

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO

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

Corso di Dottorato di Ricerca in
Ortoflorofrutticoltura XXV Ciclo

**Caratterizzazione morfo-genetica con metodi
biometrici e molecolari e applicazioni di
tecniche colturali innovative su una collezione
di germoplasma di *Hydrangea* spp.**

(s.s.d. AGR/04)

Tesi di dottorato di

Dott. Sara Lazzereschi



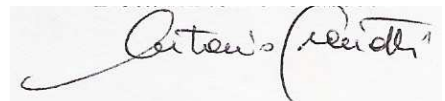
Coordinatore del corso

Dott. Giuseppe Colla



Tutore

Dott. Antonio Grassotti



07/06/2013

INDICE

<u>Parte generale</u>	pag. 1
1. Introduzione	pag. 2
1.1. Cenni storici, origine e diffusione	pag. 2
1.2. Classificazione, inquadramento sistematico e descrizione del genere	pag. 4
1.2.1. Specie	pag. 9
1.3. Impieghi del genere	pag. 17
1.4. Importanza economica, produzione e valorizzazione del genere	
<i>Hydrangea</i>	pag. 20
1.5. Note di coltivazione	pag. 26
2. Miglioramento genetico del genere <i>Hydrangea</i>	pag. 30
3. Tecniche di distinzione varietale in floricoltura	pag. 35
3.1. Introduzione	pag. 35
3.2. Marcatori morfologici	pag. 38
3.3. Marcatori biochimici (isoenzimi)	pag. 38
3.4. Marcatori molecolari	pag. 39
4. La caratterizzazione del genere <i>Hydrangea</i>: stato dell'arte	pag. 47
5. Applicazione di tecniche colturali innovative	pag. 52
<u>Parte sperimentale</u>	pag. 58
6. Materiali	pag. 59
6.1. Allestimento e descrizione della collezione	pag. 60

7. Metodi	pag. 64
7.1. Analisi morfometrica	pag. 64
7.2. Analisi molecolare	pag. 67
7.2.1. Estrazione del DNA	pag. 68
7.2.2. Ottenimento di marcatori	pag. 69
7.2.3. Reazione di amplificazione mediante PCR: analisi RAPD	pag. 70
7.3. Tecniche colturali sperimentali	pag. 74
7.4. Valutazione sperimentale di tecniche di propagazione <i>in vitro</i> idonee per la produzione su larga scale di <i>Hydrangea</i>	pag. 77
7.5. Attività di selezione delle accessioni più promettenti da avviare ad un futuro programma di <i>breeding</i>	pag. 78
 8. Risultati	 pag. 82
8.1. Analisi morfometrica	pag. 82
8.2. Analisi molecolare	pag. 83
8.3. Tecniche colturali sperimentali	pag. 88
8.4. Valutazione sperimentale di tecniche di propagazione <i>in vitro</i> idonee per la produzione su larga scale di <i>Hydrangea</i>	pag. 93
8.5. Attività di selezione delle accessioni più promettenti da avviare ad un futuro programma di <i>breeding</i>	pag. 96
 9. Conclusioni	 pag. 99
 Appendice	 pag. 101
 Pubblicazioni inerenti l'attività di dottorato	 pag. 107
 Bibliografia	 pag. 108

Parte generale

1. INTRODUZIONE

1.1. CENNI STORICI, ORIGINE E DIFFUSIONE

E' con l'affascinante storia del loro nome che si inizia a parlare di ortensie: fu il botanico francese 'cacciatore di piante' Philibert de Commerson (1727-1773) che nel 1771 battezzò alcuni esemplari provenienti dalle Indie Orientali in onore di *Hortense de Nassau*, figlia del principe di Nassau, appassionato botanico, che lo aveva accompagnato in una spedizione. Ed è sempre il loro nome, anche se stavolta quello botanico, *Hydrangea*, che da una gentile principessa ci conduce ad una terrificante figura mitologica: è Hydra, con capelli a forma di serpente simili alle asperità presenti sopra la capsula che ne contiene i semi. L'ipotesi più condivisa e diffusa è quella secondo la quale il nome *Hydrangea* deriva da due parole greche: *hydros* (acqua) e *angeion* (vaso), proprio per la particolare forma delle capsule contenenti i semi, che assomigliano a dei piccoli otri per l'acqua (Fig.1). Un'altra teoria attribuirebbe l'origine del nome alla Regina di Francia *Hortense de Beauharnais*, figlia dell'imperatrice Giuseppina e madre di Napoleone III.



Fig. 1: Particolare di capsule di *Hydrangea* contenenti i semi.

In America il nome *Hydrangea* comparve per la prima volta nel testo '*Flora Virginica*' (1739) del naturalista Gronovius per identificare la specie *H. arborescens*, la prima specie che era già stata introdotta in Europa, più precisamente in Inghilterra, nel 1736.

Nei giardini giapponesi, invece, la presenza e la popolarità delle ortensie era già notevole durante il diciassettesimo secolo, ma dato che le frontiere di quel Paese

rimasero chiuse dal 1639 al 1856 a qualunque contatto col mondo esterno, l'accesso alle sue varietà fu praticamente impossibile. Grazie comunque alle incursioni di alcuni botanici europei (tra cui vanno ricordati il botanico svedese Carl Peter Thunberg, allievo di Linneo, e il dottor Philipp Franz von Siebold), alcuni esemplari vennero trafugati ed ebbero presto una descrizione botanica, anche se inizialmente vennero classificati nel genere *Viburnum*. Nel diciannovesimo secolo comunque molti esemplari di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*, *H. macrophylla* ssp. *serrata*, *H. involucrata* e *H. paniculata* furono introdotti in Europa dall'Estremo Oriente, mentre solo alla fine dello stesso secolo *H. aspera* e *H. heteromalla* furono introdotte in Inghilterra dal Nepal. Infine le ortensie rampicanti del Centro e Sud America arrivarono in Europa nei primi anni del ventesimo secolo.

In generale, si tratta di una pianta antichissima, di cui sono state trovate tracce fossili collocabili in era Terziaria (Eocene, Oligocene e Miocene), da 70 a 12 milioni di anni fa. Al genere *Hydrangea* appartengono circa 23 specie a portamento arbustivo eretto o rampicante, con foglie decidue o persistenti (McClintock 1957).

Le zone di differenziazione del genere sono diverse (Fig.2): le specie *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*, *H. macrophylla* ssp. *serrata*, *H. involucrata*, *H. paniculata*, *H. aspera*, *H. heteromalla* e *H. petiolaris*, sono originarie dell'Asia Orientale (Tibet, Centro e Sud della Cina, Giappone, Filippine, Taiwan, Java e Sumatra) (Haworth-Booth, 1984; Huxley *et al.*, 1992); *H. arborescens* e *H. quercifolia* si sono differenziate nella parte orientale degli Stati Uniti, mentre le rampicanti sempreverdi *H. seemani* e *H. serratifolia* provengono dagli altipiani temperati della parte occidentale del Centro e Sud America (Lawson-Hall e Rothera, 2004). In tutti questi casi, si tratta comunque di piante che vivono nel sottobosco di foreste di latifoglie decidue, situate nelle fasce a clima temperato (Lombardi, 2009).



Fig. 2: Naturale distribuzione del genere *Hydrangea*.

Secondo McClintock il genere è suddiviso in due sezioni: *Hydrangea*, che include 13 specie principalmente originarie dei climi temperati, e *Cornidia*, la quale comprende 12 specie, generalmente rampicanti tipiche delle aree tropicali e subtropicali. Le specie della sezione *Hydrangea* si distinguono per le loro caratteristiche ornamentali ed oggi quasi tutte le specie coltivate appartengono a questa sezione.

La maggior parte delle specie afferenti al genere *Hydrangea* sono diploidi, con un numero di cromosomi $2n=2x=36$, oppure $2n=4x=72$ in alcune forme di *H. paniculata* (Sax, 1931). Uno studio recente (Cerbah *et al.*, 2001) ha confermato un corredo cromosomico diploide $2n=2x=36$ per la maggior parte delle specie, ma ha evidenziato un numero cromosomico $2n=2x=34$ in alcune sottospecie di *H. aspera*, e $2n=2x=30$ in *H. involucrata*.

1.2. CLASSIFICAZIONE, INQUADRAMENTO SISTEMATICO E DESCRIZIONE DEL GENERE

La classificazione tassonomica del genere *Hydrangea* è complessa a causa del suo polimorfismo e della sua distribuzione geografica in due continenti diversi. Nel 1957, McClintock pubblicò uno studio basato essenzialmente su campioni erbacei, attraverso il quale semplificò i numerosi *taxa* a solo 23 specie (BRG, 2007). In Appendice 1 viene riportata la tavola sinottica del genere (Classificazione E. McClintock 1957).

Le piante appartenenti al genere *Hydrangea* possono avere aspetto di piccoli alberi, ma più spesso sono arbusti a portamento eretto o prostrato. Varie specie hanno sviluppo rampicante, anche lianoso, poche invece si presentano in forma erbacea

(Lombardi, 2009). Raggiungono dimensioni variabili, 1-4 metri di altezza. Le foglie sono opposte o verticillate, lobate o dentate. I fiori, stellati e di piccole dimensioni, sono riuniti in infiorescenze dette corimbi o pannocchie; questi possono essere sterili (più grandi e appariscenti, che si trovano alla periferia dell'infiorescenza) o fertili (al centro dell'infiorescenza). In alcuni casi tutti i fiori dell'infiorescenza sono sterili. Le infiorescenze possono essere di diversi colori, che variano dal bianco a diverse sfumature di rosso, rosa, azzurro e violetto. I colori sono in parte determinati dal patrimonio genetico della pianta (alcune varietà sono esclusivamente rosse o rosa) ed in parte dipendono dal pH del terreno su cui crescono.

Le specie di interesse ornamentale sono in prevalenza cespugli perenni con corimbi globosi ricchi di fiori sterili molto appariscenti. Dalle più note ortensie (*Hortensia group*) con le grandi infiorescenze globose (*mophead*) bianche rosa e azzurre, si passa a quelle *lacecap* o *teller* (*Lacecap group*), con caratteristica infiorescenza piatta di grandi dimensioni, alle fioriture a pannocchia di *H. paniculata* e di *H. quercifolia*, il cui fogliame assume bellissime tonalità rosso fuoco nei mesi autunnali, fino ad arrivare alle quasi sconosciute rampicanti (*H. anomala* ssp. *petiolaris*). Di particolare interesse sono anche le varietà afferenti alla specie *H. serrata*, particolarmente resistenti al freddo, conosciute in Giappone come ortensie di montagna.

BIOLOGIA FIOREALE I fiori sono ermafroditi, generalmente a quattro petali, anche se in alcune specie possono essere in numero maggiore di dieci. La porzione superiore del fiore ospita gli stami e i petali, di dimensioni molto ridotte, mentre quella inferiore è costituita dal pistillo, con ovario e stilo, che fuoriesce fra gli stami, con uno stigma poco appariscente (Lombardi, 2009). Quello che comunemente viene indicato come fiore nell'ortensia, in realtà è un'infiorescenza, ovvero un insieme di numerosi piccoli fiori. Generalmente ogni infiorescenza è formata da fiori fertili e fiori sterili:

a) i piccoli fiori fertili (fiori veri) possono essere raggruppati in gran numero nel centro del corimbo oppure distribuiti su tutta l'infiorescenza; in alcune specie possono costituire l'intera infiorescenza.

b) i fiori sterili sono più appariscenti, decorativi e cospicui; hanno funzione vessillifera per la presenza di grandi sepali allargati; questi possono essere distribuiti

in tutta l'infiorescenza (tipo *mophead*) o attorno al margine del corimbo (infiorescenza *lacecap*), o lungo il panicolo (tipiche del fiore a pannocchia).

Le infiorescenze dell'ortensia differiscono molto da una specie e da una varietà all'altra, soprattutto perché varia la disposizione e la proporzione tra fiori sterili e fertili; per quanto riguarda la disposizione, la maggior parte delle specie di ortensia hanno infiorescenze a corimbo con i piccoli fiori inseriti in una struttura più o meno sferica, mentre solo due specie (*H. paniculata* e *H. quercifolia*) hanno un'infiorescenza allungata (tipo pannocchia) detta panicolo, su cui sono disposti fiori fertili e sterili che si aprono in successione a partire dalla base dell'infiorescenza.

Per quanto riguarda la proporzione tra fiori fertili e sterili, alcune ortensie hanno infiorescenze formate sia da fiori sterili che fiori fertili, altre hanno infiorescenze formate solo da fiori sterili o solo da fiori fertili (Lawson-Hall e Rothera, 2004).

Le varietà della specie più comune di ortensia, *H. macrophylla*, possono avere due forme diverse di infiorescenza a corimbo: *mophead* e *lacecap*. L'infiorescenza *mophead* è globosa, tipica delle *mophead hortensias* (o semplicemente *mophead*), più o meno grande e di colore diverso a seconda della varietà, ed è formata da numerosi vistosi fiori sterili e solo alcuni (in alcune varietà nessuno) piccoli fiori fertili nascosti: generalmente le infiorescenze *mophead* durano più a lungo perché i fiori sono per la maggior parte sterili e, non essendo impollinati, non subiscono le modifiche dovute ai processi di fecondazione e di formazione dei semi. Questa tipologia di fiore si è diffusa in Europa durante la fine del XIX ed inizio del XX secolo, dov'è diventata conosciuta con il nome francese di 'hortensia'. L'infiorescenza *lacecap*, tipica delle *lacecap hortensias*, o *tellerhortensien* come vengono chiamate in Germania, è meno rotondeggiante ed i fiori sono disposti su una superficie più piana con una o due file esterne di fiori sterili con grandi sepali, disposti intorno ad un gruppo centrale formato da numerosi fiori fertili. I fiori fertili al centro del corimbo vengono impollinati e gradualmente cambiano colore e producono i semi; è per questo motivo che le infiorescenze *lacecap* durano meno delle *mophead*, in quanto la pianta dopo l'impollinazione concentra le proprie energie nella produzione dei semi.

La maggior parte delle ortensie selvatiche presenta infiorescenze del tipo *lacecap*, sebbene alcune abbiano invece delle infiorescenze a panicolo (*H. paniculata* e *H. quercifolia*) (Dirr, 1990) (Fig.3).

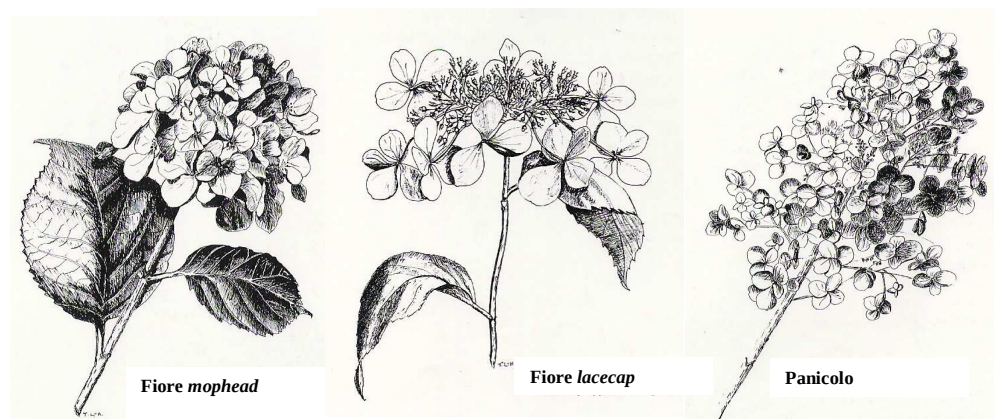


Fig. 3: Varie tipologie di infiorescenza in *Hydrangea*.

COLORE DEI FIORI E pH DEL SUOLO Il colore del fiore delle ortensie varia dal blu al rosso, con tutte le possibili sfumature intermedie; sulla stessa pianta è possibile che i fiori cambino colore, virando dal blu al rosa in diverse tonalità o viceversa. Le variazioni di colore più nette si riscontrano principalmente in alcune varietà di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* e *H. macrophylla* ssp. *serrata* (tra le *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* tipiche sono ‘Mathilda Guges’, ‘Enziandom’, ‘Geoffrey Chadbund’, mentre tra le *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *serrata* ricordiamo ‘Blue Deckle’, ‘Diadem’, ‘Miranda’); in *H. arborescens*, *H. paniculata*, *H. quercifolia*, i fiori sono sempre bianchi. Nessuna specie presenta fiori di colore arancio o giallo. Certi fiori possono essere di un bianco sporco o giallo pallidissimo: si tratta, in questi casi, di una leggera presenza di clorofilla. Le varietà a fiore bianco tendono a mantenere tale colore o acquistano leggera tonalità rosa o blu in fioritura avanzata; nelle varietà a fiore bianco con infiorescenza *lacecap* (‘Tokyo Delight’, ‘Lanarth White’), spesso i piccoli fiori fertili che si trovano al centro, possono virare dal blu al rosa o viceversa.

Nelle specie colorate, il colore varia a seconda dell’acidità del suolo: in un terreno molto acido i fiori saranno blu, in un suolo meno acido, violettati o malva, mentre in un suolo quasi neutro, rossi o rosa. In realtà, non è l’acidità del terreno che fa virare i pigmenti verso il blu, ma l’alluminio: si è osservato che le fluttuazioni nel colore sono strettamente correlate alla sensibilità della pianta al contenuto di solfato di alluminio nel suolo, che può essere più facilmente assorbito dalle radici in terreno acido. In particolare, l’alluminio nel suolo si presenta come sale solubile e quindi assorbibile dalle radici solo in suoli acidi col massimo di disponibilità a pH 4-4.5; nei

suoli alcalini, invece, l'alluminio è presente, ma in forma non solubile e quindi non disponibile per la pianta. Uno studio recente ha evidenziato che per mantenere il colore blu dei fiori, la pianta deve assorbire alluminio (Lawson-Hall e Rothera, 2004). Si può quindi affermare che esiste una correlazione fra il colore delle infiorescenze e le caratteristiche chimiche del suolo, in particolare il pH: il calcio contenuto nel terreno con un alto valore di pH, si legherà al solfato di alluminio così da non essere disponibile per la pianta (Van Gelderen e Van Gelderen, 2004).

FOGLIE Sempreverdi o decidue, generalmente caduche (ad eccezione della *H. seemannii*), le foglie delle *Hydrangeaceae* hanno forma variabile e diversa robustezza (Lombardi, 2009): possono avere forma ovata o ellittica e generalmente sono opposte. In alcuni casi, come in *H. paniculata*, le foglie sono ternate, cioè portate in gruppi di tre. In due specie, *H. quercifolia* e *H. sikokiana*, le foglie sono pinnate lobate (Lawson-Hall e Rothera, 2004). Frequentemente sono coriacee, possono essere glabre o tomentose; le ortensie presentano spesso foglie con venature evidenti, quasi sempre visibilmente in rilievo sulla pagina inferiore, qualche volta velate di tonalità rossastre. Il margine fogliare è crenato o serrato, più raramente intero (Lombardi, 2009). La superficie può essere diversa a seconda della specie: lucida, liscia, opaca o pelosa (Lawson-Hall e Rothera, 2004) (Fig.4).



Fig. 4: Foglie di varie forme e colori, che rendono le piante di *Hydrangea* molti attraenti anche durante i mesi con scarsa fioritura.

FRUTTI Sono bacche o spesso capsule deiscenti, divise in setti, contenenti innumerevoli piccoli semi, e al momento del disseccamento le capsule conservano i resti degli stami sulla parte apicale (Fig.5). I semi, bruno-giallognoli e di forma allungata, misurano circa 0.5 mm, con la superficie del tegumento striata e di consistenza cerosa (Lombardi, 2009).



Fig. 5: Capsule disseccate di *Hydrangea*, le quali conservano i resti degli stami sulla parte apicale.

1.2.1. Specie

Il genere *Hydrangea*, in passato incluso nella famiglia delle *Saxifragaceae*, è attualmente classificato fra le *Hydrangeaceae*, sia secondo Cronquist (Cronquist, 1981) sia secondo i più recenti criteri della sistematica molecolare AGP (Van Gelderen e Van Gelderen, 2004) (Tab.1):

Classificazione Cronquist	
Dominio	Eukaryota
Regno	Plantae
Divisione	Embryophyta
Sottodivisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sottoclasse	Rosidae
Ordine	Rosales
Famiglia	Hydrangeaceae
Genere	<i>Hydrangea</i> L.
Classificazione AGP	
Ordine	Cornales
Famiglia	Hydrangeaceae
Specie	<i>Hydrangea arborescens</i>
Sottospecie	<i>Hydrangea arborescens</i> ssp. <i>radiata</i>
Varietà	<i>Hydrangea macrophylla</i> ssp. <i>macrophylla</i> var. <i>normalis</i>

Tab.1: Classificazione del genere *Hydrangea*.

Il genere consta di circa 23 specie, non tutte utilizzate come piante ornamentali; le più diffuse sono descritte di seguito.



***Hydrangea anomala* D. Don:** raccolta da Wallich in Nepal nel 1820 e descritta e nominata successivamente nel 1825 da D. Don, questa pianta è stata introdotta in Gran Bretagna nel 1830 e in America da Thomas Hogg nel 1865. In natura è diffusa nei boschi, foreste e gole di montagna.

E' una specie legnosa, rampicante, che può raggiungere un'altezza superiore ai 12 m o più. Nel suo habitat naturale, si può ritrovare come rampicante su pareti rocciose, ma è anche in grado di formare una densa copertura del suolo grazie alle radici presenti lungo gli internodi. Le foglie, di colore verde chiaro sono opposte, semplici, ovate o ellittiche, acute o acuminate, cordate o rotonde alla base; il margine fogliare è serrato e la superficie è liscia. L'infiorescenza è un corimbo piatto di 15-20 cm di diametro, di colore bianco che fiorisce a fine giugno-inizio luglio; al centro dell'infiorescenza sono portati molti fiori fertili di colore bianco crema, mentre marginalmente si trovano i fiori sterili dello stesso colore dei precedenti, con lunghi peduncoli. McClintock divide questa specie in due sottospecie: *H. anomala* ssp. *anomala*, originaria del continente asiatico, e *H. anomala* ssp. *petiolaris*, proviente dal Giappone e Taiwan e conosciuta come *Hydrangea* rampicante (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



***Hydrangea arborescens* L.:** originaria degli Stati Uniti orientali, è stata la prima ortensia ad essere introdotta in Europa, più precisamente in Inghilterra nel 1736 da Peter Collinson. E' un arbusto più rustico di molte altre ortensie: deciduo, dal portamento eretto, può raggiungere anche 3 m, ma di solito oscilla intorno a 1-

1.5 m. La foglia è ovata, lunga 6-17 cm e larga 2-12 cm, con apice acuto o acuminato e base cordata, il margine è serrato; la pagina superiore è liscia e di colore verde scuro, mentre quella inferiore può essere pelosa e più chiara. L'infiorescenza è un corimbo che parte piatto per poi gonfiarsi fino ad ottenere una forma globosa che raggiunge 5-15 cm di diametro; è formata da numerosi piccoli fiori bianchi fertili e

talvolta può includere grandi fiori sterili portati su lunghi peduncoli. La fioritura è abbondante, scalare dalla fine di giugno fino ai primi freddi di settembre (Dirr, 1990). Entrano nel periodo vegetativo più tardi e fioriscono sulla vegetazione dell'anno: ne consegue una notevole versatilità nella potatura, e non sono sensibili alle gelate tardo-primaverili. Il fiore può essere reciso o essiccato per composizioni. E' fra le specie meno esigenti in termini di terreno ed esposizione: si adatta abbastanza bene anche a terreni più ricchi in scheletro e quindi più asciutti e ad esposizioni più assolate. Le cultivar *H. arborescens* 'Annabelle' e 'Grandiflora' sono tra le più conosciute.

Secondo McClintock (1957), questa specie è suddivisa in tre sottospecie: *H. arborescens* ssp. *arborescens*, *H. arborescens* ssp. *discolor* e *H. arborescens* ssp. *radiata*. Queste sottospecie sono state considerate come specie vere e proprie da Pilatowski (1980) e sono state rinominate *H. arborescens*, *H. cinerea* e *H. radiata* (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



***Hydrangea aspera* D. Don:** è un arbusto che si ritrova spontaneo in un areale ampio e molto eterogeneo: Himalaya orientale, Cina centro-occidentale e Taiwan, ma anche più a sud, Giava e Sumatra. Questa specie fu descritta da D. Don nel 1825 ed introdotta in Inghilterra nei primi anni del 900.

Può raggiungere un'altezza di 1-4 m. Sia i fusti che le foglie sono coperti da una peluria di consistenza diversa a seconda della varietà; le foglie sono di forma da lanceolata ad ovata, di colore verde scuro, variano in dimensione da 5 a 30 cm di lunghezza e da 1.5 a 15 cm di larghezza. Da luglio in poi la pianta si ricopre di grandi corimbi che raggiungono i 25 cm di diametro e risultano composti da fiori fertili blu intenso all'interno e fiori sterili rosa-lilla o bianchi all'esterno, di solito con quattro sepali, con margine dentato o intero (Lawson-Hall e Rothera, 2004). I fiori di questa specie non sono sensibili all'acidità del suolo: i fiori blu rimangono blu su terreni alcalini, mentre quelli rossi e rosa mantengono lo stesso colore su suoli acidi (Van Gelderen e Van Gelderen, 2004). E' una specie rustica, sopporta anche temperature inferiori a -15 °C e predilige posizioni di ombra; riesce a tollerare bene anche l'impianto in terreni non acidi. La potatura è limitata al contenimento e pulizia

della pianta. Tra le *cultivar* più note ricordiamo ‘Macrophylla’, ‘Mauvette’, ‘Rowallane’, ‘Villosa’ e *H. aspera* ssp. *sargentiana*. Per quanto riguarda *Hydrangea villosa* è ancora aperta la questione del suo collocamento tassonomico: fino a poco fa veniva considerata come una varietà di *H. aspera*, mentre adesso, dopo alcuni studi sul DNA, si tende a considerarla una specie a sé, comprendente alcune *cultivar* prima assegnate a *H. aspera* (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



***Hydrangea heteromalla* D. Don:** raccolta da Wallich all’inizio del 1800 e nominata da D. Don nel 1825, questa specie è stata introdotta in coltivazione intorno al 1880. Insieme a *H. paniculata*, fa parte della sottosezione *Heteromallae*, una vera e propria ortensia di montagna, cresce infatti spontanea in un’ampia fascia che va

dai rilievi montuosi dell’Himalaya (dove cresce sino ai 3300 m di altitudine), alla Cina centro-occidentale, spingendosi poi a nord-est, fino in prossimità di Pechino. Si tratta di un arbusto deciduo o cespuglio; normalmente raggiunge l’altezza di 3 m, ma può arrivare anche a 7 m. I giovani rami sono pelosi, ma nel secondo anno la loro corteccia diventa marrone, e talvolta si sfoglia. Le foglie, ovate e finemente serrate, sono spesse ma morbide al tatto, di color verde medio sulla pagina superiore e più chiare invece su quella inferiore, di dimensione 10-20 cm di lunghezza e 3-14 cm di larghezza; il peduncolo è tipicamente rosso. Le infiorescenze sono corimbi piatti, con diametro fino a 30 cm, formati da numerosi fiori fertili color bianco crema nella parte centrale e all’esterno da fiori sterili dello stesso colore, talvolta viranti al rosa, composti da 4 sepal. Alcune delle *cultivar* più diffuse sono: ‘Snow Cap’, ‘Wilsonii’, ‘Yalung Ridge’ (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



***Hydrangea involucrata* Sieb.:** graziosa specie originaria di Taiwan e del Giappone, dove cresce spontanea in alcune zone dell’isola di Honshu. E’ un cespuglio deciduo, di sottobosco, cresce ad altitudini che vanno dal livello del mare fino a 1500 m. Il suo nome trae

origine dall'involucro, composto da sei foglioline, che racchiude il boccio, formando una piccola sfera (tama in giapponese). Il corimbo, 8-15 cm di diametro, ha numerosi fiori fertili, di colore rosa, lilla o blu, e un numero ridotto di fiori sterili, bianchi, rosa pallido o blu. Le foglie sono verde opaco, ruvide e tomentose, lunghe 7-15 cm e larghe 2.5-6 cm; queste sono ellittiche o ovate, con apice acuminato, e lungo il margine si ritrovano molti peli ispidi. Raramente supera il metro in altezza, ma risulta essere un arbusto di rara bellezza in tutte le sue varietà e di particolare interesse sia per l'epoca di fioritura (da agosto in poi), che per la straordinaria durata della stessa (Lawson-Hall e Rothera, 2004).

***Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.:** questa è la specie alla quale appartiene la maggior parte delle ortensie coltivate. Cresce spontanea nelle zone orientali dell'Himalaya, nel nord-est della Birmania e nella Cina occidentale, ma soprattutto in Giappone e Corea. E' un arbusto deciduo che cresce fino a 4 m di altezza. L'infiorescenza è un corimbo ramificato, dove i fiori fertili centrali sono di colore bianco, mentre quelli sterili sono bianchi o blu, con margine intero o serrato. Le foglie possono essere ovali, ellittiche o obovate, con punta acuta o acuminata, lunghe 5.5-19 cm e larghe 2.5-13 cm. La lunghezza della foglia è 1.5-4 volte la larghezza. Il margine fogliare è serrato e la consistenza varia da spessa a sottile (Lawson-Hall e Rothera, 2004).

McClintock descrive 4 sottospecie, due delle quali (*H. macrophylla* ssp. *stylosa* e *H. macrophylla* ssp. *chungii*) sono native dell'Himalaya orientale e del sud della Cina ed hanno scarsa importanza economica. Le altre due, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* e *H. macrophylla* ssp. *serrata* (Thunb.) Mak, più comuni e meglio conosciute, si ritrovano in Giappone e sono considerate come i progenitori delle ortensie da giardino.



• *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* (Thunb.) Ser., 1830, è conosciuta anche con alcuni sinonimi come: *H. macrophylla* f. *normalis* (Wils), *H. maritima* (Haworth-Booth), o più semplicemente come *H. macrophylla*. Questa sottospecie è stata trovata solo in poche aree costiere di Honshu. E' l'ortensia più conosciuta, e

comprende un gran numero di varietà. L'altezza media è di 1-3 m, ma molte *cultivar* possono agevolmente superarla. Cresce vigorosa in posizioni di mezz'ombra, ma si adatta bene anche in situazioni un po' più soleggiate. E' versatile, facilmente coltivabile ed adattabile. Le infiorescenze sono corimbi piuttosto grandi, di forma globosa (*mophead*) con un gran numero di fiori fertili, oppure di forma piatta (*lacecap*) con fiori sterili esterni e fertili centrali. I suoi fiori possono cambiare colore a seconda del valore del pH e del contenuto minerale del suolo. I colori dei fiori variano dal bianco al rosa, rosso, blu nelle più diverse tonalità. Il fogliame, di un bel verde brillante più o meno scuro, in autunno si tinge di meravigliose tonalità di giallo e/o rosso. Il margine della foglia è seghettato o dentato.



• *H. macrophylla* ssp. *serrata* (Thunb.) Mak.: un sinonimo è *H. serrata*. Questa sottospecie è stata trovata nelle quattro isole del Giappone e in Corea, dove cresce nei boschi di montagna fino a 1500 m. Si tratta di un piccolo arbusto deciduo eretto, raramente superiore a 1.5 m di altezza. L'infiorescenza è un corimbo piatto o

leggermente convesso con fiori fertili centrali e sterili intorno, oppure può avere forma globosa di dimensioni medio-piccole. Le infiorescenze raggiungono il diametro di 5-10 cm, con fiori sterili quasi sempre presenti; i fiori fertili possono essere rosa o blu, quelli sterili possono essere di colore rosa, blu o bianchi, con margine intero o serrato. Le foglie di colore verde, presentano forma ovata, lanceolata o ellittica, sono lunghe 5-15 cm e larghe 3-6 cm, con apice acuto o acuminato; hanno superficie opaca e dalla tarda estate fino all'autunno inoltrato assumono tonalità straordinarie di rosso. Molte *cultivar* appartenenti a questa specie cambiano il colore dei fiori a seconda del pH e del contenuto di minerali nel suolo: infatti presenta infiorescenze blu, violetto con innumerevoli sfumature di colore in terreni acidi, mentre infiorescenze di colore rosa in terreni neutri. La fioritura avviene nei mesi di giugno ed agosto. E' una specie rustica che sopporta temperature fino a -20 °C. L'esposizione consigliabile è la classica mezz'ombra (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



***Hydrangea paniculata* Sieb. AM 1964:**

questa specie è originaria della Cina e del Giappone ed è stata introdotta in Europa da Siebold intorno al 1860. E' un arbusto deciduo che può raggiungere, in posizioni particolarmente favorevoli, anche 7 m di altezza, e dal punto di vista climatico è molto adattabile, perché cresce dalle zone

sub-tropicali alle zone temperate, sopportando bene le basse temperature invernali. L'infiorescenza è un panicolo più o meno ramificato ed è la sola ortensia di origine asiatica a portare questo tipo di infiorescenza. I panicoli hanno dimensioni di 15-20 cm di lunghezza e 10-13 cm di larghezza alla base; sono composti essenzialmente da fiori fertili di colore bianco con pochi fiori sterili bianchi che, in molte varietà, virano al rosa nella stagione più avanzata. Le piante appartenenti a questa specie presentano numerose caratteristiche interessanti in termini di rusticità ed adattabilità; entrano in vegetazione più tardi e riescono in questo modo ad evitare i danni dovuti ad eventuali gelate tardive; fioriscono più tardi delle altre ortensie (da luglio in poi) e i fiori si aprono scalarmente a partire dalla base. Le foglie opposte o ternate, sono ovate o ellittiche, lunghe 7-15 cm e larghe 3-7 cm, con apice acuto o acuminato; i bordi sono finemente dentati ed alcuni peli appaiono sulla superficie superiore. Per quanto riguarda la potatura, fiorendo tardivamente sulla vegetazione dello stesso anno, possono essere tranquillamente potate nel periodo invernale, anche in maniera drastica, accorciando di molto la vegetazione dell'anno precedente: ciò permette di ottenere piante dallo sviluppo contenuto e con fiori più grandi (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



***Hydrangea quercifolia* Bartr. AGM**

1992: scoperta nel sud-est degli Stati Uniti, è stata introdotta in Inghilterra nel 1803. E' un ampio arbusto deciduo con altezze comprese tra 1 e 2 m. Il nome della specie deriva dalla particolare forma della foglia: è lobata, più o meno profondamente, ampia, inizialmente di un

verde medio che poi scurisce, per tingersi in autunno di rosso scuro a partire dal margine verso l'interno; le foglie cadono molto tardivamente e talvolta permangono sulla pianta fino a fine novembre-inizio dicembre (Dirr, 1990). L'infiorescenza è un panicolo bianco crema, lungo 15-25 cm e largo fino a 12 cm alla base, che fiorisce dalla base verso l'apice, con una densità di fiori sterili diversa a seconda della varietà. I numerosi fiori sterili bianchi, fioriscono da fine luglio a settembre, con tempi diversi a seconda della zona climatica, dell'esposizione e della *cultivar*. Le foglie sono lunghe 8-25 cm e larghe 5-17 cm, generalmente penta-lobate e ricordano le foglie delle querce; hanno margine serrato, pagina superiore rugosa e inferiore pubescente, così come i piccioli e i rami giovani. La pianta è molto bella e di grande effetto anche in inverno; infatti, mostra il legno sfogliante di color arancio. Entra in vegetazione più tardi rispetto a *H. macrophylla*, e pertanto è meno esposta al rischio delle gelate tardive. Rispetto alle altre specie, ha un fabbisogno idrico inferiore, sia per quanto riguarda le piante in vaso che in piena terra. Si adatta meglio ad esposizioni più soleggiate e riesce a produrre fioriture più abbondanti, se le estati sono abbastanza calde (Lawson-Hall e Rothera, 2004).



