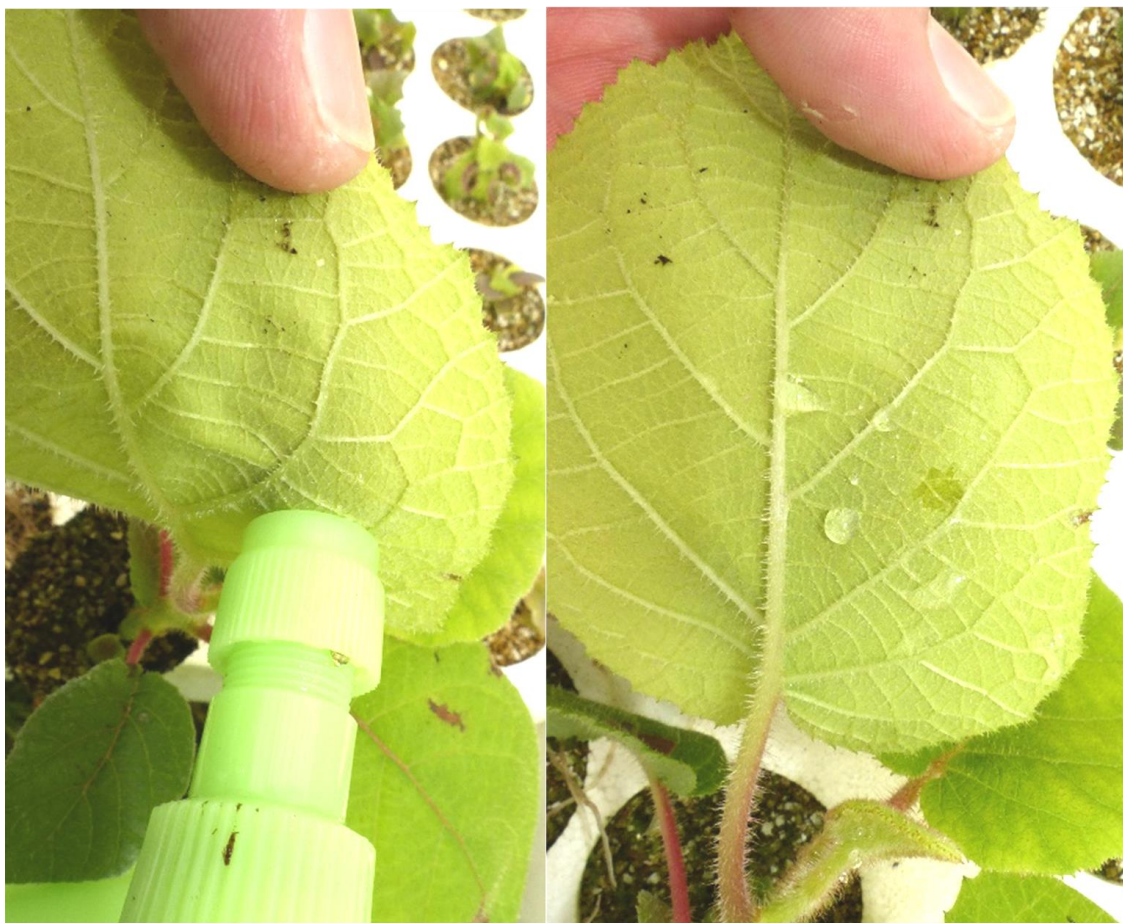


Fig. 33: inoculazione tramite infiltrazione per pressione nella pagina fogliare inferiore della sopsensione di PSA in acqua



Fig. 34: sintomatologia dell'attacco batterico in funzione della diversa tolleranza riscontrata



Fig. 35: sintomi da PSA successivi all'inoculo batterico. Da notare la capacità migratoria del batterio attraverso i tessuti vegetali. In particolare dalla foglia di sinistra ove la necrosi più grande è il punto di inoculo a quella di destra ove i piccoli anelli necrotici con alone chiaro rappresentano le ultime manifestazioni della sintomatologia batterica

10 La citofluorimetria a flusso per lo studio della ploidia in *Actinidia*

Durante il periodo di studio per il dottorato ho svolto un breve soggiorno al Plant&Food Research di Auckland ove ho potuto collaborare con diversi gruppi di lavoro tra cui quello del Dr. A.R. Ferguson ed applicare la metodologia della citofluorimetria a flusso per la determinazione indiretta della ploidia.

Il metodo della citofluorimetria a flusso per identificare i nuclei di DNA (Doležel *et al.*, 2007) è pratico semplice e veloce soprattutto nei confronti della conta diretta dei cromosomi.

Materiale e metodi

Il lavoro si caratterizza delle seguenti fasi (Fig. da 36 a 41)

1. Collezionare giovani tessuti vegetali (nel nostro caso germogli)
2. Sminuzzarli (insieme con i tessuti vegetali dello standard di riferimento) con una doppia lametta così che i nuclei vengano estratti dalle cellule rotte. Attività da svolgere su del ghiaccio, lavorando in una “petri”, con un buffer liquido (Galbraith *et al.*, 1983) addizionato col 3% polivinilpirrolidone (PVP), di per ridurre l’interferenza dei polifenoli.
3. Collezionarli e separarli dalle impurità vegetali attraverso una carta filtro di 32 μm
4. Centrifugare i nuclei (300 x g per 4 minuti) per unirli in un unico agglomerato e per separarli dal buffer.
5. Prelevamento dell’agglomerato nucleare e sospensione nel buffer di Galbraith con aggiunta dell’enzima di ribonucleasi
6. Colorazione dei nuclei con fluorocromo. Questo agente si combina con i nuclei in modo stechiometrico, ossia il numero delle molecole legate è proporzionale alla quantità di DNA
7. Trasferimento di questa combinazione (nuclei/fluorocromo) nel citofluorimetro a flusso (Cytomic FC500 MPL; Beckman Coulter, Hilaleh, FL., USA) ove i nuclei sono colpiti da una sorgente luminosa blu (laser 488 nm) che induce la fluorescenza Misurazione della fluorescenza tramite filtro a 620 nm
8. In questo metodo i nuclei e sub-popolazioni di nuclei identificati dal macchinario sono analizzati statisticamente.

Queste analisi statistiche, considerando le necessarie standardizzazioni, permettono di stimare il DNA contenuto e quindi di metterlo in correlazione con la ploidia che quindi è

a tutti gli effetti un valore derivato e non direttamente misurato. Per la stima della ploidia si fa riferimento a standard diploidi (2x) e tetraploidi (4x) di *A. chinensis* ed esaploide (6x) di *A. deliciosa* di cui la ploidia è certa in quanto il numero di cromosomi è stato identificato tramite conta diretta.

Risultati e discussione

L'utilizzo del cifluorimetro per identificare la ploidia è un mezzo senz'altro semplice e rapido. Consente, in un piano di incroci specifici e intraspecifici per il miglioramento genetico del kiwi, uno screening massivo di migliaia di individui vegetali in 1 anno senza, dover allevarli tutti per tempi lunghi. Risulta infine essere un metodo applicabile ad ogni specie vegetale (nel corso del soggiorno-studio è stato applicato anche su luppolo).

Le foto seguenti sono state in parte eseguite dal sottoscritto ed in parte gentilmente concesse dal Dr. Allan Ross Ferguson del Plant&Food Research di Auckland.



Fig. 36: Fase 1, giovane germoglio prelevato per lo studio della ploidia



Fig. 37: Fase 2, sminuzzamento del germoglio



Fig. 38: fase 3, separazione delle impurità presenti nel buffer



Fig. 39: Fase 7, Cytomic FC500 MPL

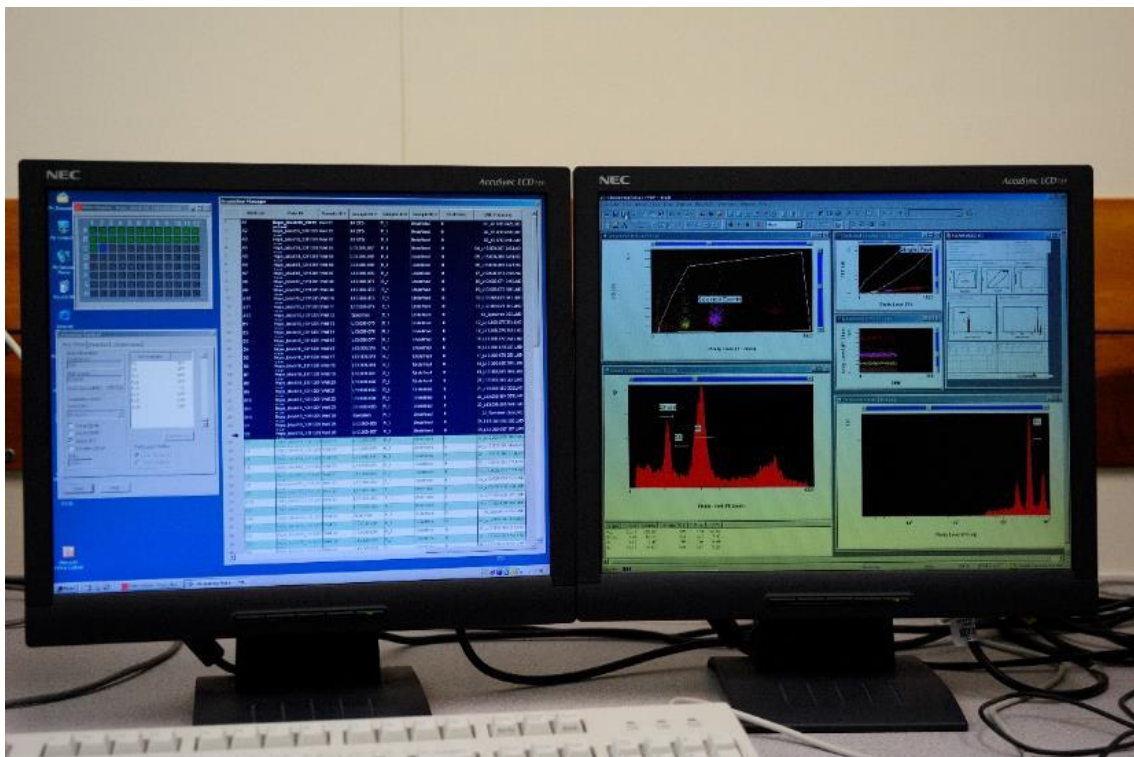


Fig. 40: Fase 8, analisi statistica del citofluorimetro

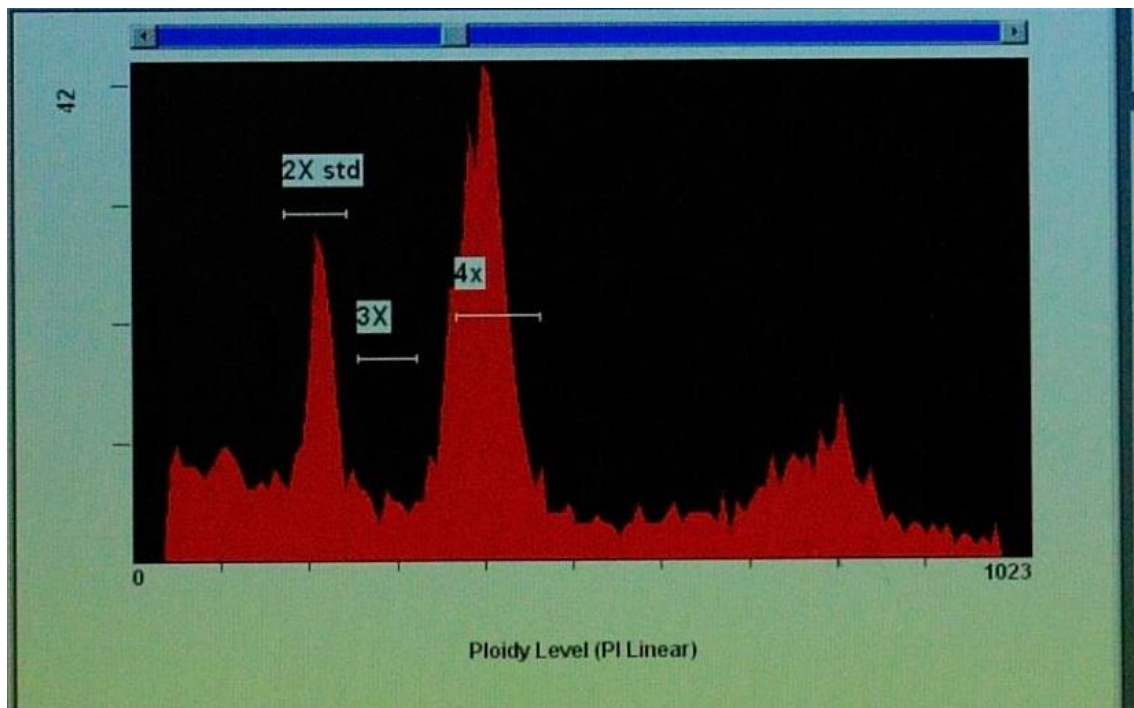


Fig. 41: identificazione della ploidia del campione (a sinistra lo standard, 2x; a destra il campione tetraploidie)

11 Induzione della variabilità genetica tramite applicazione del mutagene EMS a protocolli *in vitro* di rigenerazione avventizia

Il lavoro svolto è iniziato procedendo con l'allestimento *in vitro* del materiale vegetale raccolto presso i campi del CREA-FRU. Si è proceduto con l'applicazione di protocolli di moltiplicazione per il kiwi, confrontando due diverse citochinine, per la valutazione dell'effetto sul tasso di moltiplicazione e contestuale mantenimento del materiale vegetale. Dalle foglie del materiale in moltiplicazione si è proceduto a sviluppare un efficiente protocollo di rigenerazione avventizia (R.A.) (Bevilacqua *et al.*, 2015) che è stato utilizzato per applicare il mutagene (EMS) e si è indotta la rigenerazione dei germogli avventizi. I germogli idonei (non vetrificati e non troppo piccoli) sono stati prelevati e mantenuti su terreno di moltiplicazione prima dell'inoculo artificiale con PSA. L'inoculo è stato eseguito sperimentando 2 differenti metodi di applicazione.

11.1 Allestimento *in vitro* di *Actinidia*

Nelle pratiche di micropropagazione l'allestimento risulta il primo passaggio necessario per ottenere *in vitro* gli individui vegetali presenti *in vivo*. Di particolare importanza in questa fase è il tempo di trattamento degli espianti con agenti decontaminanti (principalmente ipoclorito di sodio e alcool) e la scelta della combinazione di fitoregolatori nel terreno di coltura. La risposta in questa fase è, comunque, anche legata alla specie, al genotipo e al periodo di prelievo delle gemme (va trovata un riferimento bibliografico).

