



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN "ORTOFLOROFRUTTICOLTURA"
XX Ciclo

**Metodologie per l'ottenimento di ibridi interspecifici
di *Lilium* spp. e per la verifica dello stato ibrido delle
progenie**

AGR/04

Coordinatore: Prof. Alberto Graifenberg

.....

Tutor: Dott. Antonio Grassotti

.....

Dottoranda: Dott.ssa Nesi Beatrice

.....

.....

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1 - IL <i>LILIUM</i>	1
1.1 Origine, diffusione ed importanza	1
1.2 Caratteristiche morfologiche	2
1.3 Ibridi e loro classificazione	4
1.4 Situazione economica	8
CAPITOLO 2 - TECNICHE COLTURALI E DI PROPAGAZIONE	10
2.1 Ciclo vegetativo	10
2.2 Tecnica colturale per la produzione di fiore reciso	11
2.3 Avversità e difesa del <i>Lilium</i>	12
2.4 Propagazione	14
2.4.1 Propagazione gamica	14
2.4.2 Propagazione agamica	15
CAPITOLO 3 - TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO	17
3.1 Barriere sessuali	19
3.1.1 Barriere pre-zigotiche	19
3.1.2 Barriere post-zigotiche	20
3.2 Ibridazione somatica	21
3.3 Coltura ‘in vitro’ per il miglioramento genetico	22
3.3.1 Moltiplicazione di gemme da scaglie	23
3.3.2 Embriocoltura	24
3.3.3 Formazione di gemme avventizie da altri tessuti	25
3.3.4 Produzione di aploidi ‘in vitro’	26
3.3.5 Colture ‘in vitro’ per la coltivazione di germoplasma	26
3.3.6 Il mezzo di coltura	27
3.3.7 Le fasi della coltura	28
3.4 Ingegneria genetica	30
3.4.1 Marcatori molecolari	30
3.4.2 Elettroforesi	34

PARTE SPERIMENTALE	
SCOPO DEL LAVORO	35
CAPITOLO 4 – MATERIALI E METODI	36
4.1 Coltivazione di piante di <i>Lilium</i>	36
4.2 Realizzazione degli incroci	39
4.3 Prelievo degli ovari	41
4.4 Coltura ‘<i>in vitro</i>’ di sezioni di ovari ed ovuli	41
4.3.1 Sterilizzazione degli ovari	41
4.3.2 Substrati usati per indurre la germinazione dell’embrione	41
4.3.3 Trasferimento e sviluppo degli espianti	42
4.4 Identificazione genotipica del materiale ottenuto	45
4.4.1 Estrazione DNA dai parentali e dagli ibridi	46
4.4.2 Quantificazione DNA	46
4.4.3 Amplificazione dei campioni mediante RADP-PCR	47
4.4.4 Primer	48
4.4.5 Riconoscimento di un ibrido	49
CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE	50
5.1 Coltivazione di piante di <i>Lilium</i>	50
5.2 Programmazione degli incroci e successivo prelievo degli ovari	50
5.3 Substrati utilizzati per la coltura di ovari e di ovuli	56
5.3.1 Coltura di sezioni di ovario	56
5.3.2 Coltura di ovuli isolati	58
5.4 Ottenimento di piante da ovuli	59
5.5 Moltiplicazione di piante ottenute da incroci e loro ambientamento	60
5.6 Analisi molecolare degli ipotetici ibridi	61
5.7 Estrazione del DNA da parentali ed ibridi	61
5.8 Identificazione dei primer informativi	62
5.9 Analisi delle progenie	64
5.9.1 Analisi delle progenie CB ₄₆ e CB ₄₇	64
5.9.2 Analisi delle progenie AC ₄₂ e AC ₄₄	68
5.9.3 Analisi delle progenie AB ₃₀ e AB ₅₀	71
CONCLUSIONI	75

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1 - IL *LILIUM*

1.1 Origine, diffusione ed importanza

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

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

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

Il genere *Lilium* comprende 80 - 100 specie originarie dell’Europa, Asia, Nord America (Anderson, 1986), tra i 10° e i 60° Nord di latitudine. L’areale di diffusione si estende su di un territorio vastissimo e comprende zone temperate dell’Europa e dell’Asia (al di sopra dell’equatore) e l’America Settentrionale. In senso longitudinale, tale area si estende attraverso l’Europa e l’Asia, sino alla Kamchatka e, dall’isola di Vancouver ad oriente, attraverso la nuova America, fino alla Nuova Scozia.

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

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

1.2 Caratteristiche morfologiche

Il *Lilium spp.*, bulbosa monocotiledone, è una pianta perenne la cui struttura base è costituita da un organo di riserva sotterraneo, un bulbo non tunicato, costituito da un piatto basale, detto *disco*, carnoso, appiattito alla base e conico superiormente sul quale sono presenti l'apice vegetativo e le radici perenni. Sul disco ed intorno all'apice sono inserite in maniera spiralata numerose scaglie, che costituiscono la parte più visibile del bulbo. Queste morfologicamente non sono altro che le foglie basali modificate, con consistenza carnosa e funzione di riserva espletata da nutrienti quali amidi, zuccheri, proteine e mucillagini finalizzate ad assicurare elevate quantità di acqua e amminoacidi.