Specie rampicanti: tale habitus non è caratteristico di una sola specie, ma lo ritroviamo in specie di sezioni diverse e di diversa provenienza geografica: sono rampicanti la maggior parte delle specie della sezione *Cornidia*, cioè le ortensie sempreverdi originarie degli altopiani del Centro e Sud America, ma anche alcune

specie asiatiche come *H. anomala* ssp. *petiolaris*, della sottosezione *Caliptranthae*, e *H. integrifolia*. Fanno parte delle rampicanti anche alcune *cultivar* di *Schizophragma hydrangeoides*, interessante rampicante sempre della famiglia *Hydrangeaceae*. Le ortensie rampicanti sono dei veri e propri gioielli per coprire pareti in ombra, dove spesso le alternative si riducono all'edera, con la quale hanno in comune le modalità di adesione alle superfici. Generalmente hanno fioriture delicate e leggere, con fiori riuniti in infiorescenze piatte, bianche abbastanza irregolari, spesso dolcemente profumate di sambuco. Sono piante a crescita lenta, ma una volta adattate sviluppano un'abbondante vegetazione. La manutenzione è semplice e spesso si riduce ad

un'eventuale potatura di contenimento subito dopo la fioritura, che generalmente è abbastanza precoce (maggio-giugno) (Dirr, 1990).

Di seguito sono riportate altre specie di *Hydrangea* meno conosciute e diffuse: *H. diplostemona* Stan., *H. glandulosa* Elmer, *H. hirta* (Thunb.) Siebold, *H. integrifolia* Hayata, *H. jelskii* Szysz., *H. mathewssi* Briquet, *H. oerstedtii* Briquet, *H. peruviana*, *H. preslii* Briquet, *H. quelpartii*, *H. sargentiana*, *H. scadens* (L.f.) Seringe, *H. seemannii* Riley, *H. serratifolia* Hooker and Arnott, *H. sikokiana* Maximowicz, *H. steyermarkii* Stan., *H. tarapotensis* Briquet, *H. villosa* Rehder.

1.3. IMPIEGHI DEL GENERE

Fin dalla loro introduzione in Europa, le ortensie sono state principalmente coltivate come piante in vaso o da giardino, anche se attualmente trovano impieghi diversi. Le *cultivar* più utilizzate come piante da giardino appartengono a *H. macrophylla*, e le loro dimensioni in altezza e in larghezza, le rendono adatte per la coltivazione in qualsiasi tipo di giardino. Tra le sottospecie di *H. macrophylla*, *H. serrata*, con le sue *cultivar* per la maggior parte *lacecap*, risulta più attraente, anche grazie alle tonalità che le foglie e le infiorescenze assumono in autunno, indipendentemente dal tipo di terreno. Altri genotipi di *Hydrangea* si prestano maggiormente per la loro attitudine alla produzione di alberi fioriti o come piante rampicanti: è il caso di *H. arborescens*, *H. anomala* ssp. *petiolaris*, *H. quercifolia*. Altre ancora, *H. quercifolia* e *H. paniculata*, si adattano alla coltivazione come cespugli fioriti da giardino. Per quanto riguarda le rampicanti, possono essere impiegate specie sempreverdi: *H. serratifolia*, *H. seemannii* e *H. integrifolia*, che mostrano vigore, ma fioriscono meglio in aree più calde. Un'altra rampicante è *H. anomala* ssp. *petiolaris*, di facile coltivazione, ma in zone non esposte al sole.

Frequentemente è facile trovare piante di *Hydrangea* anche su balconi, terrazzi o seminterrati di palazzi. Un particolare vantaggio della crescita in contenitore, è rappresentato dal fatto che il pH del suolo può essere più facilmente controllato; di conseguenza risulta più facile influenzare il colore del fiore. Alcune *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* di taglia più piccola si prestano per questo tipo di coltivazione. Fra queste ad esempio: 'Pia', *cultivar* nana, oppure 'Ami Pasquier', 'Ave Maria', 'Hornli', 'Tovelit', 'Westfalen', nessuna delle quali supera il metro di altezza. Oppure *H. macrophylla* ssp. *serrata* 'Diadem', graziosa *lacecap*, si

adatta alla coltivazione in vaso, cresce lentamente fino a raggiungere un metro in altezza e rimane decorativa per lungo tempo (Lawson-Hall e Rothera, 2004).

Se in Italia l'ortensia viene prodotta quasi esclusivamente come arbusto fiorito da giardino o come stelo da fiore reciso, nel resto d'Europa essa è molto apprezzata come pianta in vaso da interno. Sul mercato olandese, ad esempio, le ortensie figurano fra le dieci piante da interno più vendute con un fatturato annuo di oltre 24 milioni di Euro, corrispondenti al 2.6% del totale. L'accertata tendenza a trascorrere più tempo in casa, rispetto al passato, anche in Paesi mediterranei come l'Italia può certamente contribuire a far crescere il mercato della pianta 'da interno', inclusa l'ortensia, analogamente a quanto avviene nei paesi dell'Europa centro-settentrionale. Nel nord Europa, ad esempio in Norvegia, *H. macrophylla* costituisce un'importante pianta da vaso prodotta in serra durante tutto l'arco dell'anno, dove il mercato richiede piante con specifiche caratteristiche morfologiche (piante basse e compatte), con un alto valore estetico e preferibilmente fiorite (Nordli *et al.*, 2011).

Un ulteriore impulso alla valorizzazione dell'ortensia come pianta da appartamento deriva dalla sua capacità di assorbire sostanze volatili inquinanti. Recenti studi (Liu *et al.*, 2007) mostrano infatti l'efficacia di *H. macrophylla* nel ridurre significativamente la concentrazione di benzene negli ambienti chiusi.

Il genere può essere impiegato per la produzione di fiore reciso, fresco o essiccato. Accessioni particolarmente interessanti da destinare alla produzione di fiore reciso fresco sono *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Green Shadow' e *H. arborescens* 'Annabelle'. Quest'ultima, essendo a fiori bianchi, può essere impiegata soprattutto nel periodo giugno-luglio, in cui si ha una maggiore richiesta per addobbi floreali per cerimonie; la stessa potrebbe destare un certo interesse come fiore reciso autunnato, insieme a *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Harlequin', conosciuta anche con il nome di 'Bicolor', che si contraddistingue per i suoi sepali di due colori: rossi o rosa carico con il bordo bianco. Interessante per il mercato del reciso è la produzione di piante con infiorescenze miniaturizzate da bouquet, in vari colori soprattutto bianchi e verdi, con steli rigidi e lunghi, con buona durata post-raccolta e fioritura programmabile. In questo caso potrebbero risultare interessanti *H. arborescens* 'Annabelle' e *H. paniculata* 'Vanilla Fraise'.

In alcuni paesi si è posta l'attenzione, per la valorizzazione della specie, sull'attitudine alla produzione di tè; infatti le foglie di alcune ortensie possono essere essiccate ed utilizzate per ottenere questa bevanda utilizzata in tutto il mondo.

Occorre comunque prestare attenzione perchè numerose specie non possono essere utilizzate a questo scopo, poiché le loro foglie contengono la tossina 'idrangina'. Le ortensie utili per la produzione di tè appartengono alla specie *Hydrangea macrophylla* ssp. *serrata* e in particolare al gruppo Amacha (in giapponese *ama-cha* significa tè dolce). Prima dell'introduzione dello zucchero, il popolo nipponico usava questa pianta come dolcificante. Le piante di questa specie per lungo tempo sono state utilizzate per ottenere un dolcificante naturale, ma fino ad oggi non è stata avviata una coltivazione massale a questo fine. Le foglie contengono fillodulcina, una isocumarina, circa 350 volte più dolce del saccarosio per l'uomo, pertanto le foglie essiccate potrebbero essere mescolate ad altri tipi di tè ed utilizzate come dolcificante naturale. In Giappone il tè dolce è impiegato come infuso per celebrare la nascita di Buddha. L'infuso viene fatto con foglie giovani, cotte a vapore e arrotolate a mano, con cui si prepara una bevanda chiamata Ama-tsia (tè celeste). Per ottenere un sapore più intenso vengono raccolte le foglie fresche, prima che la pianta inizi a fiorire, in modo che abbiano la maggior concentrazione di edulcorante.

Le ortensie del gruppo amacha sono più di dieci e sono conosciute in Giappone col nome yama ajisai (ortensie di montagna). La maggior parte di esse ha foglie strette con superficie opaca e portano infiorescenze di tipo *lacecap*, di colore bianco, rosa o blu. Sono più o meno tutte localizzate sulle montagne del centro e nord del Giappone. Il tè più dolce si ottiene dalle lunghe foglie di 'Nagaba amacha' che cresce nel centro dell'isola di Honshu.

Anche in Corea le foglie di *H. macrophylla* ssp. *serrata* sono essiccate in maniera tradizionale, fino ad ottenere foglie scure, particolarmente ricche in olii essenziali che conferiscono un persistente sapore dolce quando vengono unite al tè nero, per ottenere un tè con un gusto particolarmente gradevole e dolcificato naturalmente.

Sono note anche proprietà terapeutiche legate al genere *Hydrangea*: gli indiani Cherokee utilizzavano le radici di *H. arborescens* nei disturbi legati ai calcoli renali, preparando decotti ritenuti in grado di rimuoverli ed alleviare il dolore dovuto alla loro emissione.

Di recente sono stati fatti studi sulle proprietà officinali del tè Amacha, che hanno evidenziato un ruolo dell'acido idrangenico nell'abbassare significativamente i livelli ematici di glucosio, trigliceridi e acidi grassi liberi. Alcuni metaboliti, come

l'idrangenolo e i tumberginoli A e F contenuti nelle foglie disidratate di *Hydrangea*, hanno mostrato un effetto antiallergico in test di reazione cutanea.

In Italia, nella città di Bolsena, durante la 'Festa delle Ortensie', una manifestazione promossa dall'associazione 'Amici delle Ortensie' che si svolge nella seconda metà di giugno, è possibile assaggiare il tè di *Hydrangea* e tutti i prodotti derivati dal tè come il gelato, le marmellate, i liquori, prodotti che presentano ottime proprietà digestive e che rappresentano rare prelibatezze per il palato.

1.4. IMPORTANZA ECONOMICA, PRODUZIONE E VALORIZZAZIONE DEL GENERE *HYDRANGEA*

L'ortensia è apprezzata da secoli come pianta decorativa. Nel corso degli ultimi venti anni del XX secolo, le ortensie hanno risentito degli effetti di un leggero calo della domanda. Ma in seguito a innovazioni varietali, sono riuscite comunque a suscitare l'interesse dei consumatori (Wagenaar, 2012). La produzione mondiale di piante in vaso di *Hydrangea* è stimata intorno a 115 milioni l'anno (Fig.6).



Fig. 6: Produzione mondiale di piante in vaso di *Hydrangea* (Wagenaar, 2012).

In particolare, i maggiori produttori di piante in vaso si ritrovano nel nord Europa, dove il totale della produzione stimata è circa 63 milioni. Paesi Bassi, Germania e Francia rappresentano i tre principali produttori, con una superficie destinata alla produzione di piante in vaso rispettivamente del 30, 26 e 15% (Tab.2), (Horticulture-RNM- PACA, 2012).

Produzione nei paesi d'Europa	<i>Hydrangea</i> macrop. in vaso da interno/esterno	Altre specie da esterno	Superficie totale destinata alla produzione piante in vaso	% superficie destinata alla produzione piante in vaso
Paesi Bassi	11.0	7.5	18.8	30
Germania	11.0	5.5	16.5	26
Francia	6.5	3.0	9.5	15
Paesi Scandinavi	3.8	1.5	5.3	8
Italia	4.0	0.5	4.5	7
Belgio	2.5	0.8	3.3	5
Regno Unito	0.5	1.5	2.0	3
Svizzera/Austria	1.4	0.6	2.0	3
Spagna	1.0		1.0	2
Paesi Est U.E.	0.6		0.6	1
Totale	42.3	20.9	63.8	100

Tab. 2: Produzione totale di piante in vaso di *Hydrangea* in Europa (milioni di piante).

Della produzione totale europea, il 65 % è rappresentato da *H. macrophylla*, il 15 % da *H. paniculata*, il 5 % da *H. arborescens* e il restante dalle altre varietà.

In Fig.7 è mostrato l'andamento delle vendite sul mercato olandese riferito sia al fiore reciso che alle piante in vaso nell'arco di tempo 2006-2010: in particolare si può osservare che le vendite sul mercato olandese di fiore reciso di *Hydrangea* hanno subito un maggiore incremento rispetto alle piante in vaso, le quali sono rimaste pressoché costanti (van Bloemenveilingen, 2008-2010).

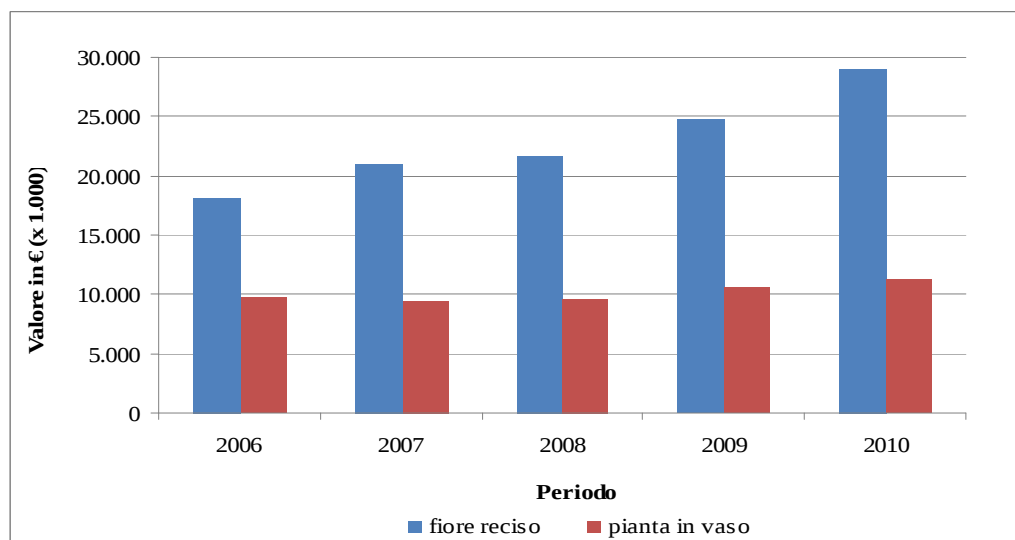


Fig. 7: Andamento delle vendite sul mercato olandese 2006-2010.

Inoltre, si può osservare che la produzione totale di *Hydrangea* sul mercato olandese è passata da 23.906.000 di € nel 2008 a 30.268.000 di € nel 2010 per quanto riguarda il fiore reciso, mentre la produzione come pianta da vaso è passata da 26.573.000 di € nel 2008 a 29.036.000 di € nel 2010 (Fig.8).

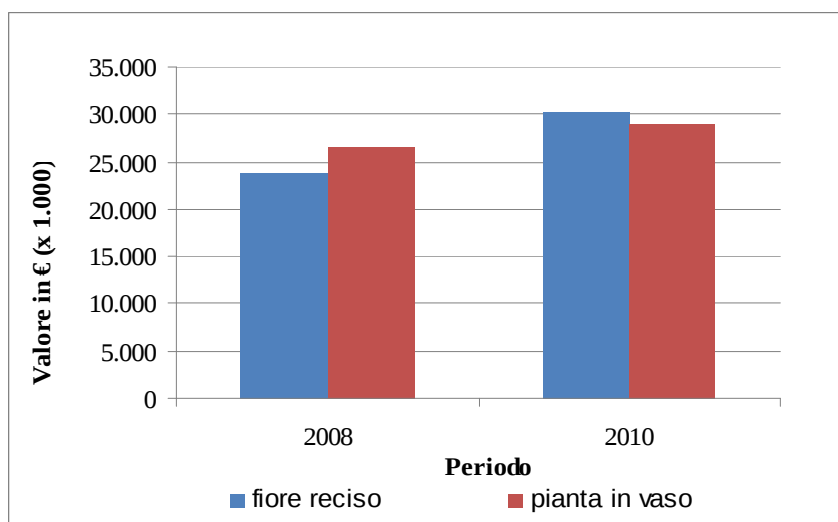


Fig. 8: *Hydrangea* (fiore reciso e pianta in vaso): valore delle produzioni affluite sul mercato olandese (anni 2008 e 2010).

Sempre in riferimento al mercato olandese (van Bloemenveilingen, 2008-2010), si osserva un maggiore incremento del numero totale di steli prodotti (da 21.733.000 nel 2008 a 29.104.000 nel 2010), rispetto al numero totale di piante in vaso prodotte (da 9.601.000 nel 2008 a 11.312.000 nel 2010) (Fig.9).

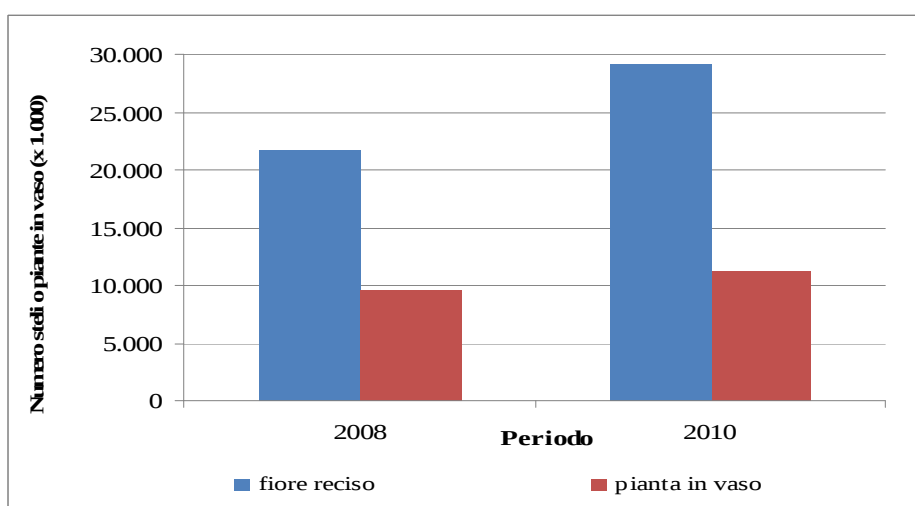


Fig. 9: Numero totale di steli e piante in vaso prodotte sul mercato olandese.

Infine per quanto riguarda il prezzo medio sia del fiore reciso che delle piante in vaso di *Hydrangea macrophylla*, nell'arco di tempo considerato, questo è rimasto pressoché costante, mentre si assiste ad un incremento del prezzo medio per quanto riguarda *Hydrangea quercifolia*, passata da 5.82 € nel 2006 a 9.25 € nel 2010 (Fig.10) (van Bloemenveillingen, 2008-2010).

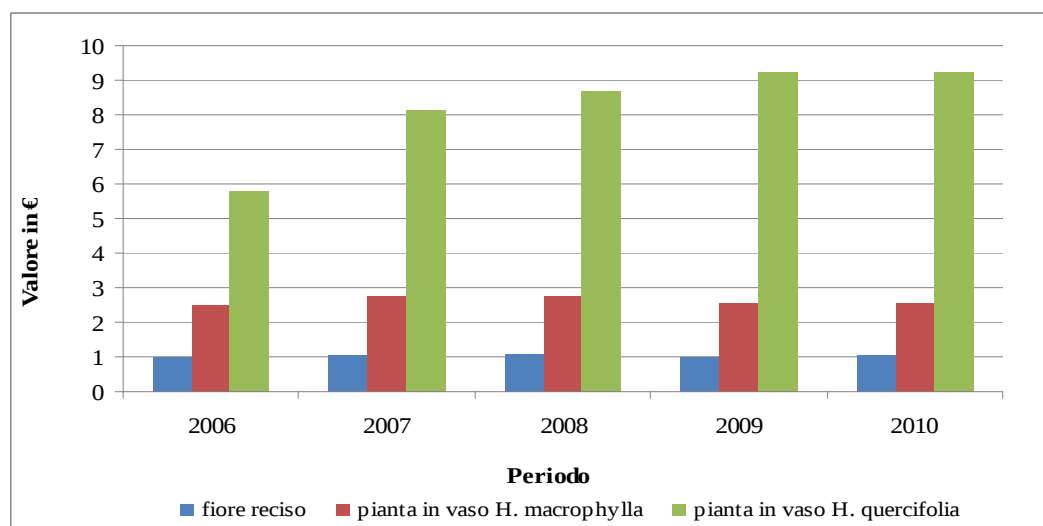


Fig. 10: Prezzo medio dei fiori recisi e delle piante in vaso sul mercato olandese.

Oggi sono disponibili sul mercato mondiale molte forme e molti colori, e possono essere usate per scopi differenti: pianta in vaso da interno, fiore reciso fresco o essiccato, per ricorrenze o celebrazioni (matrimoni o altri eventi), su balconi e terrazzi, in giardini e spazi verdi pubblici. Il mercato di questa specie, presenta una tendenza positiva soprattutto in termini di quantità vendute e stabilità dei prezzi. Ciò è dovuto principalmente a:

- facilità di coltivazione e velocità di accrescimento;
- lunga shelf-life;
- particolari caratteristiche estetiche;
- eccesso di domanda, rispetto all'offerta, in aprile-maggio-giugno;
- resistenza a condizioni climatiche (freddo/caldo, mancanza o eccesso di acqua);
- possibilità di commercializzare un prodotto multifunzionale (pianta da arredamento, da terrazzo, o come fiore reciso fresco o essiccato).

Negli Stati Uniti, negli ultimi venti anni, *Hydrangea*, in particolare *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*, varietà Endless Summer®, ha acquistato popolarità ed è cresciuta quantitativamente. Dal 2000, numerose varietà di origine europea ed

asiatica, destinate alla coltivazione come pianta in vaso, sono state oggetto di brevettazione. Negli USA si registra un crescente interesse verso le specie relativamente poco diffuse in Italia, per quanto si adattino perfettamente alle condizioni pedo-climatiche del nostro Paese: *H. arborescens*, *H. anomala* ssp. *petiolaris* e *H. quercifolia*, rispettivamente coltivabili come alberelli, rampicanti o ornamentali da foglia.

Per quanto riguarda il mercato asiatico, la produzione di *Hydrangea* è stata stimata in circa 22 milioni di piante; in particolare la maggior parte della produzione proviene da Cina e sud Corea (circa 17 milioni), a seguire il Giappone, con una produzione di piante in vaso all'anno di circa 3 milioni, ed infine Australia e Nuova Zelanda con 2 milioni di piante (Wagenaar, 2012).

In Italia, la produzione di piante in vaso di ortensia sia da esterno che da interno, varia a seconda della regione. Il maggior numero di piante da giardino sono prodotte nel Lazio (con 1.266.636 piante), seguito da Toscana (714.717) e Lombardia (443.752) (Fig.11); le stesse tre regioni sono anche le maggiori produttrici di piante in vaso da interno, rispettivamente con 267.741 piante prodotte nel Lazio, 132.798 in Toscana e 125.904 in Lombardia (Fig.12) (Dipartimento delle Politiche di Sviluppo-Direzione Generale dello Sviluppo Rurale, MiPAAF 2009).

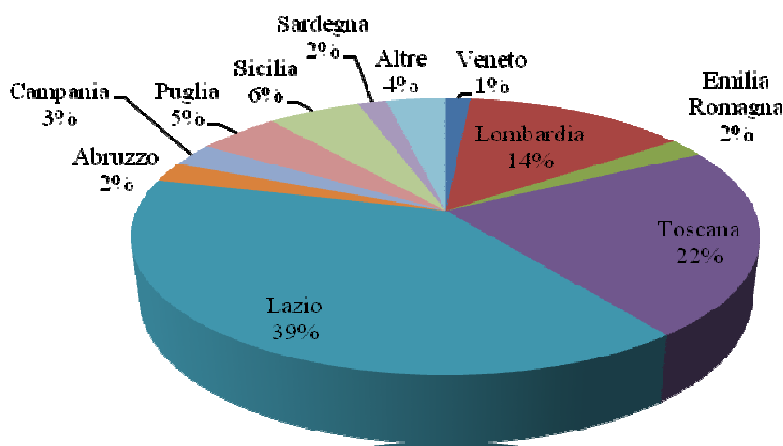


Fig. 11: Ortensia da giardino: produzione di piante in vaso nelle diverse regioni (n° piante).

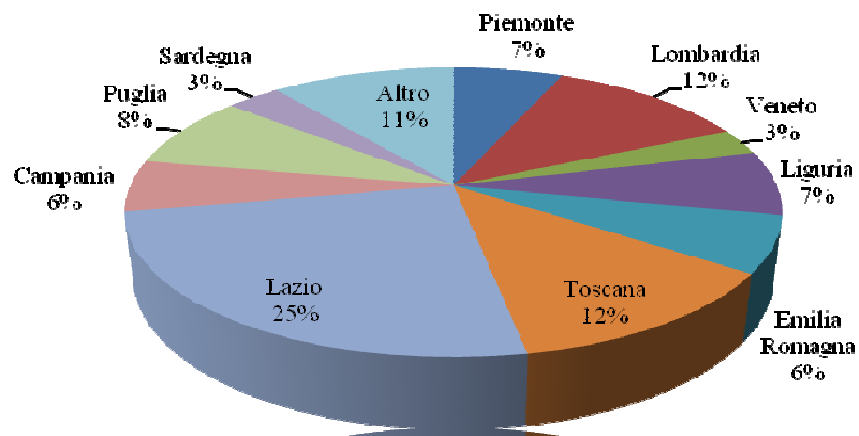


Fig. 12: Ortensia da interno: produzione di piante in vaso nelle diverse regioni (n° piante).

In Italia il genere *Hydrangea* viene valorizzato grazie all'attività di diverse associazioni, tra cui 'Amici delle Ortensie' di Bolsena. Questa associazione è stata fondata con l'obiettivo di valorizzare e far conoscere questa specie botanica, che si è rapidamente diffusa in Italia ed in Europa grazie alle sue magnifiche fioriture, che da fine primavera perdurano per tutta l'estate, diventando così una pianta ornamentale di primo ordine. L'Associazione è nata con il proposito di diffondere la conoscenza di queste piante sia attraverso un'operazione di promozione diretta, sia stringendo contatti con associazioni analoghe, vivaisti specializzati, produttori ed appassionati sparsi in Italia ed in altri Paesi.

In Francia il patrimonio genetico del genere *Hydrangea* è gestito da una cooperativa, in cui partner pubblici e privati collaborano tra loro, impegnandosi sia a rendere disponibili e diffondere le risorse genetiche di questa specie, che a partecipare alla loro manutenzione e valutazione. Questa cooperativa è stata fondata nel 1999 sotto la cura di *Bureau des Ressources Genetiques* (Ufficio delle Risorse Genetiche) ed è attualmente composta da sei partner di entrambi i settori, pubblico e privato. Lo scopo di questa rete è quello di gestire una collezione nazionale, la quale oltre ad essere stata identificata, classificata e localizzata, è anche disponibile. Infatti a questa raccolta vi è libero accesso in termini di fornitura e di distribuzione di materiale vegetale per i partner della rete, ma anche per i non-membri, naturalmente entro i limiti descritti dal regolamento della rete stessa o come deciso dal comitato direttivo. Tale disponibilità si basa sul principio di scambio. In Francia questa collezione nazionale di *Hydrangea* è considerata una banca del germoplasma, dove ciascuna accessione è rappresentata da 3 piante dello stesso clone. L'identificazione

dei cloni di questa collezione è stato uno degli obiettivi iniziali della ricerca intrapresa da questa organizzazione, dove ogni singolo clone è stato caratterizzato sia dal punto di vista morfologico, mediante 35 descrittori, sia dal punto di vista genetico attraverso marcatori molecolari. Sono stati identificati i cloni e rilevate omonimie e sinonimie, in particolare in *H. macrophylla*. Questo lavoro di caratterizzazione ha permesso di costituire la collezione nazionale (BRG, 2007).

1.5. NOTE DI COLTIVAZIONE

Ricordando la loro origine e l'ambiente di sottobosco in cui crescono, si deduce che le zone a clima mite, umide e ombrose sono più adatte alla coltivazione delle ortensie: in Inghilterra e sulle coste atlantiche della Francia queste acidofile, facilitate dalle condizioni particolarmente favorevoli del clima temperato oceanico, sono una delle colture ornamentali più diffuse ed hanno una vegetazione rigogliosa, con una capacità di fioritura veramente straordinaria.

Alle nostre latitudini, la coltivazione delle ortensie non presenta particolari difficoltà: trovano il loro habitat ideale in posizione di mezz'ombra, ma molte *cultivar* in realtà possono essere coltivate benissimo anche al sole, purché adeguatamente rifornite di acqua in terreni freschi e ben drenati, contenenti una buona quantità di sostanza organica e minerale. Le ortensie prediligono un clima temperato umido, la maggior parte delle specie comunque, resiste benissimo alle basse temperature fino a -6/-7 °C. L'unico rischio può essere rappresentato da eventuali gelate precoci o tardive, tipiche degli ambienti mediterranei, che pur non portando a morte la pianta, ne pregiudicano spesso la fioritura (Lombardi, 2009). Di seguito sono riportati in dettaglio i principali parametri da considerare durante la coltivazione.

Temperatura ed esposizione Molte specie temono gli eccessi termici, in particolare le alte temperature che disidratano rapidamente le foglie e disseccano i fiori. Il freddo invece giunge quando le ortensie, che sono in parte caducifoglie, sono ormai entrate in riposo, diventando così insensibili alle condizioni esterne. Specie come *H. quercifolia* e *H. arborescens*, superano minime invernali inferiori a -20 °C e massime estive superiori a 35 °C. Sono molto sensibili alle gelate tardive che provocando la bruciatura dei giovani germogli, possono compromettere quindi la fioritura della stagione. Essendo arbusti di sottobosco a comportamento sciafilo, cioè

adatti a condizioni di ombra o di mezz'ombra, soffrono se esposte alla luce diretta del sole soprattutto durante le ore centrali del giorno (Rampinini, 2003a).

Irrigazioni L'apporto di acqua deve essere abbondante nei periodi caldi per compensare le perdite d'acqua all'interno delle foglie per evapotraspirazione. Per quanto gradiscano generose annaffiature, queste piante soffrono i ristagni d'acqua, che provocano l'asfissia delle radici. Sono così utili irrigazioni fogliari a pioggia (Lombardi, 2009).

Suolo e messa a dimora Le ortensie sono in grado di adattarsi a diverse tipologie di suolo, ma crescono meglio su suoli con una buona ritenzione idrica, ovvero capacità di trattenere l'acqua e mantenersi umidi senza ristagni. Per quanto riguarda invece i rinvasi, si possono usare i substrati per acidofile che si trovano in commercio. Il periodo migliore per il rinvaso è quello della ripresa vegetativa in primavera, quando si ha il picco dell'attività radicale.

Un terreno eccessivamente calcareo (pH 8-8.5) o l'utilizzo di acque di irrigazione particolarmente dure, possono indurre nelle ortensie clorosi ferrica. In questi terreni la presenza di calcare rende il ferro molto meno disponibile perché in forme insolubili: le ortensie sono particolarmente sensibili a questa immobilizzazione del ferro e manifestano sintomi di carenza soprattutto a carico delle foglie, che divengono intensamente colorate di giallo; questa colorazione è dovuta ad una difficoltà da parte della pianta a produrre clorofilla, per la cui sintesi il ferro è indispensabile. Il prolungarsi delle condizioni predisponenti la clorosi, porta a schiarimenti sempre più intensi della lamina che può diventare biancastra, la foglia dissecca e necrotizza a partire dai margini. Nelle piante in vaso, possiamo intervenire somministrando alla pianta una integrazione di ferro con prodotti specifici, mentre per quanto riguarda le piante in terra, la somministrazione di chelati di ferro rinverdisce temporaneamente le foglie, ma il problema del calcare rimane.

Concimazione Al momento della ripresa vegetativa può essere utile affiancare alla concimazione organica quella minerale, importante per assicurare una vegetazione vigorosa e una fioritura abbondante (Rampinini, 2003b).

Potatura Una potatura corretta è utile per guidare la pianta in uno sviluppo armonico ed equilibrato. Se non viene effettuato un intervento di potatura, le piante potrebbero espandersi troppo, assumendo un aspetto un po' disordinato, producendo fiori più piccoli ma, comunque, continuando a crescere ed a fiorire. Al contrario, con una potatura troppo eccessiva si può perdere buona parte della fioritura e anche

rallentare lo sviluppo della pianta. Per quel che riguarda *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* e *H. macrophylla* ssp. *serrata*, che fioriscono sul legno dell'anno precedente, ci si limita ad una ripulitura del secco, alla eliminazione degli steli più deboli ed alla rimozione dei fiori secchi tagliando sopra l'ultima coppia di gemme, che sono quelle che porteranno i fiori nella stagione successiva. Per quel che riguarda *H. paniculata* e *H. arborescens*, che fioriscono sul legno dello stesso anno, la potatura può essere più drastica: si taglieranno gli steli lasciando solo due gemme alla base, ponendo le premesse per infiorescenze molto grandi. Le rampicanti (*H. petiolaris* e *H. seemani*) invece richiedono una limitata potatura che serve più che altro a contenerne la crescita e tale intervento si può effettuare anche con la pianta in vegetazione, come potatura verde. Per *H. aspera*, *H. involucrata* e *H. quercifolia* si consigliano solo potature di riordino e contenimento, da effettuare dopo la fioritura (Rampinini, 2003a).

Malattie e avversità Le ortensie sono piante rustiche e resistenti, che in genere riescono a superare gli attacchi di parassiti fungini e insetti fitofagi. Di seguito sono elencati alcuni dei sintomi più comuni (Lombardi, 2009).

Mal bianco - è un fungo che colpisce prevalentemente le foglie, ma in alcuni casi attacca anche i fiori ed i rami. La presenza della malattia si manifesta con macchie più chiare sulla lamina fogliare che ben presto si rivestono di una patina dall'aspetto polverulento di colore bianco-grigiastro: questa patina non è altro che il micelio del fungo. Col progredire dell'attacco, le parti colpite evidenziano una reticolatura nerastra, la parte del lembo colpita tende a deformarsi e a necrotizzare; le aree fogliari interessate dall'infezione sono solitamente circondate da un anello rosso-violaceo. Compare di solito in estate e prolifera in condizioni di caldo e umidità stagnante. Per controllare questo oidio sono utili alcuni accorgimenti agronomici (per es. utilizzare un tipo di irrigazione che bagni meno la chioma, come irrigazione a goccia o a capillare). Nel caso l'attacco sia tale da richiedere interventi di tipo chimico, sono utilizzabili diversi fungicidi antioidici ad azione specifica.

Armillaria mellea - Il fungo attacca generalmente l'apparato radicale o il colletto della pianta: strutture filamentose (rizomorfe) si sviluppano nel suolo fino a che non raggiungono una radice viva; gli apici delle rizomorfe penetrano nei tessuti della radice e da quel momento il fungo vive come parassita sulla pianta. Placche di tessuto fungino filamentoso bianco-crema (micelio) si formano nella zona sottocorticale, a livello del colletto e dell'apparato radicale: il fungo inizia a

‘strangolare’ la pianta rallentando, fino ad impedire il flusso dell’acqua e dei nutrienti dall’apparato radicale. Il primo sintomo è il rapido deterioramento di cespugli o loro parti fino a poco prima apparentemente in buona salute: alcuni steli si mostrano avvizziti, disidratati, come se avessero sofferto grosse carenze d’acqua. Su piante con attacchi iniziali o non molto estesi si può effettuare una ripulitura chirurgica, eliminando alla base la parte interessata e disinfettando poi il colletto e la zona adiacente con sali di rame. Nel caso di infezione avanzata è consigliato espiantare la pianta con tutto l’apparato radicale e distruggerla.