Materiale e metodi

Sono state utilizzate *A. deliciosa*, cultivar Hayward (HW) e *A. chinensis* cultivar Soreli (SOR) e cv. Zespry Gold (ZeGo) (Fig. 42) dai campi sperimentali del CREA-FRU di Roma. Si è proceduto scegliendo i rami che presentavano le gemme ritenute idonee a tale scopo.

Le singole gemme ascellari sono state prelevate e sono state inizialmente lavate utilizzando acqua e sapone antibatterico in agitazione continuativa per circa 25 minuti. Successivamente si è proceduto ad immergere gli espianti in etanolo al 70% per 2 minuti ed, a seguire, in candeggina commerciale (ipoclorito di sodio) diluita in acqua sterile (1:4) per 25 minuti. Tra un passaggio ed il seguente si è sempre proceduto a risciacquo con acqua sterilizzata. Infine le gemme sono state immerse in una soluzione di mertiolato di

sodio (0,1%). Il risciacquo finale è stato ripetuto 3 volte. Alla candeggina come anche al mertiolato di sodio è stato aggiunto un tensioattivo, il Tween 80 (2 gocce).

Con l'utilizzo di uno stereomicroscopio (Fig. 43 a, b, c) si è proceduto a prelevare la gemma il più possibile priva del materiale vegetale legnoso e non (con particolare riferimento alla peluria tipica della specie) ed ad inserirla in flaconi contenenti terreno di coltura (Fig. 44).

Il terreno di allestimento consisteva in sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) ridotti a metà concentrazione, 1 mg/L BA, 5,9 g/L agar (B & V, Italia) e 20 g/L di saccarosio (Eridania).

Le colture, in tutti gli esperimenti inclusi nella tesi, eccetto dove diversamente indicato, sono state fatte crescere a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo di 16 h di luce ed 8 di buio ed una intensità luminosa di $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ottenuta con lampade Osram fluora L58 W/77. Il mezzo di coltura è stato rinnovato ogni 4 settimane.

Risultati

Il protocollo applicato ha permesso di allestire le colture *in vitro* delle 3 cultivar, consentendo di ottenere una percentuale di sopravvivenza di espianti non inquinati di circa il 40% in ognuna.



Fig. 42: prelievo materiale vegetale *in vivo*



Fig. 43 a, b, c: lavoro di pulizia e prelevamento della gemma

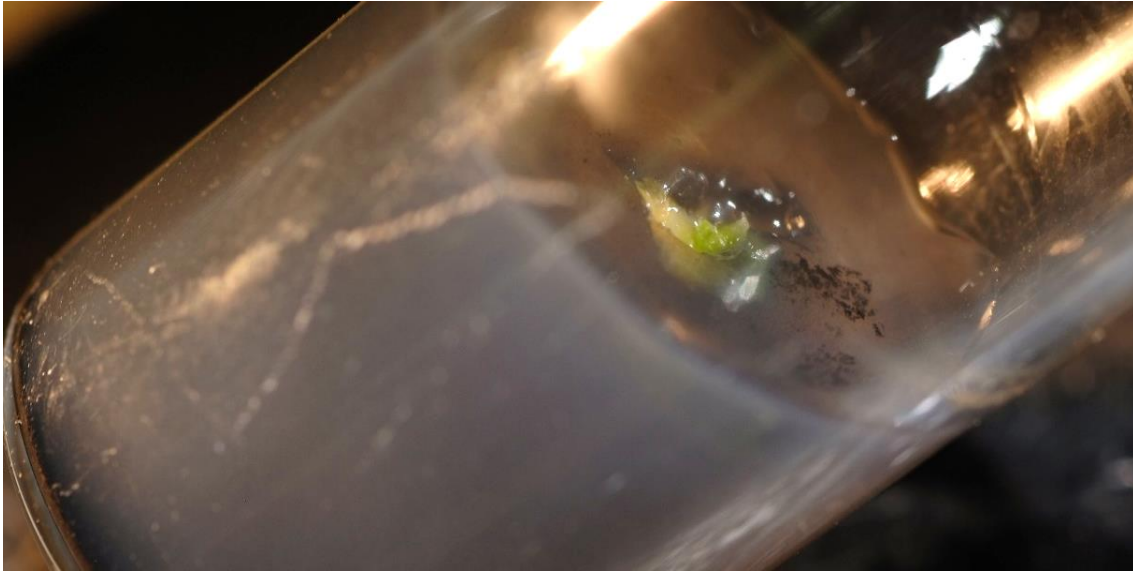


Fig. 44: gemma inserita nel terreno di allestimento

11.2 La moltiplicazione in vitro del kiwi

La coltura *in vitro* per la propagazione del kiwi è stata riportata da diversi autori su una vasta gamma di genotipi (Harada, 1975; Gui, 1979; Monette, 1986; Lin *et al.*, 1994; Kumar e Sharma, 2002; Kim *et al.*, 2007).

Come precedentemente affermato i fitoregolatori che inducono la formazione di germogli sono le citochinine. Nella moltiplicazione *in vitro* è stato verificato come i livelli endogeni di questi ormoni sono risultati insufficienti al fine dello sviluppo degli espianti di kiwi (Moncaleon *et al.*, 1999).

In lavori precedenti i migliori risultati di moltiplicazione sono stati ottenuti con la Benzil-adenina (BA) rispetto l’N-cloro-piridil-urea (CPPU) su genotipi di *A. chinensis* e cultivar di *A. deliciosa* (Caboni *et al.*, 2009). Altri autori trovano come la zeatina (ZEA) fornisca il miglior risultato di moltiplicazione nella cultivar Hayward (Rugini *et al.*, 1991). È stato anche verificato che la chinetina è meno efficiente della a BA e che i migliori risultati, per quest’ultima, si ottengono alle basse concentrazioni piuttosto che alle alte (Akbaş *et al.*, 2007).

La moltiplicazione risulta tanto più efficace tanto più è in grado di fornire un numero elevato di germogli per espianto e di alta qualità così da poter essere a loro volta sub-colturati. La qualità si misura generalmente valutando 2 parametri quali la lunghezza del germoglio e la non iperidricità (assenza di “vetrificazione”). Quindi nella fase di moltiplicazione si è proceduto al rilevamento, oltre che al tasso di moltiplicazione, anche di questi parametri.

Materiale e metodi

Il terreno di coltura (MOLT) consisteva in sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), addizionato di 20 g/L di saccarosio (Eridania), 5,9 g/L di agar (B&V, Parma) e 2 mg/L di citochinina (BA o ZEA) (Tab. 12)

Il pH del terreno è stato portato a 5,6 con NaOH 1N prima di sterilizzare il terreno in autoclave a 120°C per 20 minuti.

COMPOSTI	CONCENTRAZIONE DESIDERATA	CONCENTRAZIONE SOLUZIONE MADRE
MACRO	MS	10 X
MICRO	MS	100 X
CHELATI	MS	200 X
	mg/l	mg/ml
AC. NICOTINICO	0,5	100/200
PIRIDOSSINA	0,5	100/200
GLICINA	2	400/200
TIAMINA HCL	0,1	20/200
INOSITOLO	100	2000/200
	g/l	
SACCAROSIO	20	ERIDANIA
AGAR	5,9	B&V
BAP / ZEA	2	20/200

Tab. 12: terreno di moltiplicazione (MOLT)

La moltiplicazione essendo necessaria ai fini del lavoro sia per il mantenimento del materiale vegetale allestito che per l'ottenimento delle foglie da avviare alla successiva rigenerazione avventizia è stata realizzata per 150 espianti.

Per la valutazione dell'effetto delle citochinine si è proceduto a prelevare in modo del tutto casuale 10 cluster (gruppi di espianti) per cultivar ed a valutare il numero di nuovi espianti prodotti (lunghezza minima 0,5 cm) per cluster, lunghezza media degli stessi e numero di eventuali germogli vetrificati.

Risultati

Alla luce dei dati raccolti non sono state rilevate differenze significative ($p < 0.05$) sia come numero di germogli prodotti, che come lunghezza media degli stessi tra le due

citochine (Tab. 13 e Fig. 45). Non si sono ottenuti germogli con vetrificazione. Risultati simili sono stati ottenuti anche con la cultivar di *A. chinensis* Zespry Gold.

Per cui l'applicazione di ZEA risulta controproducente solo ai fini economici.

Espianti in moltiplicazione	Cultivar Hayward - BA		Cultivar Hayward - ZEA	
	N. germogli	Altezza media (cm)	N. germogli	Altezza media (cm)
1	5	1,8	5	1,4
2	3	1,3	3	1,3
3	4	1,6	4	1,6
4	5	1,2	2	0,8
5	2	0,8	3	1,3
6	3	1,3	3	1,2
7	3	1,0	8	2,3
8	3	1,8	3	1,5
9	3	1,5	5	1,5
10	8	1,1	3	0,9
	3,90	1,35	3,90	1,38

Espianti in moltiplicazione	Cultivar Soreli - BA		Cultivar Soreli - ZEA	
	N. germogli	Altezza media (cm)	N. germogli	Altezza media (cm)
1	8	2,3	6	2,3
2	4	0,8	4	0,8
3	1	1,5	1	1,5
4	4	1,1	5	1,2
5	5	1,2	4	1,6
6	4	1,6	3	1,3
7	2	1,2	3	0,8
8	3	1,0	5	1,2
9	4	1,6	4	1,6
10	4	1,5	3	1,3
	3,90	1,38	3,80	1,36

Tab. 13: Numero medio di germogli e lunghezza media rilevato per Hayward e Soreli in funzione della citochinina in fase di moltiplicazione



Fig. 45: esempio applicazione di ZEA (sopra) e BA (sotto) su HW

11.3 Definizione di protocolli per la rigenerazione avventizia

Lo sviluppo di un efficiente protocollo di rigenerazione avventizia per l'*Actinidia* spp. può permettere l'applicazione di biotecnologie per il miglioramento genetico, come precedentemente dimostrato in altre specie (Predieri, 2001; Shewry *et al.*, 2008).

In *Actinidia* precedenti esperimenti suggeriscono come la variazione somaclonale indotta da organogenesi *in vitro* in condizioni selettive può essere utilizzata per selezionare linee di *A. deliciosa* tolleranti alla salinità (Caboni *et al.*, 2003).

È stato dimostrato come la rigenerazione delle piante è influenzata da diversi fattori come il genotipo (Obukosia *et al.*, 2005), il terreno di coltura (Trigiano e Gray, 2000), il tipo di espianto utilizzato (Gambino *et al.*, 2007), i regolatori di crescita (Trigiano e Gray, 2000), le condizioni di cultura (Choi *et al.*, 2001).

Per l'organogenesi è possibile utilizzare diversi tessuti vegetali. Tra questi alcuni, come le foglie, possono essere ideali per i trattamenti di mutazione in quanto, non possedendo preesistenti gemme, le piante ottenute possono essere mutazioni di singole cellule aumentando la possibilità di ottenere mutanti omogenei (Dai *et al.*, 2011).

In *Actinidia* il terreno MS è stato utilizzato con successo per l'induzione di callo e per la rigenerazione avventizia (Kumar e Sharma, 2002). Tuttavia, l'applicazione ottimale di auxine e citochinine e loro combinazioni variano a seconda della condizione del materiale utilizzato per l'espianto e in base alla specie e al genotipo. Altri autori (Barbieri e Morini, 1987; Lin *et al.*, 1994) hanno utilizzato anche altri terreni di coltura con successo, tra cui Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e N6 (Chih-Ching *et al.*, 1975 e Chu, 1978).

Il ruolo dell'applicazione esogena dei regolatori di crescita sull'induzione e lo sviluppo di callo e sulla rigenerazione avventizia è stata evidenziata in diversi precedenti studi (Feito *et al.*, 1996; Centeno *et al.*, 1996, 1998, 1999).

In varie specie di fruttiferi la rigenerazione avventizia è prevalentemente indotta dal TDZ o dalla BA (Gentile *et al.*, 2002; Petri e Scorza, 2010 e referenze incluse).

Nella rigenerazione avventizia da frammenti fogliari (Caboni *et al.*, 2009) il CCPU ha dato risultati superiori alla BA in Hayward e Tomuri ma inferiori alla ZEA in una selezione di *A. chinensis*.

In Tomuri anche la ZEA ha dato buoni risultati (Prado *et al.*, 2007) ed altri autori hanno descritto il successo di ZEA anche nella rigenerazione di segmenti nodali (Rey *et al.*, 1992) e di piccioli fogliari (González *et al.*, 1995) di Hayward. In rigenerazione di *A. chinensis* (Fraser *et al.*, 1995) il TDZ e la chinetina hanno dato risultati inferiori ad altre citochinine. La ZEA, se utilizzata come unica citochinina, è risultata superiore alla BA

ma una combinazione delle due citochinine ha dato il miglior risultato in termini di numero di germogli di aspetto normale prodotti.

Osservazioni simili sono state fatte anche in altre specie, come in *A. eriantha*, dove i più alti tassi di rigenerazione sono stati ottenuti utilizzando nel mezzo di coltura ZEA+BAP (Wang *et al.*, 2006).

Tra le auxine l’NAA è già stato utilizzato con successo per la induzione di callo per la prima fase di rigenerazione avventizia (Caboni *et al.*, 2009).

Materiale e metodi

Per la rigenerazione avventizia (RA) sono stati utilizzati espianti consistenti in porzioni di foglie prelevati da germogli in fase di moltiplicazione (come sopra riportato). Le foglie sono preparate procedendo con la rimozione del picciolo e del margine fogliare ed effettuando tagli perpendicolari alla nervatura centrale, in modo da ottenere frammenti di dimensioni omogenee che sono posti con la superficie adassiale a contatto con il terreno di coltura (Fig. 46).

Sono state applicate 2 fasi di rigenerazione. La prima (RA1) in cui gli espianti sono stati trasferiti su un terreno di coltura contenente auxina+citochinina ed una seconda fase (RA2) dove nel terreno di coltura era presente solo la citochinina presente nella fase 1.

La RA1, che è definibile come “induzione alla formazione del callo” ha avuto una durata di 28 giorni ed è stata effettuata in parte al buio ed in parte alla luce. Alla fine di questa 1 fase si è proceduto a rilevare la presenza di neoformazione di callo e di necrosi degli espianti vegetali.