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

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

L'apparato radicale (*radici basali*) del bulbo è perenne, posto alla base del bulbo, si diparte dal girello ed ha la funzione di supportare la ripresa vegetativa del bulbo stesso, dopo la piantagione. Una sua corretta manipolazione durante le diverse fasi della conservazione del bulbo in magazzino è quindi importante per la buona riuscita della coltivazione stessa, in particolare per la produzione di fiore reciso.

I bulbi appartenenti al gruppo commerciale degli ibridi Asiatici presentano anche un apparato radicale secondario, avventizio, detto radici dello stelo o *stem roots*, perché poste nel tratto di fusto al di sopra del bulbo, appena al di sotto del livello del terreno e durano soltanto una stagione vegetativa, per poi disseccare con il fusto stesso (Fig. 1). Esse hanno una funzione fondamentale dal punto di vista della nutrizione della pianta durante l'accrescimento, la fioritura e la successiva fase di accumulo di sostanze di riserva.



Fig. 1.1: Apparato radicale in *Lilium*: a) radici basali, b) radici avventizie o secondarie.

Lo stelo o fusto erbaceo è eretto, più o meno rigido, la sua consistenza varia infatti durante i diversi stadi vitali della pianta, ma anche a seconda delle specie e delle varietà. Di colore dal verde al violetto purpureo, è costituito da numerosi nodi e internodi, il cui allungamento influisce sull'altezza finale della pianta.

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

I fiori sono grandi, appariscenti, spesso profumati, eretti, orizzontali o penduli, solitari o inseriti in un racemo o falso ombrello, con pochi o molti fiori, perianzio deciduo. I tepali sono segmenti liberi, variabili di forma o portamento, non troppo larghi alla base, tutti provvisti di nettario. La struttura florale delle *Liliaceae* mostra: da tre a sei tepali, sei stami, con sottili filamenti e antere dorsofisse, molto caratteristiche per la loro ricchezza in polline; lo stilo è trifido. I fiori collocati sulla parte distale dello stelo, risultano riuniti in infiorescenze, il cui numero di fiori e/o di palchi dipende dalla grandezza del bulbo. Le infiorescenze sono di diverso tipo: a singolo fiore terminale (*Lilium longiflorum*), a racemo o grappolo (*Lilium candidum*; *L. speciosum*, *L. tigrinum*), ad ombrella quando tutti i fiori si originano da un solo punto o nodo dello stelo (ibridi Mid century; *L. auratum*,...).

L'accentuata variazione del colore dei tepali dimostra l'elevata variabilità genetica intrinseca nel genere stesso: le gradazioni di colore vanno dal giallo al rosso, con l'esclusione del colore blu, che rimane un pigmento estraneo al genere *Lilium*.

Il frutto (Fig. 1.2) è una capsula triloculata, divisa cioè in tre sezioni bilobate da membrane interne. La capsula di natura papiracea (Beattie e White, 1993) è lunga anche fino a 6-7 cm, e può contenere fino a 200 semi. Il numero cromosomico è generalmente $2n=24$ (diploide), anche se esistono cultivars poliploidi ottenute da incroci intra e interspecifici.

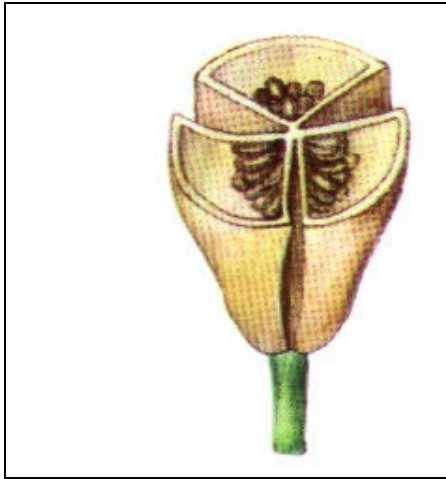


Fig. 1.2: Capsula trilocolata di *Lilium*.

1.3 Ibridi e loro classificazione

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

Se si tiene conto della larga distribuzione delle specie diverse, comprese nel genere *Lilium* e gli habitat diversi da cui originano, è evidente che la gamma di esigenze pedoclimatiche e colturali è piuttosto estesa e varia secondo gruppi di specie. Per quanto attiene alla sistematica di queste specie, una prima classificazione può essere rappresentata dalla loro originaria distribuzione geografica, indicativa per la scelta degli ambienti ottimali di coltivazione. Sulla base di questa, si distinguono specie Europee, Asiatiche ed Americane.