Afide - *Rhopalosiphum dianthi* Kalt. è un afide della grandezza di circa 2 millimetri, di colore verdastro o giallo-verdastro. La sua attività trofica può provocare il deperimento della pianta, soprattutto in corrispondenza di massicce infestazioni su piante giovani o appena germogliate; può, tramite la puntura, essere vettore di alcuni virus.

Pulvinaria - *Eupulvinaria hydrangeae* Stein. è una cocciniglia che staziona soprattutto nella pagina inferiore delle foglie, ma colonizza anche rametti e steli fiorali. Questo insetto punge i tessuti della pianta per succhiare la linfa, inducendo uno stato di sofferenza e deperimento nella pianta; inoltre i vari stadi di Pulvinaria producono una grande quantità di melata, una secrezione zuccherina che imbratta i tessuti, accentuando l’asfissia, già direttamente provocata dagli strati di colonie fioccosse che avvolgono le parti colpite e divenendo substrato nutritivo per particolari funghi che provocano il nerume o fusaggine. E’ possibile intervenire in autunno-inverno o fine inverno, contro le forme svernanti, con uno o più trattamenti a base di oli bianchi.

Virosi - L’ortensia coltivata per la produzione di piante fiorite in vaso, *H. macrophylla*, è infettata da numerosi virus, alcuni specifici di questa pianta, altri a vasta gamma d’ospiti naturali. Alcuni virus infettano anche altre specie, quali *H. paniculata* e *H. serrata*. Virus specifici maggiormente diffusi sono:

Hydrangea ringspot potexvirus (HdRSV, virus della maculatura anulare delle ortensie) è il virus più comune in ortensia, a distribuzione pressoché mondiale. E’ trasmissibile per succo, ha gamma d’ospiti ampia e non ha vettori noti. Su ortensia causa maculatura anulare, evidente soprattutto sulle foglie più adulte, talvolta di colore rosso-bruno. Le foglie possono essere arricciate, arrotolate ed asimmetriche, le infiorescenze possono avere numero ridotto di fiori, ed infine le piante possono mostrare nanismo. Alcune *cultivar* sono infette in modo quasi latente,

presumibilmente l'espressione dei sintomi dipende dalla *cultivar*, dalle condizioni ambientali e dalla nutrizione. La diffusione del virus nelle coltivazioni è dovuta soprattutto alla moltiplicazione vegetativa di materiale infetto ed anche all'uso di strumenti da taglio usati su piante infette e successivamente su piante sane.

Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV, virus del mosaico dell'erba medica) causa su ortensia evidente mosaico o maculatura clorotica, ingiallimenti delle nervature delle foglie, in particolare di quelle apicali. E' stato segnalato spesso in infezione mista con HdRSV.

Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV, virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro) causa su ortensia evidente maculatura anulare sulle foglie, bronzatura e nanismo.

2. MIGLIORAMENTO GENETICO DEL GENERE *HYDRANGEA*

Il principale obiettivo del *breeding* delle specie ornamentali è incrementare la variabilità genetica, introducendo nuovi caratteri estetici, come il colore e la forma del fiore, e il portamento della pianta. Per raggiungere questi obiettivi, è possibile ricorrere a due strategie: il miglioramento genetico tramite incrocio e l'ottenimento di nuovi genotipi per mezzo di mutazioni spontanee o indotte.

Recentemente, il miglioramento genetico per mezzo di tecniche più innovative, come la trasformazione genetica, sta cominciando ad essere applicato in floricoltura. Tra questi metodi, l'ibridazione tra specie distanti rappresenta uno strumento efficace per incrementare la variazione genetica e ben si adatta alle specie floricole per due ragioni. Primo, la maggior parte delle piante coltivate sono propagate per seme, e attraverso ripetute autofecondazioni o reincroci, è possibile fissare determinati caratteri. Comunque, gli ibridi interspecifici e intergenerici generalmente sono caratterizzati da una sterilità maschile e/o femminile, e di conseguenza questi non possono essere usati per successivi incroci. Così molte specie floricole sono propagate vegetativamente, e gli ibridi sterili possono essere usati direttamente come *cultivar* nuove. Secondo, gli ibridi interspecifici e intergenerici generalmente mostrano una morfologia intermedia tra i due parentali, la quale rappresenta una caratteristica attrattiva in floricoltura, poiché l'introduzione di

nuovi caratteri è importante per lo sviluppo di nuove *cultivar* ornamentali (Nakano e Mii, 2008).

L'ibridazione tra specie distanti solitamente implica incroci tra specie differenti all'interno dello stesso genere (Kato *et al.*, 2001), ma anche tra generi diversi (Amano *et al.*, 2007). Questa può essere ostacolata dal verificarsi di barriere sessuali, che si dividono in pre e postzigotiche. Le barriere di pre-fecondazione possono essere dovute o all'impossibilità del tubetto pollinico di attraversare lo stilo e raggiungere lo stigma, o all'incompatibilità dello stesso polline, o a un aborto dell'ovario; quelle di post-fecondazione sono invece dovute alla mancanza dell'endosperma o all'aborto dell'embrione stesso.

Le tecniche di coltura *in vitro* di cellule, tessuti ed organi vegetali, ampiamente utilizzate come strumento di indagine in biologia molecolare e fisiologia cellulare, rappresentano un importante supporto al miglioramento genetico, in particolare modo attraverso:

Embriocoltura: questa metodologia prevede l'isolamento e la coltura *in vitro* di embrioni, al fine di consentirne lo sviluppo e successivamente la germinazione. Il precoce aborto dell'embrione si può verificare per fenomeni di incompatibilità genetica in incroci interspecifici ed intergenerici. Nei programmi di miglioramento genetico si ricorre spesso all'incrocio con specie affini per introdurre in quelle coltivate caratteri interessanti dal punto di vista agronomico. Nonostante il processo di fecondazione avvenga normalmente, lo sviluppo dell'embrione si blocca precocemente seguito da degenerazione dello stesso e collassamento del seme. Spesso la morte dell'embrione sembra determinata dal mancato funzionamento dell'endosperma, fonte di nutrimento per il nuovo individuo (De Paoli *et al.*, 1993).

Tra le tecniche di coltura *in vitro*, l'*embryo rescue*, cioè il trasferimento dell'embrione immaturo su un substrato artificiale così da consentirne di raggiungere il pieno sviluppo, rappresenta un esempio di efficace integrazione delle biotecnologie con i metodi tradizionali di miglioramento genetico (Infante e Gonzales, 2002; Mancuso *et al.*, 2002).

Conservazione di germoplasma: costituisce un'attività necessaria per i genetisti in quanto consente di non perdere prezioso materiale genetico portatore di caratteri interessanti ed utilizzabile per migliorare le attuali costituzioni in commercio. Il germoplasma di una specie comprende le varietà commerciali coltivate, le vecchie *cultivar*, le linee non valide, ma dotate di caratteri specifici

interessanti, mutanti, varietà provenienti dalla zona di origine, forme selvatiche e specie selvatiche affini.

La conservazione *in vitro* di germogli e tessuti, offre un metodo vantaggioso in quanto le colture occupano spazi molto ridotti e sono salvaguardate dall'attacco di agenti patogeni visto che sono allevate in sterilità (Damiano e Palombi, 2000).

Produzione di aploidi in vitro: costituisce un metodo rapido per l'ottenimento di piante omozigoti da utilizzare nei programmi di miglioramento genetico. Le piante omozigoti possono essere utilizzate in quanto portatrici di caratteri recessivi interessanti o per la costituzione di linee pure da impiegare nella produzione di ibridi. Questa tecnica è fondamentale in specie dioiche e autoincompatibili e riduce i tempi necessari per ottenere individui omozigoti in quelle specie caratterizzate da una lunga fase giovanile e nelle stesse specie autogame per le quali è necessario effettuare 5-7 generazioni di autofecondazioni per raggiungere l'omozigosi (Rossi *et al.*, 2001).

Coltura e fusione di protoplasti: nel miglioramento genetico, viene ampiamente impiegato l'incrocio fra individui della stessa specie o di specie selvatiche geneticamente affini, per introdurre caratteri di interesse agronomico, come la resistenza alle malattie. La fusione di protoplasti fornisce un metodo alternativo per ottenere progenie; questa tecnica prevede la fusione (nucleare o citoplasmatica) di due cellule somatiche provenienti da genitori diversi e la rigenerazione di una piantina (ibrido somatico) dal prodotto di fusione.

Ingegneria genetica: il trasferimento di materiale genetico costituisce uno strumento sia per studiare la struttura e le funzioni dei geni, che per introdurre nella pianta determinati geni interessanti dal punto di vista agronomico. Questo passaggio può essere effettuato tramite vettori o per introduzione diretta di DNA nelle cellule (De Paoli *et al.*, 1993; Rossi *et al.*, 2001).

Tentativi di realizzare incroci tra specie e sottospecie nel genere *Hydrangea* sono stati effettuati da Mortreau (Mortreau *et al.*, 2003). Nella maggior parte di incroci interspecifici testati, il tubetto pollinico riesce a raggiungere l'ovario, con conseguente sviluppo degli ovuli, anche tra quelle specie che presentano notevoli differenze di quantità di DNA e un numero diverso di cromosomi, come per esempio nell'incrocio *H. arborescens* x *H. involucrata*. Mentre barriere sessuali prezigotiche si verificano ad esempio negli incroci *H. petiolaris* x *H. involucrata*, *H. arborescens* x *H. aspera* e *H. involucrata* x *H. heteromalla*. Alcune delle combinazioni di

incrocio testate, si caratterizzano da una incompatibilità interspecifica, in particolar modo è la direzione dell'incrocio che può influenzare l'esito dell'ibridazione (Fig.13).

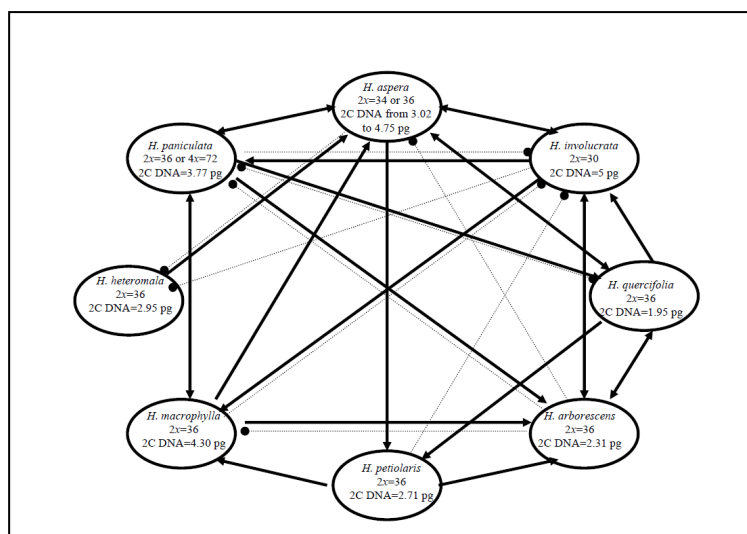


Fig. 13: Schema compatibilità incrocio interspecifico in *Hydrangea*. Le frecce indicano la compatibilità di incrocio, mentre le linee tratteggiate l'incompatibilità di incrocio. (Sono inoltre riportati il n° di cromosomi e 2C DNA secondo Cerbah *et al.*, 2001).

Le *cultivar* di *H. macrophylla* presentano generalmente una stretta base genetica, pertanto l'ibridazione tra specie distanti rappresenta un importante strumento per ampliare la variabilità genetica. Sono iniziati diversi progetti, sia in Giappone che negli Stati Uniti, in cui è stato deciso di ricorrere all'ibridazione tra specie distanti per migliorare questa specie (Kudo *et al.*, 2008). Generalmente, da quanto riportato in letteratura, nei programmi di *breeding* di *Hydrangea macrophylla*, si cerca di combinare varietà in possesso dei seguenti requisiti: buoni caratteri estetici, soprattutto per ciò che riguarda il colore e la forma del fiore, e buona resistenza al freddo, poiché la fioritura è spesso diminuita da un inusuale freddo invernale o da gelate tardive in primavera.

La resistenza al freddo rappresenta un aspetto fondamentale per il miglioramento della coltivazione di *H. macrophylla*, soprattutto in alcune zone degli Stati Uniti, dove gelate primaverili possono danneggiare la formazione dei bocci fiorali, con conseguente riduzione della fioritura. Una potenziale fonte di resistenza al freddo per accrescere l'utilità di questa popolare specie, può essere rappresentata dall'impiego di tre specie di *Hydrangea*, ampiamente coltivate negli Stati Uniti: *H. paniculata* Sieb., *H. arborescens* L. e *H. quercifolia* Bartr.. Reed indaga sulla possibilità di creare ibridi interspecifici, tra le tre specie resistenti al freddo e *H.*

macrophylla, così da ottenere nuovi ibridi con infiorescenze dai colori vivaci ma tali da poter essere coltivati nelle zone più fredde degli Stati Uniti, in particolare ibridi interspecifici tra *H. macrophylla* x *H. paniculata*. Inoltre è valutata anche l'auto-compatibilità di ognuna delle specie testate, al fine di determinare la necessità di ricorrere all'emasculazione durante l'impollinazione controllata (Reed, 2000).

In *Hydrangea*, la tecnica di *embryo rescue*, è stata impiegata come supporto per ottenere nuove piantine da incrocio interspecifico di *H. macrophylla* 'Kardinal' x *H. paniculata* 'Brussels Lace', dove il materiale da sottoporre ad analisi molecolare RAPD, è stato recuperato mediante coltura di ovari, fatto radicare *in vitro* e successivamente ambientato in serra (Reed *et al.*, 2001).

Altre tipologie di incrocio interspecifico sono state realizzate da Kudo, fra *H. scandens* ssp. *chinensis* e *H. macrophylla* 'Blue Ring' (Kudo *et al.*, 2008). Infatti *H. scandens* ssp. *chinensis*, piccolo arbusto sempreverde nativo delle regioni calde temperate e subtropicali del sud-est asiatico, presenta diverse caratteristiche attrattive, come una fioritura invernale e piccoli corimbi bianchi di diametro 15-20 cm, ma non è comunemente impiegato come pianta ornamentale. In questo modo è possibile combinare la fioritura invernale e il fogliame sempreverde di *H. scandens* ssp. *chinensis*, con le caratteristiche ornamentali di *H. macrophylla*, sfruttando l'ampia variabilità di colore delle infiorescenze. Anche in questo caso la tecnica di *embryo rescue*, è impiegata come supporto per superare le barriere postzigotiche. Gli ibridi ottenuti si caratterizzano da una morfologia del fiore e delle foglie intermedia tra le due specie parentali. Dal momento che le nuove progenie mostrano una crescita più vigorosa di entrambi i parentali, hanno foglie sempreverdi e si caratterizzano per una fioritura invernale, questo potrebbe rappresentare un ampliamento di qualità di valore tale da renderli commerciabili e disponibili per la coltivazione in serra. Come aspetto negativo, questi ibridi non producono seme, e quindi il loro impiego come parentale maschile nei programmi di incrocio risulterebbe difficile. Per ripristinare la fertilità del polline, sarebbe necessario produrre anfidiploidi attraverso il raddoppio del numero di cromosomi (Nimura *et al.*, 2003).

I precedenti tentativi di usare l'ibridazione interspecifica come strumento per combinare il colore dei fiori con la resistenza al freddo in *Hydrangea*, non hanno prodotto i risultati desiderati, poiché gli ibridi ottenuti si caratterizzavano da sterilità, aneuploidia e debolezza. In tutti questi casi, *H. macrophylla* è stata usata come fonte

di caratteristiche ornamentali. E' stata testata la possibilità di sostituire *H. macrophylla* con *H. involucrata*, come fonte alternativa (Jones e Reed, 2006).

Un esempio riguarda la produzione di ibridi tra *H. arborescens*, la quale rappresenta una tra le specie di questo genere più resistenti al freddo, ed *H. involucrata*, la quale è apprezzata, oltre che per la resistenza al freddo e per le sue caratteristiche estetiche, come il colore dei fiori blu-lavanda e le sue grandi foglie vellutate, in particolare testando l'incrocio *H. arborescens* 'Dardom' x *H. involucrata*. La produzione di questa combinazione di incrocio potrebbe portare allo sviluppo di nuove *cultivar* ed aumentare le vendite di *Hydrangea* soprattutto nelle aree più fredde degli Stati Uniti (Jones e Reed, 2005; Jones e Reed, 2006). A differenza delle combinazioni di incrocio descritte precedentemente, l'impiego di *H. arborescens* come parentale femminile e di *H. involucrata* come parentale maschile, produce seme vitale e capace di germinare. Inoltre questa tipologia di incrocio non richiede la necessità di ricorrere alle tecniche *in vitro* di *embryo rescue*, a differenza di ibridi tra *H. macrophylla* x *H. paniculata*, prodotti solo mediante tale tecnica, e tra *H. macrophylla* x *H. arborescens*, dove è necessario combinare la tecnica di *embryo rescue* con la rigenerazione da callo (Jones e Reed, 2005).

3. TECNICHE DI DISTINZIONE VARIETALE IN FLORICOLTURA

3.1. INTRODUZIONE

L'uomo è da sempre interessato all'ottenimento di piante adatte alle sue necessità ed il miglioramento genetico è una risposta a questa necessità. L'introduzione di nuove specie in ambienti diversi da quelli naturali è il caso più semplice di miglioramento genetico, basti pensare a che cosa ha significato l'introduzione nel Vecchio Continente di specie vegetali americane od originarie dell'Oriente.

In floricoltura spesso si parla di identificazione, ovvero del riconoscimento e della distinzione delle singole varietà presenti all'interno di ogni specie coltivata. Esistono principalmente due metodi per l'identificazione, quelli basati sull'analisi del fenotipo della pianta e quelli basati sull'analisi del genotipo della stessa.

Le tecniche che hanno permesso, nel corso degli anni, la distinzione fra le diverse varietà in piante ornamentali sono quelle che implicano l'utilizzo dei cosiddetti marcatori genetici.

Il termine *marcatore genetico* è usato per indicare qualsiasi carattere ereditato in maniera mendeliana semplice; è una qualsiasi differenza fenotipica controllata geneticamente ed utilizzata in un'analisi genetica (Nuez *et al.*, 2000). Un marcatore genetico deve presentare una serie di caratteristiche per essere considerato un buon marcatore ed essere utilizzato nel miglioramento genetico: deve essere polimorfico (multiallelico), non epistatico (non influenzato da altri loci), neutro (la sostituzione allelica non ha altri effetti fenotipici). I marcatori genetici sono di tre tipi:

- Marcatori morfologici (caratteri fenotipici monogenici);
- Marcatori biochimici (isoenzimi e proteine);
- Marcatori molecolari (frammenti di DNA).

Negli ultimi anni i marcatori genetici, soprattutto per l'avvento dei marcatori molecolari, hanno assunto un ruolo sempre più importante in floricoltura per le loro molteplici applicazioni.

Fino alla metà degli anni '60, i marcatori genetici utilizzati nel miglioramento genetico delle piante erano controllati da geni associati a caratteri morfologici (fenotipo); essi sono stati il primo tipo di marcatore utilizzato e solitamente rappresentano il primo passo nella identificazione varietale.

Successivamente l'analisi si è estesa con l'impiego di marcatori isoenzimatici e di altri tipi di proteine (biochimici), che hanno aumentato notevolmente il numero di marcatori disponibili; negli ultimi decenni ha assunto importanza l'impiego dei marcatori molecolari basati sull'analisi del DNA di ogni singolo individuo.

La descrizione morfologica e agronomica di una varietà, sebbene di fondamentale importanza, non è sempre sufficiente ad evidenziare problemi legati ad errori di cartellinamento, a sinonimie e ad eventuali mutazioni insorte durante il periodo di mantenimento. La rispondenza varietale nella propagazione delle piante è notoriamente basata su riscontri fenotipici, cioè sull'esame visivo dei caratteri della pianta confrontati con i descrittori propri di ciascuna varietà; è pertanto evidente che sul piano genetico, questo sistema è fortemente legato alla componente ambientale e, almeno per i caratteri quantitativi, non considera il genotipo in quanto tale.

L'identificazione varietale mediante l'applicazione di analisi molecolari del DNA che descrivono l'impronta genetica o *fingerprinting* dell'individuo, consente di

effettuare controlli e verifiche costanti della rispondenza tra le accessioni presenti nelle collezioni o propagate a livello vivaistico e le varietà originali, poiché rende possibile l'identificazione inequivocabile di ciascuna varietà mediante l'analisi dei profili del DNA (Ponti *et al.*, 1997). Per tutti questi motivi si è sentita la necessità di affiancare all'analisi del fenotipo quella del genotipo (*fingerprinting*), basata essenzialmente sull'analisi degli isoenzimi e del DNA delle piante, con tecniche quali RFLP, RAPD, microsatelliti e AFLP.

La distinzione varietale in floricoltura trova numerose applicazioni. Le collezioni varietali, intese come raccolta di germoplasma, rappresentano la fonte di variabilità genetica dalla quale è possibile attingere il materiale da utilizzare nei programmi di miglioramento genetico e consentono la conservazione di varietà che presentano alleli rari, garantendo la salvaguardia della biodiversità. E' pertanto fondamentale il controllo dell'identità delle accessioni presenti nelle collezioni.

La principale applicazione pratica del *fingerprinting* è quella di affiancare l'analisi del fenotipo nei controlli di rispondenza del materiale vegetale nelle diverse fasi di moltiplicazione (dai repository del materiale di fonte, ai centri di moltiplicazione ove si conservano le piante madri, alle varie sedi vivaistiche), siano esse inserite o meno in un sistema volontario di certificazione pubblica del materiale vivaistico prodotto (Sansavini *et al.*, 1997). È inoltre fondamentale nel definire i brevetti per l'introduzione di nuove varietà sul mercato (Camlin, 2003) e per l'attribuzione di riconoscimenti dall'Unione Europea quali DOP (Denominazione di Origine Protetta), IGP (Indicazione Geografica Protetta) e AS (Attestazione di Specificità).

In ogni caso, l'analisi del DNA non è sostitutiva del profilo varietale, compilato secondo i descrittori morfo-fenologici della pianta che si rifanno al modello UPOV (*The International Union for the Protection of New Varieties of Plants*) o a schede ridotte ai caratteri essenziali, ma va vista come un completamento dello stesso profilo. La possibilità di utilizzo di tale tecnica per la certificazione varietale è legata alla capacità discriminante dei diversi marcatori molecolari, all'affidabilità e ripetibilità dei risultati e alla possibilità di applicarla a costi contenuti.

3.2. MARCATORI MORFOLOGICI

La distinzione varietale si è basata, fino ad oggi, quasi esclusivamente sulla selezione dei caratteri fenotipici della pianta. L'individuazione di marcatori in grado di evidenziare polimorfismi all'interno di una specie è sempre stata alla base degli studi di genetica formale e di miglioramento genetico.

Il successo degli esperimenti di Mendel si deve alla scelta del materiale utilizzato (*Pisum sativum*) e dei caratteri morfologici considerati. L'interfertilità e l'autofertilità di questa specie e l'elevata numerosità di caratteri discreti, riconoscibili senza equivoci anche negli ibridi, hanno consentito a Mendel di formulare nel 1886, le leggi sull'ereditarietà che ancora oggi rappresentano la base della genetica.

Tuttavia il fenotipo è determinato non solo dalla componente genetica della pianta, ma anche da una componente ambientale, legata alle condizioni ambientali in cui la pianta si sviluppa e cresce.

Gli effetti ambientali, in molti casi, mascherano le caratteristiche genetiche rendendo inefficace la strategia di incroci intervarietali per un determinato carattere genetico, e la successiva selezione dei semenzali. Inoltre l'epistasi, fenomeno dovuto all'effetto di un gene sull'espressione di un altro gene, al pari delle condizioni ambientali, modifica il fenotipo imponendo un limite pratico al numero di marcatori morfologici individuabili in una popolazione naturale.

I rilievi condotti sul fenotipo sono spesso complessi e onerosi, richiedono tempi relativamente lunghi e possono essere eseguiti solo in determinati momenti, ad esempio l'epoca di fioritura di una pianta può essere stabilita solo nel periodo primaverile, oppure i caratteri del fiore possono essere rilevati solo una volta superata la fase giovanile improduttiva.

Quindi i marcatori morfologici controllati da un solo *locus* possono essere usati come marcatori genetici se la loro espressione è precoce, riproducibile in qualsiasi ambiente e se sono espressamente legati ad un carattere di particolare interesse economico (Vazquez *et al.*, 2000).

3.3. MARCATORI BIOCHIMICI (ISOENZIMI)

Negli studi di genetica di popolazioni, gli isoenzimi sono stati utilizzati già dal 1966 negli studi su *Drosophila* e poco più tardi negli studi sulle piante superiori.

Il termine 'isoenzima' indica le diverse forme molecolari (isoforme) di un sistema enzimatico, con la stessa attività catalitica, presenti in uno stesso organismo (Muller-Starck, 1998).

Si tratta del primo tipo di analisi genetica che ha affiancato quella fenotipica; si differenzia dalle altre tecniche di analisi del DNA in quanto non si tratta di DNA, ma di prodotti del DNA di natura proteica (Bailey *et al.*, 1983).

Hanno trovato e trovano ancora oggi applicazione negli studi di genetica delle piante arboree, in particolare nel *fingerprinting*, nella ricerca di marcatori associati a caratteri di interesse frutticolo e nella realizzazione delle mappe genetiche (Pancaldi, 1998a).

I maggiori vantaggi dell'utilizzo degli isoenzimi risiedono nella loro caratteristica codominanza (cioè nella capacità di discriminare, in assenza di dominanza, tra individui omozigoti ed eterozigoti), nella relativa semplicità dell'applicazione metodologica, nei bassi costi dell'analisi e nella elevata riproducibilità dei risultati. Tuttavia altri aspetti ne hanno ridimensionato l'utilizzo, soprattutto la disponibilità di un numero limitato di sistemi enzimatici polimorfici in alcune piante da frutto (soltanto 6 nel pesco), la difficile caratterizzazione in alcune specie e la limitata variabilità in altre (Douglas, 1983).

La tecnica può non essere distruttiva, dato che generalmente richiede solo una piccola quantità di tessuto vegetale ed è molto versatile, dato che si può utilizzare qualsiasi parte della pianta, anche se generalmente si prediligono tessuti vegetativi, come lamine fogliari o piccioli, apici radicali, semi e plantule.

L'impiego degli isoenzimi come marcatori, è equiparabile a molte delle tecniche che implicano l'utilizzo del DNA; può inoltre dare risultati talvolta più coerenti di alcune di esse che non mantengono le condizioni di ripetibilità (Vazques *et al.*, 2000).

3.4. MARCATORI MOLECOLARI

I marcatori molecolari sono sequenze di DNA che presentano un elevato grado di polimorfismo e che possono, per questo, essere usati per diversi scopi in genetica; i principali marcatori molecolari attualmente disponibili si differenziano sia per il tipo di sequenze analizzate che per la tecnica impiegata, trovando larga applicazione nell'analisi dei polimorfismi genetici.

Negli ultimi quindici anni i marcatori molecolari hanno assunto un ruolo sempre più importante nel settore delle piante ornamentali soprattutto nella caratterizzazione del germoplasma (Rajapakse, 2003), dato che essi consentono l'utilizzo di qualsiasi tipo di materiale vegetale, non sono influenzati dall'ambiente e dallo stadio di sviluppo della pianta.

Delle tre categorie sono i più diffusi, dato che rispetto agli altri sono più facili da produrre, sono abbondanti e ubiquitari nel genoma.

Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico, rilevabile con sonde (*probe*) o inneschi (*primer*) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3'.

Si basano sulla rilevazione di differenze (polimorfismi), anche minime nella sequenza nucleotidica del DNA. Questo consente di rilevare un maggior numero di loci polimorfici e di evidenziare al massimo la variabilità esistente anche all'interno di una stessa popolazione. Inoltre sono indipendenti dall'espressione genica e dallo stadio di sviluppo della pianta e possono essere messi in evidenza in qualsiasi organo o tessuto della pianta, mentre i marcatori morfologici, generalmente, sono legati a specifici organi della pianta e si evidenziano solo ad uno stadio avanzato di sviluppo. Questo rende possibile effettuare una selezione precoce nei programmi di miglioramento genetico, la quale consente di superare i principali problemi legati alla tecnica di miglioramento genetico tradizionale, cioè l'attesa del superamento della fase giovanile della pianta e la necessità di disporre di notevoli spazi per allevare le piante in campo.

Alcuni marcatori molecolari sono codominanti e consentono di distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti già alla prima generazione di incrocio, a differenza dei marcatori morfologici che sono governati da alleli che interagiscono con meccanismo dominante/recessivo. Molteplici sono le loro applicazioni; possono essere impiegati per:

- l'identificazione varietale: dall'analisi dei profili del DNA è infatti possibile identificare in maniera inequivocabile ogni singola varietà;
- studi di filogenesi: confrontando il DNA di specie coltivate e selvatiche affini è stato possibile capire da quali specie derivino le varietà attuali (Pancaldi, 1998);

- per la mappatura genetica, analisi di *linkage*, ovvero riassociazione locus-malattia, genetica forense e test del DNA.

I marcatori molecolari si ottengono mediante tecniche particolari che, sostanzialmente ripropongono il meccanismo di riconoscimento dei tratti omologhi del DNA; vengono rilevati mediante tecniche di biologia molecolare che si diversificano tra loro solo per il modo in cui intervengono sulla struttura e sul meccanismo di replicazione della molecola del DNA.

Le tecniche più utilizzate sono l'ibridazione e l'amplificazione: i marcatori basati sul processo di ibridazione tipo *Southern Blot* sono gli **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), e **VNTR** (*Variable Number of Tandem Repeat* o Minisatelliti); quelli basati sull'amplificazione sono i **RAPD** (*Random Amplified Polymorphic DNA*), **AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) e **SSR** o microsatelliti (*Simple sequence repeat*) (Tab.3).

Caratteristiche	RFLP	RAPD	SSR	AFLP
PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO	Endonucleasi 'Southern Blotting Ibridazione con sonde'	Amplificazione con primer random	Amplificazione di sequenze semplici ripetute	Amplificazione frammenti di DNA legati ad adattatori
TIPO DI POLIMORFISMO	Inserzione o delezione di basi azotate	Inserzione o delezione di basi azotate	Lunghezza sequenza ripetuta	Inserzione o delezione di basi azotate
GRADO DI POLIMORFISMO	Medio (2-4 alleli)	Medio (2-5 alleli)	Alto (6-10 alleli)	Medio (2-4 alleli)
ABBONDANZA	Alta	Molto alta	Medio-alta	Molto alta
ALLELISMO	codominanti	dominanti	codominanti	dominanti/codominanti
QUANTITÀ DI DNA	2-10 µg	10-25 ng	25-50 ng	0,2-1µg
QUALITÀ DI DNA	Alta	Media	Bassa	Alta
NECESSITÀ SEQUENZA DNA NOTA	no	no	sì	no
COSTO	Alto	Basso	Alto	Medio
METODO RADIOATTIVO	sì/no	no	sì/no	sì/no
TRASFERIBILITÀ	sì	no	sì	no

(da Pancaldi, 1998)

Tab. 3: Confronto tra i principali marcatori molecolari

A) MARCATORI BASATI SULL'IBRIDAZIONE

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Questa analisi si basa su due tecniche largamente utilizzate nella moderna biologia molecolare: la digestione del DNA per mezzo di enzimi di restrizione e il trasferimento del frammento di DNA su un filtro di nylon o nitrocellulosa dove viene

ibridato a sonde marcate di diversa origine (Brettschneider, 1998). Si tratta di una tecnica che permette di evidenziare variazioni nella lunghezza dei frammenti di DNA che si producono dopo digestione del DNA stesso con enzimi di restrizione. Questi ultimi sono endonucleasi, prodotte da diversi microrganismi, che riconoscono sequenze nucleotidiche specifiche (generalmente di 4 o 6 basi) e che tagliano il DNA in corrispondenza o nelle vicinanze di queste sequenze.

La diversa lunghezza dei frammenti di restrizione può essere attribuita al cambiamento di una singola base avvenuta nel sito di riconoscimento dell'endonucleasi di restrizione utilizzata, oppure ad eventi che coinvolgono il riarrangiamento di più basi (inserzioni, delezioni, inversioni e traslocazioni).

I frammenti di DNA così ottenuti vengono separati in base al loro peso molecolare, mediante elettroforesi su gel di agarosio, e visualizzati mediante ibridazione con sonde marcate con sostanze radioattive o chemiluminescenti. L'ibridazione avviene tra la sonda marcata e le sequenze complementari di DNA denaturato e immobilizzato su una membrana di nylon, che messa a contatto con una lastra fotografica per raggi X, mette in evidenza le bande che corrispondono ai frammenti del DNA iniziale con sequenze omologhe a quelle della sonda marcata utilizzata.

Gli RFLP sono marcatori codominanti; il loro vantaggio risiede nel fatto che permettono di generare un numero illimitato di polimorfismi, semplicemente variando le combinazioni sonda-enzima e sono fortemente affidabili e ripetibili nei risultati. Tuttavia si tratta di una tecnica complessa e costosa, che nel caso di specie di piante superiori con genotipi complessi richiede una elevata quantità di DNA (Pancaldi, 1998). La tecnica presenta costi elevati ed è piuttosto laboriosa, inoltre richiede l'uso di traccianti radioattivi per l'individuazione del polimorfismo, anche se oggi sono disponibili altri sistemi che prevedono la marcatura delle sonde con molecole chemiluminescenti come la digossigennina (Palombi, 2000; Palombi e Damiano 2002).

B) MARCATORI BASATI SULL'AMPLIFICAZIONE

Lo sviluppo di questi marcatori è avvenuto in seguito alla scoperta della reazione a catena della polimerasi (PCR), inventata e messa a punto da Mullis nel 1993, che rappresenta una pietra miliare delle analisi genomiche; è un metodo

attraverso il quale un filamento di DNA, delimitato da due sequenze riconoscibili per omologia da oligonucleotidi sintetici, detti *primer* o inneschi, può essere amplificato in maniera esponenziale *in vitro*. La reazione avviene in presenza di una polimerasi stabile alle alte temperature, detta *Taq-polimerasi*, estratta dal batterio *Thermus aquaticus* (Pancaldi, 1998). La reazione prevede la preparazione di una miscela di reazione costituita da DNA da amplificare, 2 *primer* (oligonucleotidi a singola elica), l'enzima DNA polimerasi, una miscela di quattro basi presenti nel DNA e un apposito buffer.

L'enzima utilizza DNA a singola elica come stampo per la sintesi dell'elica complementare (in direzione 5'-3'). Per iniziare l'amplificazione è necessario un frammento di DNA a singola catena, detto *primer*, omologo all'estremità 3' della catena da duplicare. E' un processo ciclico nel quale il numero di copie del DNA bersaglio raddoppia ad ogni ciclo, poiché il prodotto di estensione di ciascun innesco o *primer* funziona da stampo per l'altro innesco nel ciclo successivo. In ciascuno dei segmenti di DNA a doppia elica in esame, i due filamenti vengono separati mediante riscaldamento (94 °C) ed in seguito raffreddati per consentire ai *primer* di legarsi ad essi. Nella fase successiva la DNA-polimerasi provoca l'estensione degli inneschi, aggiungendo nucleotidi alle catene. In questo modo si possono produrre numerosi duplicati dei filamenti della molecola di DNA bersaglio (Mullis, 1991).