La RA2, quella di “formazione ed allungamento dei germogli rigenerati”, è stata effettuata alla luce ed ha avuto durata di 30 giorni, al termine dei quali si è effettuato il conteggio del numero di espianti fogliari rigeneranti e del numero di germogli rigenerati ottenuti per espianto fogliare (germogli idonei per grandezza ad essere trasferiti su terreno di moltiplicazione).

Questa seconda fase è stata ripetuta una seconda volta per effettuare un rilievo finale a 90 giorni dall’inizio del trasferimento degli espianti fogliari alla fase della rigenerazione avventizia.

La fase di luce è, similamente alla moltiplicazione, costituita da 16 h di fotoperiodo con una intensità luminosa pari a $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ottenuta con lampade Osram Fluora L58 W/77. La temperatura è regolata a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

La rigenerazione avventizia è stata indotta su un terreno basale MS con aggiunta, per la prima fase di auxina (sempre NAA) e una citochinina (come riportato nei singoli esperimenti). In seconda fase invece è stata applicata solamente la stessa citochinina presente in prima fase.



Fig. 46: Espianti delle foglie all'inizio della rigenerazione avventizia (RA1) con superficie adassiale in contatto con il terreno di coltura

11.4 La rigenerazione avventizia di *A. deliciosa*, cultivar Hayward

Dati preliminari (non pubblicati) ottenuti presso il laboratorio di *colture in vitro* del CREA-FRU, hanno messo in evidenza come una durata di buio di 7 giorni nella RA1 dia ottimi risultati in Soreli mentre in Hayward non consentiva di ottenere una soddisfacente rigenerazione avventizia. Infatti, se alla fine della 1 fase il 100% dei frammenti fogliari originava callo, dopo la RA2 per 90 gg solo il 22% presentava rigenerazione avventizia producendo, in media, 1,5 germogli per espianto fogliare.

Quindi, al fine di ottenere un numero maggiore di rigenerazioni, è stato svolto un esperimento in cui sono stati applicati i seguenti trattamenti:

1. Durata periodo di buio in RA1 (7, 14 o 21 giorni)
2. Tipo di citochinina nel terreno di moltiplicazione (ZEA confrontata con BA)
3. Tipo di citochinina nel terreno di RA1 e RA2 (TDZ confrontato con ZEA)

Materiale e metodi

Nel primo trattamento i frammenti fogliari sono ottenuti da foglie prelevate dal materiale vegetale moltiplicato su terreno addizionato di citochinina BA. Sono stati utilizzati in totale 18 frammenti fogliari per ogni trattamento di buio e sono stati messi su 3 piastre Petri (6 frammenti/piastra), diametro 90 mm, contenenti terreno addizionato di NAA+ZEA (RA1) e solo ZEA in RA2. La concentrazione degli ormoni applicati nelle fasi di RA è di 2 mg/l.

Nel secondo e terzo trattamento i frammenti fogliari sono stati ottenuti da foglie prelevate dal materiale vegetale mantenuto su terreno addizionato di citochinina BA o di ZEA e rigenerato su terreno addizionato di NAA+ZEA o NAA+TDZ (RA1) e solo ZEA o TDZ in RA2. La concentrazione degli ormoni applicati nelle fasi di RA è di 2 mg/l. La durata del buio è stata di 14 e 21 giorni in accordo ai risultati dell'esperimento precedente. Sono stati utilizzati 30 frammenti fogliari per ogni tesi e sono stati messi su 3 piastre Petri (10 frammenti/piastra) di diametro 90 mm.

In tutti gli esperimenti il buio è ottenuto mediante avvolgimento delle Petri con carta alluminio. Le altre condizioni di crescita erano quelle sopra riportate.

Risultati

Nel primo trattamento (Fig. 47 e Tab. 14) i migliori risultati ottenuti e quindi il protocollo ritenuto valido per procedere a valutazioni ed esperimenti successivi sono stati ottenuti con 14 e 21 giorni di buio. Infatti, a 90 giorni dall'inizio della rigenerazione avventizia si conferma quanto potuto osservare nello studio preliminare, ossia che in Hayward il periodo di 7 giorni di buio non è in grado di fornire risultati soddisfacenti. Applicazioni di 14 e 21 giorni hanno fornito dopo 90 giorni risultati migliori sia in termini di numero di espianti rigeneranti che di numero di germogli. In particolare, 14 giorni di buio hanno permesso di ottenere il numero significativamente più elevato di espianti rigeneranti (61%), mentre con 21 giorni di buio si è osservato il numero medio significativamente più elevato di germogli per espianto (2,13). Detti periodi di applicazione di buio sono stati, quindi, applicati nel secondo e terzo esperimento.

	Rigenerazione Avventizia Fase 1		Rigenerazione Avventizia Fase 2 (30gg)		Rigenerazione Avventizia Fase 2 (90gg)	
Durata buio (gg) in RA1	% di espianti con callo	% di espianti necrotici	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante
7	100,00a	0,00b	16,67b	1,33b	22,22c	1,50b
14	83,33b	0,00b	27,78a	1,40b	61,11a	1,64b
21	55,55c	16,67a	27,78a	2,20a	44,44b	2,12a

Tab. 14: Hayward. Effetto della lunghezza del periodo di buio sulla % di formazione di callo, di rigenerazione degli espianti e sul numero di germogli rigenerati per espianto

Nel secondo e terzo trattamento (Fig. 48 e Tab. 15) la presenza nel terreno di moltiplicazione della ZEA ha ridotto significativamente rispetto alla BA sia la % di espianti rigeneranti (con buio 14 e 21) che il numero di germogli rigenerati per espianto (con buio 21).

	% espianti con callo	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni
BA/14/ZEA	96,67	43,33c	1,3b
ZEA/14/ZEA	83,33	10,00d	1,0b
BA/21/ZEA	55	63,33a	1,9a
ZEA/21/ZEA	53,33	36,67b	0,7c

Tab. 15: Hayward. Effetto del tipo di citochinina (BA/ZEA) applicata in fase di moltiplicazione sulla rigenerazione avventizia (% di espianti rigeneranti e di rigenerazioni per espianto) effettuata con ZEA e mantenendo gli espianti in RA1 per 14 o 21 gg al buio. I dati riportati derivano dai rilievi effettuati al 90° giorno

Sempre nel secondo e terzo trattamento (Fig. 48 e Tab. 16), applicando il TDZ e la ZEA nella fase di rigenerazione avventizia, è risultato evidente un significativo effetto promotore del TDZ, rispetto alla ZEA, sia sulla % di espianti rigeneranti sia sul numero di germogli rigenerati a prescindere dal periodo di buio applicato (14 o 21) in prima fase.

	% espianti con callo	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni
BA/14/ZEA	96,67	33,33b	2,3b
BA/14/TDZ	100	90,00a	3,1a
BA/21/ZEA	100	43,33b	0,9c
BA/21/TDZ	96,67	96,67a	3,2a

Tab. 16: Hayward. Effetto del tipo di citochinina (ZEA/TDZ) applicata in fase di rigenerazione avventizia sulla % di espianti rigeneranti e di rigenerazioni per espianto, mantenendo gli espianti in RA1 per 14 o 21 gg al buio. I dati riportati derivano dai rilievi effettuati al 90° giorno



Fig. 47: Hayward. Buio 7 (alto a sinistra), 14 (alto a destra) e 21 (basso)



HAYWARD MOLT-BA BUJO-14 RA-TDZ



HAYWARD MOLT-BA BUJO-21 RA-TDZ



HAYWARD MOLT-ZEA BUJO-14 RA-TDZ



HAYWARD MOLT-ZEA BUJO-21 RA-TDZ



HAYWARD MOLT-BA BUJO-14 RA-ZEA



HAYWARD MOLT-BA BUJO-14 RA-ZEA



HAYWARD MOLT-ZEA BUJO-14 RA-ZEA



HAYWARD MOLT-ZEA BUJO-14 RA-ZEA

Fig. 48: Hayward. Effetto del periodo di buio, del tipo di ormone (BA/ZEA) applicato in moltiplicazione e del tipo di ormone (ZEA/TDZ) in rigenerazione

11.5 La rigenerazione avventizia di *A. chinensis*, cultivar Soreli

Prove preliminari hanno mostrato soddisfacenti risultati nella rigenerazione avventizia di Soreli quando veniva applicato un periodo di 7 giorni di buio in RA1. Pertanto in questo esperimento si è proceduto a valutare l'effetto della ZEA applicata al terreno di moltiplicazione in comparazione con la BA

Materiale e metodi

I frammenti fogliari di partenza sono ottenuti da foglie prelevate dal materiale vegetale mantenuto su un terreno di moltiplicazione addizionato di BA o di ZEA. Sono stati utilizzati 30 frammenti fogliari per ogni trattamento e sono stati trasferiti su 3 piastre Petri (10 frammenti/piastra) di diametro 90 mm contenenti terreno addizionato di NAA+ZEA (RA1) e solo ZEA in RA2. La concentrazione degli ormoni applicati nelle fasi di RA è di 2 mg/l.

Risultati

Con entrambe le citochinine, alla fine della RA1 (Fig. 49 e Tab. 17), il 100% dei frammenti fogliari ha generato callo. Inoltre, a differenza della cultivar Hayward, sembra esserci un effetto positivo sulla rigenerazione avventizia della ZEA, rispetto alla BA, quando applicata nel terreno di moltiplicazione, dopo 30 giorni in RA2, suggerendo un effetto di questa citochinina nel favorire una più rapida rigenerazione. Tuttavia, dopo 90gg in fase RA2 la % di rigenerazione e il numero di germogli per espianto ottenuti dai frammenti di foglia prelevati da germogli moltiplicati con BA o ZEA non sono risultate significativamente differenti.

	Rigenerazione Avventizia Fase 1		Rigenerazione Avventizia Fase 2 (30gg)		Rigenerazione Avventizia Fase 2 (90gg)	
	% di espianti con callo	% di espianti necrotici	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante
BA	100a	0	60a	1,89a	67a	2,98a
ZEA	100a	0	70b	2,76b	76a	2,79a

Tab. 17: Soreli. Effetto del tipo di citochinina (BA/ZEA) applicata in fase di moltiplicazione sulla % di espianti rigeneranti e di rigenerazioni per espianto, mantenendo gli espianti in RA1 per 7 gg al buio. I dati riportati derivano dai rilievi effettuati al 30° e 90° giorno in RA2

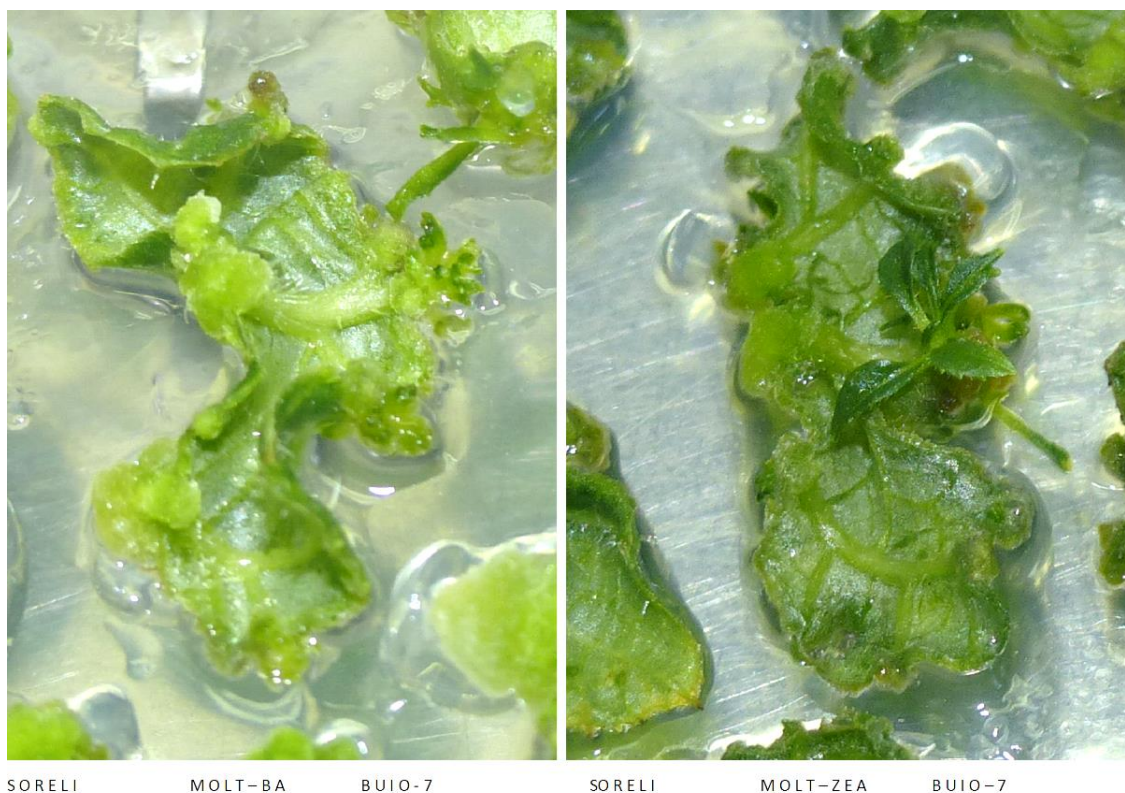


Fig. 49: Soreli. Effetto del tipo di citochinina (BA/ZEA) applicata in fase di moltiplicazione

11.6 La rigenerazione avventizia di *A. chinensis* cultivar Zespry Gold

In questo caso non vi sono prove preliminari svolte. Si è quindi proceduto a valutare l'effetto del periodo di buio di 7, 14 e 21 giorni.

Materiale e metodi

I frammenti fogliari sono stati ottenuti da foglie prelevate dal materiale vegetale moltiplicato su terreno addizionato di citochinina BA. Sono stati utilizzati in totale 36 frammenti fogliari per ogni trattamento di buio, messi su 6 piastre Petri, (6 frammenti/piastra), di diametro 90 mm, contenenti terreno addizionato di NAA+ZEA (RA1) e solo ZEA in RA2. La concentrazione degli ormoni applicati nelle fasi di RA è di 2 mg/l.