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

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

Le specie **Americane** hanno invece talvolta bulbi rizomatosi o stoloniferi; sembrano prediligere terreni costituiti da un composto che contenga in abbondanza residui di foglie o torba. Vi appartengono: *L. pardalium*, *L. parryi*, *L. superbum*, *L. washingtonianum*.

Un'altra classificazione delle diverse specie è quella fatta in base alla forma del fiore:

-Sezione I “Martagon”: fiori penduli con tepali molto ricurvi all’indietro. Di questa sezione fanno parte:

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

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

-Sezione II “Isolirion o Pseudolirion”: fiori eretti a imbuto. Tra le specie di questa Sezione troviamo:

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

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

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

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

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

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

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

Le specie e varietà botaniche conosciute sono state ripartite in nove Divisioni:

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

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

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

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

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

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

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

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

- VI(a): ibridi con fiori a forma di tromba, come 'Sulphur Queen' o 'Black Dragon'
- VI(b): ibridi con fiori a forma di coppa rivolti verso l'esterno come 'Gwendoin Anley' o 'New Era';
- VI(c): ibridi con fiori pendenti come il 'Golden Clarino', 'Summer Song' e 'Christmas Day';
- VI(d): ibridi con fiori piatti, a forma di stella, come 'T. A. Havemeyer' o 'Mimosa Star'.

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

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

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

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

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

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

Gli **Ibridi Asiatici** hanno una base genetica ancora più ampia, essendo il risultato di incroci effettuati fra almeno 12 specie: *L. amabile*, *L. bulbiferum*, *L. concolor*, *L. dauricum*, *L. davidii*, *L. maculatum*, *L. leichtlinii*, *L. pumilium*, *L. henryii*, *L. japonicum* e *L. tigrinum*, ora conosciuto come *L. lancifolium*. Tali specie presentano una morfologia fiorale molto variabile: fiori piccoli del *L. pumilium*, e grandi del *L. tigrinum*. I fiori degli ibridi Asiatici sono in genere di colore arancione, rosso, giallo e bianco panna e sono poco profumati.

Negli ultimi anni si è andato fortemente affermando un quarto gruppo, quello degli “**LA**”, ibridi interspecifici tra ibridi *Longiflorum* ed ibridi Asiatici, che manifesta qualità apprezzabili sotto l’aspetto della taglia, della robustezza dello stelo, della grandezza, forma e colore dei fiori, come anche della “qualità agronomica”: presenta infatti facilità di coltivazione, resistenza alle più usuali fitopatie e virusi, ciclo breve di coltivazione (meno di 90 giorni in alcuni casi). La pianta è poco bisognosa di temperature elevate durante il periodo invernale e il bulbo è piuttosto facile da riprodurre. La disponibilità varietale risulta essere però ancora piuttosto limitata.

Per quanto riguarda la coltivazione degli ibridi di *Lilium*, nozioni più approfondite si avranno nel capitolo 2, visto che attualmente la maggior parte delle varietà coltivate sono ibridi (Tab. 1.1). Pertanto, di seguito si elencheranno alcune delle caratteristiche più importanti che differenziano gli ibridi fra loro.

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

La dimensione dei bulbi comunemente impiegati dai floricoltori, per la produzione di fiore reciso, dipende dalla varietà e dal periodo di impianto. I bulbi comunemente impiegati sono di calibro da 14/16 a 16/18 per gli Ibridi Asiatici, di calibro da 16/18 a 18/20 per gli Ibridi Orientali e di calibro 10/12 per steli monofiore e 12/14 per steli con 2-3 fiori per i *longiflorum*.

I tipi di *Lilium* che hanno una specifica rilevanza economica sono elencati nella seguente tabella:

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

Tab. 1.1: I principali tipi di *Lilium* con rilevanza economica.

1.4 Situazione economica

La floricoltura italiana, settore molto vivace dell'agricoltura nazionale, è tradizionalmente penalizzata dalla limitata disponibilità di materiale vegetale di provenienza locale e quindi è costretta ad importare quasi tutto quanto è necessario alla produzione di fiore reciso e vaso fiorito. Questo penalizza fortemente il comparto florovivaistico, che pure rimane attivo nel rapporto import-export, in particolare grazie al livello di esportazione di fiori recisi, fogliame fresco e, soprattutto, piante ornamentali. Questa situazione di dipendenza dall'estero è ancora più vera, sentita e limitante per quello che riguarda l'approvvigionamento di bulbi da fiore, che ogni anno vengono importati, in forti quantitativi, dai 700 agli 800 milioni di bulbi di dimensioni varie, appartenenti ad alcune decine di generi e specie diverse. Nel 2004 l'Italia ha importato dall'Olanda bulbi per oltre 30 milioni di Euro, rispetto ai poco più di 31 milioni di Euro per bulbi provenienti da tutto il mondo (Tab. 1.2) (AIPH/Union Fleurs, 2005).