Ogni ciclo di PCR avviene in tre fasi: una denaturazione a caldo (94-96 °C) per consentire l'apertura della catena di DNA e quindi la separazione dei due filamenti complementari che la compongono; nella seconda fase, detta di *annealing* o accoppiamento, la temperatura è mantenuta a 36-60 °C in funzione della temperatura di melting del *primer*, ed ha luogo l'appaiamento dei *primer* con i singoli filamenti di DNA-stampo; il ciclo termina con l'estensione (72 °C) cioè sintesi di un nuovo filamento da parte della DNA polimerasi, aggiungendo a ciascun filamento i nucleotidi complementari. La ripetizione di un ciclo per 30-40 volte dà origine all'amplificazione del segmento di DNA definito dagli estremi 5' degli inneschi. Ad ogni ciclo si raddoppia la quantità del segmento di DNA sintetizzato. Si ha pertanto, una crescita esponenziale del frammento di DNA iniziale definito dai due inneschi: al termine di un'amplificazione di n cicli si può ottenere un numero massimo teorico di molecole di DNA a doppia elica pari a 2^n .

In origine tale tecnica era stata concepita per individuare eventuali mutazioni all'interno di un genoma, ma successivamente ha avuto un più vasto campo di applicazioni (Aert *et al.*, 1998).

La reazione a catena della polimerasi costituisce il meccanismo di base per l'ottenimento di diversi marcatori molecolari. Dalla scelta degli inneschi o *primer* dipende il tipo di marcatore che si vuole ottenere (RAPD, microsatelliti o SSR, AFLP ecc.).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Rispetto ad una normale PCR, questi marcatori richiedono l'impiego di un solo *primer* decamerico a sequenza casuale, avente un contenuto in GC superiore al 60% per ottimizzare l'appaiamento. Essendo i *primer* a corta sequenza, trovano numerosi siti di attacco sul DNA. La perdita di un sito di aggancio o il suo allontanamento determina l'impossibilità di amplificazione e quindi la comparsa di un polimorfismo che, per i RAPD, è di tipo dominante (presenza o assenza di banda) (Palombi, 2000). E' il metodo che ha avuto maggiore utilizzo. L'analisi richiede una piccola quantità di DNA genomico di partenza, ha un elevato potere discriminante, non richiede informazioni sulla sequenza bersaglio del DNA, è rapida e realizzabile con costi ridotti.

I prodotti di amplificazione vengono separati tramite elettroforesi, colorati con bromuro di etidio ed evidenziati alla luce UV sotto forma di bande (Sansavini *et al.*, 1995), (Andrews, 1990).

Tuttavia i RAPD presentano dei limiti nella ripetibilità dell'amplificazione e possono dare risultati diversi in funzione del tipo di estrazione del DNA, della concentrazione dei reagenti, dalla qualità del materiale utilizzato; inoltre sono marcatori dominanti, quindi non discriminano le progenie eterozigote da quelle omozigote dominanti, sono pertanto meno informativi rispetto ad altri marcatori (Pancaldi, 1998).

Il polimorfismo di tipo RAPD è stato utilizzato in numerose specie ornamentali, ortofrutticole ed arboree. I marcatori RAPD si sono rivelati efficaci nell'evidenziare l'effetto della coltura *in vitro* sulla stabilità genetica delle piante di fragola rigenerate (Monticelli *et al.*, 2002). Nel IV convegno sulla Peschicoltura Meridionale del 2003 sono stati riportati molti lavori relativi al *fringerprintig* (impronta genetica) del pesco e diversi sono stati i marcatori utilizzati a questo

scopo: RAPD, AFLP e SSR. La maggior parte delle mappe di pesco è stata, infatti, costruita utilizzando quasi esclusivamente RAPD e AFLP (Gentile e Quarta, 2003). L'analisi mediante tecnica RAPD è stata utilizzata anche da Pasquali e dal suo gruppo di lavoro nel 2003 per studiare la patogenicità e la compatibilità vegetativa in 33 isolati di *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* ottenuti da lattuga colpita da tracheofusariosi (Pasquali *et al.*, 2003). Analisi RAPD sono state condotte per verificare in modo rapido ed efficiente la natura ibrida in progenie F₁ derivanti da incroci interspecifici in *Limonium* spp. (Bruna *et al.*, 2002) e in *Alstroemeria* (De Benedetti *et al.*, 2000).

MICROSATELLITI (SSR - Simple Sequence Repeats)

Con questo termine vengono indicate regioni di DNA, caratterizzate dalla ripetizione in tandem di una stessa sequenza di basi azotate (Tautz, 1989; Tautz, 1993), costituita da 1-6 nucleotidi e ripetuta un numero variabile di volte. Queste sequenze sono presenti nei genomi di tutti gli organismi eucarioti, tuttavia le loro funzioni non sono note; probabilmente sono delle porzioni di DNA non codificante (*junk DNA* o DNA spazzatura) che presentano un elevato grado di variabilità all'interno della stessa specie; tale polimorfismo è dovuto alla diversa lunghezza del motivo ripetuto (Ciofi *et al.*, 1998). Generalmente le ripetizioni di dinucleotidi costituiscono i microsatelliti più comuni; nei genomi vegetali il dinucleotide più ripetuto è (AT)_n (Smulders *et al.*, 1997); il numero di ripetizioni è variabile, ed in generale il grado di polimorfismo aumenta con la lunghezza totale del microsatellite (Weber, 1990).

Inizialmente l'analisi mediante SSR era basata sulla tecnica dell'ibridazione: il DNA veniva digerito con enzimi di restrizione e poi ibridato con sonde a sequenza ripetuta. Recentemente si è dimostrata più conveniente la tecnica dell'amplificazione utilizzando coppie di *primer* in grado di riconoscere e amplificare la regione microsatellite.

Una sequenza viene prima amplificata in PCR con *primer* complementari alle regioni fiancheggianti il microsatellite stesso, a monte e a valle, lunghi a sufficienza (18-24 bp) da avere un'amplificazione specifica per questo *locus*. Il polimorfismo dei microsatelliti viene visualizzato tramite elettroforesi dei prodotti di amplificazione, poiché la diversa lunghezza dei segmenti influenza la loro velocità di migrazione (Sansavini *et al.* 1997).

I microsatelliti sono considerati attualmente tra i marcatori molecolari più interessanti e versatili, poiché sommano molti pregi che altri marcatori hanno solo in parte: sono molto abbondanti, sono molto polimorfici in quanto ogni *locus* può presentare anche una ventina di alleli (Tautz, 1989), sono marcatori codominanti, sono *loci* veri perché sono ottenuti da amplificazioni PCR in cui si usano *primer* specifici che amplificano una determinata regione del genoma, la tecnica di identificazione è assolutamente riproducibile (Testolin *et al.*, 1998).

Per poter utilizzare un microsatellite come marcatore è necessario isolarlo nel genoma, clonarlo e sequenziarlo, avendo cura di conservare anche una regione che lo fiancheggia a monte e a valle, per poter disegnare dei *primer* specifici. Il processo è impegnativo ed ha un costo elevato, anche se negli ultimi anni si è diffuso l'uso di sequenziatori automatici che ha notevolmente semplificato il procedimento.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

Gli AFLP si basano sulla combinazione di due tecniche usate per la generazione di marcatori molecolari: la digestione con enzimi di restrizione, propria degli RFLP, e la PCR, usata per molti altri marcatori.

Gli AFLP consistono nell'amplificazione selettiva, tramite PCR, di frammenti di DNA, precedentemente digeriti con enzimi di restrizione, ai quali vengono legati degli adattatori specifici, che terminano con una sequenza complementare al sito di restrizione (Vos *et al.*, 1995). A questo punto si amplifica con PCR; i *primer* utilizzati per l'amplificazione sono complementari agli adattatori, ma con 2-3 basi azotate (basi selettive) in più all'estremo 3' (in questo modo si amplificano solo alcune parti dei frammenti di DNA). Utilizzando combinazioni di *primer* con differenti basi selettive o impiegando enzimi di restrizione diversi ed i loro adattatori corrispondenti, si dispone di un numero virtualmente illimitato di marcatori (Garcia-Mas *et al.*, 2000). Infine i frammenti amplificati vengono separati mediante elettroforesi su gel di sequenza in poliacrilamide (Andrews, 1990), anche se al momento è molto diffusa la separazione mediante sequenziatori automatici.

Se confrontati con la più diffusa tecnica RFLP, gli AFLPs sono più veloci da ottenere, meno complicati e forniscono un numero più elevato di informazioni; un ulteriore vantaggio rispetto ai RAPD è rappresentato dalla loro riproducibilità (Matthes *et al.*, 1998).

Gli AFLP sono altamente polimorfici e riproducibili, inoltre la tecnica permette di produrre marcatori dominanti e codominanti; tuttavia è necessario avere a disposizione elevate quantità di DNA di ottima qualità, cioè privo di contaminanti che possono inibire gli enzimi di restrizione.

4. LA CARATTERIZZAZIONE DEL GENERE *HYDRANGEA*: STATO DELL' ARTE

Nel tempo il genere è stato largamente studiato da numerosi botanici; la classificazione di McClintock è la più recente ed è considerata la più completa. Tuttavia ad oggi sono ancora poco esaustivi gli studi condotti al fine di approfondire la conoscenza dell'origine e della natura genetica dei diversi genotipi. La caratterizzazione morfologica e genetica delle risorse genetiche disponibili è fondamentale per una corretta gestione del germoplasma, e per un efficace programma di miglioramento genetico questo si presenta come un limite. Inoltre, come testimoniano le vaste collezioni conservate presso i diversi repository, sia in Oriente, che negli Stati Uniti e in Europa, alle diverse specie afferenti al genere *Hydrangea* appartiene un numero molto elevato di *cultivar* diverse; tuttavia si suppone che fra queste ci siano numerosi casi di omonimie e sinonimie.

E' necessario, per una valida e corretta gestione e conservazione del germoplasma e per risolvere i problemi suddetti, che essa sia accompagnata da dettagliati studi sulla diversità.

Tali studi richiedono come punto di partenza la selezione di appropriati sistemi di marcatori; sono state applicate tecniche di distinzione varietale basate su osservazioni di caratteri morfologici, isoenzimatici e molecolari.

Gli studi condotti sottolineano la necessità di un numero elevato di marcatori per una identificazione certa delle *cultivar*, quindi allo scopo risultano più idonei i marcatori molecolari, rispetto agli isoenzimi; i marcatori basati sull'analisi del DNA hanno, rispetto ai marcatori isoenzimatici, numerosi vantaggi, incluso il fatto che non sono influenzati dall'ambiente, possono essere ricavati da qualsiasi tipo di tessuto ed a qualsiasi stadio di sviluppo; inoltre i marcatori che si possono ottenere sono molto più numerosi.

A partire dal 1975, al Gaston Allard Arboretum ad Angers in Francia, è stata allestita una collezione UPOV di *Hydrangea*, la più importante risorsa genetica in Europa di questa specie, grazie al contributo scientifico dell'*Istitut National d'Horticulture*. Inizialmente, costituita da 40 accessioni, oggi questa collezione è arrivata a comprendere circa 700 genotipi, conservati in due differenti giardini, uno situato nella città di Angers e l'altro nella zona periferica. La collezione comprende 16 specie, secondo la classificazione di McClintock (1957), originarie del continente asiatico e del nord e sud America (Bertrand, 2000). All'interno della collezione, la principale specie è rappresentata da *H. macrophylla* Ser., con circa 350 *cultivar*. Sulle piante presenti in questa collezione, Bertrand ha effettuato un'analisi multidimensionale per una prima caratterizzazione morfologica di alcuni genotipi, prendendo in considerazione 33 caratteri, di cui 28 qualitativi e 5 quantitativi; tale analisi ha permesso di evidenziare la presenza di alcuni ibridi e di separare e caratterizzare due sottospecie di *H. macrophylla* (*serrata* e *macrophylla*). Successivamente (Lambert *et al.*, 2000), al fine di caratterizzare ulteriormente le *cultivar* presenti in collezione e migliorarne la gestione, gli stessi genotipi sono stati sottoposti ad analisi isoenzimatica, così da evidenziare duplicazioni ed errori di cartellinamento delle piante.

I dati raccolti con la caratterizzazione morfologica insieme all'applicazione di marcatori di tipo RAPD, sono stati utilizzati per confermare la natura ibrida della progenie ottenuta attraverso *embryo rescue* dall'incrocio interspecifico *H. macrophylla* 'Kardinal' x *H. paniculata* 'Brussels Lace' (Reed *et al.*, 2001). Con lo scopo di valutare la possibilità di ibridare *H. involucrata* con *H. paniculata* e *H. arborescens*, per combinare la resistenza al freddo con alcune caratteristiche ornamentali, come il colore del fiore, gli ibridi ottenuti sono stati verificati attraverso l'impiego di marcatori molecolari RAPD, la conta dei cromosomi somatici e con la comparazione morfologica tra ibridi e parentali (Jones e Reed, 2005; Jones e Reed, 2006). In particolar modo, gli ibridi tra *H. arborescens* x *H. involucrata*, attraverso analisi RAPD, mostrano un *patterns* di bande in comune ad entrambi i parentali, e bande in comune al solo parentale maschile. In aggiunta, il numero di cromosomi e la valutazione morfologica, confermano l'effettiva ibridità di queste progenie (Jones e Reed, 2006). Kudo (Kudo *et al.*, 2008) ha ottenuto ibridi interspecifici fra *H. scandens* ssp. *chinensis* e *H. macrophylla* 'Blue Ring' la cui natura ibrida è stata

chiaramente confermata dall'analisi con *primer* RAPD e caratterizzazione morfologica.

I marcatori molecolari si sono rivelati un valido strumento nell'identificazione di genotipi appartenenti alle diverse specie di *Hydrangea* e nel chiarire le relazioni esistenti fra le stesse. L'analisi condotta da Lindstrom (Lindstrom *et al.*, 2003) su alcune cultivar di *H. macrophylla* con marcatori RAPD ha evidenziato la stretta relazione genetica esistente fra queste.

La caratterizzazione genetica è essenziale nella gestione del germoplasma, ma le relazioni genetiche all'interno del genere *Hydrangea* sono pressoché sconosciute. In un lavoro pubblicato da Mortreau (Mortreau *et al.*, 2003) sono riportati i risultati relativi alla riproduzione e alla realizzazione di incroci tra specie e sottospecie, studiando anche la vitalità degli ibridi. Per questo studio sono stati usati i marcatori ISSR (*inter-simple sequence repeat*), i quali si sono rivelati molto utili nell'identificazione di alcuni cloni presenti in una collezione e per chiarire le relazioni genetiche esistenti fra le diverse *cultivar*.

La caratterizzazione morfologica insieme all'applicazione di marcatori molecolari, è stata impiegata per identificare quattro accessioni sconosciute di *Hydrangeaceae*, che presentano una morfologia fogliare differente da *H. anomala* var. *petiolaris* e *Schizophragma hydrangeoides*, ma che crescono adiacenti ad entrambe le specie, nella provincia di Jeju, in Corea, tali da poter considerare queste accessioni come putativi ibridi interspecifici tra le due specie (Joung *et al.*, 2010). Per identificare queste accessioni sconosciute, dall'ambiente naturale sono state raccolte 29 accessioni di *Hydrangea* e *Schizophragma*, che sono state analizzate mediante le caratteristiche morfologiche delle foglie e degli apici del germoglio e mediante marcatori RAPD e SNPs del gene *rbcL* (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Sulla base dell'analisi RAPD, SNPs e delle caratteristiche morfologiche, le accessioni sconosciute sono state identificate come *H. anomala* var. *petiolaris*. I campioni di *Schizophragma hydrangeoides* raccolti sull'Isola di Ulleung (Corea) sono raggruppati insieme a quelli raccolti in Giappone, evidenziando la vicinanza geografica di queste due popolazioni. I marcatori RAPD, supportati dall'analisi SNP, sono risultati efficaci per l'identificazione delle quattro accessioni sconosciute.

Inoltre, con lo scopo di descrivere ed analizzare le relazioni tra le specie conservate al Gaston Allard Arboretum di Angers in Francia è stata effettuata

un'analisi mediante citometria del contenuto di DNA e della composizione di base nelle 16 specie e sottospecie di *Hydrangea*, in relazione al loro numero di cromosomi. Questo primo approccio è stato completato con uno studio sul cariotipo delle specie economicamente più importanti, in particolare *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* (Cerbah *et al.*, 2001). Questo rappresenta una base per ulteriori analisi del genere al fine di indagare le relazioni filogenetiche e di elaborare futuri programmi di *breeding*, così da introdurre nuovi caratteri originali. Tale lavoro è importante perché gli studi relativi alla dimensione del genoma rappresentano un efficace parametro tra gli strumenti molecolari da impiegare nel miglioramento delle caratteristiche agricole ed orticole della specie.

La prima analisi genetica completa applicata ad un numero più elevato di *cultivar*, è stata effettuata da Rinehart nel 2006 (Rinehart *et al.*, 2006). Infatti al fine di studiare le relazioni tra le diverse specie e sottospecie di *Hydrangea*, sono stati utilizzati gli SSR, dimostrando la loro utilità in lavori di identificazione delle specie e nella conservazione del germoplasma. Da quattro genoteche, create sulla base del DNA genomico di *H. macrophylla* e *H. paniculata*, sono state ottenute 288 coppie di *primer*, testati su 18 DNA diversi, rappresentanti di 8 specie di *Hydrangea*. Di questi, 14 hanno evidenziato loci polimorfici in tutti i campioni. L'analisi è stata poi estesa ad altri genotipi, 85 campioni. I risultati di questi studi sono supportati dalla classificazione di McClintock. Anche se più campioni sarebbero necessari per uno studio definitivo sulla tassonomia, i marcatori SSR impiegati sono sufficienti a determinare in maniera inequivocabile le specie testate.

Rispetto al lavoro precedente, Reed e Rinehart (Reed e Rinehart, 2007), impiegano nel loro studio un numero più elevato di SSR e di *cultivar*, così da analizzare in maniera più approfondita la diversità genetica in *H. macrophylla*, in particolare modo per studiare le relazioni all'interno e tra *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* e *H. macrophylla* ssp. *serrata*. In questo studio, sono utilizzate 87 *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*, 20 *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *serrata* e come *outgroup* 3 genotipi di *H. scandens* (L.f.) Ser. e 39 loci SSR. Si osserva una maggiore diversità genetica all'interno di *H. macrophylla* ssp. *serrata* rispetto a *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*: questo senza dubbio è imputabile al fatto che molte *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *serrata* sono state selezionate in natura, mentre molte delle *cultivar* dell'altra sottospecie sono state sviluppate attraverso l'attività di *breeding*, impiegando un numero ristretto di *cultivar* originali.

Successivamente Reed e Rinehart, utilizzano con successo i marcatori SSR, in particolare 26, al fine di studiare la diversità genetica tra 36 *cultivar*, ibridi e specie selvatiche di *H. paniculata* Sieb., prestando particolare interesse nel rettificare e correggere un'eventuale confusione fra sinonimi ed errori di cartellinamento. Questo studio fornisce informazioni sulle relazioni tra le *cultivar* in oggetto e su potenziali fonti di germoplasma non sfruttate nel miglioramento di questo popolare arbusto. Tali informazioni rappresentano importanti indicazioni per i *breeders*, i quali sono alla continua ricerca di nuove e innovative forme di *H. paniculata* (Reed e Rinehart, 2009).

Nonostante oggi siano disponibili un elevato numero di *cultivar* di *H. macrophylla*, poche informazioni riguardo al comportamento riproduttivo di questa specie sono state pubblicate. L'impollinazione nelle forme *mophead* di *H. macrophylla* è spesso limitata dal basso numero di fiori fertili presenti in una singola infiorescenza. Infatti secondo McClintock (1957), i fiori sterili usualmente sono costituiti dal solo calice allargato: in *H. macrophylla*, in cui le infiorescenze producono pochi fiori fertili, i fiori sterili possono avere petali, stami e pistilli. Sono state osservate antere con abbondante polline in fiori sterili non solo nelle *cultivar mophead*, ma anche nelle forme *lacecap*, in cui i fiori fertili sono molto più numerosi rispetto ai fiori sterili. Sebbene i vistosi fiori *mophead* siano spesso considerati sterili, in realtà molti producono antere con polline completamente funzionale (Reed, 2005).

Per quanto riguarda l'auto-incompatibilità, questa è definita come l'incapacità di una pianta provvista di funzionali gameti maschili e femminili, di produrre seme quando auto-impollinata (Brewbaker, 1957). L'auto-incompatibilità gametofitica è determinata dal genotipo del polline e si manifesta attraverso un'inibizione della crescita del tubetto pollinico nello stilo (de Nettancourt, 1977). Nelle specie caratterizzate da auto-incompatibilità gametofitica, il polline germina liberamente sullo stigma, ma il tubetto pollinico non riesce a percorrere tutto lo stilo. L'auto-incompatibilità gametofitica è stata ritrovata in tutte le piante che, come *Hydrangea*, rilasciano il polline in fase di sviluppo. Questo è stato ritrovato da Reed in alcune specie di *H. macrophylla* testate (*H. macrophylla* ssp. *macrophylla mophead* ('All Summer Beauty', 'Dooley', 'Balimer', 'Lemon Zest', 'Madame Emile mouillere', 'Marechal Foch'), *lacecap cultivar* ('Blumaise', 'Kardinal') e *H. macrophylla* ssp. *serrata* 'Kiyosumi').

5. APPLICAZIONI DI TECNICHE COLTURALI INNOVATIVE

Nell'orticoltura e floricoltura c'è una costante esigenza di miglioramento delle produzioni, sia in termini di resa che di qualità, e di riduzione dei costi di produzione per unità di prodotto. L'aumento delle produzioni può essere determinato dall'adozione di soluzioni tecniche diverse o da innovazioni della tecnica di coltivazione. Ad esempio in Olanda, le produzioni per unità di superficie sono pressoché raddoppiate dal 1980 al 2005. Numerosi fattori hanno contribuito a tale crescita: periodo di coltivazione più lungo, concimazione carbonica, introduzione di *cultivar* più produttive, miglioramento delle tecniche colturali e della difesa (Heuvelink e Gonzalez-Real, 2008).

Lo sviluppo di una pianta è un processo influenzato da fattori interni, come ad esempio l'orologio biologico endogeno e l'espressione genica, e da fattori esogeni, tra cui i più importanti sono la luce e la temperatura. La luce è considerata sia fonte di energia, che un importante fattore di regolazione nella vita delle piante. Sostanzialmente tutti i processi fisiologici, dalla emergenza delle piantine alla produzione del frutto, dipendono dalla luce.

Il controllo della luce per scopi agricoli e orticoli ha una lunga storia: inizialmente gli sforzi si focalizzavano sul controllo della quantità di luce, in relazione alle specifiche esigenze di ogni coltura. Ad esempio nelle specie frutticole, gli approcci più comunemente impiegati per migliorare l'intercettazione della luce sono legati al disegno di impianto, alla potatura e alla forma di allevamento scelta. Tuttavia, le piante rispondono anche alla qualità della luce incidente (Shahak *et al.*, 2004a).

Le piante possono percepire la quantità, la qualità e la direzione della luce e usare questa proprietà come segnale per ottimizzare la loro crescita e il loro sviluppo in un determinato ambiente. Le piante mostrano risposte fisiologiche a lunghezze d'onda da 280 a 800 nm, regione dello spettro che comprende la luce visibile ma anche le regioni UV-A e UV-B e l'infrarosso vicino (Fig.14). Oltre al suo ruolo nella fotosintesi, la luce è coinvolta anche nella risposte di fotomorfogenesi, fotoperiodo e fototropismo. Con il termine fotomorfogenesi si intende il controllo, da parte della luce, dello sviluppo e il differenziamento della pianta indipendentemente dalla fotosintesi. Le risposte fotomorfogeniche sono indotte da stimoli luminosi: la pianta riesce a rilevare e analizzare l'intensità e la lunghezza d'onda della luce incidente per

mezzo di fotorecettori con differenti spettri d'azione (Mohr, 1972). Nelle piante sono presenti almeno tre tipi di fotorecettori, coinvolti nelle risposte fotomorfogeniche:

- il **fitocromo**, assorbente più o meno in tutta la banda interessata dalle radiazioni fotobiologiche (280-800 nm). Ha due stati possibili, in equilibrio fotodinamico, che differiscono dai loro massimi di assorbanza (660 e 730 nm) e possono convertirsi da uno stato ad un altro a seconda della lunghezza d'onda della luce assorbita (ad esempio la luce a 660 nm convertirà la forma P_R 660nm nella forma P_{FR} 730nm e viceversa). La forma P_{FR} 730nm è considerata la forma attiva in quanto molti processi fotomorfogenici sono indotti dalla luce rossa. È responsabile nella rilevazione della luce rossa (red R) e rosso-lontano (far-red FR), ma capace anche di percepire la luce blu e UV (Quail *et al.*, 1995);
- uno o più fotorecettori assorbenti nella luce blu e UV-A denominati genericamente **criptocromi** o recettore blu/UV-A. Diverse risposte sono attribuite a questo pigmento, come la biosintesi di alcuni pigmenti, l'apertura degli stomi, l'inibizione dell'allungamento del fusto, il fototropismo, etc. (Batschauer, 1998);
- un ulteriore fotosensore assorbente nella banda dell'ultravioletto (con picco a 290 nm e assenza di risposta a lunghezze d'onda superiori ai 350 nm), detto recettore UV-B (Oren-Shamir *et al.*, 2001).

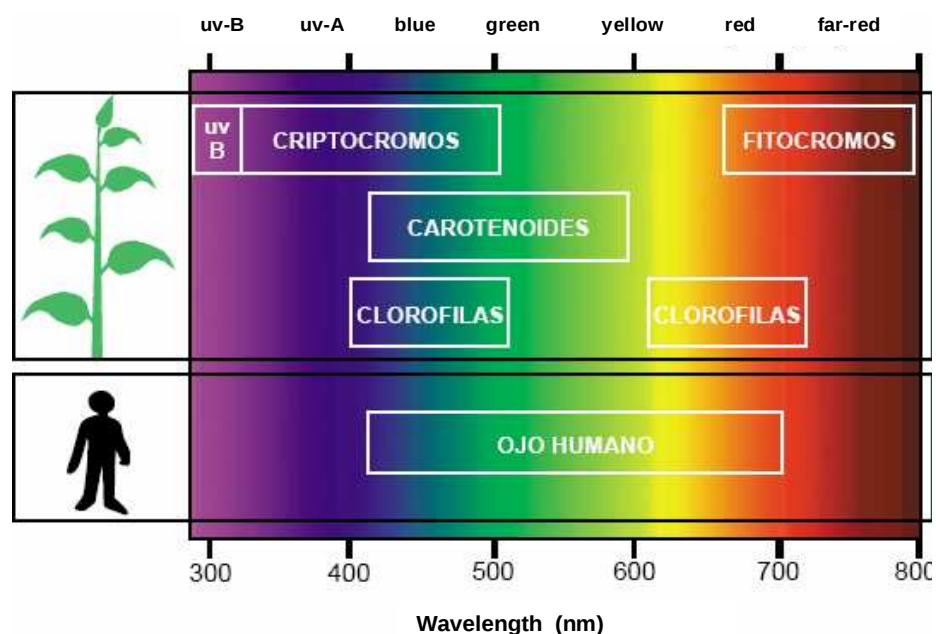


Fig. 14: Spettro della luce visibile cade tra il rosso e il violetto includendo tutti i colori percepibili dall'occhio umano. La lunghezza d'onda della luce visibile nell'aria va dai 380 ai 760 nm.

Da un punto di vista biomolecolare, uno dei sistemi-modello più studiati per comprendere l'effetto della luce sulle piante è costituito dalle piantine eziolate, le quali presentano un insieme di caratteristiche particolari (lunghi internodi, foglie piccole e rudimentali, di colore giallo per lo scarso sviluppo dei cloroplasti e mancata sintesi di clorofilla). Le piante eziolate sono un sistema ideale in quanto modificano la loro crescita molto velocemente quando esposte alla luce (Sofo, lavoro di tesi).

Le piante usano i fotorecettori per percepire e rispondere con precisione ai cambiamenti delle condizioni di luce (Mohr, 1994). Un esempio è il ruolo del fitocromo nel monitoraggio del rapporto R/FR come indicatore della competizione da altre piante, e come iniziatore dei cambiamenti che favoriscono la sopravvivenza delle piante (Kasperbauer, 1994; Smith, 1995).

Per modificare lo spettro della radiazione solare che raggiunge la coltura è possibile ricorrere a film o reti foto-selettive, classificabili in tre principali categorie, a seconda degli obiettivi agronomici perseguibili: controllo della morfogenesi delle piante; difesa fitosarinaria (in quanto il ruolo di specifiche bande di lunghezza d'onda tra 280-400 nm è noto nella riduzione della proliferazione di diverse malattie funginee); film '*heat-blocking*' e '*Heat-barrier*' (film barriera per il calore, che permettono una riduzione sostanziale del carico di calore della serra e rischi minori di stress) (Heuvelink e Gonzalez-Real, 2008). Per quanto riguarda i primi, la modifica della qualità della luce, attraverso l'incorporazione di additivi e coloranti che modificano le proprietà spettrali dei materiali di copertura, rappresenta un'alternativa non chimica al controllo dell'altezza della pianta.

È ampiamente riconosciuto che la risposta delle piante alla luce mediata dal fitocromo è regolata dal rapporto rosso-rosso lontano (R:FR) ed è descritta quantitativamente considerando il fotoequilibrio (ϕ); ϕ è dato dal rapporto tra la forma P_{FR} e la somma delle due forme:

$$\phi = P_{FR} / (P_R + P_{FR}).$$

Quando le piante sono illuminate con la luce solare (R/FR=1), il valore di ϕ è intorno a 0.5-0.6; una diminuzione o aumento del rapporto R/FR determina una variazione nello stesso senso di ϕ . In genere, un aumento del rapporto R/FR provoca una diminuzione delle lunghezze degli internodi ed in molte specie vegetali l'altezza della pianta è inversamente proporzionale a ϕ (cioè, più alto è ϕ , più bassa è la pianta) (Morgan e Smith, 1976). Un basso rapporto R:FR al livello della copertura vegetale induce una morfologia tipica della risposta all'ombreggiamento (*shade-*

type), che può danneggiare il valore commerciale degli ortaggi e la qualità delle piante in vaso e in contenitore.

La presenza di coperture con coloranti che assorbono la luce FR può influenzare non solo l'architettura della pianta, modificando l'incidenza di alcune frazioni (dimensione delle foglie, lunghezza degli internodi) e l'andamento delle ramificazione, ma anche la biochimica all'interno dei tessuti fogliari, l'accrescimento, la ripartizione della sostanza secca, il tempo di fioritura e lo sviluppo florale. Queste risposte sono specie-specifiche ed evidenziano l'importanza di informazioni tecniche circa le lunghezze d'onda filtrate dai diversi materiali (Heuvelink e Gonzalez-Real, 2008).

Diverse sono le tecniche proposte per ridurre gli effetti negativi provocati sulle piante dalle particolari condizioni di illuminazione determinate dal materiale di copertura e dalla elevata densità colturale. Alcune di queste tecniche mirano a modificare il rapporto R/FR:

- 1) nel caso di coltura in serra, scelta di materiali per la copertura o per l'ombreggiamento con proprietà ottiche più favorevoli per la crescita delle piante, cioè capaci di trasmettere la luce R più di quella FR (Moe e Heins, 1990; Rajapakse *et al.*, 1999);
- 2) illuminazione artificiale con lampade ad elevato R/FR;
- 3) impiego di film foto-selettivi (Rajapakse *et al.*, 1999).

È evidente che la più importante innovazione, sarebbe quella di ottenere l'effetto specifico desiderato sul comportamento della coltura, attraverso la scelta di idonei additivi o coloranti, senza influenzare la trasmissione della PAR. In generale, questi materiali dovrebbero diventare disponibili ad un prezzo più contenuto per rendere economicamente possibile un'applicazione di larga scala (Heuvelink e Gonzalez-Real, 2008).

L'impiego delle reti ha tre principali usi in agricoltura: (i) ombreggiamento, come protezione dall'eccesso di radiazione solare; (ii) protezione dagli agenti ambientali, quali venti forti, tempeste di grandine e sabbia; (iii) protezione da uccelli, pipistrelli e insetti. L'approccio delle reti colorate rappresenta un nuovo concetto in campo agronomico, poiché permette di combinare la protezione fisica che la rete offre alla coltura a determinate filtrazioni della luce, in modo da promuovere risposte fisiologiche desiderate. Queste risposte sono quelle che incidono sul valore

commerciale di ogni coltura, tra cui la resa, la qualità e la velocità di maturazione del prodotto stesso (Shahak *et al.*, 2004a; Shahak *et al.*, 2004b).

Le reti più comunemente utilizzate sono di plastica nera e trasmettono la luce uniformemente attraverso la parte visibile dello spettro di luce, agendo quindi come filtri a densità neutra (Oren-Shamir *et al.*, 2001). Generalmente sono in polipropilene (PP) o polietilene ad alta densità (HDPE); sono caratterizzate da una percentuale di ombreggiamento che varia dal 10 al 90%, fattore che rappresenta la capacità delle reti di ridurre la radiazione solare incidente. La percentuale di ombreggiamento viene misurata per mezzo di un luxmetro, così può essere correlata alla lunghezza d'onda di radiazione visibile che si estende da 380 a 760 nm, compreso il range di radiazione fotosinteticamente attiva (PAR), da 400 a 700 nm. La percentuale di ombreggiamento è legata al valore medio della trasmittanza della rete nel campo del visibile, ma non dà informazioni sulla distribuzione spettrale della radiazione in tale intervallo; queste informazioni si possono ottenere misurando la trasmittanza spettrale $\tau(\lambda)$, la quale rappresenta la frazione del flusso di energia radiante incidente trasmessa ad una specifica lunghezza d'onda λ (Scarascia Mugnozza *et al.*, 2011).

La distribuzione della lunghezza d'onda spettrale e la quantità di radiazione solare che passa attraverso la rete influenzano la crescita e la produttività delle piante, coinvolgendo le risposte di fotosintesi, fotomorfogenesi, fototropismo e fotoperiodismo nella pianta (Oren-Shamir *et al.*, 2001).

Rispetto alla rete nera, le reti di colore rosso e giallo riescono a stimolare la crescita vegetativa, quelle di colore blu possono causare nanismo, mentre è stato osservato che le reti grigie in *Pittosporum variegatum* promuovono una maggiore ramificazione, così da produrre piante più cespugliose, caratterizzate da rami corti, foglie più piccole e meno variegate. Reti ombreggianti di colore rosso, la cui efficienza è stata ampiamente dimostrata per *Gypsophila*, *Philodendrum*, *Ruscus*, sembrano influire sull'allungamento degli steli decorativi (ad esempio per le accessioni ritenute idonee per il mercato del fiore reciso), o sull'anticipo di fioritura. Infatti è stato osservato che nelle specie floricole destinate al mercato del fiore reciso, la coltivazione sotto rete colorata, incide anche sulla qualità e sull'epoca di fioritura (Oren-Shamir *et al.*, 2001; Shahak *et al.*, 2002; Priel 2001).