Risultati

Alla fine della RA1, la formazione del callo (Fig. 50) è stata osservata tra il 97 ed il 100% dei frammenti fogliari. Dopo 30gg in RA2 non si sono evidenziate differenze significative nelle % di espianti rigeneranti tra i diversi trattamenti di buio (circa il 50%) anche se il periodo di 7 gg ha fornito un numero inferiore di rigenerazioni per rigenerante. Dopo

90gg le % più elevate di rigenerazione così come il numero di rigenerazioni per rigenerante si sono ottenuti, anche in questa cultivar, con 14 e 21 giorni di buio (Tab. 18). Tuttavia, a 90 giorni, i calli sottoposti al trattamento di buio più prolungato hanno cominciato a manifestare sintomi di invecchiamento (come imbrunimenti e necrosi, ammolamento e necrosi). Poiché la % di rigenerazione ottenute in questo esperimento sono state elevate (superiori al 90% con 14 e 21 giorni di buio in RA1) non è stato necessario procedere ad un'ulteriore ottimizzazione del protocollo.

Durata buio (gg) in RA1	Rigenerazione Avventizia Fase 1		Rigenerazione Avventizia Fase 2 (30gg)		Rigenerazione Avventizia Fase 2 (90gg)	
	% di espianti con callo	% di espianti necrotici	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante
7	100a	0	50a	0,83b	47b	0,94b
14	100a	0	50a	1,75a	97a	1,89a
21	97a	3	47a	1,83a	94a	1,92a

Tab. 18: Zespry Gold. Effetto della lunghezza del periodo di buio sulla % di formazione di callo, di rigenerazione degli espianti e sul numero di germogli rigenerati per espianto



Fig. 50: Zespry Gold. Effetto della lunghezza del periodo di buio

11.7 Considerazioni conclusive sulla rigenerazione avventizia di 3 cultivar commerciali

Nel lavoro sono stati realizzati studi per definire protocolli di rigenerazione avventizia da porzioni di foglia prelevate da germogli moltiplicati *in vitro* per 3 cultivar commerciali: Hayward (*A. deliciosa*), Soreli e Zespry Gold (*A. chinensis*).

Per “Hayward” il protocollo prevede la moltiplicazione del materiale vegetale su BA e la rigenerazione con applicazione del TDZ (risultati migliori e minor costi di ZEA) con una durata del buio durante la prima fase di rigenerazione di 14 o 21 giorni.

Per la cv. Soreli i migliori risultati si ottengono con la moltiplicazione del materiale vegetale su BA e rigenerazione avventizia effettuata con applicazione della ZEA e 7 giorni di buio.

Infine, per la cv. Zespry Gold, similamente a Soreli, una elevata rigenerazione avventizia (superiore al 90%) si ottiene prelevando gli espianti fogliari da germogli moltiplicati su BA e inducendo rigenerazione con applicazione della ZEA, ma è necessario un periodo di buio, durante la prima fase di rigenerazione di 14 o 21 giorni, similamente ad Hayward.

In *Actinidia* i risultati della rigenerazione avventizia sembrano quindi essere influenzati non solo dalla specie ma anche dalla cultivar. Inoltre, si ricorda che le cultivar impiegate hanno anche diversa ploidia. Infatti, Hayward è esaploide (6X), Soreli è tetraploide (4X) e Zespry Gold è diploide (2X). Quindi non è da escludere che anche la ploidia possa rappresentare un’ulteriore variabile in grado di influenzare i risultati della rigenerazione avventizia, ossia i protocolli della stessa.

11.8 Applicazione dell’EMS alle cultivar Soreli e Hayward utilizzando i protocolli di rigenerazione avventizia

La mutagenesi *in vitro* utilizzando l’EMS è un approccio potenziale per creare variabilità genetica ed è stato per sviluppare nuove varietà a partire da diversi tessuti vegetali e in diverse specie come in crisantemo (Latado *et al.*, 2004), soia (Hoffmann *et al.*, 2004), uva (Khawale *et al.*, 2007) e rosa (Senapati e Rout, 2008) o linee tolleranti a stress biotici ed abiotici come in patata dolce (Luan *et al.*, 2007).

Diversi autori hanno riscontrato un aumento della mortalità degli espianti all’aumentare della concentrazione o del tempo di esposizione con l’EMS (Behera *et al.*, 2012), mentre altri hanno anche osservato come all’aumentare del tempo di esposizione veniva inibita la crescita del callo, come in fagiolo comune (Svetleva e Crino, 2005).

Infine, in viburno (Dai *et al.*, 2011) è stato messo in evidenza che l'EMS ha effetto inibitorio sulla proliferazione del callo (proporzionalmente alla concentrazione ed al tempo di applicazione del mutagene), soprattutto nella fase iniziale, portando entro le prime 4-6 settimane al numero maggiore di necrosi dei calli.. Tuttavia, i calli sopravvissuti hanno mantenuto la capacità di crescere e rigenerare nel terreno di coltura.

Materiale e metodi

Sono stati utilizzati calli delle cultivar HW e SOR ottenuti alla fine della RA1 con i protocolli sopra descritti come i più efficienti per ciascuna cultivar. I calli, prima di essere avviati alla RA2, sono stati trattati con l'agente mutagene. Il trattamento è avvenuto tramite immersione dei calli in un'emulsione di EMS in terreno di coltura liquido e, per facilitare il contatto con la componente vegetale, si è posto il tutto in agitazione al buio (300 RPM/min).

Il terreno di coltura liquido era lo stesso della RA2, ma privo di agar, così da ridurre lo stress sui calli dovuto al trattamento mutagenico. Per lo stesso motivo quindi non si è applicato l'EMS in acqua (cosa invece effettuata per la mutazione del materiale *in vivo*) ma utilizzando questo terreno liquido.

L'EMS è stato applicato alla concentrazione dell'1% (g/g) per 4 differenti tempi di contatto (30, 60, 120 e 240 minuti). Dopo il trattamento i calli prelevati sono stati risciacquati in acqua sterile per 60 secondi per eliminare eventuali residui di EMS ed asciugati con carta sterile.

Oltre ai trattamenti con mutagene sono stati eseguiti 2 controlli. Il primo in agitazione per 240 minuti in assenza di EMS (per valutare l'effetto dell'immersione e dell'agitazione sui risultati di rigenerazione avventizia) e il secondo senza agitazione, avviando direttamente i calli alla RA2, per verificare i risultati della rigenerazione avventizia.

Per Hayward i frammenti fogliari di partenza sono ottenuti da foglie prelevate dal materiale vegetale mantenuto su terreno addizionato di BA e per la rigenerazione avventizia si è applicato il TDZ e 14 giorni di buio (si rimanda per maggiori dettagli al paragrafo 4 del presente capito). Complessivamente per Hayward sono stati utilizzati 66 calli di cui 48 sottoposti a trattamento con EMS (3 calli per 4 repliche per 4 trattamenti); 9 ad agitazione senza mutagene (3 calli per 3 repliche) e 9 a rigenerazione avventizia senza ulteriori trattamenti (3 calli per 3 repliche).

Per Soreli i frammenti fogliari di partenza sono stati ottenuti da foglie prelevate dal materiale vegetale mantenuto su terreno addizionato di BA e per la rigenerazione

avventizia si è applicata la ZEA e 7 giorni di buio (si rimanda per maggiori dettagli al paragrafo 5 del presente capitolo). Complessivamente per Soreli sono stati utilizzati 125 calli di cui 100 sottoposti a trattamento con EMS (5 calli per 5 repliche per 4 trattamenti); 15 ad agitazione senza mutagene (5 calli per 3 repliche) e 10 a rigenerazione avventizia senza ulteriori trattamenti (5 calli per 2 repliche).

La soluzione del mutagene è stata filtrata con un filtro in nylon di 0,20 µm al fine di renderla sterile prima di aggiungerla al terreno di coltura.

Risultati

Sono stati raccolti i dati di rigenerazione avventizia al 60° giorno dall'applicazione del mutagene per Soreli (Fig. 51 e Tab. 19) mentre a 150 giorni per Hayward (Fig. 52 e Tab. 20).

Per Soreli all'aumentare del tempo di applicazione dell'EMS si riducono le % della rigenerazione avventizia e il numero di rigenerazioni per espianto. Quando l'EMS è stato applicato per 240 minuti i calli erano completamente necrotici. Mentre la riduzione della % dei rigeneranti è attribuibile interamente alla presenza dell'EMS nel terreno di coltura, è stata anche osservata l'influenza sui calli dell'agitazione in terreno liquido per 240 minuti, che hanno rigenerato un numero inferiore di germogli per espianto rispetto al controllo. Va comunque detto che, oltre ai dati dei rilievi presentati, tutti i calli sopravvissuti sono stati sub-colturati ogni 30 giorni e hanno continuato fino a 6 mesi dal trattamento mutageno a produrre germogli che sono stati prelevati e clonati per avviare le linee ottenute ai successivi studi e valutazioni compresi quelli di risposta a PSA.

Infine, bisogna sottolineare che alla fine di questo periodo sono stati prelevati, dal trattamento con EMS 240 minuti, un totale di 17 germogli.

L'applicazione di EMS alla rigenerazione avventizia di Hayward ha indotto minori necrosi nei calli rispetto a quanto osservato in Soreli però ritardando e riducendo notevolmente la formazione di germogli avventizi.

I rilievi si sono protratti per circa 150 giorni dall'applicazione di EMS e in questo periodo i calli hanno manifestato un ottimo stato generale.

Ad eccezione del trattamento più lungo (240 minuti) l'applicazione dell'EMS non ha ridotto il numero di espianti rigeneranti ma ha ridotto il numero di rigenerazioni per rigenerante. I calli posti in sola agitazione manifestano leggere differenze rispetto quelli che non hanno subito detto trattamento ma comunque entrambi i controlli producono

risultati superiori a quelli sottoposti ad EMS e simili alle prove di rigenerazione avventizia svolte precedentemente.

Parte delle rigenerazioni di Soreli ed Hayward, ottenute a seguito del protocollo di mutazione con EMS, sono state trasferite su terreno di moltiplicazione e sottoposte ad inoculo con PSA.

	Espianti necrotici dopo applicazione EMS	% espianti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante
30	0	92,00a	2,35b
60	0	76,00b	2,16bc
120	0	72,00b	1,56d
240	100	0,00c	0,00e
240c	no EMS	100,00a	2,60b
No Agitazione	no EMS	100,00a	6,50a

Tab. 19: Soreli. Rigenerazione avventizia in presenza di EMS



Fig. 51: Soreli. Rigenerazione avventizia in presenza di EMS

	Espianti necrotici dopo applicazione EMS	% espanti rigeneranti	N. di rigenerazioni per rigenerante
30	0	83,33a	1,25cd
60	0	80,00a	0,83d
120	0	83,33a	0,30e
240	0	33,33b	0,20e
240c	no EMS	88,89a	2,75b
No Agitazione	no EMS	88,89a	3,25a

Tab. 20: Hayward. Rigenerazione avventizia in presenza di EMS



HAYWARD EMS 30'



HAYWARD EMS 60'



HAYWARD EMS 120'



HAYWARD EMS 240'

Fig. 52: Hayward. Rigenerazione avventizia in presenza di EMS

11.9 Considerazioni conclusive sull'applicazione dell'EMS sulla cv. Soreli e sulla cv. Hayward

Nel lavoro solto è stata valutata la possibilità di applicare un mutagene chimico (EMS) ai protocolli di rigenerazione avventizia, come precedentemente ottenuti, per 2 cultivar commerciali: Hayward (*A. deliciosa*) e Soreli (*A. chinensis*).

Lo studio dell'efficienza del mutagene chimico EMS per indurre mutazioni in *actinidia* ha consentito, come in altre specie (Masrizal, *et al.*, 1991; Dai *et al.*, 2011), di confermare complessivamente che all'aumentare della dose o del tempo di contatto si riduce la sopravvivenza del tessuto.

Inoltre sia in Hayward che in Soreli il numero di rigenerazioni per espianto rigenerante si riduce all'aumentare del tempo di contatto con l'EMS, indicando come il mutagene riduca anche la capacità rigenerativa degli espianti stessi.

La risposta all'applicazione del mutagene chimico sembra infine essere influenzata anche dalla cultivar dove in Soreli si hanno maggiori necrosi dei calli e minore sopravvivenza degli stessi nel lungo periodo, mentre in Hayward le necrosi sono ridotte ed il periodo in cui i calli si mostrano ancora vitali e rigeneranti è maggiore.

12 Inoculo con PSA dei rigeneranti ottenuti da calli trattati con EMS

Materiale e metodi

Preliminarmente, per valutare quale metodo di inoculo fosse il più idoneo per l'infezione *in vitro* dei germogli sono stati prelevati 40 germogli (Tab. 21) di un clone rigenerato da Hayward (ottenuti quindi da una singola rigenerazione). Di questi 15 sono stati inseriti su terreno MOLT in provette Falcon da 15 ml e sottoposti ad inoculo mediante ferita con ago sulla pagina fogliare (similmente al lavoro *in vivo*) e successiva deposizione di 1 goccia di sospensione di PSA in acqua (Fig. 53). Altri 15 germogli, invece, sono stati immersi con la parte basale, per 24 ore, in 0,5 ml della sospensione di PSA, in provette Falcon da 15 ml (Fig. 54), e successivamente inseriti in terreno MOLT. Infine 10 germogli sono stati sottoposti agli stessi trattamenti (5 germogli/trattamento) ma in assenza di PSA. La sospensione batterica è stata realizzata con PSA, ceppo CRA-FRU 8.43, (come per gli eventi *in vivo* gentilmente concesso dal Dott. Marco Scortichini del CREA-FRU) ad una concentrazione di 10^8 CFU.

Definito, quindi, il metodo di inoculo da applicare si è proceduto ad inoculare con PSA germogli rigenerati di SOR e di HW ottenuti a seguito degli eventi di rigenerazione avventizia con applicazione del mutagene (Tab. 22). Sono stati utilizzati 20 germogli per ogni trattamento più 20 germogli di controllo per cultivar.

Risultati

Tra i due metodi testati è stato ritenuto migliore quello dell'immersione in quanto ha fornito risultati in tempi più brevi ed è stato considerato più discriminante, poiché si è avuta una mortalità maggiore dei cloni di HW nel medesimo tempo (tra infezione e rilievo dati).