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

Tab. 1.2: Importazione di bulbi da fiore negli anni 1997 e 2004 (AIPH/Fleurs 1998, 2005).

Tra i bulbi maggiormente coltivati per il fiore reciso figurano *Lilium*, Tulipani, Gladioli, Fresie e Iris (Grassotti e Nesi, 2002) (Tab. 1.3). I *Lilium* risultano senza dubbio la specie più importante dal punto di vista economico, con bulbi che possono costare da 0,13 a 1,80 Euro e steli fioriti che sul mercato possono essere venduti da 0,25 a 2,60 Euro (Grassotti e Nesi, 2002).

Specie	Numero Bulbi Importati
Tulipani	76,7 milioni
Iris	82,5 milioni
Gladioli	320,5 milioni
<i>Lilium</i>	559,0 milioni

Tab. 1.3: Principali bulbose importate dall'Olanda (AIPH/Union Fleurs 1998, 2005).

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

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

coincidenza con l'avvento della moneta unica europea, la coltivazione di *Lilium* per la produzione di fiore reciso, è oggi in forte ripresa in tutta Europa e quindi anche in Italia.

CAPITOLO 2 - TECNICHE COLTURALI E DI PROPAGAZIONE

2.1 Ciclo vegetativo

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

Possono essere chiaramente individuate due diverse fasi: una *fase di riposo* nei mesi freddi dell'anno, durante i quali il bulbo rimane in stasi vegetativa e una *fase vegetativa* che inizia in tarda primavera e porta, durante l'estate, all'allungamento dello stelo florale e poi alla fioritura.

Durante le fasi vegetative della pianta, si individuano due stadi: uno *stadio vegetativo*, durante il quale si assiste ad un aumento del volume del bulbo fino al raggiungimento del suo peso massimo e delle dimensioni adatte alla fioritura ed uno *stadio riproduttivo*, durante il quale viene indotta la fioritura, la differenziazione degli organi fiorali, l'allungamento dello stelo, la fioritura e la formazione del seme.

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

- I. periodo di crescita vegetativo;
- II. fioritura e stadio riproduttivo;
- III. accrescimento dell'organo propagativo con accumulo di sostanze di riserva;
- IV. stato latente di riposo o dormienza.

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

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

Durante la fase di accrescimento e di fioritura della pianta, alla base di una scaglia mediana o di una scaglia posta in prossimità dell'asse florale si differenzia solitamente un apice vegetativo, in base alla dimensione del bulbo, a volte possono svilupparsi anche più apici.

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

2.2 Tecnica colturale per la produzione di fiore reciso

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

La **temperatura**: come molte altre bulbose, i *Lilium* temono più gli eccessi di temperatura, che non il freddo. La temperatura dell'ambiente di coltivazione non dovrebbe superare i 12-15°C notturni e i 21-25°C diurni. La formazione dei fiori attraversa due stadi, prima la differenziazione e successivamente lo sviluppo, entrambi parametri importanti nel determinare il numero dei bocci che arriveranno a fiorire su ogni stelo. Infatti nei bulbi tenuti a temperature elevate (21-25°C), si induce la formazione di un numero minore di fiori, probabilmente a causa di squilibri ormonali. Viceversa, coltivare a temperature più basse, provoca il rallentamento della crescita, ma nel contempo il miglioramento della qualità, ovvero la produzione di steli più lunghi e robusti con un elevato numero di fiori. Se la temperatura viene però ridotta sotto gli 8°C, si ritarda la fioritura e si occuperebbe la serra troppo a lungo con il rischio di perdere competitività sul mercato (Pergola e Grassotti, 1984; Grassotti, 1996).

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

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

Densità di piantagione: questo parametro dipende dall'epoca di impianto, cioè la densità aumenta durante i periodi stagionali favorevoli e diminuisce nel caso di piantagioni precoci, e dal calibro dei bulbi utilizzati per la produzione. Ogni varietà è caratterizzata da uno standard per la produzione del bulbo. I bulbi con calibro maggiore sono usati nei periodi stagionalmente più sfavorevoli poiché riescono a superare meglio le difficoltà ambientali.

Epoca di piantagione: la scelta della data di piantagione è finalizzata a centrare la raccolta nei momenti di maggiore richiesta del mercato. Ciò è possibile conoscendo i tempi necessari alle varie specie per giungere alla fioritura, in funzione dell'epoca di impianto (Grassotti, 1996).

Esigenze idriche: il terreno deve essere mantenuto umido dalla piantagione dei bulbi fino alla raccolta e le irrigazioni devono essere regolate di conseguenza: meno frequenti e meno abbondanti nelle prime settimane di coltivazione e nei periodi invernali, più frequenti e più abbondanti su piante in pieno sviluppo ed in estate. I *Lilium* attualmente coltivati sono forniti di un apparato radicale secondario, che deve essere mantenuto sempre molto attivo e funzionale per far fronte alle richieste idriche della pianta. Questo apparato radicale è molto superficiale e perciò non è importante la quantità di acqua, ma la frequenza degli interventi irrigui.