L'uso delle reti colorate è stato valutato in numerose specie ornamentali, coltivate di solito sotto rete ombreggiante nera (Nissim-Levi *et al.*, 2008), vegetali (Fallik *et al.*, 2009; Fallik *et al.*, 2010), alberi da frutto (Shahak *et al.*, 2004a) e

vigneti. In tali reti, durante la fabbricazione, sono incorporati vari additivi cromatici, luce dispersiva ed elementi riflettenti (Ilic *et al.*, 2011). Ad esempio in *Lisianthus* è stato osservato che piante coltivate sotto rete rossa o gialla producono steli di 10 cm più lunghi rispetto a piante cresciute sotto rete nera. Queste piante cresciute sotto rete gialla mostrano anche un peso maggiore; inoltre sotto rete grigia, è stato osservato un maggior numero di steli fioriti per pianta, rispetto alla coltivazione sotto le altre reti. Infatti un importante parametro che incide sul valore commerciale dei fiori recisi, è la lunghezza e il peso dello stelo (Shahak *et al.*, 2004b). Un altro esempio, è rappresentato da piantine di pepe cresciute sotto reti ombreggianti rosse e gialle, che hanno mostrato un rendimento nettamente superiore rispetto alla coltivazione sotto rete ombreggiante nera, senza però ridurre la pezzatura dei frutti (Fallik *et al.*, 2009).

In un recente lavoro (Fritegotto e Vitale, 2012), è stato evidenziato che l'utilizzo di reti foto-selettive, posizionate sopra i tunnel di acclimatazione in vivaio, influisce sullo sviluppo morfologico di piante di ciliegio micropropagate, con risultati positivi specifici per ciascuna combinazione colore-portainnesto. Infatti nelle diverse epoche di ambientamento, da aprile ad agosto, sono state ottenute sotto le diverse reti colorate piante con calibri e allungamenti maggiori rispetto alla normale copertura neutra.

Parte sperimentale

6. MATERIALI

Il presente lavoro di dottorato riguarda parte dell'attività svolta nell'ambito del progetto di ricerca 'Valorizzazione a scopi commerciali del genere *Hydrangea* (acronimo: Hydra)' finanziato dal MiPAAF (Bando Imprese Florovivaismo, D.M. 186 del 1° agosto 2007, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n° 208 del 7/09/2007). Il progetto nasce dalla volontà dell'impresa proponente 'Azienda Meristema srl Società Agricola' di Cascine di Buti (PI) di sviluppare ed ampliare l'utilizzo del genere *Hydrangea*, in virtù delle sue molteplici attitudini non ancora sfruttate dai mercati.

La ricerca oggetto del dottorato si è posta l'obiettivo di acquisire conoscenze quanto più esaustive sulle caratteristiche morfometriche, genetiche ed agronomiche delle diverse accessioni presenti in una collezione di *Hydrangea* allestita presso il CRA-VIV di Pescia. Ulteriore scopo è stato quello di studiare più approfonditamente le metodologie riguardanti le tecniche generali di propagazione e di miglioramento genetico, per un successivo miglioramento delle diverse accessioni presenti in collezione. La ricerca si è articolata in 4 fasi diverse:

- valutazione delle caratteristiche morfometriche di tutte le accessioni inserite in collezione, facendo riferimento ai principali descrittori CPVO-UPOV specifici per il genere *Hydrangea* (CPVO-UPOV, 2011). Tale valutazione è integrata con una caratterizzazione genetica con marcatori molecolari, poiché essi permettono l'identificazione inequivocabile di ciascuna varietà attraverso l'analisi dei profili del DNA;
- applicazione di tecniche colturali sperimentali al fine di indagare sulle possibili *performances* di reti ombreggianti colorate applicate alla collezione di piante di *Hydrangea*. L'impiego di film foto-selettivi ha la capacità di modificare lo spettro della radiazione solare che raggiunge la coltura, influenzando così l'attività fisiologica della pianta e la sua architettura. Questo potrebbe risultare adatto per *cultivar* da destinare alla produzione di fiore reciso o di pianta in vaso;
- valutazione sperimentale di tecniche di propagazione *in vitro* idonee per una produzione di qualità e su larga scala delle accessioni più promettenti di *Hydrangea*, al fine di verificarne l'efficienza produttiva, rispetto alle tradizionali tecniche di propagazione (taleggio). E' stato messo a punto un protocollo standard di micropropagazione, riguardante le seguenti fasi: a) espanto dei meristemi; b) lavaggio e sterilizzazione degli espanti; c) messa in coltura su substrati specifici; d)

fase di moltiplicazione *in vitro*; e) fase di radicazione *in vitro*; f) fase di ambientamento in serra;

- messa a punto di una strategia di *breeding* idonea per lo sviluppo di un futuro programma di miglioramento genetico di *Hydrangea*, attraverso uno studio sulla compatibilità intra ed interspecifica di specie diverse, al fine di ottenere nuovi ibridi con caratteristiche innovative e tali da suscitare interesse nel mercato e nei consumatori.

6.1. ALLESTIMENTO E DESCRIZIONE DELLA COLLEZIONE

L'Unità di Ricerca per il Vivaismo e le Gestione del Verde Ambientale ed Ornamentale (CRA-VIV) si trova a Pescia, città situata al limite nord-orientale della Piana di Lucca e al confine nord-ovest della Valdinievole, in provincia di Pistoia, nella Toscana settentrionale, fra Lucca e Firenze, a 62 m s.l.m. e alle coordinate geografiche 43°54'0''N 10°41'0''E.

Presso questa struttura, facente parte del CRA, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, è stata realizzata tra aprile-ottobre 2010 una collezione di piante appartenenti al genere *Hydrangea*. Tale collezione è stata individuata a partire da specie botaniche asiatiche ed americane, ibridi e *cultivar* di *Hydrangea* già presenti sui mercati, così da confrontarne le caratteristiche agronomiche e valutarne le potenzialità commerciali in nuovi segmenti di mercato.

Le diverse accessioni sono state selezionate presso un'Azienda di Pistoia specializzata in *Hydrangea*, che dispone di oltre 500 accessioni (fra specie botaniche, ibridi e *cultivar*, molte delle quali rare e/o note soltanto ai collezionisti), avvalendosi della collaborazione di alcuni esperti dell'Associazione Amici delle Ortensie di Bolsena. La selezione delle diverse accessioni è stata effettuata sulla base del loro grado d'innovazione, rispetto alle tipologie di *Hydrangea* già presenti sul mercato italiano.

La collezione presente a Pescia è composta da circa 400 piante, comprendenti 66 differenti accessioni appartenenti alle seguenti specie: *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* (*mophead* e *lacecap*), *H. macrophylla* ssp. *serrata*, *H. paniculata*, *H. quercifolia*, *H. anomala* ssp. *petiolaris*, *H. arborescens*, *H. heteromalla*, *H. involucrata*, *H. aspera* e 3 genotipi di *Schizophragma* spp. In Tab.4 è riportato l'elenco completo delle varietà selezionate per la costituzione della collezione: per

ciascuna varietà sono riportate alcune informazioni relative al colore del fiore, al portamento della pianta, alla percentuale di ombreggiamento (richiesta secondo le informazioni presenti in letteratura) ed al pH del terreno.

	Varietà	Colore fiori	Portamento	% ombreg.	pH terreno
<i>H. macrophylla</i> <i>ssp. macrophylla</i> <i>mophead</i>	Bela	Blu	Eretto	70	3.5-4.5
	Elbatal	Blu	Eretto	70	3.5-4.5
	Harlequin	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Alberta	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Dienemann	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Europa	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Lake S. Marcos	Blu	Eretto	70	3.5-4.5
	Endless Summer	Blu/Rosa	Eretto	70	3.5-4.5 5.5-6.5
	White First	Bianco	Eretto	70	3.5-4.5
	Schneebal	Bianco	Eretto	70	3.5-4.5
	San Baronto	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	First Red	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Ayesha	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Masja	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Soeur Thérèse	Bianco	Eretto	70	3.5-4.5
	Intermezzo	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Merveille Sanguinea	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Green Shadow	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Paris	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Ami Pasquier	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Dolce Kiss	Bianco	Eretto	70	5.5-6.5
	Dolce Gipsy	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
<i>H. macrophylla</i> <i>ssp. macrophylla</i> <i>lacecap</i>	Libelle	Bianco	Prostrato	70	3.5-4.5
	Kardinal	Rosso	Eretto	70	5.5-6.5
	Benxi	Bianco	Eretto	70	3.5-4.5
	Lanarth White	Bianco	Eretto	70	3.5-4.5
	Lemon Wave	Bianco	Eretto	70	5.5-6.5
	Hanaby	Bianco	Prostrato	70	3.5-4.5
	Zorro	Blu/Rosa	Eretto	70	3.5-4.5 5.5-6.5
	Miharayama-Yae	Bianco	Eretto	70	3.5-4.5
	Blaumaise	Blu	Eretto	70	3.5-4.5
	Tricolor	Rosa	Eretto	70	3.5-4.5
	Etoile Violette	Lilla	Eretto	70	5.5-6.5
	Grant's Choice	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
<i>H. paniculata</i>	Unique	Bianco	Prostrato	Sole	3.5-4.5
	Phanthom	Bianco	Prostrato	Sole	3.5-4.5

	Vanille Fraise	Rosa	Eretto	Sole	5.5-6.5
	Limelight	Bianco	Prostrato	Sole	3.5-4.5
	Pink Diamond	Rosso	Prostrato	Sole	5.5-6.5
<i>H. macrophylla</i> <i>ssp. serrata</i>	Blue Bird	Blu	Prostrato	Sole	Sensibile
	Stellata	Bianco	Prostrato	Sole	Sensibile
	Warabe	Bianco	Prostrato	Sole	Sensibile
	Yae-no-amacha	Rosa	Prostrato	Sole	Sensibile
	Yao Temari	Rosa	Eretto	Sole	Sensibile
	Miranda	Blu/Rosa	Prostrato	50	3.5-4.5 5.5-6.5
	Amacha	Bianca	Prostrato	70	5.5-6.5
	Mont Aso	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Acuminata	Lillà	Eretto	70	5.5-6.5
	Japonica	Rosa	Prostrato	Sole	5.5-6.5
	Woodlander	Lillà	Prostrato	Sole	Sensibile
	Preziosa	Bianco	Eretto	Sole	5.5-6.5
<i>H. quercifolia</i>	Alice	Bianco	Eretto	Sole	3.5-4.5
	Harmony	Bianco	Eretto	Sole	3.5-4.5
	Snow Queen	Bianco	Eretto	Sole	3.5-4.5
<i>H. anomala</i>	Petiolearis	Bianco	Rampicante	90	3.5-4.5
<i>H. arborescens</i>	Annabelle	Bianco	Eretto	Sole	3.5-4.5
<i>H. heteromalla</i>	Snow Cap	Bianco	Eretto	90	3.5-4.5
<i>H. involucrata</i>	Miharayama Kokonoe Tama	Bianco	Prostrato	90	3.5-4.5
	Yoraku Tama	Bianco	Prostrato	90	3.5-4.5
<i>H. aspera</i>	Macrophylla	Rosa	Eretto	70	5.5-6.5
	Longipes	Bianco	Eretto	70	5.5-6.5
	Mauvette	Bianco	Prostrato	50	5.5-6.5
	Rowallane	Rosa	Eretto	90	5.5-6.5
<i>Schizophragma</i>	Hydrangeoides	Rosa	Rampicante	Sole	5.5-6.5
	Roseum	Rosa	Rampicante	Sole	5.5-6.5
	Moonlight	Bianca	Rampicante	Sole	5.5-6.5

Tab.4: Elenco delle accessioni di *Hydrangea* presenti nella collezione allestita presso il CRA-VIV.

Le diverse accessioni, messe a dimora tra la primavera e l'autunno 2010, sono state collocate inizialmente in un'area appositamente predisposta sotto tre diversi livelli di ombreggiamento nero (50, 70 e 90%), a seconda delle esigenze di luce riportate in letteratura per ogni specifica *cultivar*. Le piante sono state allevate per la maggior parte in vasi di diametro 18 cm e solo alcune in vasi di diametro maggiore (24 e 30 cm), su di un substrato a base di pomice (diametro 6/14) e terriccio universale in rapporto 1:1, con l'aggiunta di Multicote 12 mesi, pH compreso tra 5.5 e 6.5, in base alle informazioni riportate in bibliografia. Riguardo all'irrigazione, è

stato predisposto un sistema a goccia con ugelli autocompensanti con portata di 2 l/h e l'acqua è stata distribuita con 3 irrigazioni giornaliere di 3' ciascuna, nel corso della primavera. Per quanto riguarda il periodo estivo è stato predisposto un sistema aggiuntivo di irrigazione a pioggia con ugelli dinamici 'Dan Verde', da utilizzare durante le ore più calde della giornata, con 2-3 cicli di irrigazione di 3' ciascuna, così da abbassare l'alta temperatura (Fig.15).



Fig. 15: Impianto iniziale della collezione di *Hydrangea* sotto tre differenti livelli di ombreggiamento.

7. METODI

7.1. ANALISI MORFOMETRICA

Sebbene l'impiego di marcatori morfologici sia discutibile dal momento che le caratteristiche fenotipiche delle piante sono fortemente influenzate dalle condizioni ambientali, l'approccio morfologico costituisce il primo passo per la descrizione e la classificazione del germoplasma. I marcatori morfologici o biometrici attualmente rappresentano lo strumento ufficiale per caratterizzare il materiale vegetale in base a criteri di particolarità, uniformità e stabilità. Essi infatti sono stati adottati dall'Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà Vegetali (UPOV) come strumento di caratterizzazione e protezione di nuove varietà a livello comunitario. L'attuazione ed applicazione del regime di protezione comunitaria sono di pertinenza dell'Ufficio Comunitario delle Varietà Vegetali (CPVO). Tali parametri costituiscono quindi la principale risorsa per l'ottenimento di privative in ambito europeo.

Nello specifico si tratta di una serie di parametri di tipo biometrico che individuano in maniera univoca le caratteristiche fenotipiche di una varietà. Tali parametri esistono per tutte le varietà vegetali sia orticole che frutticole che ornamentali.

Al fine di caratterizzare e studiare la diversità e le relazioni delle diverse accessioni presenti in collezione, è stato condotto uno studio di caratterizzazione morfologica sulle singole piante. L'attività di raccolta e catalogazione dei dati morfometrici è iniziata durante il primo anno della ricerca, mentre le osservazioni riguardanti le infiorescenze e le fioriture, sono state aggiunte invece a partire solo dal secondo anno, in quanto inizialmente le piante della collezione presentavano una fioritura ridotta a causa di una precedente e tardiva potatura.

La caratterizzazione morfologica è stata effettuata facendo riferimento alle linee guida UPOV (2011) - '*International Union for the Protection of New Varieties of Plants*', per lo svolgimento delle prove di distinzione, uniformità e stabilità specifiche per il genere *Hydrangea* (UPOV Code: HYDRN).

In particolare, sono stati presi in considerazione 27 descrittori specifici per il genere *Hydrangea*, di cui 16 qualitativi e 11 quantitativi, riportati in Appendice 2. Di

seguito vengono illustrati alcuni esempi di descrittori presi in considerazione per la caratterizzazione morfologica (Fig.16 a, b, c, d, e, f, g, h).

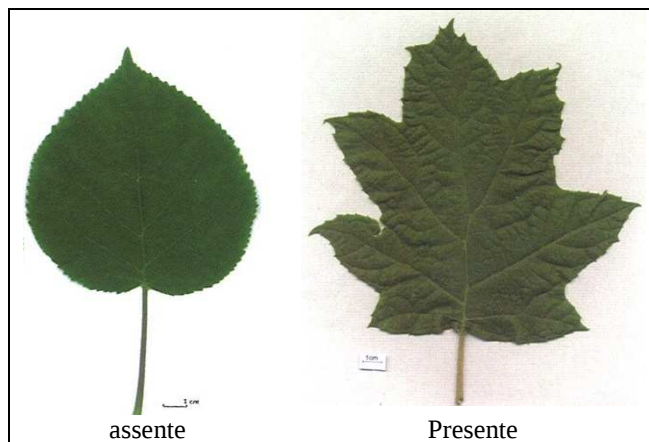


Fig. 16a: Lobatura margine fogliare.

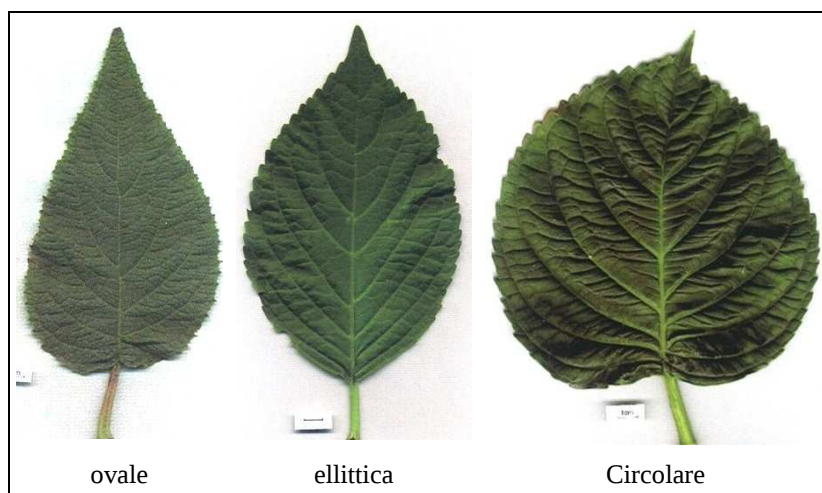


Fig. 16b: Forma lamina fogliare.

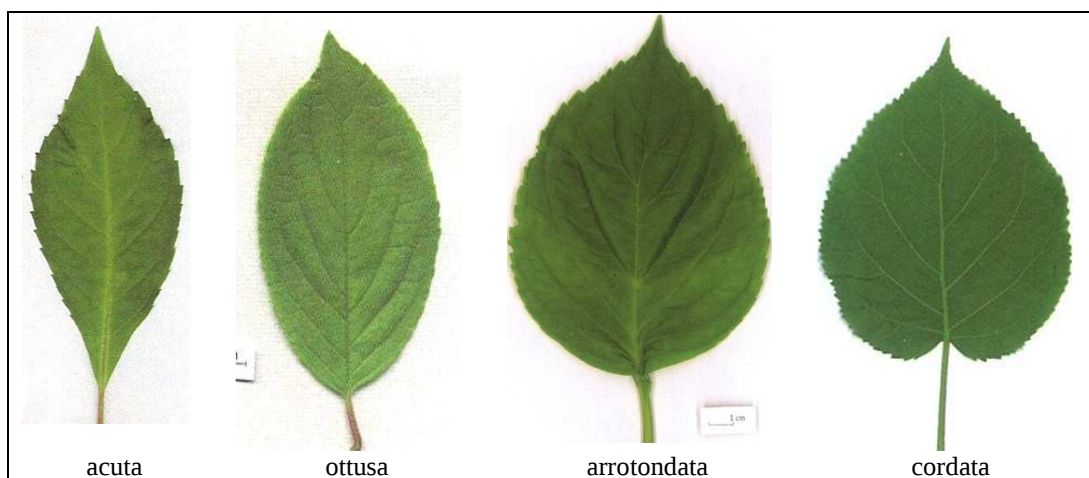


Fig. 16c: Forma base fogliare.



Fig. 16d: Forma infiorescenza.

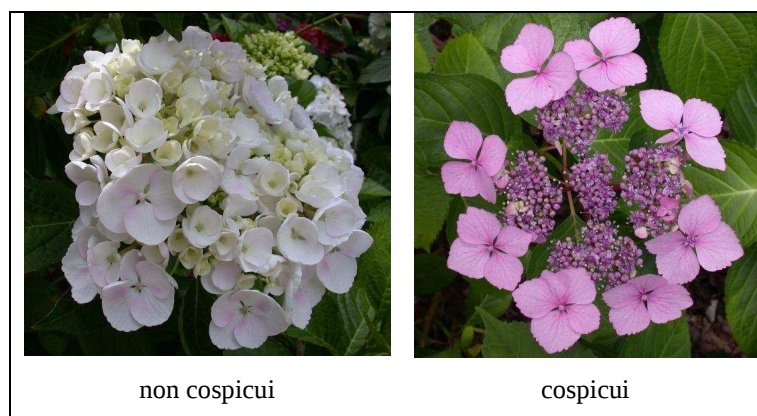


Fig. 16e: Cospicuità dei fiori fertili.

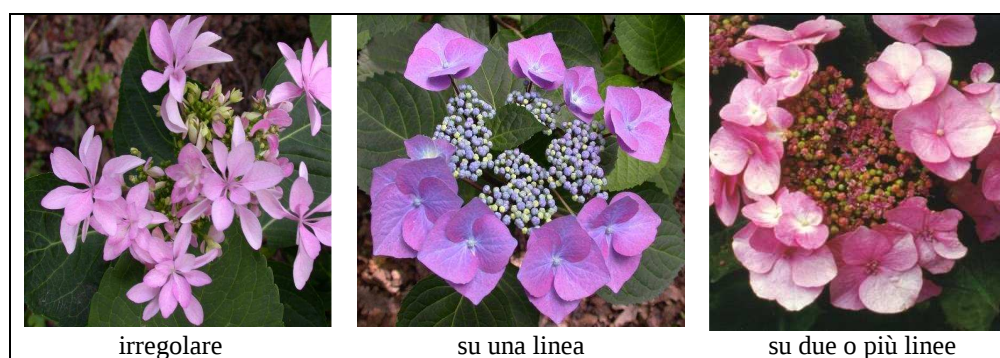


Fig. 16f: Solo per le *cultivar* con infiorescenza *lacecap*: disposizione fiori sterili.

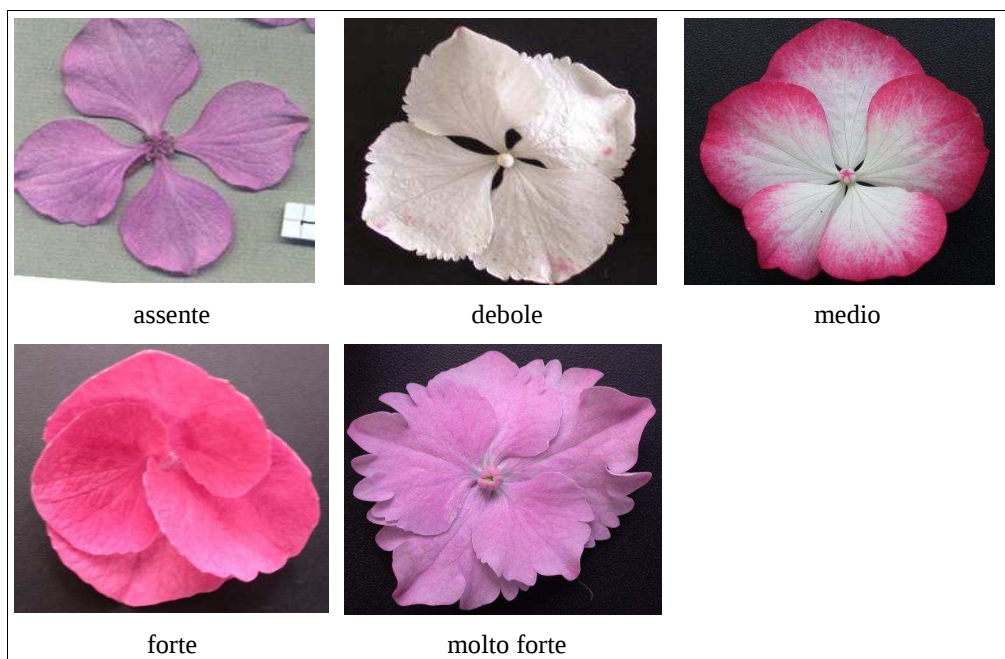


Fig. 16g: Grado di sovrapposizione fiori sterili.

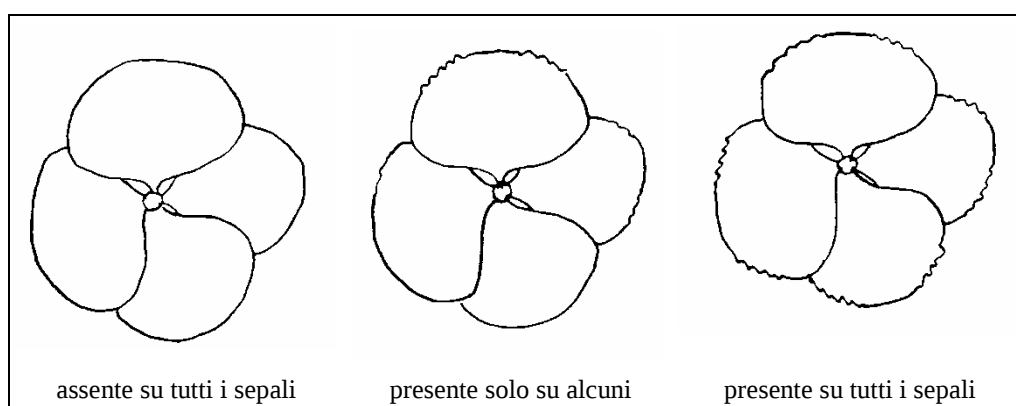


Fig. 16h: Fiori sterili: tipo di incisione dei sepali.

I dati morfometrici raccolti sono stati ordinati in un foglio excel ed analizzati con il software ‘*R computer package version 2.14.0*’ (*R foundation for statistical computer*), per una analisi multivariata per *cluster* (*cluster analysis*).

7.1. ANALISI MOLECOLARE

Nel corso del terzo anno di ricerca, lo studio di caratterizzazione morfologica è stato integrato con una caratterizzazione dei profili genetici, in modo da poter ottenere uno *screening* generale, dato l’elevato numero di accessioni presenti in collezione. Fra le tecniche di distinzione varietale, sono stati scelti i marcatori

molecolari, poiché essi permettono l'identificazione inequivocabile di ciascuna varietà attraverso l'analisi dei profili del DNA. Tale indagine è stata svolta avvalendosi di marcatori molecolari RAPD che costituiscono metodi semplici ed efficaci di *fingerprinting*. E' stato deciso di condurre l'analisi genetica con questi marcatori sia perché impiegati recentemente in studi di caratterizzazione molecolare per identificare accessioni sconosciute di *Hydrangeaceae* (Joung *et al.*, 2010) o per identificare varietà diverse all'interno di *H. macrophylla* (Lindstrom *et al.*, 2003), sia perché l'impiego di altri marcatori come SSR avrebbe comportato un maggior impegno economico.

7.2.1. Estrazione del DNA

Punto di partenza di tale analisi è stata quindi l'estrazione del DNA, dalle foglie giovani e totalmente espanse di tutte le diverse accessioni di *Hydrangea* e dei 3 genotipi di *Schizophragma* spp., utilizzate queste ultime come *outgroup*, congelate e conservate a -80° C.

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il kit di estrazione *Invisorb® Spin Plant Mini Kit* (Invitex-Germany) (Appendice 3). Il funzionamento del kit di estrazione è ottimizzato utilizzando al massimo 100 mg di materiale vegetale. Se si superano le quantità di materiale di partenza raccomandate, la lisi cellulare può risultare ridotta, così come la purezza dei campioni. La quantità di DNA ottenibile varia in base alle dimensioni del genoma ed all'età del campione; generalmente la resa è di circa 3-30 µg per 100 mg peso vivo del campione. Il DNA che si ottiene con questo procedimento arriva fino ad una lunghezza di 40 kb, ma generalmente predominano frammenti di 20-25 kb; frammenti di questa lunghezza si denaturano completamente in PCR e consentono la più elevata efficienza di amplificazione. Il kit di estrazione consiste di una serie di *buffer* contenenti sali, agenti denaturanti e detergenti, che uniti all'omogeneizzato provocano lisi cellulare. Il lisato deve poi essere chiarificato per mezzo della centrifugazione, al fine di rimuovere polisaccaridi e residui cellulari.

Al termine, il DNA viene eluito con un apposito *buffer* o con acqua ed è pronto per essere sottoposto a successive analisi. Una volta eseguita l'estrazione è necessario valutare la quantità di DNA presente in ogni campione per poter mettere a punto con precisione le successive tecniche di amplificazione. La concentrazione del

DNA è stata stimata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0.6% con TBE 1X e bromuro di etidio (1mg/ml), di 5 µl di ogni campione con 2 µl di BBF 6X (blu di bromo-fenolo); dopo la corsa i gel sono stati osservati alla luce UV (*High Performance Ultraviolet Transilluminator* UVP) e la luminosità della banda di ogni campione è stata comparata con quella di un λ DNA di concentrazione nota. Un possibile vantaggio della quantificazione su gel di agarosio è dato dalla possibilità di valutare, contemporaneamente alla concentrazione, le condizioni dell'estratto, cioè lo stato di frammentazione del DNA; infatti, quando i frammenti di DNA sono di dimensioni troppo ridotte, nel gel non è visualizzato come una banda ben definita, ma come *smear*. Tuttavia un limite della tecnica è dato dalla soggettività delle misurazioni, dato che la comparazione dell'intensità delle bande con lo standard è effettuata visivamente. La determinazione è stata effettuata anche per mezzo di uno spettrofotometro *BioRad SmartSpecTM Plus Spectrophotometer*.

7.2.2. Ottenimento di marcatori

La scelta del sistema di marcatori da utilizzare per l'analisi delle relazioni genetiche fra le accessioni in studio dipende dal tipo di informazioni genetiche richieste e dalla capacità del metodo di individuare polimorfismi all'interno di una data popolazione.

Le tecniche che implicano l'applicazione della PCR (*Polymerase chain reaction*) per ottenere marcatori genetici hanno notevolmente ridotto i costi dell'analisi e permettono di individuare un numero più elevato di marcatori, in particolare per quanto riguarda la tecnica RAPD. Nel presente lavoro si è deciso di utilizzare tale tecnica per valutare le relazioni genetiche che intercorrono fra i diversi genotipi considerati. Il DNA per essere amplificato ed analizzato deve essere di buona qualità, privo sia di contaminazioni che di eventuali residui di RNA; questo è molto importante per i marcatori RAPD che prevedono l'impiego di *primer* aspecifici, hanno un elevato potere discriminante ma sono molto sensibili alle condizioni di reazione.

7.2.3. Reazione di amplificazione mediante PCR: analisi RAPD

La tecnica RAPD differisce dalla PCR di tipo specifico fondamentalmente per la presenza di un solo *primer*, formato da 10 nucleotidi di sequenza nota, ma non disegnato in base a sequenze di regioni specifiche del genoma; il *primer random*, favorito da cicli di amplificazione caratterizzati da temperature e tempi di *annealing* (appaiamento) ed estensione sensibilmente diversi da quelli di una PCR specifica, trova complementarietà di sequenza e quindi si lega ai filamenti denaturati del DNA campione in più regioni non conosciute a priori (non in una soltanto come in una PCR specifica). Le successive reazioni di amplificazione, catalizzate dall'enzima *Taq*-polimerasi, portano alla formazione di numerosi marcatori, ossia frammenti di DNA di diversa lunghezza (e quindi diverso peso molecolare) che risultano gli 'strumenti' necessari per stabilire la diversità o la similarità tra individui di una stessa popolazione o tra popolazioni.

L'*annealing* del *primer*, quindi la formazione del marcatore, può avvenire in qualsiasi regione del genoma, in zone codificanti e non, e su una qualsiasi delle componenti genomiche presenti all'interno della cellula, che per quelle vegetali sono costituite da genoma nucleare, mitocondriale (mtDNA) o plastidiale (cpDNA), tuttavia con differente probabilità.

Uno dei potenziali limiti della tecnica RAPD, riportato in letteratura (Meunier *et al.*, 1993), (Welsh *et al.*, 1990), concerne in un deficit di riproducibilità dei marcatori prodotti che non risulterebbero stabili e dunque non affidabili per stimare differenze e quindi variabilità tra campioni.

La riproducibilità della tecnica RAPD si basa sulla stesura di un protocollo la cui affidabilità sia comprovata da un congruo numero di prove e sulla sua fedele esecuzione sia per quanto riguarda la metodologia che i materiali (reagenti e strumenti) utilizzati.

Uno dei fattori in grado di influenzare in maniera determinante l'esperimento e la sua riproducibilità concerne la concentrazione e l'integrità del *template* (DNA copia) utilizzato. Infatti, nonostante l'elevata sensibilità della reazione di amplificazione che permette di utilizzare quantità minime di DNA, è determinante il suo grado di frammentazione; la frammentazione diminuisce la possibilità e la stabilità di *annealing* del *primer* che, nel caso della tecnica RAPD, si traduce in una diminuzione dei marcatori potenzialmente presenti ed in una loro più bassa

riproducibilità. E' quindi fondamentale operare solo su estrazioni di DNA di buon esito, aspetto che può sembrare scontato ma che non sempre è tale, soprattutto quando si opera su tessuti vegetali e si impiegano kit di estrazione, indispensabili per la loro maggiore velocità quando si gestisce un numero elevato di campioni, ma che non garantiscono le rese dei protocolli di estrazione di tipo classico.

Un altro fattore che influenza la reazione di amplificazione è la scelta della quantità di DNA (ng) da amplificare, a seconda della dimensione del genoma dell'organismo studiato, variabile che deve essere stimata empiricamente di volta in volta.

Un altro 'difetto' di estrazione può essere costituito dalla presenza di inibitori derivati da metaboliti secondari cellulari che, nel caso degli organismi vegetali, può essere particolarmente consistente (polifenoli) e che può essere solo in parte mitigato dalle diluizioni.

Per la scelta del *primer*, oltre alla dimensione e complessità del genoma oggetto di indagine, è importante conoscerne il contenuto in GC (guanina+citosina), poiché la formazione tra queste basi azotate di 3 legami a idrogeno, rispetto ai 2 che si formano tra adenina-timina, aumenta la stabilità dell'*annealing* del *primer* durante l'amplificazione. Nel caso dell'organismo studiato, si sono utilizzati *primer random* a differente contenuto in GC, scelti sulla base di precedenti studi. Quelli testati per la caratterizzazione genetica appartengono alla serie OPA e OPB della ditta *Operon* e sono stati scelti in base a precedenti studi e alla loro sperimentazione diretta su *Hydrangea* (Lindstrom *et al.*, 2003; Joung *et al.*, 2010).

Di seguito si riportano la composizione della miscela di reazione utilizzata ed il protocollo sperimentale dell'amplificazione RAPD.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume totale di miscela di reazione di 25 µl contenente i reagenti necessari alle seguenti concentrazioni: *buffer* 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, *primer* 2 µM, *Taq DNA polymerase* (5 Prime) 2 U e 20 ng di DNA.

Le amplificazioni sono state effettuate con un *Mastercycler* (Eppendorf), applicando il seguente protocollo di amplificazione: un primo ciclo di 94 °C per 4', 48 °C per 70" e 72 °C per 2'; per i successivi 45 cicli il DNA è stato denaturato a 94 °C per 45", mantenuto alla temperatura di *annealing* a 48 °C per 70", con una estensione a 72 °C per 2'; l'estensione finale è stata effettuata a 72 °C per 5' e successivamente conservati a 4 °C (Lindstrom *et al.*, 2003). Il protocollo di PCR

sviluppato da Levi nel 1993 su piante legnose, richiede condizioni stringenti per l'*annealing* del *primer* decamerico al DNA, pur mantenendo un sufficiente grado di amplificazione per il rilevamento mediante elettroforesi su gel di agarosio. Invece il protocollo di Lindstrom genera meno prodotti di amplificazione, ma migliora la ripetibilità del *pattern* di bande da una reazione ad un'altra.

Dopo la reazione di PCR, i frammenti amplificati sono stati trasferiti in eppendorf da 0.5 ml e mixati con 3 µl di BBF 6X; successivamente sono stati caricati in un gel di agarosio al 2% con tampone TBE 1X e separati in funzione del loro peso, tramite elettroforesi per circa 3 ore a 90 volts. Al fine di stimare le dimensioni dei frammenti di DNA prodotti mediante PCR, per ogni gel sono stati caricati nei due pozzetti più esterni 6 µl di *marker* 100 bp DNA ladder (5 Prime). I gel sono stati colorati con bromuro di etidio 1mg/ml ed i profili di amplificazione sono stati visualizzati attraverso un transilluminatore a luce ultravioletta (*High Performance Ultraviolet Transilluminator* UVP).