Tipo di inoculo	Cloni trattati	Cloni sopravvissuti a 120 giorni
Con ferita	15	9
Con ferita co.	5	5
Con immersione	15	1
Con immersione co.	5	5

Tab. 21: risultati del confronto tra i due metodi di inoculo, per ferita e per immersione e rispettivi controlli (co.) nella cv. Hayward

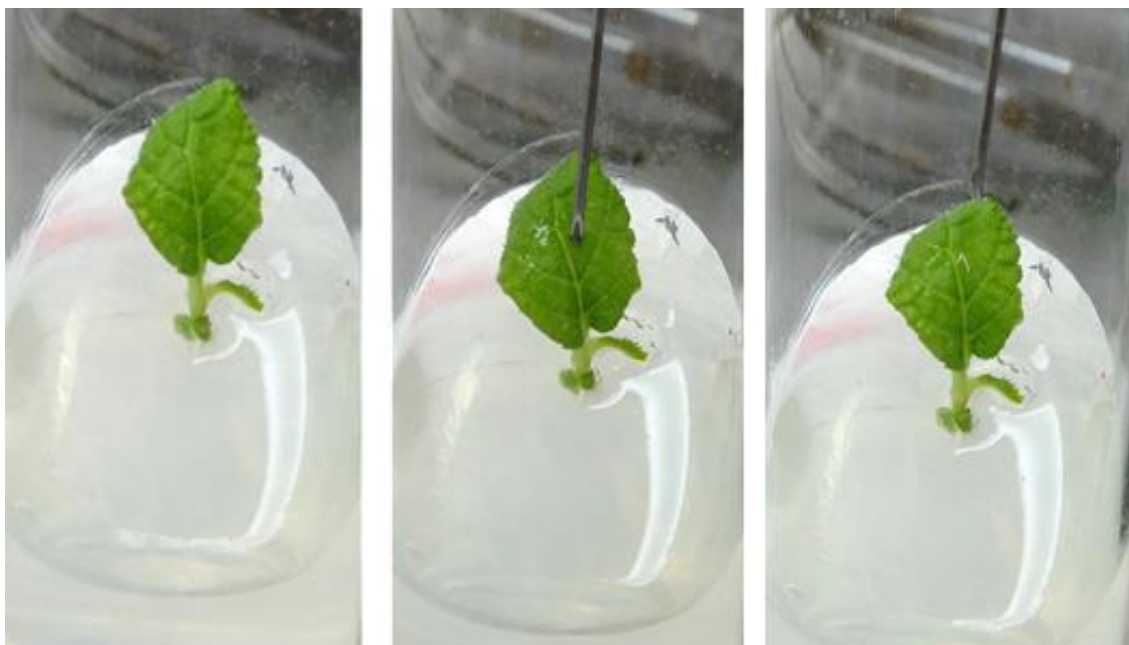


Fig. 53: inoculazione di PSA mediante ferita sulla foglia in Hayward

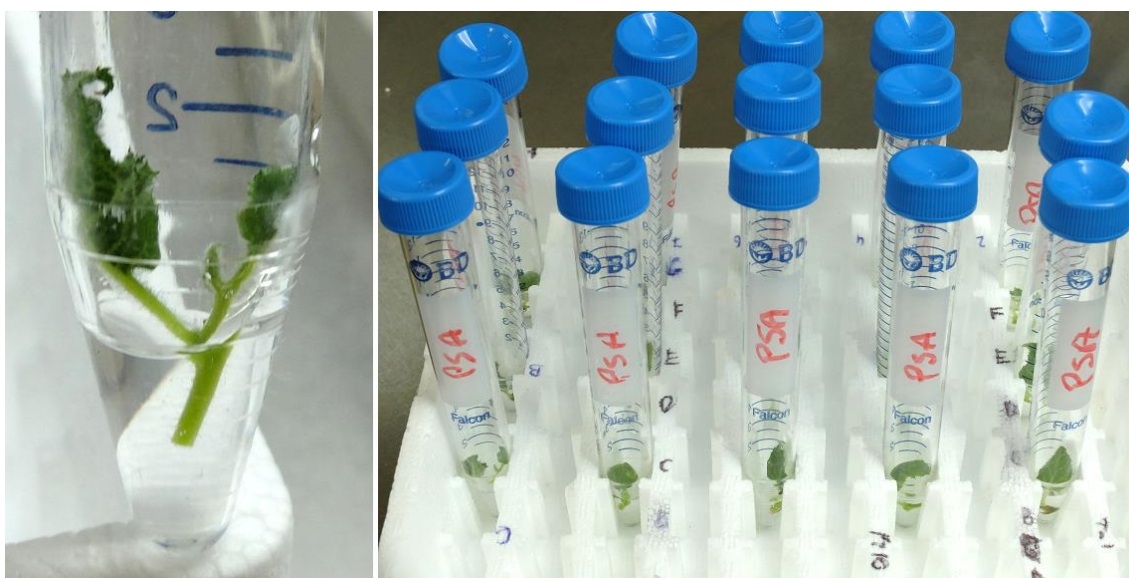


Fig. 54: inoculazione di PSA mediante immersione della parte basale in Hayward

Dei germogli inoculati per immersione in PSA, derivanti dai trattamenti in rigenerazione con EMS, dopo 240 giorni dall'immersione, ne sono sopravvissuti 8, 6 di HW e 2 di SOR, (Tab. 22, Fig. 55) che sono in corso di ulteriore valutazione e di trasferimento in serra, previa moltiplicazione, radicazione e ambientamento per effettuare ulteriori valutazioni *in vivo*.

Nessun germoglio dei controlli, in entrambe le cultivar, è sopravvissuto all'infezione.

Cultivar e trattamenti con EMS applicati in rigenerazione avventizia	Germogli sopravvissuti a 120 gg	Germogli sopravvissuti a 240 gg
HW (co.)	0	0
HW EMS 30 min	2	0
HW EMS 60 min	2	2
HW EMS 120 min	3	2
HW EMS 240 min	3	2
SOR (co.)	0	0
SOR EMS 30 min	5	1
SOR EMS 60 min	3	0
SOR EMS 120min	1	1

Tab. 22: Germogli della cv. Hayward (HW) e della cv. Soreli (SOR) rigenerati in presenza di EMS (0 – 240 min) e inoculati con PSA sopravvissuti dopo 120 e 240 gg dall'inoculo. SOR EMS 240 min non ha dato rigenerazioni utilizzabili per l'inoculo

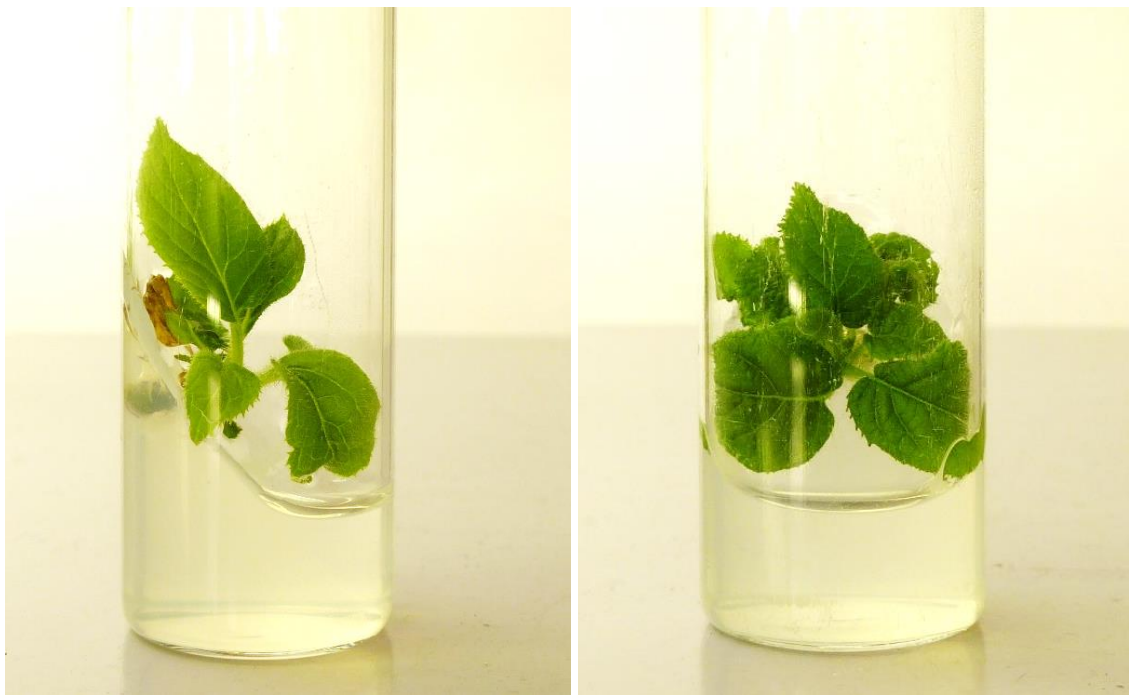


Fig. 55: esempio di esemplari ottenuti da applicazione di EMS ai calli di rigenerazione avventizia e vivi a 240 giorni dall'inoculo con sospensione batterica di PSA in acqua e applicazione tramite immersione della parte basale. Cultivar Hayward a destra e cultivar Soreli a sinistra.

CONCLUSIONI

Nel lavoro si è proceduto alla valutazione della risposta a *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) del materiale vegetale reperibile presso il CREA-FRU e di quello ottenuto tramite applicazione di tecniche di miglioramento genetico non convenzionale, utilizzando l'Etil-Metan-Sulfonato (EMS), un mutagene chimico.

Inizialmente si è proceduto alla valutazione *in vivo* di presunte resistenze/tolleranze che alcune evidenze empiriche (spesso di agricoltori o tecnici di campo) attribuivano ad alcune cultivar (particolarmente Hayward). Non è stato possibile validarle negli esperimenti eseguiti. Infatti, procedendo all'innesto su piede infetto da PSA di 14 cultivar maschili e femminili commercialmente importanti, per un totale di 112 piante, non si è manifestata nessuna sopravvivenza. Per 3 anni si è proceduto anche alla valutazione in pieno campo di selezioni sperimentali di *actinidia* presenti presso il CREA-FRU. Questa ha consentito di identificare, tra oltre 1700 individui sintomatici, circa 30 genotipi (meno del 2%) senza sintomi.

Successivamente si è applicato il mutagene EMS (in concentrazioni variabili) a più di 17.000 semi ottenuti da libera impollinazione di Hayward (la cultivar commerciale più coltivata nel mondo), di 3 selezioni del CREA-FRU senza sintomi rilevati e di 1 selezione dell'Università di Udine. Di questi circa 15.000 semi hanno germinato (germinabilità media circa 88%).

Si è proceduto anche ad una prova di dose letale (LD) intesa come la percentuale di EMS applicata ai semi tale da rendere gli stessi non in grado di germinare. La prova ha fornito risultati univoci, dimostrando come la concentrazione di EMS applicata influenza il numero di semi in grado di germinare. È stato identificato un intervallo compreso tra 1 e 2%, dove ad 1% non si ha sostanziale differenza con il non trattato mentre a 2% la germinabilità è prossima a zero.

È stato poi applicato l'EMS alle antere di selezioni maschili da cui in seguito è stato estratto il polline (putativamente mutagenizzato) per l'esecuzione di incroci controllati. La valutazione della germinabilità indica come la stessa è influenzata dall'applicazione del mutagene infatti in assenza di trattamento ha raggiunto anche l'82% mentre in presenza di EMS non ha superato il 17%.

Dagli incroci sono stati ottenuti frutti dai quali sono stati collezionati oltre 13.000 semi tutti messi in condizione di germogliare. Il numero medio di semi per frutto sembra essere influenzato dal tempo di applicazione del mutagene alle antere. La germinabilità dei semi è stata molto bassa, ottenendo circa 1.000 piantine (8%).

Le piante (circa 16.000) ottenute da tutti gli esperimenti di mutazione eseguiti sono state sottoposte a inoculo artificiale con PSA e i sintomi dell'infezione sono stati rilevati e le piante infette eliminate.

Sono stati eseguiti 3 diversi metodi di inoculo: irrigazione con una sospensione batterica in acqua, ferita sul peduncolo fogliare e conseguente deposito di colonie batteriche, infiltrazione della sospensione batterica in acqua attraverso la pagina inferiore della foglia. Tra i diversi metodi si è ritenuto migliore, sia per efficacia che per praticità, quest'ultimo ove in pratica si è andato ad inserire il batterio direttamente nel mesofillo fogliare attraverso le aperture stomatiche ma anche attraverso gli interstizi cellulari della parete fogliare inferiore.

La sintomatologia non è apparsa chiara ed univoca infatti in alcune piante l'effetto dell'inoculo è stato quasi immediato, portando alla morte prima della 3 foglia vera mentre in altre è stato molto più lento e spesso non ha portato alla morte dell'esemplare vegetale anche se i sintomi erano comunque molto evidenti (necrosi fogliari estese e presenti su tutti i palchi fogliari).

Appare comunque chiaro come le giovani piantine abbiano mostrato molta suscettività al patogeno, risultando vitali, a 120 giorni dall'inoculo, solamente in 83 (0,5%) ed alla ripresa vegetativa dell'anno seguente, solamente in 5 (0,03%), ad oggi presenti. Questo numero estremamente basso se da un lato ci fa apprezzare la forte aggressività del patogeno e ci mostra come questo approccio, quando utilizzato nel miglioramento genetico, necessita di elevati numeri iniziali per ottenere un basso numero di piante apparentemente tolleranti dall'altro lato apre comunque alla possibilità di ottenere fonti di tolleranza/resistenza dalle quali partire per sviluppare nuove cultivar commercialmente valide.

Per i seguenti esperimenti *in vitro* si è allestito materiale vegetale prelevato in campo. Sono state utilizzate 3 cultivar commerciali (Hayward, Soreli, Zespri Gold) e la percentuale di sopravvivenza di espianti non inquinati è stata di circa il 40% in ognuna di

esse. Il materiale allestito è stato moltiplicato applicando come citochinine la Benzil-Adenina (BA) e la Zeatina (ZEA). Alla luce dei dati raccolti non sono state rilevate differenze significative tra le due citochine sia come numero di germogli prodotti che come lunghezza media degli stessi e non si sono ottenuti germogli con vetrificazione. Questi dati sono in accordo con alcuni autori (Caboni *et al.*, 2009) ma in disaccordo con altri (Rugini *et al.*, 1991).

Successivamente utilizzando il materiale moltiplicato si è proceduto ad individuare protocolli validi di rigenerazione avventizia (RA) in grado di fornire un adeguato numero di rigeneranti. Nella RA si possono distinguere 2 distinte fasi: la RA1, definibile come “induzione alla formazione del callo”, ha avuto una durata di 28 giorni ed è stata effettuata in parte al buio ed in parte alla luce; RA2, “formazione ed allungamento dei germogli rigenerati”, è stata effettuata alla luce ed ha avuto durata di 30 giorni.