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

2.3 Avversità e difesa del *Lilium*

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

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

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

Numerose e gravi sono le patologie fungine, i principali funghi che attaccano la parte ipogea sono *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Colletotricum*, che causano generalmente marciumi radicali sui bulbi con formazione di macchie, conseguente alterazione dello stelo ed ingiallimento delle foglie. Tra i funghi che attaccano la parte epigea si ricordano *Rhizoctonia solani*, che, nel caso di lievi attacchi, provoca delle macchie bruno chiare sulle foglie basali mentre, nel caso di gravi attacchi, causa delle macchie anche sulle foglie apicali fino a

compromettere la fioritura. La *Botrytis elliptica* si manifesta con piccole macchie circolari sulle foglie che vanno ingrandendosi fino ad occupare tutta la superficie fogliare e, in seguito, anche sul resto della pianta. Le temperature medie e tassi di umidità elevati favoriscono lo sviluppo di questo patogeno.

Le malattie di origine virale che possono colpire il *Lilium* sono numerose: il CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), l'AMV (*Arabic Mosaic Virus*), il TMV (*Tabacco Mosaic Virus*), il TRSV (*Tabacco Ring-Spot Virus*), l'LVX (*Lily Virus X*), il TBV (o “Virus della rottura del colore del tulipano”) e LSV (o “Virus senza sintomi del Giglio”).

Tra questi, LSV (*Lily Symptomless Virus*) è il più comune dei virus del *Lilium*, colpisce quasi tutti gli ibridi coltivati ed è, inoltre, l'unico specifico (Marani, Bertaccini, 1984). La sua presenza limita lo sviluppo vegetativo della pianta, diminuisce il numero e la grandezza dei fiori, rendendo la pianta più suscettibile ad attacchi patogeni di *Botrytis* e *Fusarium*. La trasmissione avviene comunemente attraverso gli afidi. Per risanare piante colpite da virus vengono utilizzate varie tecniche, quali la termoterapia, la chemioterapia e la coltura ‘*in vitro*’ di apici meristematici.

2.4 Propagazione

Il *Lilium* si moltiplica facilmente sia per via sessuata che per via asessuata. La moltiplicazione per seme presenta molti aspetti negativi, soprattutto legati alla lunghezza dei tempi necessari per l'ottenimento di nuovo materiale ed all'elevata eterogeneità del materiale ottenuto, per questo tale metodo viene utilizzato per lo più nei programmi di miglioramento genetico, soprattutto finalizzato all'ottenimento di nuove cultivars. Per ottenere materiale omogeneo da destinare all'ingrossamento, viene comunemente adottata la moltiplicazione per via agamica. La finalità della moltiplicazione del *Lilium* è quella di produrre nuovo materiale partendo da parti come bulbi, bulbetti, bulbilli, al fine di ottenere nuove plantule da destinare all'ingrossamento.

2.4.1 Propagazione gamica

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

Il *Lilium* è una pianta allogama caratterizzata da spiccata auto incompatibilità e quindi difficilmente è in grado di produrre seme se autoimpollinata. Questa caratteristica, unita a frequenti casi di incompatibilità interspecifica, costituiscono un ostacolo ai fini dell'esecuzione di programmi di miglioramento genetico, come meglio sarà evidenziato nel capitolo seguente. Notevole importanza riveste la vitalità del polline che, conservato ad un'umidità relativa non superiore al 6% ed ad una temperatura di circa 0 °C, può avere una durata di oltre un anno. Al

momento della semina, importante è anche il tipo di germinazione, che può essere di tipo epigeo, con emergenza dei cotiledoni e formazione delle prime foglie vere prima della formazione del bulbo (così come in *L. amabile*, *L. concolor*, *L. henryi*, *L. longiflorum*, *L. regale*, *L. tigrum*), o di tipo ipogeo, con formazione del bulbetto 6-8 mesi prima dell'emissione delle prime foglie vere (come in *L. auratum*, *L. bolanderi*, *L. canadense*, *L. martagon*, *L. parvum* e *L. speciosum*).

2.4.2 Propagazione agamica

Questo tipo di propagazione consente di ottenere bulbi che produrranno piante omogenee per quanto riguarda i caratteri varietali. In alcuni casi vengono utilizzati organi già preformati sulla pianta, bulbetti e bulbilli, in altri, è richiesta la disarticolazione meccanica di parti vegetative, come scaglie, foglie e steli.

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

Moltiplicazione per divisione del bulbo e da bulbetti ipogei

Durante le prime fasi di sviluppo vegetativo, vicino alla gemma che ha originato il fusto florale si formano una, due o più gemme vegetative che tendono a rivestirsi di scaglie e a formare nuovi bulbi. Quest'ultimi possono essere separati dal bulbo materno e dopo un anno di ingrossamento essere utilizzati come materiale per la produzione di fiori. Possono essere destinati all'ingrossamento anche i bulbetti che si formano nella parte ipogea dello stelo florale e possono variare sia per numero (da 10 a 20) che per calibro in base alla specie (2/4, 4/6, 6/8). Alcune specie producono di norma numerosi bulbetti (es. *L. speciosum* ed ibridi asiatici), altri ne producono in numero limitato, altre ancora non sono in grado di emetterne.