Ogni marcatore generato è contraddistinto da un preciso peso molecolare, che lo rende riconoscibile nei profili di amplificazione di individui diversi. I marcatori più riproducibili sono stati ottenuti con 7 *primer*, riportati in Tab.5. I marcatori che caratterizzano ogni profilo di amplificazione sono stati numerati progressivamente in base al loro peso molecolare (Fig.17, vedi punto a).

Primer	Sequenza 5' to 3'	Contenuto in CG%
OPA-02	TGCCGAGCTG	70
OPA-03	AGTCAGCCAC	60
OPA-04	AATCGGGCTG	60
OPA-13	CAGCACCCAC	70
OPA-14	TCTGTGCTGG	60
OPA-15	TTCCGAACCC	60
OPB-05	TGCGCCCTTC	70

Tab.5: Lista dei *primer* che generano polimorfismi in *Hydrangea*.

Un aspetto fondamentale in questa fase dell'analisi dei dati, risulta essere la coerenza con cui si assegna la numerazione dei marcatori tra campioni diversi; questa operazione è piuttosto agevole tra campioni appartenenti allo stesso gel, meno tra gel diversi. Anche minime alterazioni della migrazione possono risultare di ostacolo nella lettura, nonostante si sia aiutati dalla presenza di *marker* di peso molecolare noto e dalla costanza delle condizioni di elettroforesi e di acquisizione dell'immagine.

Si rende necessario perciò un elevato grado di correzione effettuato direttamente dall'operatore sia per individuare marcatori meno intensi che uno specifico programma potrebbe non riconoscere, sia per interpretare le discordanze tra i valori di peso molecolare assegnati da questo a marcatori evidentemente omologhi.

Per aumentare il grado di sicurezza si sono perciò esclusi quei marcatori per i quali la differenza in paia di basi è risultata al di sotto del grado di risoluzione del gel (20 bp).

Terminata la fase di analisi dei gel, ogni individuo risulta così caratterizzato dalla presenza di alcuni fra i marcatori individuati e numerati tra tutti i campioni analizzati; come riportato in Fig.17 (vedi punto b) è possibile così costruire un vettore di stato presenza/assenza, basato sull'assegnazione del valore 1 alla presenza del marcatore nei profili e dal valore 0 all'assenza di questo.

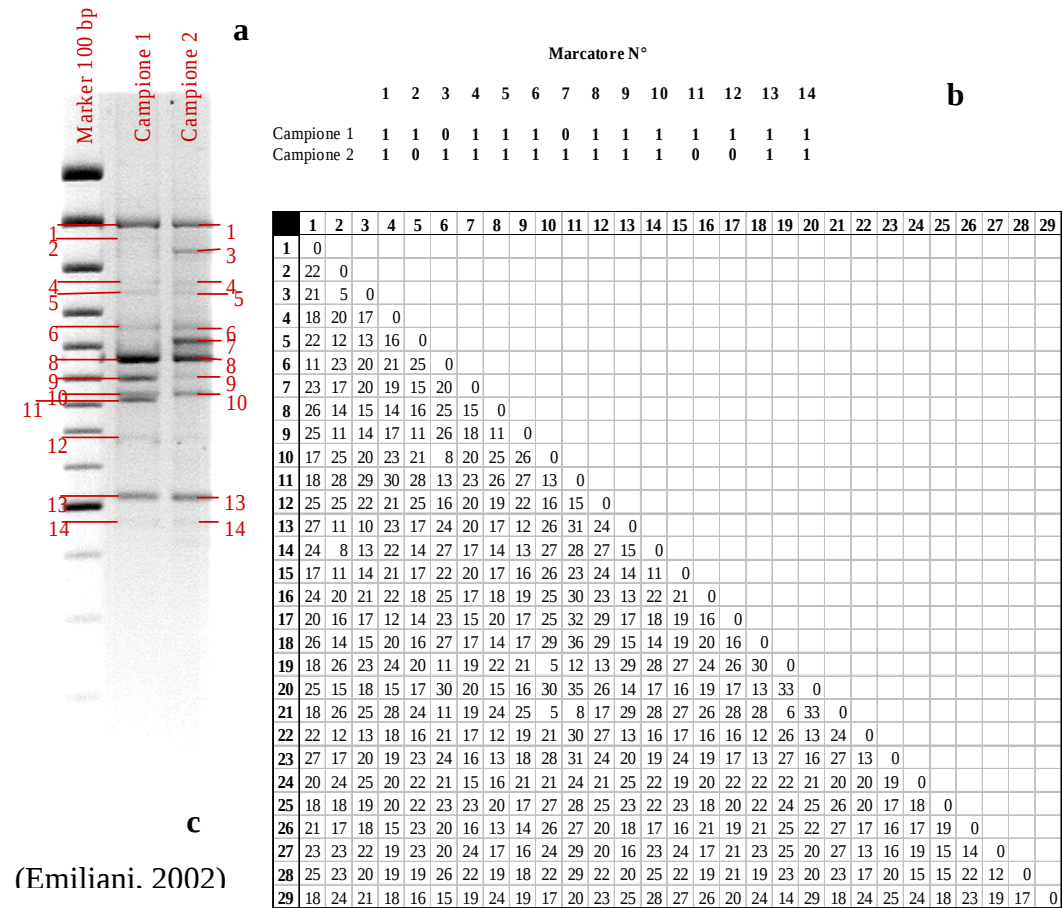


Fig. 17. Esempio di analisi molecolare: a) classificazione dei marcatori sulla base del loro peso molecolare; b) costruzione vettore di stato presenza/assenza; c) matrice delle distanze genetiche.

I vettori di stato presenza/assenza sono stati utilizzati per il calcolo della distanza genetica fra ogni coppia di individui utilizzando la matrice delle distanze euclidea Fig.17 (vedi punto c) definita:

$$E = \varepsilon^2_{xy} = n \{1 - [2n_{xy}(2n)^{-1}]\}$$

dove: n_{xy} = n° di marcatori comuni alla coppia di individui (X e Y)

n = n° di marcatori totali ottenuti.

Questi dati sono utilizzati per calcolare la matrice delle distanze fra i diversi campioni con il coefficiente di Nei. L'analisi dei dati della matrice di similarità è stata realizzata con i programmi MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) ed NTSYS pc2.02 (Exeter Software, Setauket, NY), (Rolfh, 1993), così da ottenere dei dendrogrammi con il metodo dell'algoritmo di Neighbour-Joining (NJ) (Saitou *et al.*, 1987).

7.3. TECNICHE COLTURALI SPERIMENTALI

Per modificare lo spettro della radiazione solare che raggiunge la coltura e quindi poter studiare la risposta di morfogenesi della pianta, attraverso l'impiego di reti foto-selettive colorate, nel corso della primavera 2011 l'intera collezione è stata riorganizzata. In particolare, le reti nere a differente grado di ombreggiamento (50, 70 e 90%) impiegate nel corso del primo anno della ricerca, sono state sostituite con reti colorate blu e rosse con un ombreggiamento pari al 70% e messe a confronto con una rete nera tradizionale, anch'essa al 70% di ombreggiamento, acquistate presso la ditta AGRITENAX. Le reti colorate, lunghe 19 m e larghe 5 m, sono state poste ad un'altezza da terra di 3.5 m (Fig.18 a e b).

Tutte le accessioni presenti in collezione sono state uniformemente distribuite sotto le diverse reti colorate, in modo da avere delle repliche della stessa *cultivar* sotto i tre ombreggiamenti, ed alcune di esse, ritenute di particolare interesse, sono state oggetto di studio. Le varietà prese in esame sono state: *H. macrophylla* ssp. *macrophylla mophead* ('Dieneman', 'San Baronto'); *H. macrophylla* ssp. *macrophylla lacecap* ('Zorro', 'Lemon Wave' e 'Tricolor'); *H. quercifolia* 'Snow Queen'; *H. paniculata* 'Limelight', integrate con materiale di nuovo ottenimento proveniente da micropropagazione e taleaggio.



Fig. 18a: Panoramica della prova di coltivazione sotto reti ombreggianti colorate.



Fig. 18b: Allestimento della prova di coltivazione sotto reti ombreggianti colorate rosse e blu con ombreggiamento del 70%, poste a confronto con una rete nera tradizionale, anche questa con percentuale di ombreggiamento del 70%.

La prima informazione necessaria per capire se le reti ombreggianti colorate impiegate rispecchiano le esigenze richieste, è avere a disposizione informazioni relative alla qualità delle reti stesse, in particolar modo all'intensità e alla trasmissione della luce. Quindi sono state effettuate misurazioni relative all'intensità della luce mediante *Luxmeter HD 8366 lx 0.1-199.9 klx Autorange Silicon Sensa* (Delta OHM), sotto ogni rete colorata testata.

Invece, le misure relative alla trasmissione della luce delle reti ombreggianti sono state condotte mediante spettroradiometro MACAM mod. SR9910-V.7#7467, in collaborazione con il CNR-IBIMET di Sesto Fiorentino (FI); lo strumento è in grado di misurare l'intensità luminosa per ogni lunghezza d'onda nel range 280-800 nm. Questi dati sono stati elaborati per calcolare gli spettri di trasmittanza e il rapporto UV-A/PAR (UV-A, 320-400 nm, PAR, radiazione fotosinteticamente attiva, 400-700 nm) e il rapporto RED/FAR RED (R, rosso, 660-670 nm, FR, rosso lontano, 740-750 nm). In questo modo è possibile ricavare informazioni sul rapporto

R/FR, valore importante per la corretta crescita morfologica della pianta, determinato secondo il metodo della *narrow band* [Σ (655-665nm) / Σ (725-735 nm)] o della *broad band* [Σ (600-700nm) / Σ (700-800 nm)]. Le misure sono state effettuate 6 volte per ogni campione di rete in 4 giorni consecutivi, in condizioni di cielo sereno, durante il mese di giugno e nelle ore centrali della giornata, e il valore medio è stato utilizzato per calcolare gli indici per il RED/FAR RED, utili per capire l'effetto morfologico sulla pianta.

Durante la coltivazione, sono stati effettuati i seguenti rilievi morfologici e fisiologici sulle piante prese in esame: fotosintesi netta, contenuto interno di CO₂, conduttanza stomatica ed evapotraspirazione mediante *CIRAS-2[®] portable CO₂ and H₂O Gas Analyzer* (PP Systems-USA); superficie fogliare, misurata come L.A.I. (*Leaf area index*, indice di area fogliare), ossia come il rapporto tra la superficie fogliare totale e la superficie del suolo su cui le foglie si proiettano, per mezzo di un ceptometro *AccuPar model LP-80* (Decagon Devices-USA); altezza totale della pianta e lunghezza degli internodi; area fogliare e ampiezza variegatura fogliare solo per le varietà *H. macrophylla* ssp. *macrophylla lacecap* 'Lemon Wave' e 'Tricolor' mediante *WinDIAS Image Analysis System* (Delta-T Devices, U.K.).

I rilievi sono stati effettuati durante tre diverse fasi fenologiche: al momento dell'impianto (durante il mese di aprile), nel periodo della fioritura (giugno-inizio luglio) e alla fine del periodo vegetativo (fine agosto-inizio settembre), al fine di valutare l'effetto delle reti sulla morfologia e fisiologia delle piante.

Nel corso del terzo anno di ricerca, l'analisi dei parametri morfologici e fisiologici è stata in parte ripetuta su alcune *cultivar* già testate nell'anno precedente e risultate significative, ed in parte estesa ad altre. Le accessioni oggetto di studio sono state: *H. macrophylla* ssp. *macrophylla mophead* ('Alberta', 'Green Shadow', 'Intermezzo', 'White First', 'San Baronto'); *H. macrophylla* ssp. *macrophylla lacecap* ('Zorro', 'Lemon Wave' e 'Tricolor'), anche in questo caso integrate con materiale di nuovo ottenimento proveniente da micropropagazione e taleaggio.

L'analisi della varianza dei dati è stata eseguita usando il programma COSTAT e le medie sono state comparate con Student Newmann Keuls test a $p \leq 0.05$ (SNK).

7.4. VALUTAZIONE SPERIMENTALE DI TECNICHE DI PROPAGAZIONE *IN VITRO* IDONEE PER LA PRODUZIONE SU LARGA SCALE DI *HYDRANGEA*

Contestualmente al lavoro di caratterizzazione morfologica e molecolare, e all'applicazione di tecniche colturali innovative, è stato sviluppato e messo a punto un protocollo di propagazione *in vitro*, volto ad individuare all'interno della collezione alcune varietà potenzialmente interessanti da destinare ad un successivo sviluppo commerciale.

Al fine di ottenere una produzione di qualità e su larga scala, verificandone quindi l'efficienza produttiva rispetto alle tradizionali tecniche di propagazione (taleaggio), il protocollo ha riguardato le seguenti fasi: a) lavaggio e sterilizzazione degli espianti; b) messa in coltura su substrati specifici; c) fase di moltiplicazione *in vitro*; d) fase di radicazione *in vitro*; e) fase di ambientamento in serra. Le accessioni oggetto di studio, scelte poiché in possesso di caratteristiche ornamentali interessanti, come l'attitudine alla produzione di fiore reciso o come pianta in vaso, sono state: *H. macrophylla* ssp. *macrophylla mophead* ('San Baronto', 'Hanaby', 'Masja', 'Endless Summer', 'Soeur Thérèse'); *H. macrophylla* ssp. *macrophylla lacecap* ('Libelle', 'Lemon Wave'); *H. quercifolia* ('Harmony', 'Alice', 'Snow Queen'); *H. paniculata* 'Phantom'; *H. heteromalla* 'Snow Cap'; *H. involucrata* 'Yoraku Tama'; *H. arborescens* 'Annabelle'; *H. anomala* ssp. *petiolaris*.

Il materiale di partenza, rappresentato da gemme apicali e ascellari, è stato prelevato in diversi periodi dell'anno direttamente dalle piante della collezione, coltivate in vaso sotto le reti ombreggianti. Nella fase di sterilizzazione il materiale vegetale è stato sottoposto ad un pre-trattamento con immersione in etanolo (70%) per 30''. Gli espianti sono stati immersi in una soluzione di NaOCl a diverse concentrazioni di cloro attivo (1.5-2.5-5%) con aggiunta di 2 gocce di Tween 20 ® (polyoxyethylene sorbitano monolaurato) testando diversi tempi di immersione (10', 15' o 20'), al fine di individuare il trattamento migliore in termini di dosaggi e tempi di sterilizzazione. Dopo la sterilizzazione, gli espianti sono stati sciacquati due volte in acqua sterile bidistillata sotto cappa a flusso laminare, e successivamente sono stati posti su mezzo agarizzato contenete MS (Murashige e Skoog, 1962), 3% di saccarosio con 0.3 mg/l di 6-benziladenina (BA).

In fase di moltiplicazione, gli espianti ottenuti sono stati moltiplicati *in vitro*, testando l'effetto sulla produttività e qualità dei nuovi germogli della benziladenina a diverse concentrazioni (0.25, 0.5 e 1 mg/l) e della Kinetina (Kin) a due differenti concentrazioni (1 e 2 mg/l), poste a confronto con un mezzo *hormone-free*. Per ogni trattamento, sono state effettuate 3 repliche con 7 espianti ciascuno. Il materiale è stato incubato in cella climatica a temperatura di 23 ± 1 °C, con 16 h di fotoperiodo, fornito da luci con $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ *photosynthetic photon flux density* (P.P.F.D.). Al fine di indurre un efficiente e funzionale apparato radicale *in vitro*, gli espianti sono stati coltivati su un mezzo di coltura contenente MS con aggiunta di tre differenti auxine alla stessa concentrazione (0.5 mg/l): acido indolacetico (IAA), acido indolbutirrico (IBA) ed acido naftalenacetico (NAA) comparati con mezzo *hormone-free*. Per ogni trattamento, sono state effettuate 3 repliche con 7 espianti ciascuno. Le condizioni di crescita erano le stesse del protocollo di moltiplicazione.

I germogli radicati, provenienti dalle prove di micropropagazione, sono stati ambientati in contenitori alveolari contenenti torba più perlite (1:1, v/v) autoclavata in precedenza, mantenendo il materiale in costante umidità. Dopo 30 giorni, questo materiale vegetale è stato trasferito in serra di ambientamento in bancali di nebulizzazione con un umidità relativa del 70% fornita da un sistema mist con 4 turni di irrigazione di 30'' ciascuno, distribuiti nell'arco della giornata.

Allo scopo di confrontare il materiale ottenuto da prove di propagazione *in vitro*, con quello di prove di propagazione *in vivo*, sono state messe a dimora 15-20 talee per ciascuna varietà. Le talee con due gemme dormienti ciascuna, sono state posizionate in serra, su bancale di radicazione con sola perlite, sotto nebulizzazione, con 4 turni di irrigazione di 30'' ciascuno, distribuiti nell'arco della giornata. Una volta radicate, sono state trapiantate utilizzando apposito terriccio da trapianto mescolato a concime. Parte delle talee radicate sono state impiegate per integrare la collezione sotto le reti ombreggianti colorate.

7.5. ATTIVITA' DI SELEZIONE DELLE ACCESSIONI PIU' PROMETTENTI DA AVVIARE AD UN FUTURO PROGRAMMA DI BREEDING

Sulla base di quanto riportato in letteratura, le varietà da includere in un programma di *breeding* devono essere in possesso dei seguenti requisiti: buoni

caratteri estetici, soprattutto per ciò che riguarda il colore e la forma del fiore, e buona resistenza al freddo, poiché la fioritura è spesso interessata negativamente da un inusuale freddo invernale o da gelate tardive in primavera.

L'obiettivo è stato quello di indagare sulla compatibilità intra ed interspecifica di *H. macrophylla*, *H. paniculata*, *H. arborescens*, al fine di ottenere nuovi ibridi con caratteristiche innovative ed approfondire le conoscenze riguardo l'auto-compatibilità di queste specie, così da valutare la necessità di emasculazione durante l'impollinazione controllata.

Nel corso dell'estate 2012, sono stati effettuati incroci intra ed interspecifici e autoimpollinazioni, con l'obiettivo di individuare quei genotipi utilizzabili come portaseme e/o come impollinatori e per ottenere informazioni sul grado di fertilità/auto-sterilità.

Allo scopo di valutare l'idoneità alla produzione di seme in futuri programmi di *breeding*, sulla base di quanto sopra riportato, riguardo al grado di compatibilità e fertilità delle diverse specie, sono state individuate e selezionate alcune tra le più importanti specie botaniche di *Hydrangea*, coltivate per particolari caratteristiche estetiche.

Le specie botaniche oggetto di studio sono state: *H. arborescens* ('Annabelle'); *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* *mophead* ('Alberta', 'Ayesha', 'Bela', 'Europa', 'First Red', 'Green Shadow', 'Endless Summer', 'Harlequin', 'Intermezzo', 'Masja', 'Merveille Sanguinea', 'Paris', 'Scheenball', 'Seour Therese', 'White First'); *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* *lacecap* ('Benxi', 'Kardinal', 'Lanarth White', 'Zorro'); *H. serrata* ('Preziosa'), e *H. paniculata* ('Limelight') (Fig.19).



Fig. 19: Alcune *cultivar* testate nella prova preliminare di *breeding*.

Le auto-impollinazioni sono state effettuate utilizzando piante in fioritura: le infiorescenze utilizzate sono state coperte con sacchetti di materiale traspirante in tessuto non tessuto prima dell'apertura dei fiori. Durante la fioritura, le infiorescenze sono state scosse delicatamente almeno tre volte alla settimana per distribuire il polline sugli stigmi dei fiori in apertura e sono state lasciate sulla pianta per tutto il periodo estivo ed autunnale. Infatti queste sono state rimosse alla fine dell'autunno-inizio inverno, quando le capsule dell'infiorescenza avevano assunto una colorazione marrone, cioè circa 4 mesi dopo l'isolamento delle infiorescenze.

Per ogni incrocio sono state testate diverse combinazioni di *cultivar* parentali (decise a seconda del numero di *cultivar* a disposizione). Le infiorescenze utilizzate come parentale femminile, sono state anch'esse racchiuse in sacchetti di tessuto non tessuto prima dell'apertura del fiore. Successivamente per mezzo di piccole forbici, i fiori sterili sono stati rimossi dall'infiorescenza prima dell'apertura dei fiori fertili, eliminando anche quelli già aperti e quelli estremamente immaturi. I fiori rimasti sono stati emasculati rimuovendo petali e antere con pinze a punta fine.

Le impollinazioni sono state effettuate da 1 a 4 giorni dall'emasculazione: i fiori con il polline maturo sono stati rimossi ed utilizzati immediatamente per effettuare l'impollinazione sulle infiorescenze femminili, in modo che le antere dei primi, ricche di polline, toccassero direttamente gli stigmi dei fiori precedentemente emasculati. Successivamente l'infiorescenza è stata chiusa in un sacchetto di materiale traspirante. Anche in questo caso le infiorescenze impollinate sono state rimosse a fine autunno quando le capsule avevano assunto una colorazione marrone (Fig.20).

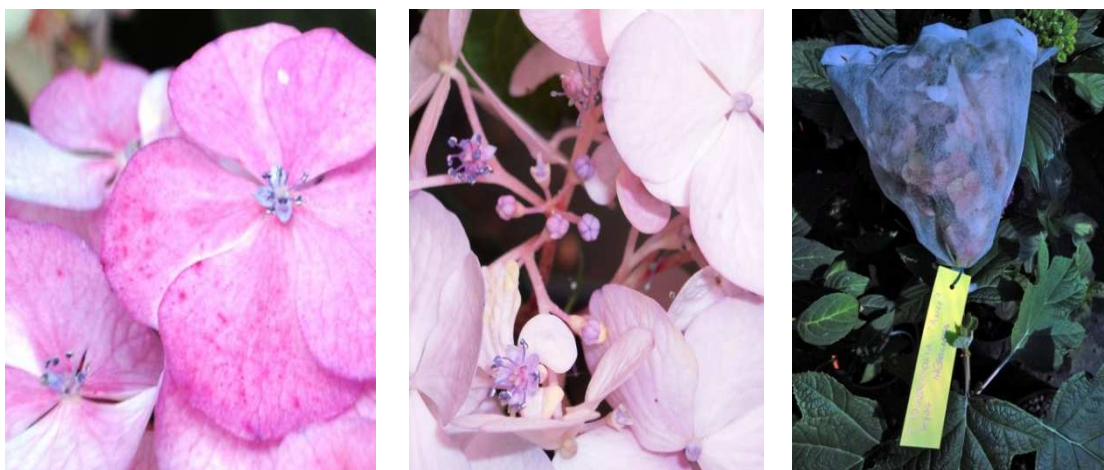


Fig. 20: Nelle prime due foto si osservano i fiori fertili presenti sull'infiorescenza in fasi diverse, mentre nella terza foto viene mostrata un'infiorescenza racchiusa in un sacchetto di tessuto non tessuto.

8. RISULTATI

8.1. ANALISI MORFOMETRICA

Con l'analisi multivariata per *cluster* (*cluster analysis*) mediante il software *R*, si è ottenuta una matrice di distanza dei gruppi di unità tra loro simili rispetto all'insieme dei caratteri presi in considerazione. Questa ha permesso la costruzione di un dendrogramma, nel quale sono riportate le relazioni tra i genotipi conservati in collezione presso il CRA-VIV (Fig.21).

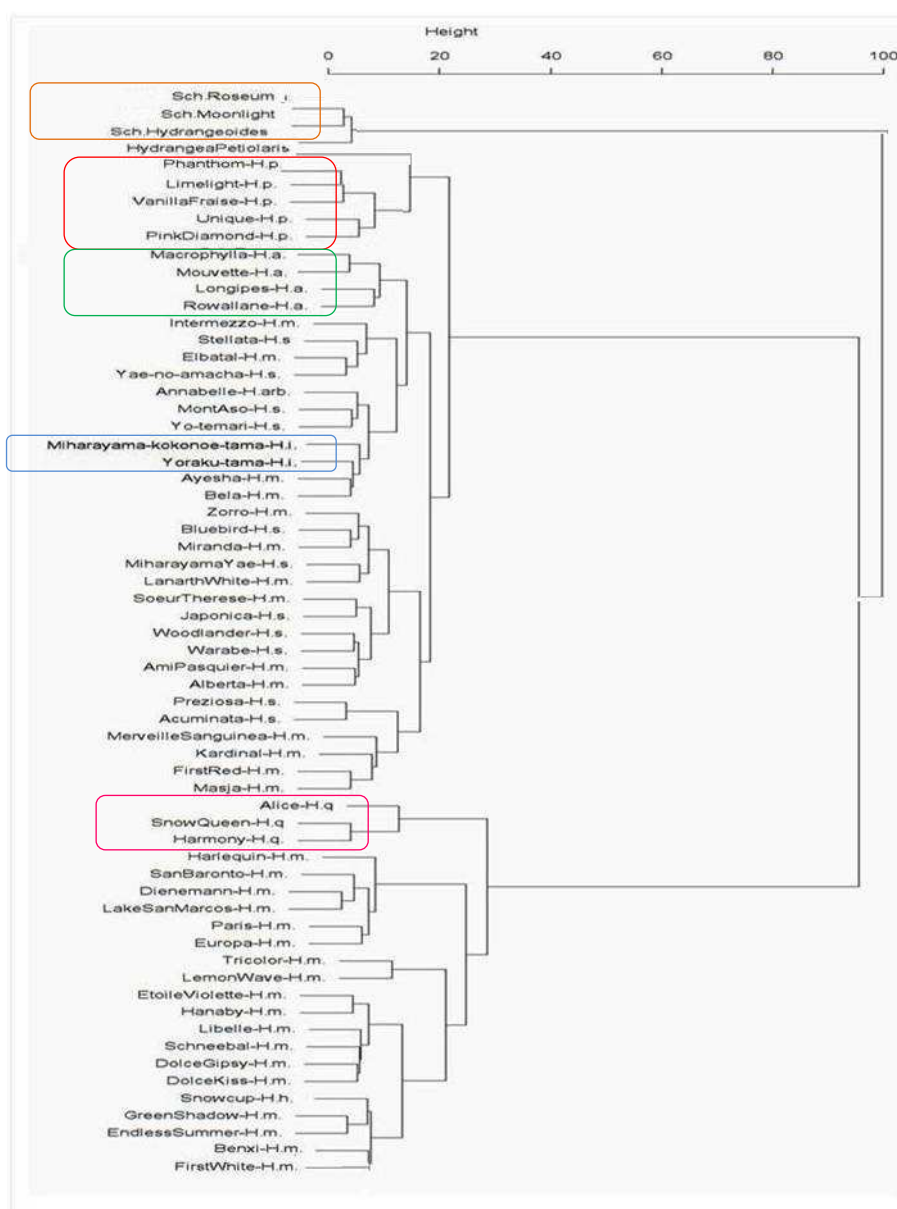


Fig. 21: Dendrogramma ottenuto attraverso i descrittori CPV-UPOV specifici per il genere *Hydrangea* mediante il software *R computer package version 2.14.0*.

Dall'analisi non sono emersi errori di duplicazione o di etichettatura delle piante della collezione.

Prima di tutto nell'analisi si osserva che le tre specie di *Schizophragma* spp., utilizzate come *outgroup*, sono ben visibili in posizione separata nel dendrogramma. Si può osservare che il dendrogramma ottenuto risulta composto da due *cluster* principali: il primo *cluster* a sua volta si suddivide in due *subcluster*, in cui sono comprese *H. anomala* ssp. *petiolatris* e ben raggruppate le *cultivar* appartenenti a *H. paniculata*, queste ultime morfologicamente molto vicine le une alle altre. Nell'altro *cluster*, a sua volta suddiviso in due *subcluster*, si osserva da un lato la stretta relazione tra le *cultivar* di *H. aspera* e dall'altro di *H. involucrata*, oltre a *H. arborescens* 'Annabelle' e buona parte delle *cultivar* di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* e *H. macrophylla* ssp. *serrata*.

Il secondo *cluster* a sua volta si suddivide in due *subcluster*, dove nel primo sono correttamente raggruppate le *cultivar* appartenenti a *H. quercifolia*, mentre nel secondo sono presenti i genotipi appartenenti a *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*, *H. macrophylla* ssp. *serrata* e *H. heteromalla*, non definendo con chiarezza i rapporti tra le *cultivar* appartenenti a specie diverse. Da notare come le *cultivar* variegata di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Lemon Wave' e 'Tricolor' siano morfologicamente molto vicine le une alle altre.

Tre *cultivar* (*H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Blumaise' e 'Grant Choice' e *H. macrophylla* ssp. *serrata* 'Amacha') non sono riportate nel dendrogramma poiché non è stato possibile raccogliere tutte le informazioni necessarie alla loro caratterizzazione in quanto al momento della raccolta dei dati presentavano uno sviluppo stentato ed erano prive di fioritura. Per questo motivo non sono state incluse nell'analisi con il software *R*.

8.2. ANALISI MOLECOLARE

La scelta del sistema di marcatori da utilizzare per l'analisi delle relazioni genetiche fra le accessioni allo studio dipende dal tipo di informazioni genetiche richieste e dalla capacità del metodo di individuare polimorfismo all'interno di una data popolazione.

Il DNA estratto dalle diverse *cultivar* presenti in collezione, è stato amplificato mediante tecnica RAPD con i *primer* della serie OPA e OPB (*Operon*):

OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-13, OPA-14, OPA-15 e OPB-05. Per quanto riguarda la riproducibilità della tecnica, questa è stata verificata in esperimenti indipendenti e confermata ripetendo le amplificazioni almeno tre volte, in modo tale da analizzare soltanto quei marcatori risultati riproducibili.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% (Fig.22 a, b, c): dall'analisi dei profili di amplificazione è stato possibile individuare 248 marcatori RAPD riproducibili di diverse dimensioni da 200 a 1100 bp e tutti polimorfici. Per le analisi RAPD condotte, la classificazione delle bande che compongono i profili di ogni individuo, è stata effettuata manualmente.

L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando i programmi NTSYS pc2.02 (Exeter Software, Setauket, NY), (Rolfh, 1993) e MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). I profili di amplificazione sono stati trasformati in un vettore di stato presenza/assenza, considerando ogni marcatore un *locus* e la presenza o l'assenza della banda, su gel, la presenza o l'assenza dell'allele a quel *locus*. Quindi sulla base di tali risultati è stata calcolata una matrice delle distanze genetiche fra i diversi campioni con il coefficiente di Nei; sulla base di questi dati si è ottenuto un dendrogramma *unrooted* secondo il metodo Neighbor-Joining (Fig.23).

Il dendrogramma ottenuto, evidenzia la chiara posizione, ben separata rispetto ai genotipi di *Hydrangea* spp., delle tre specie di *Schizophragma* spp. utilizzate come *outgroup*.

Il dendrogramma risulta separato in due *cluster*, in uno dei quali si ritrova soltanto *Hydrangea anomala* ssp. *petiolaris*, unica varietà rampicante fra quelle analizzate, escludendo *Schizophragma* spp.

Nell'altro *cluster* sono invece raggruppate tutte le altre accessioni analizzate. Questo a sua volta risulta suddiviso in 2 *subcluster*: nel primo sono raggruppate tutte le accessioni appartenenti a *Hydrangea macrophylla* ssp. *macrophylla* e *Hydrangea macrophylla* ssp. *serrata*. Insieme a queste ritroviamo anche *Hydrangea arborescens* 'Annabelle', unica varietà appartenente a questa specie mantenuta in collezione; le relazioni esistenti fra questa varietà e le altre potrebbero essere ulteriormente approfondite con l'impiego di altri marcatori molecolari, per esempio SSR.

Nel secondo *subcluster* sono riunite tutte le varietà appartenenti alle altre specie: in particolare le *cultivar* di *Hydrangea quercifolia*, *Hydrangea aspera*, *Hydrangea involucrata*, *Hydrangea paniculata* e *Hydrangea heteromalla*. Da notare che per quanto riguarda *Hydrangea paniculata* e *Hydrangea heteromalla* non

risultano raggruppate in maniera chiara; infatti i genotipi appartenenti a queste specie non sono raggruppati in una posizione ben definita, mentre quelli appartenenti a *Hydrangea aspera* e *Hydrangea quercifolia* sono correttamente raggruppati fra loro. Anche in questo caso potrebbe essere interessante approfondire l'analisi con marcatori SSR.

Nella realizzazione delle matrici e successivamente del dendrogramma non è stata inclusa *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Blumaise', poiché questa *cultivar* ha presentato problemi di amplificazione con tutti i *primer* testati. Ciò potrebbe essere imputabile al DNA impiegato, il quale per essere amplificato ed analizzato dovrebbe essere di buona qualità, privo sia di contaminazioni che di eventuali residui di RNA; questo è molto importante per i marcatori RAPD che prevedono l'impiego di *primer* aspecifici, hanno un elevato potere discriminante ma sono molto sensibili alle condizioni di reazione.

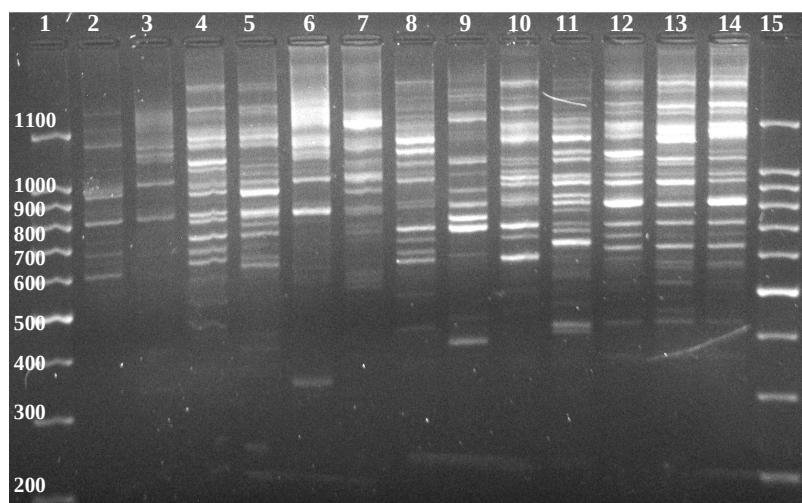


Fig. 22a: Esempio del profilo di amplificazione ottenuto con il *primer* OPA-02: la linea 1 e 15=DNA Ladder; da 2 a 14=campioni analizzati.

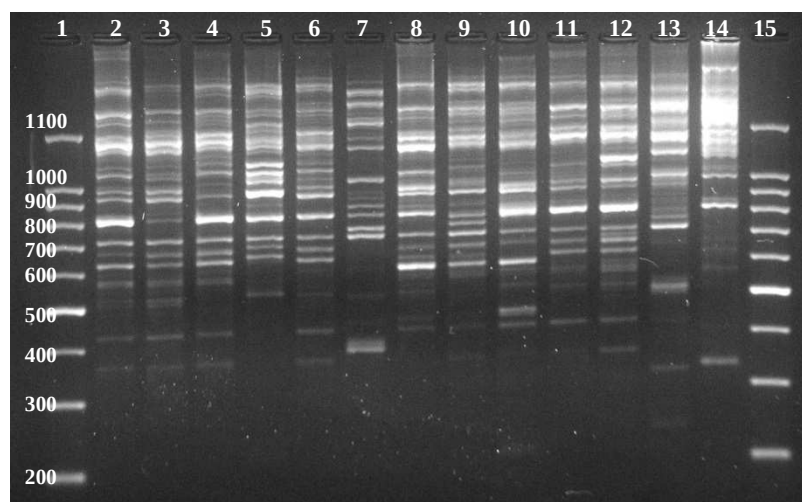


Fig. 22b: Esempio del profilo di amplificazione ottenuto con il *primer* OPA-04: la linea 1 e 15=DNA Ladder; da 2 a 14=campioni analizzati.