Per la rigenerazione avventizia sono stati utilizzati espianti consistenti in porzioni di foglie prelevate da germogli in fase di moltiplicazione. Le foglie sono preparate procedendo con la rimozione del picciolo e del margine fogliare ed effettuando tagli perpendicolari alla nervatura centrale, in modo da ottenere frammenti di dimensioni omogenee che sono posti con la superficie adassiale a contatto con il terreno di coltura. In RA1 gli espianti sono stati trasferiti su un terreno di coltura contenente auxina+citochinina mentre in RA2 nel terreno di coltura era presente solo la citochinina presente nella fase 1. L'auxina utilizzata è l'Acido-Naftalen-Acetic (NAA).

Per Soreli i risultati ottenuti sono stati soddisfacenti con 7 giorni di buio. Si è proceduto a valutare l'effetto della ZEA, in comparazione con la BA, quando applicata al terreno di moltiplicazione. Nel complesso non si segnalano risultati significativamente differenti.

Per Zespry Gold si è ritenuto soddisfacente un periodo di 14 o 21 giorni anche se i calli sottoposti al trattamento di buio più prolungato hanno cominciato a manifestare sintomi di invecchiamento. Poiché i tassi di rigenerazione ottenuti in questo esperimento sono stati elevati (> 90%) non è stato necessario procedere ad un'ulteriore ottimizzazione del protocollo.

Per Hayward appare necessario un periodo di buio di almeno 14 giorni, pur non risultando comunque soddisfacente. Infatti 14 giorni di buio hanno permesso di ottenere il numero

significativamente più elevato di espianti rigeneranti (61%), mentre con 21 giorni di buio si è osservato il numero medio significativamente più elevato di germogli per espianto (2,13). In questo caso quindi si è proceduto a valutare i risultati della rigenerazione avventizia quando le piante da cui prelevare i frammenti fogliari venivano moltiplicate anche su ZEA e quando come citochinina nelle fasi di rigenerazione avventizia è utilizzata anche il Thidiazuron (TDZ) come alcuni autori (Gentile *et al.*, 2002; Petri e Scorza, 2010) suggeriscono per altre specie fruttifere recalcitranti.

La presenza nel terreno di moltiplicazione della ZEA non ha migliorato la situazione anzi ha ridotto significativamente, rispetto alla BA, sia la % di espianti rigeneranti (-30%) che il numero di germogli rigenerati per espianto (da 1,9 a 0,7).

Al contrario è risultato evidente un significativo effetto promotore del TDZ, rispetto alla ZEA, sia sulla % di espianti rigeneranti (+50%) che sul numero di germogli rigenerati (da 0,9 a 3,2).

Questi risultati inducono a pensare che in kiwi la rigenerazione avventizia è influenzata da tutti i parametri investigati nelle fasi della stessa, ossia il periodo di buio in RA1 e la citochinina applicata in RA2. Oltre questi sembra esserci anche un effetto diretto del genotipo sui risultati ottenibili. Si ricorda, inoltre che le 3 cultivar hanno diversa ploidia, ove Hayward è esaploide, Soreli è tetraploide e Zespri Gold è diploide e questo potrebbe avere un ruolo nella capacità rigenerativa.

Si è quindi proceduto quindi a creare variabilità genetica tramite immersione dei calli, ottenuti alla fine della RA1, aggiungendo EMS in terreno di coltura liquido. L'applicazione è stata fatta ai calli, di Hayward e Soreli, alla concentrazione (g/g) dell'1% e con 4 diversi tempi (30', 60', 120' e 240').

Per Soreli all'aumentare del tempo di applicazione dell'EMS si riducono le % della rigenerazione avventizia e il numero di rigenerazioni per espianto. Questi risultati sono attribuibili interamente alla presenza dell'EMS nel terreno di coltura, anche se è stata osservata l'influenza sui calli dell'agitazione in terreno liquido per 240 minuti, che hanno rigenerato un numero inferiore di germogli per espianto rispetto al controllo.

In Hayward l'EMS ha indotto minori necrosi nei calli rispetto a quanto osservato in Soreli, però ritardando la formazione di germogli avventizi, come ottenuto in viburno (Dai *et al.*,

2011). L'EMS non sembra ridurre il numero di espianti rigeneranti se non al maggior tempo di applicazione (240') del mutagene.

Successivamente, prima di procedere agli inoculi artificiali con PSA degli individui ottenuti *in vitro*, si è proceduto a valutare il metodo di inoculo migliore. Il primo tramite ferita sulla foglia e successiva deposizione di una goccia di acqua e PSA. Il secondo tramite immersione della base del germoglio nella medesima soluzione. Quest'ultimo metodo è stato ritenuto migliore, in quanto ha fornito risultati in tempi più brevi ed è stato considerato più discriminante.

Infine, sono stati eseguiti gli inoculi con PSA anche su parte degli individui di Hayward e Soreli ottenuti dalle rigenerazioni avventizie in presenza di EMS. A 240 giorni dall'immersione, ne sono sopravvissuti 8, 6 di HW e 2 di SOR che sono in corso di ulteriore valutazione e di trasferimento in serra, previa moltiplicazione, radicazione e ambientamento per effettuare ulteriori valutazioni *in vivo*.

Sono stati, quindi, provati diversi metodi per indurre variabilità in *Actinidia*, con lo scopo principale di individuare mutanti in grado di manifestare resistenza o tolleranza alla PSA. I risultati ottenuti appaiono incoraggianti e, nonostante gli esperimenti riportati in questo lavoro siano del tutto preliminari, possono far sperare di individuare qualche genotipo resistente/tollerante, con le metodologie proposte. Fino ad ora, non ci sono evidenze certe e documentate riguardo alla disponibilità di genotipi tolleranti questa grave patologia. La difesa dal patogeno è ancora affidata alla buona pratica agronomica e alla protezione con presidi fitosanitari autorizzati.

BIBLIOGRAFIA

- Abelleira A., Ares A., Aguin O., Picoaga A., Lopez MM, Mansilla P., 2014. Current situation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Galicia (northwest Spain). Plant Pathology 63: 691-699.
- Aiello D., Cinquerrui A., Abriano S., Ferrante P., Scortichini M., Polizzi G., Cirvilleri G., 2014. Prevalence of copper resistance among strains of *Pseudomans syringae* isolated from mango cultivars in Sicily. Atti XX Convegno nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale, Pisa 22-24 settembre. Pp. 59.
- Balestra G.M., 2004. Il contenimento delle batteriosi dell'actinidia mediante l'impiego dei formulati rameici. Rivista di Ortoflorofrutticoltura 10, 5-41
- Balestra G.M., Mazzaglia A., Quattrucci A., Spinelli R., Graziani S., Rossetti A., 2008. Bacterial canker on *Actinidia chinensis*. Informatore Agrario 64: 75-76
- Balestra G.M., Mazzaglia A., Quattrucci A., Renzi M., Rossetti A., 2009a. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in JinTao kiwi plants in Italy. Phytopathologia Mediterranea 48: 299-301.
- Balestra G.M., Mazzaglia A., Quattrucci A., Renzi M., Rossetti A., 2009b. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. Australasian Plant Disease Notes 4: 34-36.
- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A. Mazzaglia A., 2012. Riconoscimento molecolare di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e contemporanea attribuzione a popolazioni dl patogeno di differente provenienza e grado di virulenza tramite multiplex-PCR. Kiwi informa anno 8° n. 1-3/2012. Pp. 42-43.
- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A. Mazzaglia A., 2013. A Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and Differentiation of Populations with Different Geographic Origin. Plant. Dis. 97:472478.
- Barbieri C. e Morini S., 1987. Plant regeneration from *Actinidia* callus cultures. Journal of Horticultural Science, Vol. 62, Issue 1, pp. 107-109, ISSN 0022-1589
- Bastas K.K., Karakaya A., 2012. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. Plant Disease 96: 452.
- Beatson R.A., Datson P.M., Ferguson A.R., Montefiori M., 2014. Use of Kiwifruit Germplasm Resources for Genetic Improvement. Proc. IInd IS on Biotechnology of Fruit Species. Ed.: S.E. Gardiner. Acta Hort. 1048, ISHS 2014

- Behera M., Panigrahi J., Mishra R.R., Rath S.P., 2012. Analysis of EMS induced in vitro mutants of *Asteracantha longifolia* (L.) Nees using RAPD markers. Indian Journal of Biotechnology Vol 11, January 2012, pp 39-47
- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I., Wake J., Daley S., 1998. A micropropagation system for *Primula scotica*: A rare and at risk Scottish species endemic to Orkney. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 34: P-1074, 61A
- Bevilacqua D., Cipriani G., Caboni E., 2015. Rigenerazione avventizia del kiwi (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward; *Actinidia chinensis*, cv Soreli). Colture *in vitro*: note di laboratorio. Pp. 181-182.
- Bhardwaj L., Ramawat K.G., 1993. Effect of anti-oxidants and adsorbents on tissue browning associated metabolism in *Cocculus pendulus* callus cultures. Indian Journal of Experimental Biology. Agosto 1993 n. 31(8), Pp. 715-718.
- Bhojwani S.S. e Razdan M.K., 1983. Plant tissue culture: "Theory and practice". Ed. Elsevier p.52.
- Bourgin J.P., Nitsch J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides à partir d'étamines cultivées in vitro. *Ann. Physiol. Veg.* 9: 377-382.
- Brained K.E. e Fuchigami L.H., 1981. Stomatal Functioning of In Vitro and Greenhouse Apple Leaves in Darkness, Mannitol, ABA, and CO₂. <https://doi.org/10.1093/jxb/33.3.388>.
- Brundell D.J., 1975. Flower Development of the Chinese Gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.). *New Zealand Journal of Botany*, 13:3. Pp. 485-496.
- Bucci V., Costa G., 2006. Kiwi, è divenuto più ampio il panorama varietale. *Agricoltura* 2006 settembre. Pp. 96-98.
- Burge G. K., Spence C. B., Marshall R. R., 1987. Kiwifruit: effects of thinning on fruit size, vegetative growth, and return bloom. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 1987. Vol. 15. Pp. 317-324.
- Caboni E., Anselmi S., Donato E., Manes F., 2003. In Vitro Selection of *Actinidia deliciosa* Clones Tolerant to NaCl and their Molecular and In Vivo Ecophysiological Characterisation. *Acta Hort.* 618, ISHS 2003. Pp. 77-83.
- Caboni E., Biasi R., Delia G., Tonelli M., 2009. Effect of CPPU on in vitro axillary shoot proliferation and adventitious shoot regeneration from leaf explants in kiwifruit. *Plant Biosystems*, Vol. 00, No. 00, Month 2009, pp. 1-6.
- Cacioppo O., 1989. L'*Actinidia*. Edizioni REDA, 1989.

- Cacioppo O., 2012. *Actinidia*: esperienze di prevenzione e lotta alla batteriosi da P.S.A. e P.V. in provincia di Latina. Kiwi informa n. 4-6/2012, pp. 56-59.
- Cacioppo O., 2013. Riflettori puntati oggi sulle cultivar a pasta gialla. Analisi sulla situazione a fine anno 2012 e prospettive future. Kiwi informa n. 7-9/2013. Pp. 5-45.
- Cacioppo O., 2015. Speciale storia della fecondazione artificiale del kiwi in Italia. Kiwi informa n. 7-9/2015. Pp. 9-21.
- Cacioppo O. e Scortichini M., 1990. Informatore Agrario n. 22/1990.
- Centeno M. L., Rodríguez A., Feito I., e Fernández B., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. Plant Cell Reports, 16(1), 58-62.
- Centeno M. L., Rodríguez A., Albuérne M. A., Feito I., e Fernández B., 1998. Uptake, distribution and metabolism of 6-benzyladenine and cytokinin content during callus initiation from *Actinidia deliciosa* tissues. Journal of plant physiology, 152(4-5), 480-486.
- Centeno M. L., Fernández B., Feito I., e Rodríguez A., 1999. Uptake, distribution, and metabolism of 1-naphthaleneacetic acid and indole-3-acetic acid during callus initiation from *Actinidia deliciosa* tissues. Journal of plant growth regulation, 18(2), 81-88.
- Chapman J., Taylor R., Alexander B., 2011. Second report on characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolates in New Zealand. Ministry of Agriculture and Forestry. Pp. 10.
- Chapman J. R., Taylor R. K., Weir B. S., Romberg M. K., Vanneste J. L., Luck J., Alexander B. J. R., 2012. Phylogenetic Relationships Among Global Populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Phytophthology Volume 102, Numero 11, Pp. 1034-1044.
- Cheng D.S.K., Freeling M., 1976. Methods of maize pollen germination in vitro, collection, storage, and treatment with toxic chemicals; recovery of resistant mutants. Maize genetics cooperation newsletter, Columbia, 1976.
- Choi J., Kim H., Lee J., Bae Y., Chung Y., Shin J., Hyung N., 2001. Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). In Vitro Cell Dev Biol-Plant 37:274–279.
- Chih-Ching C., Ching-Chu W., Ching-san S., Chen H., Kwang-chu Y., Chih C. e Feng-yun, B., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice

- through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia sinica*, 18(5), 659-668.
- Chu C.C., 1978. The N6 medium and its application to anther culture of -cereal crops, *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.*, Peking, 43.
- Cipriani G., Testolin r., 2007. “Jintao”: a Chinese kiwifruit selection grown in Italy. *Acta Horticulturae* 753. Pp. 247-252.
- Cipriani G., Tommasi R., Buratto E., Macor D., Frezza R., Comuzzo G., Messina R., Testolin R., 2009. Nuovi impollinatori per le varietà di *Actinidia chinensis* “Jintao” e “Soreli”. *Italus Hortus* 16 (5), 2009. Pp. 157-160.
- Costa G. e Ryugo K., 1978. Indagini preliminari sulla partenocarpia e sullo sviluppo dei frutti di *actinidia* indotto da fitoregolatori esogeni. *Proc. “Incontro frutticolo SOI, Actinidia”*, Torino, Italia, 1978. Pp. 144-146.
- Costa G., Donati I., Spinelli F., Graziani S., Vittone G., Onorato R., Bucci V., Donati G., Pelliccioni F., 2012. Ruolo delle tecniche agronomiche sul cancro batterico dell'*actinidia*. *Kiwi informa* anno 8° n. 1-3/2012. Pp. 46-47.
- Cunty A. Poliakov F., Rivoal C., Cesbron S., Fischer-Le Saux M., Lemaire C., Jacques M.A., Manceau C., Vanneste J.L., 2014. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a *de novo* pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathol* Doi: 10.1111:12297.
- Dai W., Yuanjie S., Castillo C., Beslot O., 2011. Plant regeneration from in vitro leaf tissues of *Viburno dentatum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2011) 104:257–262.
- De Paoli G., Rossi V., Scozzoli A., 1994. Micropropagazione delle piante ortofrutticole. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300302703>.
- Debergh, P.C., Maene L.J., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Vol. 14, (4): 335-345.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2, -2233 - 2244 (2007)
- Everett K.R., Taylor R.K., Romberg M.K., Rees-George J., Fullerton R.A., Vanneste J.L., Manning M.A., 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* 6: 67-71.
- Everett K.R., Pushparajah I.P.S., Vergara M.J., 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on surfaces in the orchard. *New Zealand Plant Protection* 65: 19-24.