Moltiplicazione per bulbetti da foglie

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

Moltiplicazione da bulbilli

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

CAPITOLO 3 - TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO

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

Il successo commerciale del *Lilium* ha indotto le grandi aziende di produzione e di commercializzazione alla creazione di cultivar proprie, al fine di evitare l'oneroso passaggio delle "royalties", dovute al detentore del brevetto vegetale. Le cultivar di *Lilium* coltivate sono oggi diventate centinaia, grazie al continuo lavoro di miglioramento genetico e di ibridazione portato avanti da numerose società specializzate. Il rilevante valore economico delle sementi, l'articolato e funzionale sistema di brevettazione e controllo delle semine vigente in Olanda, paese detentore della maggior parte dei brevetti industriali delle cultivar, hanno indotto molte imprese del settore ad una specializzazione nel lavoro e nell'allestimento di strutture idonee alla ibridazione e al successivo mantenimento in purezza delle neo-cultivar realizzate (Di Genova, 2000). La quasi totalità delle varietà commerciali oggi coltivate sono ibride, cioè derivate dall'incrocio tra specie.

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

1. l'individuazione di ibridi in grado di rispondere positivamente alla forzatura, in modo da creare cultivars che assicurino buoni risultati per la coltivazione di fiore reciso durante tutto l'arco dell'anno;
2. il reperimento di nuovi colori, per ampliare la gamma presente in natura e rispondere positivamente alle continue richieste di novità da parte del mercato;
3. la messa a punto di nuovi tipi di infiorescenza, cercando di fondere nei nuovi ibridi le diversità rinvenibili anche nelle specie spontanee. Negli ultimi anni si è andato ad esempio affermando un nuovo gruppo, quello degli LA, ibridi interspecifici tra *Longiflorum* e gruppo degli Ibridi Asiatici, nei quali vengono esaltati i caratteri positivi dei primi, attraverso un incremento della dimensione dei fiori dei secondi, oltre che ad un

ampliamento della gamma dei colori. Questo nuovo gruppo sta riscuotendo un notevole apprezzamento da parte dei produttori e dei consumatori, sotto l'aspetto della taglia, della robustezza dello stelo, oltre che della grandezza, forma e colore dei fiori. Presenta infatti, facilità di coltivazione, resistenza alle più usuali fitopatie e virosi, ciclo breve di coltivazione (meno di 90 giorni in alcuni casi). La pianta è poco bisognosa di temperature elevate durante il periodo invernale e il bulbo piuttosto facile da riprodurre. La disponibilità varietale risulta però essere ancora piuttosto limitata.

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

A partire dagli anni '80 presso il CRA-VIV di Pescia, già sezione periferica dell'Istituto per la Floricoltura di Sanremo, è stato sviluppato un programma di miglioramento genetico su *Lilium* con l'obiettivo di rendere disponibili cloni, selezionati sulla base delle caratteristiche degli ambienti italiani. Sono stati per questo utilizzati metodi classici di incrocio, agenti mutageni fisici e coltura *'in vitro'* di embrioni (Grassotti e Nesi, 2002), al fine di ottenere cloni di *Lilium*, del gruppo degli Ibridi Asiatici (ibridi intraspecifici), in possesso di caratteri agronomici e commerciali innovativi quali: taglia, forma, colore del fiore, ciclo culturale, attitudine alla produzione di bulbilli e alla coltivazione in vaso, fiori senza polline.

Nei tradizionali programmi di breeding, gli incroci intraspecifici, interspecifici e intergenerici rappresentano uno strumento importante al fine di introdurre variabilità genetica nelle piante coltivate. Anche per le colture ornamentali, tra queste il *Lilium*, la più importante fonte di variabilità genetica è rappresentata dall'ibridazione interspecifica.

In natura esistono molte specie di *Lilium* che rappresentano una fonte inesauribile di geni, che codificano per caratteri quali resistenza a stress abiotici (freddo, siccità e salinità) e biotici (funghi, batteri e virus), nuovi colori e forme del fiore, etc.

Il *Lilium* è una pianta allogama, caratterizzata da una marcata auto-incompatibilità, ne consegue quindi una naturale incapacità a produrre seme se auto-impollinate. Con la fecondazione incrociata, all'interno della stessa specie, si ottiene generalmente un'abbondante quantità di seme, ne sono riprova i numerosi ibridi intraspecifici presenti in commercio sia tra il gruppo degli Orientali che tra quello degli Asiatici, mentre si registrano difficoltà operative nella

realizzazione di incroci tra specie diverse. Ne deriva una certa criticità nella produzione di ibridi interspecifici per il verificarsi di barriere di incompatibilità.