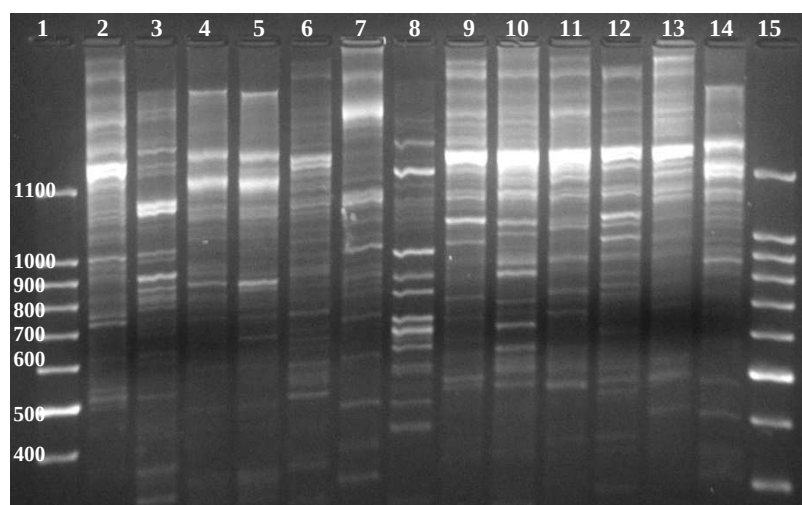


Fig. 22c: Esempio del profilo di amplificazione ottenuto con il *primer* OPA-14: la linea 1 e 15=DNA Ladder; da 2 a 14=campioni analizzati.

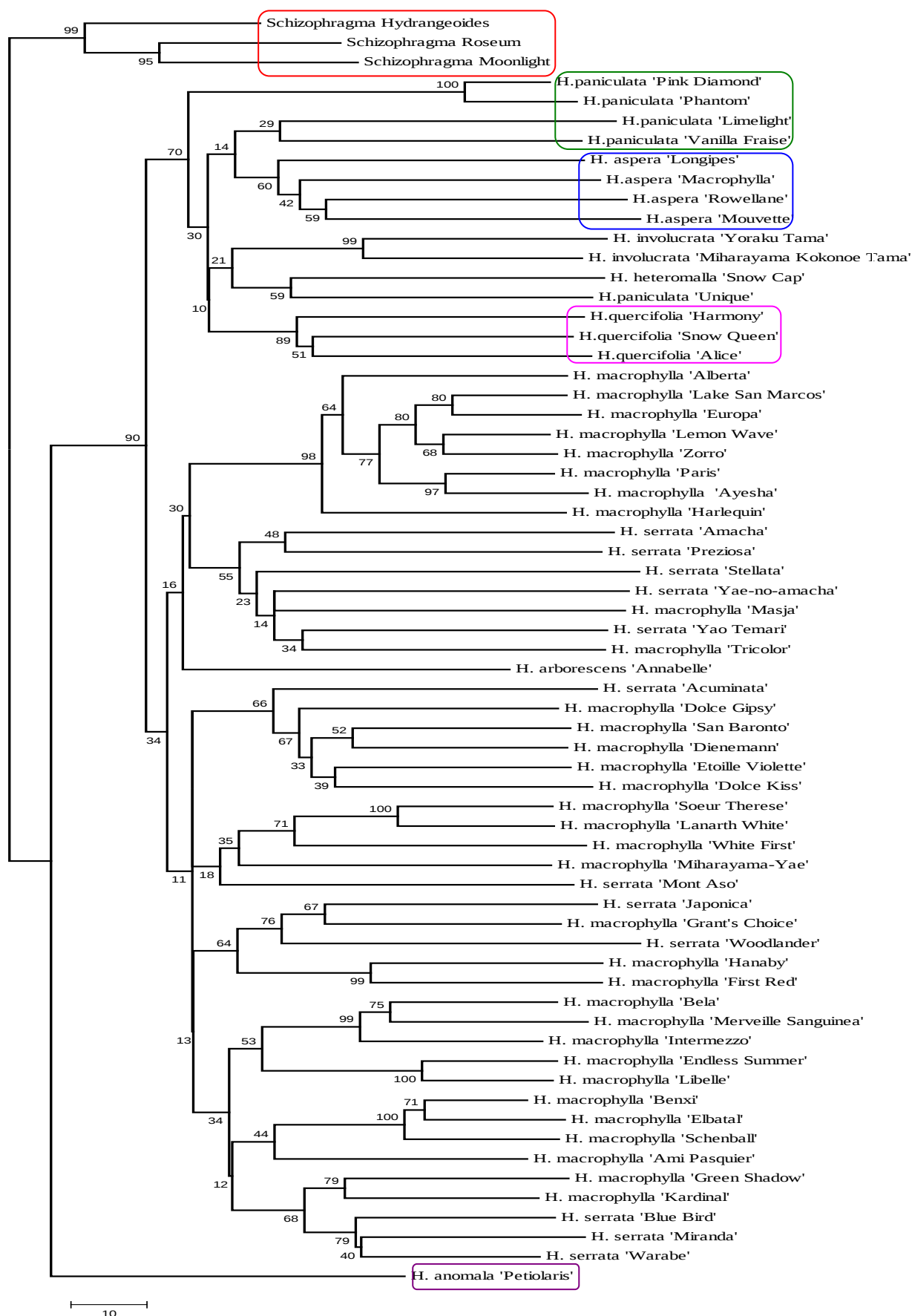


Fig. 23. Dendrogramma di Neighbor-Joining ottenuto dalla matrice delle distanze fra i 65 genotipi analizzati ed elaborato con MEGA 4.

8.3. TECNICHE COLTURALI SPERIMENTALI

Dal momento che la prima informazione necessaria per capire se le reti ombreggianti colorate impiegate rispecchiano le esigenze richieste, è necessario avere a disposizione informazioni relative alla qualità delle reti stesse, in particolar modo alla intensità ed alla trasmissione della luce. Le misurazioni relative all'intensità della luce, effettuate mediante *Luxmeter HD 8366 lx 0.1-199.9 klx Autorange Silicon Sensa* (Delta OHM), sono risultate comprese tra 31.78 e 33.2 klx, quindi corrispondenti alla percentuale di ombreggiamento richiesta del 70%. In Tab.7 sono riportati i dati calcolati relativi alle misurazioni della trasmissione della luce delle reti ombreggianti effettuate con lo spettroradiometro MACAM mod. SR9910-V.7#7467, utili per il calcolo del rapporto R/FR, in modo da capire l'eventuale effetto morfologico sulla pianta.

Parametri	Unità	Rete rossa	Rete nera	Rete Blu	Luce
Irradiance (280-800 nm)	(W m ⁻²)	133.70	116.94	121.41	294.89
PAR (400-700 nm)	(W m ⁻²)	73.34	77.47	78.09	190.85
RED (655-665)	(W m ⁻²)	3.44	2.50	1.83	6.05
FAR RED band (725-735)	(W m ⁻²)	3.60	2.19	1.40	5.34
RED/FAR Red narrow band		0.96	1.14	1.30	1.13
UV A (320-400 nm)	(W m ⁻²)	7.76	8.65	6.31	24.93

Tab. 7: Misure effettuate con lo spettroradiometro MACAM mod. SR9910-V.7#7467 nel range 280-800 nm e relativi calcoli per l'energia presente nelle varie categorie di luce.

Il rapporto R/FR è considerato un importante fattore per le risposte mediate dal fitocromo. In confronto al rapporto R/FR misurato per la luce naturale (pari a 1.13), le reti nere, blu e rosse inducono basse variazioni del rapporto R/FR che oscilla da 0.96 (rete rossa) a 1.30 (rete blu) (Tab. 7). La rete rossa, seppur di poco, tende ad alterare il normale rapporto R/FR, spostandolo e abbassandolo rispetto al rapporto della luce naturale; da quanto riportato in letteratura, in questo modo dovrebbero essere favoriti effetti morfologici tipici della filatura, tra cui ad esempio l'allungamento degli internodi, definito come 'sindrome da ombreggiamento'. La rete nera è caratterizzata da un rapporto R/FR paragonabile a quello della luce naturale, confermando il suo impiego come tesi di controllo. Infine la rete blu, che tende ad aumentare di poco il rapporto R/FR, in confronto alla luce naturale,

dovrebbe permettere di ottenere piante più compatte, con una maggiore chioma fogliare, caratterizzate da internodi più corti.

In Fig.24 è mostrato un tipico spettro (280-800 nm), misurato in condizioni di cielo sereno, durante il mese di giugno e nelle ore centrali della giornata, sotto ogni rete colorata e posto a confronto con la luce naturale. Le reti presentano un ampio picco di trasmissività intorno a 470 nm, oltre ad un ulteriore picco a 750 nm. In particolare, la luce trasmessa dalla rete blu è caratterizzata da un picco a lunghezza d'onda nello spettro del blu, cioè tra 400 e 500 nm, dove al contrario la rete rossa mostra valori più bassi di trasmissività; infatti questa presenta elevati valori di trasmissività a lunghezza d'onda superiore a 600 nm.

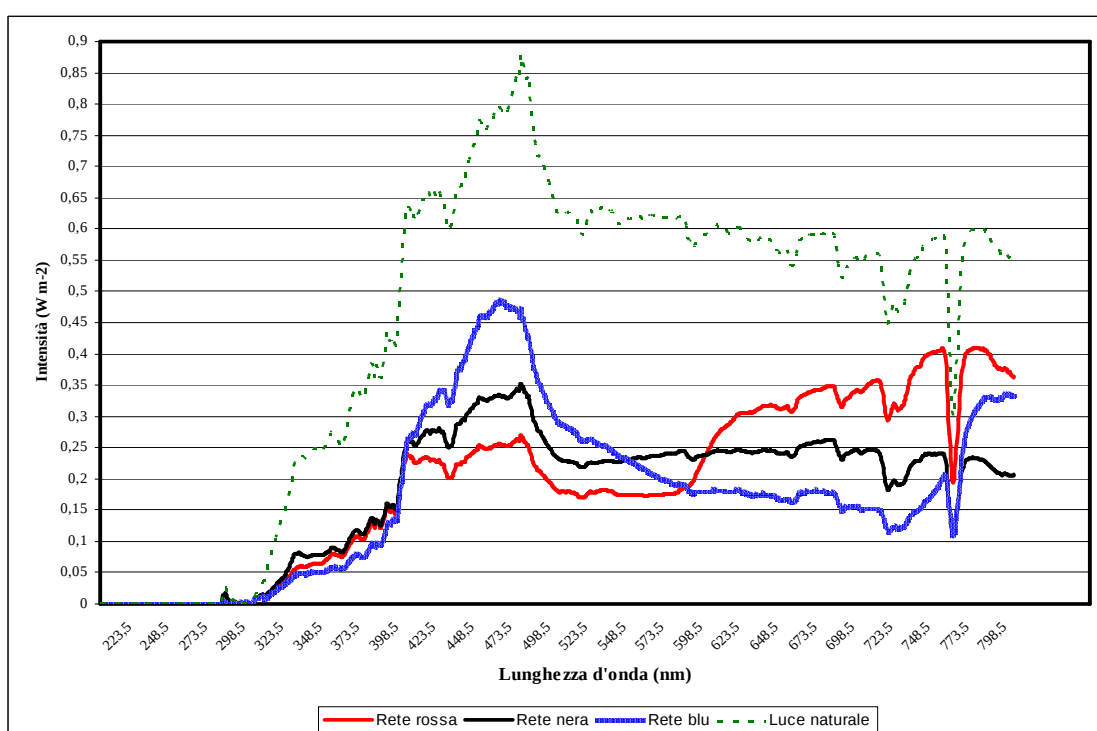


Fig. 24: Trasmittanza delle reti ombreggianti nel range 280-800 nm, a confronto con la luce naturale.

Sotto ogni rete ombreggiante sono state inoltre misurati parametri ambientali, temperatura ed umidità, ma non sono state rilevate differenze significative.

Al fine di valutare l'effetto delle reti sulla morfologia e sulla fisiologia delle piante, sono stati analizzati soltanto i dati relativi al campionamento effettuato nel periodo di fioritura (giugno-inizio luglio), perché in questo stadio le piante, in piena crescita vegetativa, dovrebbero mostrare gli effetti indotti da alterazioni nella composizione della luce.

I dati ricavati dal primo anno di coltivazione non sono riportati poiché considerati dati preliminari di prova, necessari però per osservare il comportamento e la risposta delle *cultivar* al trattamento.

Effetti sull'attività morfologica

Nella maggior parte delle *cultivar* testate, si osserva una costante risposta indotta dai trattamenti nelle piante cresciute sotto la rete blu, le quali si caratterizzano per un minore sviluppo in altezza rispetto alle stesse *cultivar* cresciute sotto rete nera e rossa. Solo l'altezza di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Tricolor' è stata influenzata dai trattamenti: le piante cresciute sotto rete rossa sono significativamente più alte rispetto a quelle sotto rete nera e del blu, con rispettivamente 118.33, 101 e 36 cm di altezza raggiunta. Unica eccezione a questa tendenza delle altezze, è rappresentata da *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'White First', nella quale l'altezza delle piante allevate sotto rete rossa è risultata inferiore rispetto alle piante cresciute sotto la rete blu e nera, mostrando una tendenza inversa rispetto alle altre *cultivar*.

Una maggiore altezza, dovrebbe essere accompagnata da una maggiore lunghezza degli internodi. Una *cultivar* che evidenzia correttamente questo andamento proporzionale tra altezza totale della pianta e lunghezza media degli internodi è *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Tricolor'; infatti le piante allevate sotto rete rossa, oltre ad una differenza statisticamente significativa per l'altezza, mostrano una lunghezza media degli internodi pari a 7.58 cm, contro i 3.48 cm per le piante sotto rete blu. Nelle altre *cultivar*, pur non riscontrandosi differenze statisticamente significative per la lunghezza media degli internodi, si osserva una risposta costante per quanto riguarda le piante cresciute sotto rete blu, che si caratterizzano per una lunghezza ridotta rispetto a quella delle piante cresciute sotto rete nera o rossa.

Nella maggior parte delle *cultivar* studiate, ad eccezione di *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'White First', ad un minor sviluppo in altezza è corrisposto un L.A.I. maggiore: in particolare, le piante di una stessa *cultivar* allevate sotto rete blu mostrano un rapporto maggiore rispetto a quelle cresciute sotto rete rossa e, in alcuni casi, nera. Questo perché maggiore è il L.A.I., maggiore è la quota di radiazione intercettata e quindi minore quella che arriva a livello del terreno, peculiarità delle piante con maggiore chioma fogliare.

In generale i parametri morfologici analizzati non hanno quindi mostrato differenze statisticamente significative nelle *cultivar* oggetto di studio (Tab.8).

Pertanto l'assenza di risultati statisticamente significativi a livello morfologico tra i diversi trattamenti potrebbe significare che il genere *Hydrangea*, non risulterebbe particolarmente sensibile ad alterazioni nella composizione della luce, almeno per le *cultivar* in osservazione.

<i>H. macrophylla</i> ssp. <i>macrophylla</i>	Trattamento reti	Altezza (cm)	numero internodi	Lungh. media internodi (cm)	L.A.I. (Leaf area index)
'White First'	Rosso	76.63 a	10.31 a	7.74 a	3.30 a
	Nero	87.34 a	11.00 a	7.33 a	2.77 b
	Blu	83.33 a	12.00 a	7.45 a	2.59 b
'Lemon Wave'	Rosso	53.66 a	9.66 a	5.84 a	1.11 a
	Nero	55.33 a	12.33 a	5.47 a	1.91 a
	Blu	51.22 a	10.66 a	5.21 a	2.47 a
'Zorro'	Rosso	94.33 a	14.00 a	7.58 a	0.87 c
	Nero	89.33 a	14.33 a	6.13 a	1.74 b
	Blu	77.00 a	13.12 a	7.25 a	3.36 a
'Green Shadow'	Rosso	93.66 a	14.15 a	6.41a	1.30 b
	Nero	81.34 a	12.66 a	6.34 a	2.17 ab
	Blu	78.66 a	14.66 a	5.60 a	2.59 a
'San Baronto'	Rosso	109.00 a	10.66 a	8.70 a	0.85 b
	Nero	102.12 a	12.33 a	7.69 a	3.63 a
	Blu	91.14 a	14.00 a	6.41 b	3.76 a
'Alberta'	Rosso	122.66 a	18.33 a	8.39 a	1.48 b
	Nero	110.66 a	13.66 a	7.62 a	2.13 b
	Blu	108.00 a	17.16 a	7.48 a	3.68 a
'Intermezzo'	Rosso	105.33 a	12.30 a	9.38 a	1.98 b
	Nero	93.33 a	9.66 a	8.48 a	2.27 b
	Blu	86.33 a	14.65 a	7.39 a	3.42 a
'Tricolor'	Rosso	118.33 a	15.33 a	7.58 a	0.67 c
	Nero	101.0 b	19.33 a	6.23 a	1.40 b
	Blu	36.00 c	9.04 a	3.48 b	2.15 a

Tab. 8. Effetti dei differenti trattamenti sulla morfologia in piante di *Hydrangea*. Differenti lettere vicino ai valori numerici indicano differenze significative $P < 0.05$.

Per *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Lemon Wave' e 'Tricolor' uniche *cultivar* presenti in collezione con foglie variegata, sono stati raccolti anche i dati relativi alla variegatura fogliare. È interessante notare come la rete rossa induca una più ampia variegatura, statisticamente significativa in 'Tricolor', con il rapporto di "area non verde"/"area fogliare totale" più basso sotto la rete blu (Fig.25). Le differenze relative alla variegatura fogliare in 'Lemon Wave' non sono risultate significative.

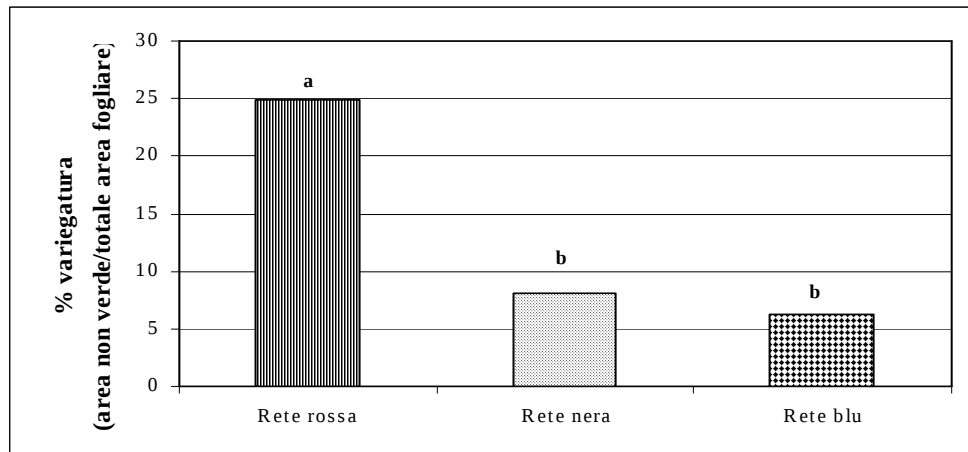


Fig. 25: *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Tricolor': effetto dei trattamenti sul LAI (*Leaf area index*).
Differenti lettere indicano differenze significative con $p = 0.05$ (SNK test).

Effetti sull'attività fisiologica

Dai dati analizzati e riportati in Tab.9, si può osservare come in *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'Lemon Wave', i trattamenti inducono le differenze più significative tra i parametri valutati (conduttanza stomatica, contenuto interno di CO_2 e fotosintesi), fatta eccezione per il tasso di traspirazione. La fotosintesi e la conduttanza stomatica sono significativi in *H. macrophylla* ssp. *macrophylla* 'San Baronto' e 'Intermezzo', mentre in 'Tricolor' si osservano differenze significative nel tasso di traspirazione e nella conduttanza stomatica. I trattamenti hanno indotto differenze significative sulla fotosintesi nelle *cultivar* 'White First' e 'Alberta', e sulla conduttanza stomatica nelle *cultivar* di 'Zorro'. In 'Green Shadow' non si osservano differenze significative tra i parametri analizzati.

Dall'analisi dei parametri fisiologici, è possibile affermare che l'effetto indotto dai trattamenti non determina un andamento costante nelle singole *cultivar* studiate. Anche in questo caso, l'assenza di risultati statisticamente significativi tra i diversi trattamenti, per i parametri fisiologici osservati, potrebbe essere imputabile alle singole *cultivar* o, come già riferito, al genere *Hydrangea*, il quale non risulterebbe sensibile ad alterazioni nella composizione della luce.

<i>H. macrophylla</i> ssp. <i>macrophylla</i>	Trattamento reti	Tasso di traspirazione ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Conduttanza stomatica ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Contenuto interno CO ₂ (ppm)	Fotosintesi ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
'White First'	Rosso	3.90 a	276.83 a	320.66 a	7.95 a
	Nero	3.43 a	252.16 a	327.16 a	5.65 ab
	Blu	4.23 a	275.83 a	329.66 a	4.88 b
'Lemon Wave'	Rosso	3.81 a	939.33 a	332.23 a	2.42 b
	Nero	4.15 a	403.00 b	308.66 ab	6.92 a
	Blu	3.25 a	230.83 b	271.83 b	7.91 a
'Zorro'	Rosso	4.91 a	444.12 b	304.11 a	5.66 a
	Nero	7.54 a	226.66 a	307.33 a	7.96 a
	Blu	5.24 a	285.52 a	287.83 a	6.78 a
'Green Shadow'	Rosso	4.89 a	399.16 a	304.33 a	7.23 a
	Nero	5.56 a	736.5 a	309.83 a	7.02 a
	Blu	4.10 a	233.33 a	296.83 a	5.13 a
'San Baronto'	Rosso	4.57 a	364.32 b	316.16 a	8.05 a
	Nero	4.87a	359,16 b	33.21 a	4.83 b
	Blu	5.57 a	255,5 a	344.33 a	4.46 b
'Alberta'	Rosso	3.66 a	208,33 a	342.16 a	2.31 b
	Nero	3.03 a	162.66 a	314.83 a	4.36 ab
	Blu	3.91 a	334.12 a	336.33 a	6.46 a
'Intermezzo'	Rosso	3.81 a	137.83 b	322.33 a	2.96 b
	Nero	4.98 a	358.11 a	328.66 a	5.76a
	Blu	3.75 a	231.66 ab	309.83 a	7.15 a
'Tricolor'	Rosso	4.95 a	658.16 a	334.15 a	6.45 a
	Nero	3.07 b	320.23 b	336.83 a	3.62 a
	Blu	3.14 b	173.12 b	306.66 a	5.08 a

Tab. 9. Effetto dei trattamenti sull'attività fisiologica in piante di *Hydrangea*. Differenti lettere indicano differenze significative con $p = 0.05$ (SNK test).

8.4. VALUTAZIONE SPERIMENTALE DI TECNICHE DI PROPAGAZIONE IN VITRO IDONEE PER LA PRODUZIONE SU LARGA SCALE DI *HYDRANGEA*

Per quanto riguarda la valutazione sperimentale di tecniche di propagazione *in vitro*, dopo aver valutato l'effetto di vari dosaggi e tempi di sterilizzazione, è stato identificato il trattamento migliore in immersione degli espianti in una soluzione di NaOCl a concentrazione 5% di cloro attivo più alcune gocce di Tween20®, per 15' di immersione, seguita da due lavaggi in acqua sterile bidistillata.

Sono state ottenute buone percentuali di sterilizzazione per *H. macrophylla mophead* e *lacecap group*: in questo caso la percentuale di sterilizzazione più elevata, quasi il 100%, è stata raggiunta con il materiale prelevato durante i mesi estivi dalle diverse varietà testate. Con il materiale prelevato dalle altre specie e in altri periodi dell'anno, la percentuale di sterilizzazione è risultata variabile: 80% in ottobre per *H. quercifolia*, 70% in maggio per *H. paniculata* e *H. arborescens*, 100% in aprile per *H. heteromalla*, 83% in maggio per *H. anomala ssp. petiolaris* e 25% in maggio per *H. involucrata* 'Yoraku-tama'.

Nella fase di moltiplicazione è stato confrontato l'effetto di BA e Kin a diverse concentrazioni sulla produttività e sulla qualità dei nuovi germogli. È stato osservato che BA, a qualsiasi concentrazione, induce il miglior tasso di moltiplicazione (più di 7 germogli per espianto per mese) ed il peso fresco più elevato, ma all'aumentare della concentrazione della citochinina si osserva un aumento dell'iperidricità dei germogli. L'utilizzo della Kin ha fornito espianti di ottima qualità, ma il tasso di moltiplicazione è risultato molto basso (2.5 germogli per espianto per mese). Per questa ragione, gli espianti in fase di moltiplicazione sono stati allevati su un terreno di coltura base MS con aggiunta di BA alla concentrazione di 0.25 mg/l, 30 g/l di saccarosio, 7 g/l agar, pH 5.7 effettuando subcolture ogni 30 giorni (Fig.26) .

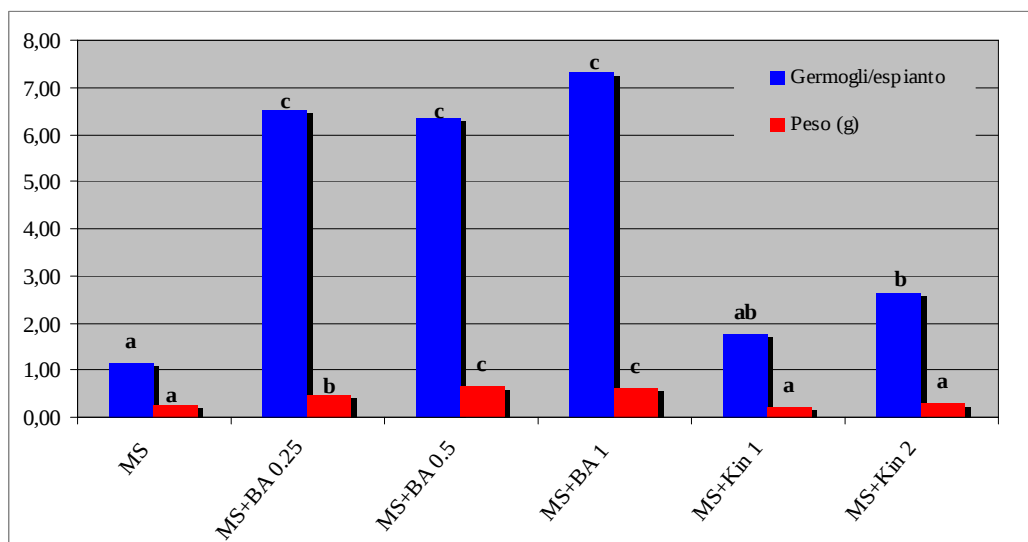


Fig. 26: Confronto tra BA e Kin a diverse concentrazioni (mg/l) per valutare la produttività e la qualità dei nuovi germogli: tasso di moltiplicazione e peso fresco in relazione alle citochinine testate. Differenti lettere indicano differenze significative con $p \leq 0.05$ (SNK test).

Per quanto riguarda la fase di radicazione, dopo un confronto tra le auxine alla stessa concentrazione, il 100% di radicazione è stato ottenuto in presenza di NAA, la quale promuove un considerevole numero di radici per germoglio (circa 8 radici per mese). Anche in questo caso, sono state effettuate subcolture ogni 30 giorni e il materiale vegetale è stato mantenuto in cella climatica alle stesse condizioni di crescita del protocollo di moltiplicazione (Fig. 27) (Fig. 28).

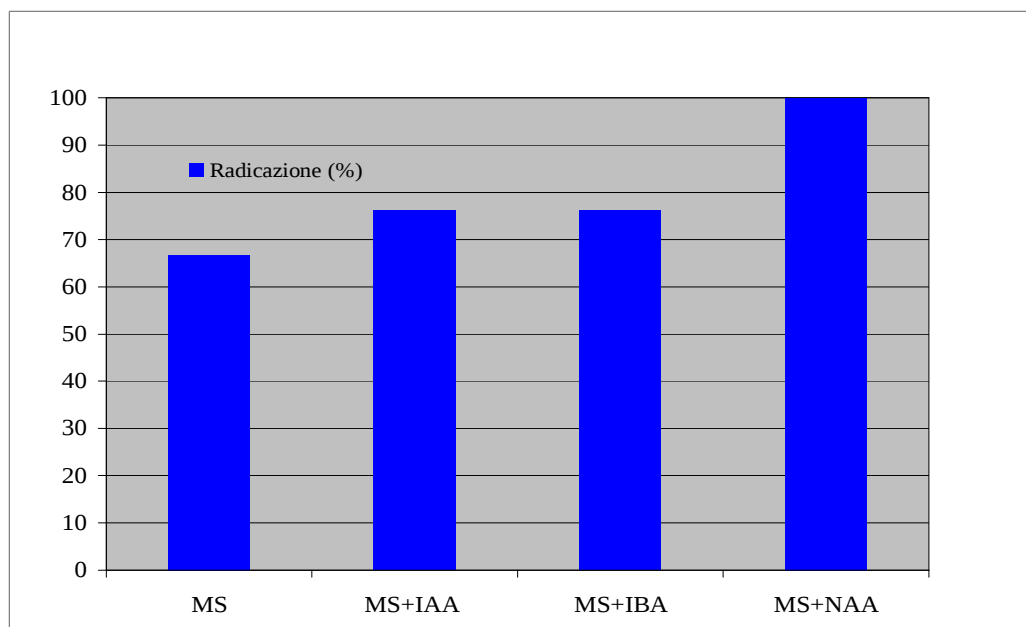


Fig. 27: Confronto tra IAA, IBA e NAA alla stessa concentrazione (0.5 mg/l): percentuale di radicazione *in vitro* in relazione alle diverse auxine testate.

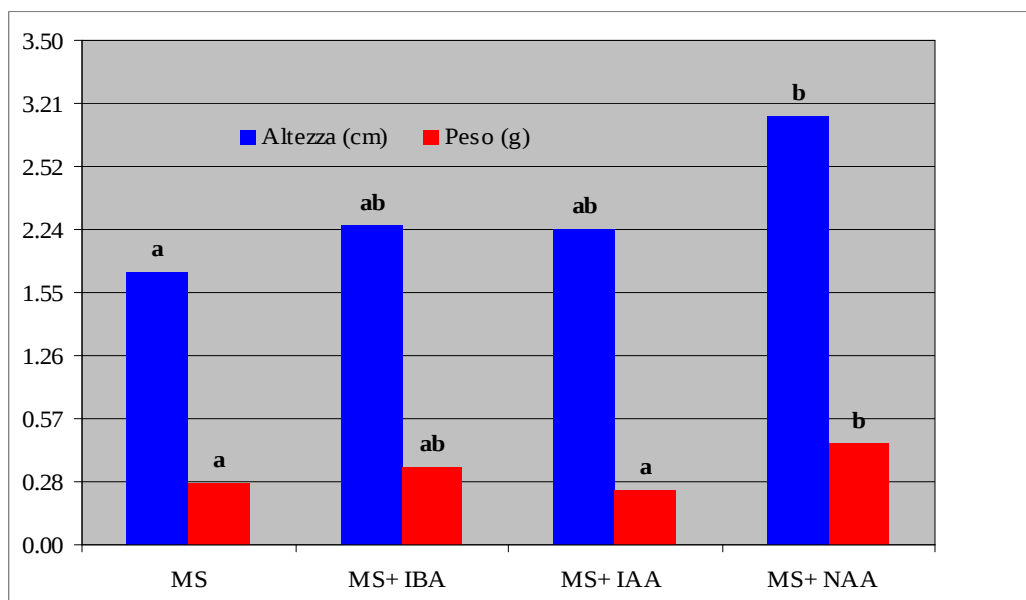


Fig. 28: Confronto tra IAA, IBA e NAA alla concentrazione 0.5 mg/l: lunghezza e peso fresco delle radici ottenute *in vitro*. Differenti lettere indicano differenze significative con $p \leq 0.05$ (SNK test).

Ponendo a confronto il materiale ottenuto da propagazione *in vitro* con quello ottenuto da taleaggio, sono state osservate alcune differenze. Le piante ottenute dal *vitro*, oltre ad essere caratterizzate dalla rapidità del processo di propagazione, si contraddistinguono per la loro uniformità ed omogeneità, così da essere più rispondenti alle esigenze dei vivaisti e coltivatori. Inoltre la produzione è svincolata dall'andamento stagionale poiché eseguita in ambiente completamente condizionato. Queste piante non riescono a raggiungere la fioritura nel primo anno di coltivazione, aspetto che invece caratterizza il materiale proveniente da talea, il quale però non presenta caratteristiche di uniformità ed omogeneità nel primo anno.

8.5. ATTIVITA' DI SELEZIONE DELLE ACCESSIONI PIU' PROMETTENTI DA AVVIARE AD UN FUTURO PROGRAMMA DI BREEDING

Durante l'estate 2012, sono stati realizzati un totale di 112 incroci e 43 auto-impollinazioni. Alla fine dell'autunno 2012, le infiorescenze secche derivate sia da auto-impollinazione che da incrocio, sono state raccolte e ripulite in modo da separare le capsule ottenute dal resto dell'infiorescenza (Fig. 29). Per essere sicuri che fossero seccate completamente, le capsule sono state mantenute in stufa per 4 giorni a circa 30 °C e, dopo conservazione in frigo, nel mese di aprile sono state seminate.



Fig. 29: Semi e capsule semi ottenuti da incrocio e da auto-impollinazioni in *Hydrangea*.

Sono state raccolte 4805 capsule dalle diverse combinazioni di incrocio (Tab.10). Al momento della semina, le capsule contenenti i semi sono state seminate direttamente in seminiere di polistirolo contenenti terriccio da semina più perlite e mantenute in serra.

Parentale femminile ♀	Parentale maschile ♂	Totale incroci	Capsule raccolte
H. m. 'Zorro'	H. m. 'Alberta'	2	155
	H. m. 'White First'	2	131
	H. m. 'Lanarth White'	1	256
	H. a. 'Annabelle'	3	350
H. s. 'Preziosa'	H. m. 'Alberta'	3	54
	H. m. 'Intermezzo'	3	88
	H. m. 'White First'	2	127
	H. m. 'Green Shadow'	3	166
H. m. 'Intermezzo'	H. s. 'Preziosa'	3	103
	H. m. 'Green Shadow'	3	68
H. m. 'Masja'	H. m. 'White First'	4	31
H. m. 'Green Shadow'	H. m. 'Lanarth White'	3	63
	H. m. 'White First'	3	40
H. m. 'Ayesha'	H. m. 'Lanarth White'	1	96
	H. m. 'White First'	2	80
	H. a. 'Annabelle'	1	30
H. m. 'Kardinal'	H. m. 'White First'	4	87
	H. m. 'Lanarth White'	4	433
	H. m. 'Scheenball'	2	44
H. m. 'White First'	H. m. 'Green Shadow'	3	113
	H. m. 'First Red'	5	60
	H. m. 'Paris'	3	54
H. m. 'Lanarth White'	H. m. 'Green Shadow'	2	313
	H. m. 'First Red'	4	230
	H. m. 'Harlequin'	5	385
	H. m. 'Merveille Sanguinea'	2	185
H. m. 'Merveille Sanguinea'	H. s. 'Preziosa'	2	31
H. m. 'Bela'	H. s. 'Preziosa'	2	27
	H. m. 'White First'	1	95
H. m. 'Scheenball'	H. m. 'Green Shadow'	3	34
	H. m. 'First Red'	3	29
	H. s. 'Preziosa'	1	10
H. m. 'Benxi'	H. m. 'First Red'	2	252
H. m. 'Europa'	H. m. 'Endless Summer'	2	60
	H. m. 'Green Shadow'	1	24
	H. a. 'Annabelle'	1	7
H. m. 'Seour Therese'	H. m. 'Green Shadow'	2	16
	H. m. 'Scheenball'	2	60
H. m. 'Alberta'	H. m. 'Green Shadow'	3	63
	H. m. 'White First'	2	13
H. m. 'Endless Summer'	H. s. 'Preziosa'	1	20
H. m. 'Paris'	H. m. 'White First'	6	130
H. m. 'First Red'	H. s. 'Preziosa'	1	80
H. a. 'Annabelle'	H. m. 'First Red'	4	112
Totale incroci effettuati		112	4805

Tab. 10. Incroci effettuati durante l'estate 2012.