- Feito I., Gea M. A., Fernández B., e Rodríguez R., 1996. Endogenous plant growth regulators and rooting capacity of different walnut tissues. *Plant growth regulation*, 19(2), 101-108.
- Ferguson A.R.. Kiwifruit: A botanical review. *Horticultural Reviews*. 1984. Vol. 6. Pp. 1-64.
- Ferguson A.R., 2004. Cele100 years of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in New Zeland, 1904-2004. *NZJ Crop & Hort Sci* 32 (1): 1-27.
- Ferguson A.R. e Huang H.W., 2007. Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding. *Horticultural Reviews* 33: 1-121.
- Ferguson A.R., Zhang J.-L., Duffy A.M., Beatson R.A., Cheng C.-H., Datson P.M., Russel G. L., McNeilage M. A., Harris-Virgin P. M., Seal A. G., Wu J. H., 2009. Ploidia e uso della citometria a flusso nel miglioramento genetico dell'*actinidia*. *Italus Hortus* vol. 16 n.5, Pp. 78–83.
- Ferrante P., Scortichini M., 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology* 157: 768-770.
- Ferrante P., Scortichini M., 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology* 69: 954-962.
- Ferrante P., Fiorillo E., Marcelletti S., Marocchi F., Mastroleo M., Simeoni S., Scortichini M., 2012. Relazione tra parametri ambientali e comparsa dell'Epidemia di *Pseudomonas Syringae* pv. *actinidiae* in Italia e ciclo della malattia su *Actinidia deliciosa* e *A. Chinensis*. *Kiwi informa* 1-3/2012, pp. 34-36.
- Ferrante P., Fiorillo E., Marcelletti S., Marocchi F., Mastroleo M., Simeoni S., Scortichini M., 2012. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. *Journal of Plant Pathology* 94: 455-461.
- Ferrante P., Scortichini M., 2014. Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathology* 63: 12-19.
- Ferrante P., Scortichini M., 2015. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathology* 64: 51-62.

- Fideghelli C.; Della Strada G.; Liverani A.; Minguzzi A., 1986. Introduzione di Venus e Romea, due nuove cultivar per la peschicoltura italiana. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Roma, 1986. V. 17 p. 137-144.
- Fideghelli C. e Della Strada G., 2007. I brevetti della varietà di kiwi in Europa. Atti 8° convegno nazionale *Actinidia* 2007. Pp. 84-87.
- Fideghelli C., 2012. Cultivar di kiwi introdotte nel mondo dal 1980. Kiwi informa n. 7-9/2012. Pp. 20-29.
- Fraser L.G., Kent J. e Harvey C.F., 1995. Transformation studies of *Actinidia chinensis* Planch. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol. 23, Issue 4, pp. 407-413, ISSN 0114-0671.
- Froud K., Cogger N., Beresford R., 2014. The relationship between kiwifruit bacterial canker disease (Psa-V (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)) and kiwifruit productivity. New Zealand Plant Protection 67: 34-40.
- Froud K., Cogger N., Beresford R., Clark G., 2015. Orchardist-observed prevalence of symptoms of kiwifruit bacterial canker disease in 'Hayward' kiwifruit blocks in New Zealand. Proceedings of the first international symposium on bacterial canker of kiwifruit. Pp. 45-48.
- Froud K.J., Everett K.R., Tyson J.L., Beresford R.M., Cogger N., 2015. Review of the risk factors associated with kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Insects & diseases in apples & kiwifruit, New Zealand Plant Protection 68: 313-327 (2015).
- Galbraith D.W., Harkins K. R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. Science 220 (1983): 1049-1053.
- Gallelli A., Talocci S., L'Aurora A., Loreti S., 2011. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruit, from symptomless fruits and twigs, and from pollen. Phytopathologia Mediterranea 50: 462-472.
- Gambino G., Ruffa P., Vallania R., Gribaudo I., 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers, and ovaries of grapevine (*Vitis spp.*). Plant Cell Tiss Org Cult 90:79-83.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K., 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50, 151.

- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.W., Thorpe T., 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plants*, 32: 272-289.
- Gautheret R.J., 1939. Sur la possibilité de réaliser a culture indefinite des tissus de tubercules de carotte. *C R Hebd Seances Acad Sc* 208:118–120
- Gentile A., Monticelli S., e Damiano C., 2002. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Reports*, 20(11), 1011-1016.
- George E.F., 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology.* Exegetics Ltd., Edington.
- Gilchrist E., e Haughn G., 2010. Reverse genetics techniques: engineering loss and gain of gene function in plants. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elp059>.
- Gonzales M.V., Rey M., Rodriguez R., 1995. Plant regeneration from petioles of kiwifruit microshoots. *Hort. Sci.*, 30: 1302–3
- Goto M., Hikota T., Nakajima N., Takikawa Y., Tsuyumu S., 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 60: 147-153.
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ. (2003). Spectrum of Chemically Induced Mutations From a Large-Scale Reverse-Genetic Screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 731-740.
- Grondeu C. e Samson R. A., 1994. Review of thermotherapy to free plant materials from pathogens especially seed from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13. Pp.57-75
- Grout B.W.W., 1975. Wax development on leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. Currawong regenerated from meristem culture. *Plant Science Letters* Vol. 5, Issue 6, December 1975, Pages 401-405. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(75\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0304-4211(75)90007-3).
- Guha S., Maheshwari S.C., 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature* 212: 97-98.
- Gui Y.L., 1979. Callus induction from stem segments and plantlet regeneration of Chinese gooseberry. *Acta Botanica Sinica*, Vol. 21, Issue 4, pp. 339-344, ISSN 0577-7496.
- Gullino M.L., Brunelli A., Vittone G., 2012. Difesa da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Kiwi informa* anno 8° n. 1-3/2012. Pp. 48-49.
- Haberlandt G., 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien. Math Naturwiss* 111:69–92.

- Hanning E., 1904. Über die kultur von Cruciferne, Embryonen ausenhalb des Embryosachs. Bot. Ztg. 62: 45–80.
- Harada H., 1975. In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* Pl. as a technique for vegetative multiplication. Journal of Horticultural Science, Vol. 50, Issue 1, pp. 81-83, ISSN 0022-1589.
- Hoffmann N.E., Raja R., Nelson R.L., Korban S.S., 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of Soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers, Biol Plant, 48 (2004) 173-177.
- Hopping M. E., 1976. Effect of exogenous auxins, gibberellins, and cytokinins on fruit development in Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.). New Zealand Journal of Botany, 1976, Vol. 14: 69-75.
- Hopping, 1980. Supplementary pollination of tree fruits, Field trials on kiwifruit and Japanese plums. New Zealand Journal of Agricultural Research 23, 1980. Pp. 517-521.
- Hu C.Y., Wang P.J., 1983. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. Evans D.F., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y., (eds), pp. 177-227. Macmillan Publishing, New York.
- Huang H., Wang Y., Zhang Z., Jiang Z., e Wang S., 2004. *Actinidia* germplasm resources and kiwifruit industry in China. HortScience, 39(6), 1165-1172.
- Youssef J., Bergamini A., 1980. L'*actinidia* (Kiwi, Yang Tao) e la sua coltivazione. Bologna, Edagricole, 1980
- Youssef J., Scarbalo E., Giuliva C., Ponchio G., 1983. Studi sull'apparato radicale dell'*Actinidia* allevata in ambienti diversi. Atti del II Incontro Frutticolo sull'*Actinidia*, Societa Orticola Italiana, Sezione Frutticoltura, Bologna, pp. 195-200.
- Khawale R.N., Yeramilli V., Singh S.K., 2007. Molecular marker assisted selection of *in vitro* chemical mutagen induced grapevine mutants, Curr Sci, 92 (2007) 1056-1060.
- Kim M.; Kim S.C.; Moon D.Y. e Song K.J., 2007. Rapid shoot propagation from microcross sections of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward'). Journal of Plant Biology, Vol. 50, Issue 6, pp. 681-686, ISSN 1226-9239.
- Koh Y.J., Kim G.H., Jung J.S., Lee Y.S., Hur J.S., 2010. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv.

actinidiae in Korea. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 38: 275-282.

- Kumar S. e Sharma D.R., 2002. In vitro propagation of kiwifruit. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, Vol. 77, Issue 5, pp. 503-508, ISSN 1462-0316.
- Kurtz S.L., Hartman R.D. e Chu I.Y., 1991. Current methods of commercial micropropagation. In: Vasil, IK (Ed) Scale-up and Automation in Plant Propagation, Academic Press, New York. Pp. 7–35.
- Latado R.R., Adames A.H., Neto A.T, 2004. *In vitro* mutation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzveler) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell Tissue Organ Cult, 77 (2004) 103-106.
- Lentini Z., Reyes P., Martínez C.P., Roca W.M., 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04180-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04180-3).
- Letham D. S., 1964. Isolation of a kinin from plum fruitlets and other tissues. Éditions du Centre National de la Recherche Scientific.
- Letham D. S., 1973. Cytokinins from *Zea mays*. Phytochemistry n.12(10). Pp. 2445-2455.
- Li M., Tan G., Li Y., Cheng H., Han X., Xue L., Li L., 2004. Resistance of different Chinese gooseberry cultivars to Chinese gooseberry bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and their cluster analysis. Plant Protection 30: 51-54.
- Li Y., Cheng H., Fang S., Qian Z., 2001. Ecological factors affecting prevalence of kiwifruit bacterial canker and bacteriostatic action of bacteriocides on *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Yingyong Shengtai Xuebao 12:359-362.
- Lin Q.L.; Chen Z.Q. e Wu J.S., 1994. Propagation in vitro of some excellent clones of kiwi fruit. Journal of Fujian Agricultural University, Vol. 23, Issue 3, pp. 271-274, ISSN 1006-7817.
- Liu Y., Li S., Zhu T., Shao B., 2012. Specific DNA markers for detection of bacterial canker of kiwifruit in Sichuan, China. African Journal of Microbiology Research 6: 7512-7519.
- Luan Y.S., Zhang J., Gao X-R, An L.J., 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult (2007) 88:77–81

- Macchi E., 2014. L'impatto economico della batteriosi e la costituzione del catasto. Mipaaf 2014.
- Macchi E., 2014/2. Situazione e prospettive della coltura nel mondo. Kiwi informa n. 10-12/2014, pp. 14-15.
- Macchi E., 2014. Kiwi 2014/2015 stime di produzione e commercializzazione. Aggiornamento sul kiwi, Villafranca 8 ottobre 2014.
- Majada J.P., Fal M.A. e Sánchez-Tamés R., 1997. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant (1997) 33: 62. Doi:10.1007/s11627-997-0042-6.
- Marcelletti S. e Scortichini M., 2011. Clonal outbreaks of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* in Italy. Journal of Plant Pathology 93: 479-483.
- Marcelletti S., Ferrante P., Petriccione M., Furraro G., Scortichini M., 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. PLoS ONE 6:e27297.
- Marga F., Vebret L. e Morvan H., 1997. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (1997) 49: 1. doi:10.1023/A:1005832115954.
- Marletto F., 1980. L'importanza di impollinazione delle api nella fruttificazione di uva spina cinese (*Actinidia chinensis*). Apicoltore Moderno 1980. Vol. 71 No. 3. Pp.81-85.
- Marin J. A., Gella R., 1987. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? Symposium on High Technology in Protected Cultivation 230, 1988. Pp. 105-112.
- Martin B., Ramiro M., Martínez-Zapater J.M., Alonso-Blanco C., 2009. "A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg erecta genic background of Arabidopsis". BMC Plant Biol 9:147
- Masrizal, Simonson R.L. e Baenziger P. S., 1991. Response of different wheat tissues to increasing doses of ethyl Methanesulfonate. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26: 141-146, 1991.
- Mazzaglia A., Renzi M., Balestra G.M., 2011. Comparison and utilization of different PCR-based approaches for molecular typing of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Italy. Canadian Journal of Plant Pathology. Volume 33, 2011 - Issue 1.

- Mazzaglia A., Studholme D.J., Taratufolo M.C., Cai R., Almeida N.F., Goodman T., Guttman D.S., 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) Isolates from Recent Bacterial Canker of Kiwifruit Outbreaks Belong to the Same Genetic Lineage.
- McCann H.C., Rikkerink E.H.A., Bertels F., Fiers M., Lu A., Rees-George J., Andersen M.T., Gleave A.P., Haubold B., Wohlers M.W., Guttman D.S., Wang P.W., Straub C., Vanneste J., Rainey P.B., Templeton M.D., 2013. Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *Plos Pathogens* 9: e1003503.
- McGregor S.E., 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. USDA book 1976.
- Miller E.V., 1954. The natural origins of some popular varieties of fruit. *Econ. Bot.* 8: 337-348.
- Miller C. O., 1967. Cytokinins in *Zea mays*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 144(1), 251-257.
- Miller L.R. e Murashige T., 1976. Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In vitro* 12: 797-813.
- Monette P.L., 1986. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 6, Issue 1, pp. 73-82, ISSN 0167-6857.
- Morel G., Martin C., 1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *C R Seances Acad Agric Fr* 41:472–475
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, pp. 853-858.
- Nakajima M., Goto M., Hibi T., 2002. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *Journal of General Plant Pathology* 68: 68-74.
- Nobécourt P., 1939. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C R Seances Soc Biol Ses Fil* 130:1270–1271
- Obukosia S., Kimani E., Waithaka K., Mutitu E., Kimani P., 2005. Effects of growth regulators and genotypes on pyrethrum in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:162–166.
- Ossani V., 2002. Summer 3373. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 64 (9). Pp. 9.