3.1 Barriere sessuali

Le barriere di incompatibilità interspecifica negli incroci tra specie lontane del genere *Lilium* (Van Tuyl, 1997) rappresentano un ostacolo per l'ottenimento di validi risultati. La principale difficoltà riscontrata nel raggiungere l'ibridazione interspecifica è la comparsa di barriere sessuali, classificate in pre e post zigotiche (Stebbins, 1958) ed è proprio in base alla natura di queste barriere che si individua il metodo più idoneo per poterle superare (Van Tuyl, 1997).

3.1.1 Barriere pre-zigotiche

Le barriere pre-zigotiche, o di pre-fecondazione, sono quelle barriere che si verificano prima della fusione dei gameti e possono essere riconducibili all'incompatibilità che impedisce al tubetto pollinico di allungarsi e di attraversare lo stilo fino a raggiungere l'ovario per fecondare l'ovulo, come pure all'incompatibilità intrinseca nello stesso polline.

Per il superamento della prima, buoni risultati si sono ottenuti con il 'Cut-style' method, cioè quella tecnica che prevede il taglio dello stilo 2-3 mm al di sopra dell'ovario, seguito dalla deposizione del polline direttamente sulla superficie stilare sezionata (Van Tuyl *et al.*, 1989 e 1991; Janson *et al.*, 1993). Buoni risultati sono stati ottenuti anche con il 'Grafted-style' method. Con questa tecnica il granulo pollinico è depositato su uno stigma compatibile; il giorno successivo lo stilo, col polline donatore, è tagliato a 2 mm dall'ovario ed innestato sull'ovario di una pianta incompatibile. Stilo e stigma possono essere mantenuti uniti *in vitro* utilizzando 'water agar' (Van Tuyl, 1991 e 1997). Risultati positivi sono stati ottenuti anche con il trattamento termico del polline, che sembra inattivare gli inibitori termosensibili della crescita del tubetto pollinico (Van Tuyl, *et al.*, 1997).

Per superare l'incompatibilità intrinseca nel polline, buoni risultati sono stati ottenuti con la tecnica del 'Mentor Pollen', cioè miscelando polline incompatibile con polline compatibile, precedentemente irraggiato per renderlo sterile, in modo da utilizzare l'azione delle proteine del polline compatibile e favorire la penetrazione nello stilo, anche di polline desiderato, ma incompatibile (Brown, Adiwilaga, 1991). In *Lilium* l'uso di 'Mentor Pollen' è stato efficace nel superamento dell'autoincompatibilità, ma non in incroci interspecifici (Van Tuyl *et al.*, 1982).

In alcuni esperimenti è stata applicata con successo anche una doppia impollinazione della pianta 'portaseme', che prevede di eseguire una prima impollinazione con il polline incompatibile. Dopo circa 4-5 giorni si interviene con una seconda impollinazione utilizzando un polline

compatibile, in grado di liberare auxine, che consentono il superamento delle reazioni di incompatibilità.

E' stata applicata con successo anche l'impollinazione '*in vitro*' che consiste nella coltura, su substrato solido, di parte del peduncolo florale, ovario, stilo e stigma, che viene impollinato con polline asettico, nel momento della massima recettività stigmatica, circa 2 giorni dopo l'emasculazione (Van Tuyl *et al.*, 1991).

Infine buoni risultati si sono ottenuti con l'applicazione di regolatori di crescita, come auxine, citochinine e gibberelline agli ovari, subito dopo l'impollinazione (Van Creij *et al.*, 1996b).

3.1.2 Barriere post-zigotiche

Le barriere di post-fecondazione, o post-zigotiche, sono quelle che si verificano dopo la fusione dei gameti e che impediscono l'ulteriore sviluppo dell'embrione appena formatosi; queste sono riconducibili a degenerazione dell'endosperma come anche alla liberazione di tossine all'interno del tegumento in cui è racchiuso l'embrione e che impediscono in entrambi i casi l'ulteriore sviluppo dell'embrione stesso, appena formatosi.

Una serie di tecniche '*in vitro*' sono state impiegate per superare questo secondo tipo di barriere (Van Tuyl *et al.*, 1994). Tra queste l'*embryo rescue*, che consente di far sviluppare l'embrione evitando che l'endosperma possa degenerare precocemente. In questo caso, infatti, l'embrione viene separato dal resto del seme e posto "*in vitro*" su substrati adeguati all'accrescimento. La prima relazione di coltura embrionale fu pubblicata da Nakajima nel 1940, che utilizzò come semplice substrato ovatta o carta da filtro in una soluzione di zucchero. L'embriocultura ('*embryo-rescue*') può essere applicata in incroci in cui i fiori impollinati possono rimanere sulla pianta per un periodo relativamente lungo (Williams *et al.*, 1987; Van Tuyl, 1997) e permette di far sviluppare l'embrione evitando che l'endosperma possa degenerare precocemente.