Ad oggi il materiale raccolto è in serra in fase di germinazione e di conseguenza i dati relativi alla germinazione dei semi non sono ancora disponibili. Successivamente a questa tesi di dottorato, sarà possibile valutare oltre alla percentuale di germinazione, l'effettiva ibridità del nuovo materiale ottenuto sia da un punto di vista fenotipico che genetico, e l'influenza dell'incrocio, cioè la modalità con cui viene impiegato un parentale rispetto ad un altro.

9. CONCLUSIONI

L'applicazione di efficienti tecniche di caratterizzazione morfologica e molecolare unite a specifiche tecniche agronomiche innovative, tecniche di propagazione *in vitro* e di miglioramento genetico, possono contribuire a valorizzare le collezioni di germoplasma di *Hydrangea* spp., in particolare quella conservata presso il CRA-VIV di Pescia oggetto di studio della presente ricerca.

L'approccio della ricerca si è rivolto in ogni sua fase all'ottenimento di risultati direttamente fruibili dall'Azienda proponente, in accordo con lo spirito dei progetti del Bando Imprese Florovivaistiche (D.M.186/2007), operando su questa raccolta di germoplasma, con caratteristiche colturali idonee alle condizioni pedo-climatiche del territorio nazionale, con l'obiettivo di approfondire gli aspetti genetici, fenotipici e colturali per renderla maggiormente apprezzata dal mercato italiano.

Obiettivo iniziale del progetto di dottorato è stato quello di caratterizzare la collezione di germoplasma di *Hydrangea* spp., avvalendosi di marcatori morfologici e molecolari.

La scelta dei parametri morfometrici per effettuare l'analisi filogenetica ha interessato i descrittori maggiormente rappresentativi ed informativi in relazione alle specie in esame. Sebbene l'impiego di marcatori morfologici sia discutibile dal momento che le caratteristiche fenotipiche delle piante sono fortemente influenzate dalle condizioni ambientali, l'approccio morfologico comunque costituisce il primo passo per la descrizione e la classificazione del germoplasma.

La caratterizzazione molecolare con l'uso di marcatori RAPD non ha presentato problemi di ripetibilità e, oltre ad essere utile per il *fingerprinting* delle *cultivar* di *Hydrangea* spp., ha permesso di chiarire eventuali errori di duplicazione o di etichettatura delle piante della collezione. Sono stati individuati 7 *primer* in grado di produrre un elevato numero di poliformismi nei profili elettroforetici del DNA delle accessioni conservate in collezione.

Dal punto di vista della messa a punto di protocolli integrati di caratterizzazione filogenetica, si può affermare che i marcatori morfologici, se opportunamente adattati al contesto in cui vengono applicati, risultano piuttosto affidabili e sicuramente economici. In merito ai marcatori molecolari, invece, il principale vantaggio risiede nel fatto che le analisi possono essere condotte in ogni momento della fase vegetativa della pianta, dal momento che sono svincolate dallo

stadio di sviluppo della pianta. I dubbi sorti nell'interpretazione di alcuni raggruppamenti potrebbero essere ulteriormente studiati con l'impiego di altri marcatori, ad esempio SSR, così da approfondire le relazioni esistenti tra alcune specie risultate poco chiare con i marcatori RAPD.

Relativamente alle prove di coltivazione sotto reti ombreggianti di diverso colore, in generale i parametri morfologici e fisiologici analizzati non hanno evidenziato i risultati attesi, sulla base di quanto riportato in letteratura per altri generi di ornamentali, non mostrando differenze statisticamente significative nelle *cultivar* oggetto di studio. Relativamente ai parametri morfologici, le piante cresciute sotto la rete blu sono risultate tendenzialmente di taglia più ridotta rispetto alle stesse *cultivar* cresciute sotto rete nera o rossa, ma non mostrando comunque differenze statisticamente significative.

L'assenza di risposte statisticamente significative tra i diversi trattamenti potrebbe essere imputabile alla *cultivar* o al genere stesso, che non risulterebbe sensibile ad alterazioni nella composizione della luce, ma anche ad una gestione della pianta (potatura, concimazione, irrigazione) da mettere maggiormente a punto. Risposte analoghe si sono avute per quanto riguarda l'analisi dei parametri fisiologici, con tendenze quasi sempre in linea con quanto atteso, ma senza differenze significative tra i diversi trattamenti.

Per quanto riguarda la propagazione *in vitro*, è stata confermata la validità del protocollo di micropropagazione: in tale protocollo sono state messe a punto indicazioni precise per produrre *in vitro* elevate quantità di materiale propagato. I tassi di moltiplicazione e radicazione ottenuti sono risultati maggiori rispetto a quelli descritti in letteratura per altre specie di *Hydrangea* (Abu Dahab, 2007; Sebastian e Heurser, 1987).

Ulteriori sviluppi del progetto, che è alla base del presente lavoro di tesi di dottorato, potranno essere legati all'ottenimento di nuovi individui grazie all'azione di *breeding*, peraltro già avviata ed ancora non conclusa. Dovranno infatti essere raccolti i dati relativi alla germinazione dei semi. Per gli individui ottenuti, presunti ibridi, sarà successivamente necessaria, in una prima fase, una valutazione fenotipica e genotipica al fine di verificarne l'effettiva ibridità e successivamente una valutazione delle caratteristiche qualitative con l'obiettivo di ampliare i campi di impiego delle nuove *cultivar* in vista di una loro immissione sul mercato.

APPENDICE

1) Tavola sinottica del genere *Hydrangea* (Classificazione E. McClintock 1957)

Genere *Hydrangea* Linnaeus 1753

Sezione 1: *Hydrangea* Linnaeus 1753

Sottosezione 1: ***Hydrangea*** (Americanae)

Hydrangea arborescens L. subsp. *arborescens* 1753

Hydrangea arborescens subsp. *discolor* Seringe 1956

Hydrangea arborescens subsp. *radiata* (Walter) McClintock 1956

Hydrangea quercifolia Bartram 1791

Sottosezione 2: ***Asperae***

Hydrangea sikokiana Maximowicz 1887

Hydrangea involucrata Siebold & Zuccarini 1839

Hydrangea aspera D. Don 1825 subsp. *aspera* 1825

Hydrangea aspera subsp. *strigosa* (Rehder) McClintock 1956

Hydrangea aspera subsp. *robusta* (Hooker f. & Thomson) McClintock 1956

Hydrangea aspera subsp. *sargentiana* (Rehder) McClintock 1956

Hydrangea villosa Rehder 1911

Sottosezione 3: ***Calyptanthae***

Hydrangea anomala D. Don subsp. *anomala* 1825

Hydrangea anomala subsp. *petiolaris* (Siebold & Zuccarini) McClintock 1956

Sottosezione 4: ***Petalanthae***

Hydrangea hirta (Thunberg) Siebold 1828

Hydrangea scadens (L.f.) Seringe subsp. *scadens* 1830

Hydrangea scadens subsp. *liukiuensis* (Nakai) McClintock 1956

Hydrangea scadens subsp. *chinensis* (Maximowicz) McClintock 1956

Hydrangea scadens subsp. *kwangtungensis* (Merrill) McClintock 1956

Sottosezione 5: ***Heteromallae***

Hydrangea paniculata Siebold 1829

Hydrangea heteromalla D. Don 1825

Sottosezione 6: ***Macrophyllae***

Hydrangea macrophylla (Thunberg) Seringe subsp. *macrophylla* 1830

Hydrangea macrophylla subsp. *stylosa* (Hooker f. & Thomson) McClintock 1956

Hydrangea macrophylla subsp. *chungii* (Rehder) McClintock 1956

Hydrangea serrata (Thunberg) Seringe

Sezione 2: CORNIDIA

Sottosezione 1: ***Monosegia*** (Americanae)

Hydrangea seemannii Riley 1924

Hydrangea asterolasia Diels 1941

Hydrangea integrifolia Hayata 1906

Hydrangea oerstedtii Briquet 1919

Hydrangea peruviana Moricand 1830

Hydrangea diplostemonia (Donnell Smith) Standley 1921

Hydrangea preslii Briquet 1919

Hydrangea steyermarkii Standley 1940

Sottosezione 2: ***Polystegia***

Hydrangea serratifolia (Hooker & Arnott) Philippi f. 1881

Hydrangea tarapotensis Briquet 1919

Hydrangea jelskii Szyszylowicz 1895

Hydrangea mathewsii Briquet 1919

2) **Elenco dei descrittori morfometrici CPVO-UPOV.** I descrittori contraddistinti dalla lettera QL sono di tipo qualitativo, i descrittori contraddistinti dalla lettera QN sono di tipo quantitativo.

HYDRANGEA	descrittori specifici
QL1. Portamento pianta	eretto
	prostrato
	rampicante
QN1. Altezza pianta alla fioritura (solo per le varietà non rampicanti)	bassa
	media
	alta
QN2. Lunghezza foglie	corta
	media
	lunga
QN3. Larghezza foglia	stretta
	media
	ampia
QL2. Colore principale lamina fogliare	verde
	viola
QL3. Variegatura lamina fogliare	assente
	presente
QN4. Lucidità pagina superiore lamina fogliare	assente
	presente
QL4. Forma lamina fogliare	circolare
	ellittica
	ovata
QL5. Forma apice fogliare	acuminato
	acuto
	arrotondato
QL6. Forma base fogliare	arrotondata
	Acuta
	ottusa
	cordata
QL7. Lobatura lamina fogliare	assente
	presente
QN5. Tipo di incisione lamina fogliare	fine
	medio
	grossolano

QL8. Tipo di incisione margine fogliare	crenato
	serrato
QN6. Diametro infiorescenza	piccolo
	medio
	largo
QN7. Cospicuità fiori fertili	non cospicui
	cospicui
QL9. Disposizione fiori sterili	irregolare
solo per le varietà <i>lacecap</i>	su una linea
	su due o più linee
QL10. Forma infiorescenza	<i>mophead</i>
	<i>lacecap</i>
	panicolo
QN8. Fiori sterili: diametro del calice	piccolo
	medio
	largo
QL11. Fiori sterili: intensità di colore	debole
	medio
	forte
QL12. Fiori sterili: tipo	singolo (n° dei sepali da 3 a 6)
	doppio (n° dei sepali > 6)
QL13. Fiori sterili: sovrapposizione	assente
	presente
QN9. Fiori sterili: grado di sovrapposizione	assente
	debole
	medio
	forte
	molto forte
QN10. Fiori sterili: incisione margine	assente su tutti i sepali
	presente su alcuni
	presente su tutti i sepali
QL14. Fiori sterili: tipo di incisione	crenato
	serrato
QL15. Fiori fertili: intensità colorazione	debole
	medio
	forte
QL16. Intensità colorazione antere	debole
	medio

	forte
QN11. Epoca di fioritura	precoce
	medio
	tardivo

3) Protocollo di estrazione DNA: Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek-Germany)

- Polverizzare 60 mg di materiale vegetale di partenza con azoto liquido, trasferirlo in eppendorf da 1.5 ml ed aggiungere 400 µl di Lysis Buffer P e 20 µl di proteinasi K, quindi vortexare.
- Incubare la miscela per 30' a 65 °C e trasferire il lisato sulle colonnette con filtro; centrifugare per 1' a 12.000 rpm e rimuovere le colonnette.
- Se è necessario eliminare l'RNA, aggiungere ad ogni campione 40 µl di RNasi A (10 mg/ml), vortexare ed incubare a temperatura ambiente per 5'.
- Aggiungere 200 µl del Binding Buffer P e vortexare accuratamente.
- Sistemare le colonnette (Spin Filter) in nuove eppendorf da 2 ml, trasferirvi i campioni ed incubare per 1', quindi centrifugare 1' a 12.000 rpm; eliminare il filtrato e riposizionare la colonnetta nell'eppendorf.
- Aggiungere 550 µl di Wash Buffer I e centrifugare per 1' a 12.000 rpm; eliminare il filtrato e riposizionare la colonnetta nell'eppendorf.
- Aggiungere 550 µl di Wash Buffer II e centrifugare per 1' a 12.000 rpm; eliminare il filtrato, posizionare nuovamente le colonnette nelle eppendorf e ripetere nuovamente il lavaggio
- Eliminare il filtrato e centrifugare per 2' a 12.000 rpm (per rimuovere eventuali residui di etanolo).
- Posizionare le colonnette in eppendorf da 1.5 ml ed aggiungere 100 µl di Elution Buffer D; incubare per 3' a temperatura ambiente e centrifugare per 1' a 10.000 rpm.

Pubblicazioni inerenti l'attività di dottorato

Rizzo, B. Nesi, L. Stefani, M. Antonetti, S. Lazzereschi, S. Pecchioli, M. Della Bartola, A. Materazzi, A. Grassotti, (2011) – Occurrence of *Hydrangea RingSpot virus* in a *Hydrangea* varietal collection. Journal of Plant Pathology (2011), 93 (4, Supplement), S4.25-S.4.62.

Pecchioli S., Lazzereschi S., Nesi B., Antonetti M., Salazar-Orozco G. and Grassotti A. (2011) - Morphological Characterization of a Collection of *Hydrangea* spp. VII International Symposium on New Floricultural Crops, Buenos Aires Argentina 22-25 Novembre 2011: 44. In press on Acta Hort.

Lazzereschi S., Nesi B., Pecchioli S., Salazar-Orozco G., Antonetti M. and Grassotti A. (2011) –Effects of Colored Shade Netting on the Vegetative Development and the Photosynthetic Activity in Several *Hydrangea* Genotypes. VII International Symposium on New Floricultural Crops, Buenos Aires Argentina 22-25 Novembre 2011: 59. In press on Acta Hort.

Lazzereschi S., Nesi B., Pecchioli S., Antonetti M., Grassotti A., Sacco E., Savona M., Ruffoni B., Pasqualetto P. L. (2012) - Valorizzazione a scopi commerciali del genere *Hydrangea*. Acta Italus Hortus, 4: 131-143.

Lazzereschi S., Nesi B., Pecchioli S., Grassotti A. (2012) Effects of Colored Shade Netting: Morphological and Physiological Responses of Several *Hydrangea* Genotypes. Book of Abstract Hydrangea 2012 International Symposium 5-6 July 2012, France Angers pag. 18. In press.

Nesi B., Lazzereschi S., Pecchioli S. Grassotti A. (2012) Morphological and Genetic Characterization of a Collection of *Hydrangea* spp. Book of Abstract Hydrangea 2012 International Symposium 5-6 July 2012, France Angers pag. 8. In press.

Sacco E., Lazzereschi S., Nesi B., Savona M., Pecchioli S., Grassotti A., Ruffoni B., Pasqualetto P. L. (2012) - Primi risultati di propagazione *in vitro* di alcune accessioni di *Hydrangea*. Acta Italus Hortus, 6:38-43.

BIBLIOGRAFIA

- Abu Dahab T.A.M., 2007. *In vitro* propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. Arab J. Biotech., Vol. 10, No (1) Jan. (2007): 161-178.
- Aert R., Voet M., Van Campenhout S., Vander Stappen J., Volckaert., 1998. Polymerase chain reaction. In: A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram (eds) Molecular Tools for Screening Biodiversity - Plants and animals, 8.1: 111-117.
- Amano J., Kuwayama S., Mizuta Y., Oomiya T., Nakamura T., Nakano M., 2007. Early identification of intra- and intergeneric hybrids among Colchicaceous ornamentals, *Gloriosa* spp., *Littonia modesta* Hook and *Sandersonia aurantiaca* Hook., by flow cytometry and random amplified polymorphic DNA analysis. *Japan Soc Hort Sci* 76:73-78.
- Andrews A.T., 1990. Electrophoresis. Techniques and biochemical and clinical applications. Oxford Univ. Press, NY.
- Bailey D.C., 1983. Isozymic variation and plant breeders' rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds), Isozymes in plant genetics and breeding - Part A: 425-438.
- Batschauer A., 1998. Photoreceptors of higher plants. *Planta*, 206, 479-92.
- Bertrand H., 2000. Management and knowledge of the *Hydrangea* collection of Angers. Morphological characters and data analysis. *Acta Hort.*, 508: 173-178.
- Brettschneider R., 1998. RFLP analysis. In: A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram (eds) Molecular Tools for Screening Biodiversity - Plants and animals, 6: 85-94.
- Brewbaker J.L., 1957. Pollen cytology and self-incompatibility system in plants. *J. Hered.* 48: 271-277.
- Bruna S., Burchi G., De Benedetti L., Mercuri A., Schiva T., 2002. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for genetic improvement of *Limonium* spp. Atti III Workshop: 'Lo stato dell'arte nel miglioramento genetico delle principali specie ortoflorofrutticole di interesse mediterraneo' Giornate Scientifiche SOI (Bari, 25-26 Giugno 2002), 407-414.
- BRG - Bureau des Ressources Genétiques, 2007. Répertoire des Ressources Génétiques *Hydrangea* L. - Réseau *Hydrangea* 2006.
- Camlin M.S., 2003. Possible future roles for molecular techniques in the identification and registration of new plant cultivars. International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture. *Acta Hort.*, 546: 37-47.
- Cerbah M., Mortreau E., Brown S., Siljak-Yakovlev S., Bertrand H., Lambert C., 2001. Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*.

Ciofi C., Funk S.M., Coote T., Cheesman D.J., Hammond L.R., Saccheri I.J., Bruford M.W., 1998. Genotyping with microsatellite markers. In: A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity - Plants and animals*, 11.1: 195-204.

Cronquist A., 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Colombia University Press, New York.

Damiano C., Palombi M.A., 2000. La micropropagazione 20 anni dopo: innovazioni tecniche e ottimizzazione dei protocolli delle colture - *in vitro*. *Frutticoltura* 2: 48-56.

De Benedetti L., Burchi G., Mercuri A., Secchioni N., Faccioli P., Schiva T., 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the verification of hybridity in interspecific crosses of *Alstroemeria*. *Plant Breeding* 119: 443-445.

de Nettancourt D., 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin.

De Paoli G., Rossi V., Scozzoli A., 1993. *Micropropagazione delle piante ortoflorofrutticole*. Edagricole-Edizione Agricole della Calderini.

Dipartimento delle Politiche di Sviluppo-Direzione Generale dello Sviluppo Rurale, MiPAAF 2009. *Miglioramento delle statistiche congiunturali delle colture floricole e orticole - secondo anno di attività. Indagine florovivaismo 2007. Relazione finale*.

Dirr, M.A. 1990. *Manual of Woody Landscape Plants: Their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses*. Stipes Publishing Company: 380-390.

Douglas, C.B., 1983. Isozymic variation and plant breeders' rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds), *Isozymes in plant genetics and breeding - Part A*: 425-438.

Emiliani G., 2002. Variabilità genetica di *Fagus Sylvatica*. L. in Italia Meridionale. Tesi di laurea.

Fallik E., Alakali-Tuvia Sh., Parselan Y., Aharon Z., Elmann A., Offir Y., Matan E., Yehezkel H., Ratner K., Zur N., Sharak Y., 2009. Can colored shade nets maintain sweet pepper quality during storage and marketing? *Acta Hort.* 830: 37-44.

Fallik E., Goren A., Alakali-Tuvia Sh., Perzelan Y., Aharon Z., Sharak Y., 2010. The effect of colored shade nets on sweet bell pepper quality after prolonged storage and shelf life. *Book of abstracts of 28th International Horticultural Congress*. Lisboa, Portugal, Volume II, p. 198.

Fritegotto S. e Vitale A., 2012. Miglioramenti morfologici con le reti foto-selettive. *Culture Protette*, n. 9: 54-60.

Garcia-Mas J., Graziano E., Aranzana M.J., Monforte A., Oliver M., Ballester J., Viruel M.A., Arus P., 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos. In: *los marcadores geneticos en la mejora vegetal*, 93-151..

Gentile A., Quarta R., 2003. Miglioramento genetico del pesco mediante biotecnologie e biologia molecolare: stato dell'arte. Da: IV Convegno Nazionale sulla Peschicoltura Meridionale, Campobello di Licata ed Agrigento, 11-12 settembre 2003.

Gronovius J.F., 1739. Flora Virginica.

Haworth-Booth M., 1984. The Hydrangeas. 5th ed. Constable and Company, London.

Heuvelink Ep. e Gonzalez-Real M.M., 2008. Innovazioni di tecnica colturale in coltura protetta e interazioni pianta-ambiente. Review n.7 - *Italus Hortus* 15 (1), 2008: 15-25.

Horticulture - Réseau des Nouvelles des Marchés - PACA, Note technique n° 4 - Juillet 2012.

Huxley A., Griffiths M., Levy M., 1992. The New Royal Horticultural Society dictionary of gardening. Macmillan London.

Ilic Z., Milenkovic L., Durovka M., Kapoulas N., 2011. The effect of color shade nets on the greenhouse climate and pepper yield. 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia. 529-532.

Infante R. e Gonzales J., 2002. Early maturing peach embryo rescue and *in vitro* survival at different fruit growth stages. Proc. 5th IS on Peach, Acta Hort. 592: 89-92.

International Union for the Protection of New Varieties of Plants UPOV (2011). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. TG/133/4.

Jones K.D. and Reed S.M., 2005. Recent developments in *Hydrangea* interspecific hybridization. Plant Breeding and Evaluation Section - SNA Research Conference - Vol. 50: 643-645.

Jones K.D. and Reed S.M., 2006. Production and verification of *Hydrangea arborescens* 'Dardom' x *H. involucrata* Hybrids. HortScience, 41(3): 564-566.

Joung Y.H., Suh J.K., Lee N.S., Eum S.M., Choi I.Y., Roh M., 2010. Identification of *Hydrangeaceae* accessions of wild origin from Jeju, Korea, using molecular markers. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization (2010) 8 (3): 235-241.

Kasperbauer M.J., 1994. Light and plant development. In: *Plant-environment interactions*. (Wilkinson, R. E., Ed.). Marcel Dekker Inc., NY, USA, 83-123.

Kato J., Ishikawa R., Mii M., 2001. Different genomic combinations in inter-section hybrids obtained from the crosses between *Primula sieboldii* (Section Cortusoides) and *P. obconica* (Section Obconicolisteri) by the embryo rescue technique. *Theor Appl Genet* 102: 1129-1135.

- Kudo N., Matsui T., Okada T., 2008. A novel interspecific hybrid plant between *Hydrangea scandens* ssp. *chinensis* and *H. macrophylla* via ovule culture. *Plant Biotechnology*, 25: 529-533.
- Lambert C., Bertrand H., Lallemant J., Bourgoïn M., 2000. Characterisation of a collection of *Hydrangea macrophylla* using isoenzyme analysis. *Acta Hort.*, 508: 295-296.
- Lawson-Hall T. and Rothera B., 2004. *Hydrangeas - A Gardener's Guide*. B.T. Batsford.
- Levi L., Rowland L., Hartung J., 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. *HortScience* 28: 1188-1190.
- Lindstrom J.T., Matthew C.P., Dirr M.A., 2003. Molecular Assessment of remountant (Reblooming) *Hydrangea macrophylla* cultivars. *J. Environ. Hort.*, 21(2): 57-60.
- Liu Y.-J., Mu Y.-J., Zhu Y.-G., Ding H., Crystal Arens N., 2007. Which ornamental plant species effectively remove benzene from indoor air? *Atmospheric Environment*, Vol. 41 (3): 650-654.
- Lombardi P., 2009. *Ortensie, azalee, camelie e altre acidofile*. Giunti Editore S.p.A., 2009.
- Mancuso M.L., Germanà M.A., Caruso T., 2002. Peach breeding programme for early ripening, low chilling requirement cultivars: embryo rescue and somatic embryogenesis. *Proc. 5th ISHS on Peach, Acta Hort.* 592: 125-129.
- Matthes M.C., Daly A., Edwards K.J., 1998. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity - Plants and animals*, 10: 183-190.
- McClintock E., 1957. A monograph of the genus *Hydrangea*. *Proc. Calif. Acad. Sci.*, 29(5): 147-256.
- Meunier J.R., Grimont P.A.D., 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, 144: 373-379.
- Moe R. and Heins R.D., 1990. Control of plant morphogenesis and flowering by light quality and temperature. *Acta Hort.* 272: 81-89.
- Mohr H., 1972. *Lectures on photomorphogenesis*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Mohr H., 1994. Coaction between pigment systems. In: *Photomorphogenesis in plants*, 2nd ed., Kendrick R. E. and Kronenberg G. H. M. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 353-73.

- Monticelli S., Festa S., Palombi M. A., 2002. La rigenerazione avventizia *in vitro* induce variabilità genetica in fragola? Lavoro svolto nell'ambito del Progetto Finalizzato Mi.P.A.F. 'Frutticoltura', Sottoprogetto 'Miglioramento genetico della fragola'. Giornate Scientifiche SOI Spoleto 23-25 Aprile 2002.
- Morgan D.C. and Smith H., 1976. Linear relationship between phytochrome photoequilibrium and growth in plants under natural radiation. *Nature* 262: 210-21.
- Mortreau E., Bertrand H., Lambert C., Lallemand J., 2003. Collection of *Hydrangea*: genetic resources characterisation. *Acta Hort.*, 623: 231-238.
- Muller-Starck G., 1998. Isozymes. In: A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity - Plants and animals*, 5.1: 75-81.
- Mullis K.B., 1991. La scoperta della reazione a catena della polimerasi. *Le Scienze*, quaderni, 62: 51-58.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakano M. and Mii M., 2008. Recent advances in wide hybridization and embryo rescue of floricultural plants in Japan. *Plant Biotechnology*, 25:509.
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nimura M., Kato J., Mii M., Morioka K., 2003. Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theor Appl Genet* 106: 1164-1170.
- Nissim-Levi A., Farkash L., Hamburger D., Ovadia R., Forrer I., Kagan S., Oren-Shamir M., 2008. Light-scattering shade net increases branching and flowering in ornamental pot plants. *J. Hort. Sci. Biotech.* 83: 9-14.
- Nordli E.F., Strom M., Torre S., 2011. Temperature and photoperiod control of morphology and flowering time in two greenhouse grown *Hydrangea macrophylla* cultivar. *Scientia Horticulturae* 127: 372-377.
- Nuez F., Carrillo J.M., DE Ron A.M., 2000. Los marcadores geneticos en la mejora vegetal. *Introduction*, 1: 3-22.
- Oren-Shamir M., Gussakovsky E. E., Shpiegel E., Nissim-Levi A., Ratner K., Ovadia R., Giller Y.E., Sharak Y., 2001. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2001, 76 (3), 353-361.
- Palombi M.A., 2000. I marcatori molecolari nel controllo della stabilità genetica di specie frutticole propagate vegetativamente. *Atti delle V Giornate Scientifiche Sirmione* 28-30 marzo 2000. Vol.2.

- Palombi M.A., Damiano C., 2002. Comparison between RAPDs and SSRs molecular markers to detect genetic variation in kiwifruit [*Actinidia deliciosa* A. Chev]. *Plant Cell Rep* 20: 1061–1066.
- Pancaldi M., 1998. Marcatori biochimici: gli isoenzimi. In: Sansavini S., Pancaldi M., *Lezioni di biotecnologie delle colture frutticole*, Clueb Bologna (ed.), 8: 50-54.
- Pancaldi M., 1998a. Marcatori biochimici: gli isoenzimi. In: Sansavini S., Pancaldi M., *Lezioni di biotecnologie delle colture frutticole*, Clueb Bologna (ed.), 8: 50-54.
- Pasquali M., Gilardi G., Gullino M. L., Garibaldi A., 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* da lattuga: compatibilità vegetativa e analisi RAPD. *Informatore fitopatologico* 10 / 2003.
- Priel A., 2001. Coloured nets can replace chemical growth regulators. *FlowerTECH*. 4: 12-13.
- Ponti I., Bordini R., Sansavini S., 1997. Aspettative e utilità della certificazione genetico-molecolare del materiale vivaistico in frutticoltura. Atti del convegno 'Riconoscimento e rispondenza genetica delle piante da frutto con tecniche di fingerprinting'. AGRO-BIO-FRUIT, Cesena: 9-10.
- Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., Xu Y. and Wagner D., 1995. Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science*, 268, 675-80.
- Rajapakse N.C., Young, R.E., McMahon, M.J., Oi, R., 1999. Plant height control by photoselective filters: Current status and future prospects. *HortTechnology* 9: 618–624.
- Rajapakse S., 2003. Progress in application of molecular markers to genetic improvement of horticultural crops. XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement. *Acta Hort.*, 625: 29-36.
- Rampinini G., 2003a. Guida alla coltivazione delle piante ornamentali: *Hydrangea macrophylla*. *Clamer informa* n° 6: 33-48.
- Rampinini G., 2003b. Guida alla coltivazione delle piante ornamentali: *Hydrangea macrophylla*. *Clamer informa*, n° 7/8: 33-49.
- Reed S.M., 2000. Compatibility studies in *Hydrangea*. *J. Environ. Hort.* 18 (1): 29-33.
- Reed S.M., Riedel G.M., Pooler M.R., 2001. Verification and establishment of *H. macrophylla* 'Kardinal' x *H. paniculata* 'Brussels Lace' interspecific hybrids. *J. environ. Hort.*, 19(2): 85-88.
- Reed S.M., 2005. Pollination biology of *Hydrangea macrophylla*. *HortScience* 40(2): 335-338.

- Reed S.M. and Rinehart T.A., 2007. Simple sequence Repeat marker analysis of genetic relationships within *Hydrangea macrophylla*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132(3): 341-351.
- Reed S.M. and Rinehart T.A., 2009. Simple-sequence Repeat marker analysis of genetic relationships within *Hydrangea paniculata*. HortScience 44(1): 27-31.
- Rinehart T.A., Scheffler B.E., Reed S.M., 2006. Genetic diversity estimates for the genus *Hydrangea* and development of a molecular key based on SSR. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131(6):787-797.
- Rolfh F.J., 1993. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8 Exeter Publications Setauket. New York.
- Rossi L., Ancora G., Benvenuto E., Giorgi B., 2001 - Biotecnologie vegetali, ENEA. 21mo Secolo Scienza e Tecnologia.
- Saitou N., Nei M., 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.
- Sansavini S., Pancaldi M., 1995. Ruolo delle biotecnologie nella identificazione, moltiplicazione e diffusione di materiale di propagazione in frutticoltura. Atti del convegno su 'Tecnologie avanzate per l'identificazione varietale e il controllo genetico-sanitario nel vivaismo fruttivendolo'. AGRO-BIO-FRUIT, Cesena : 9-29.
- Sansavini S., Pancaldi M., Vinatzer B., 1997. Il 'fingerprinting' nelle specie da frutto: progressi nelle tecnologie molecolari e trasferibilità dei metodi nell'identificazione varietale e nella distinzione dei cloni. Atti del convegno su 'Riconoscimento e rispondenza genetica delle piante da frutto con tecniche di fingerprinting'. AGRO-BIO-FRUIT, Cesena : AGRO-BIO-FRUIT, Cesena: 11-30.
- Sax K., 1931. Chromosome numbers in the ligneous *Saxifragaceae*. J. Arnold Arbor., 12: 198-205.
- Scarascia Mugnozza G., Vox G., Schettini E., 2011. Radiometric properties of coloured nets for peach tree protected cultivation. Convegno di Medio Termine dell'Associazione Italiana di Ingegneria Agraria, Belgirate, 22-24 settembre 2011.
- Sebastian T.K. and Heurser C.W., 1987. *In vitro* propagation of *Hydrangea quercifolia* Bartr. Scientia Hort. 31: 303-309.
- Shahak Y., Lahav T., Spiegel E., Philosoph_Hadas S., Meir S., Orenstein H., Gussakovsky E., Ratner K., Giller Y., Shapchisky S., Zur N., Rosenberger I., Gal Z. and Ganelevin R., 2002. Growing Aralia and Monstera under colored shade nets. Olam Poreah, July issue 13:60-62 (in Hebrew).
- Shahak Y., Gussakovsky E.E., Cohen Y., Lurie S., Stern R., Kfir S., Naor A., Atzmon I., Doron I., Greenblat-Avron Y., 2004a. ColorNets: A new approach for light manipulation in fruit trees. Acta Hort. 636: 609-616.

Shahak Y., Gussakovsky E.E., Gal E., Ganelevin R., 2004b. ColorNets: Crop protection and light-quality manipulation in one technology. *Acta Hort.* 659: 143-151.

Smith H., 1995. Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 289-315.

Smulders M.J.M., Bredemeijer G., Rus-Kortekaas W., Arens P., Vosnam B., 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentus* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 264-272.

Sofo A. Fotomorfogenesi, effetto dei fitormoni e regolazione genica durante il ciclo vitale delle piante. Tesi di laurea.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

Tautz D., 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.*, 17 (16) : 6463-6471.

Tautz D., 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In *DNA Fingerprinting: State of Science*. Edited by: s.d.j. Pena, E. Chacabarty, JT Epplen and AJ Jeffreys. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.

Testolin R., Filippetti I., 1998. I microsatelliti. In: Sansavini S., Pancaldi M., *Lezioni di biotecnologie delle colture frutticole*, Clueb Bologna (ed.), 9B: 60-65.

van Bloemenveillingen in Nederland, Leiden 2008-2010.

Van Gelderen C.J. and Van Gelderen D.M., 2004. *Encyclopedia on Hydrangeas*. Timber Press (August 15, 2004).

Vazquez J.F., Sanchez-Yelamo M.D., Carrillo J.M., 2000. Marcadores morfológicos y bioquímicos. In: 'Los marcadores genéticos en la mejora vegetal', 2:25-89.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hrnés M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.*, 23: 4407-4414.

Wagenaar B, 2012. Status and prospects for the markets hydrangea. *Book of Abstract: Hydrangea 2012 International Symposium*, Angers, 5-6 July.

Weber J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.

Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.*, 18: 7213-7218.

Ringraziamenti

Con questo lavoro di tesi intendo ringraziare in primo luogo il mio tutor, Dott. Antonio Grassotti, per i preziosi consigli dati e per avermi spronato più di una volta all'inizio della mia attività.

Non posso poi dimenticare due preziose colleghe ed amiche del CRA-VIV di Pescia, le Dott.sse Beatrice Nesi e Simona Pecchioli, che oltre ad avermi aiutato nel mio lavoro e nella stesura di questa tesi, non mi hanno mai fatto mancare il loro sostegno e la loro guida, mostrandosi sempre pronte ad offrirmi il loro aiuto anche nei momenti più disperati.

Un ringraziamento anche al Dott. Gianluca Burchi, per la fiducia, l'incoraggiamento e l'entusiasmo dimostrato.

Infine gli ultimi ringraziamenti, non certo in ordine di importanza, vanno alla mia famiglia, ad Alessandro, a Giulio e a tutti coloro che mi sono stati vicino.