- Palmer-Jones T., Clinch P.G., 1974. Observations on the pollination of Chinese gooseberries variety 'Hayward'. N.Z. Journal of Experimental Agriculture vol. 2. Pp. 455-458.
- Palmer-Jones T., Clinch, P.G., Briscoe D.A., 1976. Effect of honeybee saturation on the pollination of Chinese gooseberries, variety 'Hayward'. New Zealand journal of experimental agriculture vol. 4. Pp. 255-256.
- Palmieri A. e Pirazzoli C., L'*actinidia* in Italia e nel mondo tra concorrenza e nuove opportunità. Frutticoltura n. 12/ 2014, pp. 66-68.
- Parry M. A., Madgwick P. J., Bayon C., Tearall K., Hernandez-Lopez A., Baudo M., Rakszegi M., Hamada W., Al-Yassin A., Ouabbou H., Labhilili M. e Phillips A. L., 2009. Mutation discovery for crop improvement. Journal of Experimental Botany, 60 (10). Pp. 2817-2825.
- Petri C. e Scorza R., 2010. Factors affecting adventitious regeneration from in vitro leaf explants of 'Improved French' plum, the most important dried plum cultivar in the USA. Annals of applied biology, 156(1), 79-89.
- Pinzauti, M. 1991. Impollinazione entomofila: Gli insetti e le Colture. L'Italia Agricola n.1. Pp. 49-62.
- Pinzauti, M. e Vannozzi, G.P., 1988 . L'impollinazione entomofila nel girasole. Atti Convegno CNR "Stato Attuale e Prospettive delle Colture oleaginose in Italia". Pp. 491-499.
- Pinzauti M., Frediani D., Biondi C., Belli R., Panizzi L., Cosimi C., Zummo V., 1991. Impiego delle api nel rilevamento dell'inquinamento ambientale. Analysis, 8:354-407.
- Pirazzoli C. e Palmieri A., 2013. Aspetti economici della diffusione della batteiosi del kiwi in Italia: stima dei maggiori costi annui di produzione e calcolo del valore del soprassuolo. Alma Mater Studiorum Università di Bologna Dipartimento di Scienze Agrarie 2013, All. 1 ed All. 2.
- Prado M. J., Gonzalez M. V., Romo S., Herrera M. T., 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. Plant Cell Tiss Organ Cult (2007) 88:1–10
- Predieri S., 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 185–210, 2001.

- Pulido C. M., Harry I. S. e Thorpe T. A., 1990. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). Canadian Journal of Forest Research, 20(8), 1200-1211.
- Read P.E., 1988. Stock plants influence micropropagation success. Acta Hort. 226: 41-52.
- Rees-George J., Vanneste J.L., Cornish D.A., Pushparajah I.P.S., Yu J., Templeton M.D., Everett K.R., 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. Plant Pathology 59: 453-464.
- Rey M., Fernandez M. T., Gonzalez M. V., Rodriguez R., 1992. Kiwifruit micropropagation through callus shoot-bud induction. In vitro Cellular Develop. Biol., 28: 148-52
- Rugini E., 2012. Risultati preliminari di una sperimentazione di miglioramento genetico dell'*Actinidia* in campo, con formule biotecnologiche di tolleranza a stress idrico, funghi patogeni, e modifica dell'architettura della chioma. Kiwi Informa n. 7-9/2012, pp. 5-18.
- Schleiden M.J., 1838. Beiträge zur Phytogenesis. Arch Anat Physiol Wiss Med (J Müller) pp 137-176.
- Schmid R., 1978: Reproductive anatomy of *Actinidia chinensis* (Actinidiaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 100: 149-195.
- Schwann T., 1839. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen. W Engelmann: Leipzig No 176.
- Scortichini M., 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. Plant Pathology 43: 1035-1038.
- Scortichini M. e Simeoni S., 1993. *Pseudomonas Syringae* pv. *actinidiae* in Italia nel 1993, L'informatore Agrario, 47.34.35.
- Scortichini M. e Cipriani G., 2012. Struttura genomica, epidemiologia e miglioramento genetico per la resistenza. Frutticoltura Supplemento al n. 9/2012. Pp. 26- 31.
- Scortichini M., Marcelletti S., Ferrante P., Petriccione M., Firrao G., 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multifaceted, pandemic pathogen. Molecular Plant Pathology 13: 631-640.

- Scortichini M. 2014. Caratterizzazione molecolare del batterio ed interventi di prevenzione e difesa. Presentazione progetto INTERACT MiPAAFF 2014.
- Scorza R, Mehlenbacher SA, Lightner GW (1985). Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the Eastern United States and implications for peach germplasm improvement. J Amer Soc Hort Sci 110 (4), pp. 547-552.
- Senapati S.K. e Rout G.R., 2008. *In vitro* mutagenesis of rose with ethylmethanesulfonate (EMS) and early selection using RAPD markers, Adv Hortic Sci, 22 (2008) 218-222.
- Serizawa S., Ichikawa T., 1993a. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit: 1. Infection and bacterial movement in tissue of new canes. Annals of the Phytopathological Society of Japan 59: 452-459.
- Serizawa S., Ichikawa T., 1993b. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit: 3. The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. Annals of the Phytopathological Society of Japan 59: 469-476.
- Serizawa S., Ichikawa T., 1993c. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 4. Optimum temperature for disease development on new canes. Annals of the Phytopathological Society of Japan 59: 694-701.
- Serizawa S., Ichikawa T., Suzuki H., 1994. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit: 5. Effect of infection in fall to early winter on the disease development in branches and trunk after winter. Annals of the Phytopathological Society of Japan 60: 237-244.
- Shewry P. R., Jones H. D., e Halford N. G., 2008. Plant biotechnology: transgenic crops. In Food Biotechnology (pp. 149-186). Springer Berlin Heidelberg.
- Skoog F., 1955. Growth factors, polarity and morphogenesis. Année biol. 31, 1-11.
- Skoog F., Miller C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-131.
- Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D. (2005). A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. Nat Biotechnol 23: 75-81.
- Spada R., Spada G., 2005. Green Light. Kiwi Informa 1 (7-9). Pp. 30.
- Spinelli F., Donati I., Vanneste J., Costa M., Costa G., 2011. Real time monitoring of the interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia* species. Acta Horticulturae 913: 461-466.

- Stefani E., Giovanardi D., 2011. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathologia Mediterranea* 50:489-496.
- Svetleva D. L. e Crino P., 2005. Effect of ethyl methanesulfonate (EMS) and N-nitrose-N-ethyl urea (ENU) on callus growth of common bean. *J Centr Euro Agric* 6:59–64.
- Tadele Z., MBA C., Till J.B., 2013. TILLING for Mutations in Model Plants and Crops. *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Cap. 13. DOI 10.1007/978-90-481-2967-6_13.
- Takikawa Y., Serizawa S., Ichikawa T., Tsuyumu S., Goto M., 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* new pathovar the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 437-444.
- Talebi Alin.B., Talebi Amin.B., Jafarpour M., 2012. Identify the Lethal Dose of EMS and Gamma Radiation Mutagenesis in Rice MR219. 2nd International Conference on Environment Science and Biotechnology, 2012. DOI: 10.7763/IPCBE. 2012. V48. 5.
- Taylor R., Surrey M., Alexander B., 2015. Evaluation of DNA extraction and enrichment procedures for qPCR detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants and pollen. *Acta Horticulturae: 1st International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit (Psa)*. Atti.
- Testolin R., 2004. Risorse genetiche e selezione nelle piante da frutto e nella vite. Una nuova visione di obiettivi, strategie e priorità. *Agribusiness Paesaggio & Ambiente*. Vol. VII (2003) n. 2, Marzo 2004.
- Testolin R., 2009. Il miglioramento genetico dell'*actinidia* in Italia. *Italus Hortus* 16 (5), 2009. Pp. 73-77.
- Testolin R., 2013. Jintao®: nuova varietà di *actinidia* a polpa gialla. *L'informatore agrario* 36/2001. Pp. 57-59.
- Testolin R., 2014. Voglia di cambiare: il kiwi verso un nuovo panorama varietale. *Frutticoltura* n. 1/2-2014. Pp. 8-15.
- Testolin R. e Cipriani G., 2008. “Soreli”: una nuova varietà di kiwi a polpa gialla. Ottenuta e diffusa dall'Università di Udine. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 70 (7-8). Pp. 54-56.
- Testolin R., Cipriani G., Comuzzo G., Frezza R., Macor D., 2008. Sbarca tra i produttori la nuova varietà kiwi a polpa gialla “Soreli”. *Kiwi informa* n. 7-9/2008. Pp. 4-13.

- Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, Comai L. (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol* 7: 19.
- Trigiano R. e Gray D., 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tyson J.L., Rees-George J., Curtis C.L., Manning M.A., Fullerton R.A., 2012. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on the orchard floor over winter. *New Zealand Plant Protection* 65: 25-28.
- Tyson J.L., Curtis C.L., Manning M.A., 2014a. Budrot in 'green' kiwifruit (*Actinidia* sp.) varieties – Spring 2014a. A confidential report prepared for Zespri Group Limited, SPTS No. 11140, Plant & Food Research, Auckland, New Zealand. Pp. 9.
- Tyson J.L., Manning M.A., Curtis C.L., Dobson S.J., McKenna C.E., Vergara M.J. 2014b. Inoculum production and infection of kiwifruit plants by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. VIII International Symposium on Kiwifruit. Dujiangyan City, Chengdu, China. Atti p.105.
- Vanneste J.L., Giovanardi D., Yu J., Cornish D.A., Kay C., Spinelli F., Stefani E. 2011. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection* 64: 246-251.
- Vanneste J., Yu J., Cornish D., Tanner D., Windner R., Chapman J., Taylor R., Mackay J., Dowlut S., 2013. Identification, virulence, and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Disease* 97: 708-719.
- Vogel EW, Natarajan AT (1995). "DNA damage and repair in somatic and germs cells in vivo". *Mutat. Res.* 330 (1-2): 183-208
- Schleiden Wardle K., Dobbs E. B., e Short K. C., 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. amer. Soc. hort. Sci*, 108, 386-9.
- Wang T., Ran Y., Atkinson R. G., Gleave A. P., Cohen D., 2006. Transformation of *Actinidia eriantha*: A potential species for functional genomics studies in *Actinidia*. *Plant Cell Rep* (2006) 25: 425–431.
- Went F.W. e Thimann K.V., 1937. Phytohormones. 1937 pp.xi + 294 pp. Pubblicazione MacMillan Company, New York.
- Wetzstein H.Y., Sommer H.E., 1983. Scanning electron microscopy of *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. amer. Soc. hort. Sci.* 108: 475–480, 1983.

- White P.R., 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol* 9:585–600.
- White P.R., (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am J Bot* 26:59–64.
- Wu J-H, Ferguson AR, Murray BG. 2011. Manipulation of ploidy for kiwifruit breeding: in vitro chromosome doubling in diploid *Actinidia chinensis* Planch. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 503–511.
- Wu J.H., Ferguson A.R., Murray B.G., Duffy A.M., Jia Y., Cheng C., Martin P.J., 2013. Fruit Quality in Induced Polyploids of *Actinidia chinensis*. *HORTSCIENCE* 48(6):701–707. 2013.

SITOGRAFIA

<http://www.csoservizi.com>

<http://cameradiommerciolatina.it>

<http://www.kiwifruitpsa.com>

<http://www.sigmaaldrich.com/>

<http://www.c-fern.org/>

[http://www.intechopen.com/books/innovations-in-biotechnology/applications-of
biotechnology-in-kiwifruitactinidia-](http://www.intechopen.com/books/innovations-in-biotechnology/applications-of-biotechnology-in-kiwifruitactinidia-)

ABBREVIAZIONI

BA	Benzil-adenina
BAP	Benzil-Ammino-Purina
CCPU	N-cloro-piridil-urea
EMS	Etil-Metan-Sulfonato
FDA	Diacetato di fluoresceina
HW	Cultivar Hayward
LD	Dose letate
MG	Miglioramento genetico
MOLT	Terreno di moltiplicazione
MS	Terreno Murashige e Skoog
NAA	Acido-Naftalen-Acetico
NT	Non Trattato
RA	Rigenerazione Avventizia
RA1	Rigenerazione Avventizia fase 1
RA2	Rigenerazione Avventizia fase 2
SOR	Cultivar Soreli
TDZ	Thidiazuron
ZEA	Zeatina
ZEGO	Cultivar Zespry Gold

ELENCO DELLE PRODUZIONI EFFETTUATE DURANTE IL DOTTORATO DI RICERCA

Bevilacqua D., Cipriani G., Caboni E., 2015. Rigenerazione avventizia del kiwi (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward; *Actinidia chinensis*, cv Soreli). Colture in vitro: note di laboratorio. Pp. 181-182.

Cipriani G., **Bevilacqua D.**, Terlizzi M., Di Cintio A., Rosato T., Sartori A., Ferrante P., Alberti F., Scortichini M., 2015. Selection of genotypes resistant or tollerant to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) through ems Mutagenesis. ISHS Acta Horticulturae 1095: I International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1095.23

Sartori A., **Bevilacqua D.**, Terlizzi M., Di Cintio A., Rosato T., Caboni E., Ferrante P., Scortichini M., Cipriani G., 2015. EMS mutagenesis and selection of genotypes resistant or tolerant to *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. ISHS Acta Horticulturae 1096: VIII International Symposium on Kiwifruit. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1096.24

Bevilacqua D., Terlizzi M., Di Cintio A., Rosato T., Sartori A., Ferrante P., Scortichini M., 2014. Selezione di materiale mutagenizzato per l'individuazione della resistenza o tolleranza a *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA). Kiwi informa, anno 10 n.10-12/2014 & anno 11 n. 1-3/2015. Pp. 63-65.

Bevilacqua D., Cipriani G., Sartori A., Ferrante P., Scortichini M., Frattarelli A., Caboni E., 2014. Applicazione delle colture *in vitro* per la selezione di cloni di *Actinidia spp.* resistenti a PSA. Kiwi informa, anno 10 n.10-12/2014 & anno 11 n. 1-3/2015. Pp. 67-69.

Bevilacqua D., Terlizzi M., Di Cintio A., Rosato T., Sartori A., Ferrante P., Alberti F., Scortichini M., Cipriani G., 2013. Selezione per la resistenza o tolleranza a *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) di genotipi mutagenizzati tramite EMS. Convegno frutticolo nel Lazio: Stato dell'arte della ricerca sulle colture arboree nel Lazio – Viterbo, 23 Aprile 2013. Pp. 44-48.