Questo metodo è stato utilizzato in un'ampia categoria di colture, tra cui le bulbose: *Allium* (Nomura e Oosawa, 1990), *Alstroemeria* (Buitendijk *et al.*, 1992), *Lilium* (Van Tuyl. *et al.*, 1991), *Tulipa* (Custers *et al.*, 1995) e *Zantedeschia* (Yao *et al.*, 1995). Nel *Lilium*, la coltura dell'embrione è stata applicata per la prima volta per gli Ibridi Orientali da Emsweller nel 1963; successivamente tale tecnica è stata applicata con successo per prevenire aborti di embrioni risultanti da incroci interspecifici e permettendo, in questo modo, di ottenere incroci tra Orientali ed Asiatici (Okazaki *et al.*, 1994).

Di recente abbastanza diffusa è anche la '*ovary culture*', cioè la coltura di segmenti di ovari precedentemente impollinati, che può essere applicata quando l'aborto si verifica in un periodo giovanile ed i tessuti materni non hanno influenza negativa sullo sviluppo dei semi. La tecnica dell'*'ovary culture'* è stata applicata con successo in molte specie come *Brassica* (Inomata,

1980), *Nerine*, *Tulipa* e per la produzione di ibridi interspecifici di *Lilium* (Van Tuyl. *et al.*, 1993, Van Creij. *et al.*, 2000). Secondo questa metodologia, gli ovari vengono raccolti tra i 7 e i 40 giorni dopo l'impollinazione intrastilare e dopo sterilizzazione superficiale (Babes *et al.*, 2000). La germinazione dei semi avviene 30-150 giorni dopo ed è possibile così ottenere piantine da piccoli embrioni. Sempre su *Lilium* e successivamente alla 'coltura di ovari' può essere applicata la 'coltura di ovuli' (Fukai. *et al.*, 2004). In questo caso, 60 giorni dopo l'impollinazione, gli ovuli risultati migliori in coltura di ovari, vengono prelevati con l'aiuto di un microscopio binoculare e, una volta isolati, posti in coltura su di un substrato idoneo al loro sviluppo. In questo modo si è ottenuta germinazione in incroci di tipo LO (Fukai *et al.*, 2002) e in incroci di tipo LA (Chi ., 2000, 2002). Inoltre questa tecnica è stata applicata in *Alstroemeria* (Bridgen *et al.*, 1989), in *Nicotiana* (Iwai . *et al.*, 1986), in *Lilium* e *Nerine* (Van Tuyl *et al.*, 1992) e *Tulipa* (Van Tuyl *et al.*, 1993; Van Creij *et al.*, 1996a, Fukai *et al.*, 2004).

In molti casi è stata applicata la combinazione delle tecniche di impollinazione '*in vitro*', in un primo momento, e la 'coltura di ovari', successivamente, ottenendo con successo l'ibridazione tra *L. elegans* e *L. longiflorum* (Fernandez *et al.*, 1996).

La coltura di parti di ovario dopo il taglio dello stilo impollinato è stata usata per la produzione di ibridi interspecifici tra *L. longiflorum* e *L. concolor*.

Le barriere ancora presenti dopo l'embriocoltura o la coltura di ovari, determinano l'ottenimento di 'hybrid breakdown', cioè di piante che muoiono prima della fioritura per la presenza di una nuova combinazione instabile del genoma (Yao *et al.*, 1995) e più comunemente di ibridi F₁ sterili originati dalla riduzione dell'appaiamento cromosomico durante la meiosi. In questo caso la fertilità dell'ibrido potrebbe essere ristabilita attraverso la poliploidizzazione, favorendo cioè l'appaiamento di cromosomi omologhi negli ibridi allopoliploidi. Incroci del genere sono stati ampiamente usati nei programmi di ibridazione interspecifica di molte bulbose, come *Alstroemeria*, *Fresia*, *Gladiolus*, *Lilium* (Van Tuyl , 1997).

Cromosomi somatici (mitotici) doppi potrebbero indurre appaiamenti omologhi degli stessi e quindi rendere nuovamente l'ibrido fertile. In *Lilium* è stata usata, con successo, la colchicina che ha permesso la produzione di piante allotetraploidi fertili (Asano, 1980; Van Tuyl, 1989).

Nei casi in cui, con i metodi sopra descritti, non sia stato possibile ottenere ibridazione interspecifica, una valida alternativa potrebbe essere il ricorso all'ibridazione somatica.

3.2 Ibridazione somatica

Le cellule vegetali, a differenza di quelle animali, possiedono una parete cellulare all'interno della quale è contenuto il protoplasto. Nel 1960 Cocking, dell'Università di Nottingham, dimostrò per la prima volta che si potevano isolare protoplasti da cellule vegetali, mediante la digestione

enzimatica della parete cellulare. Da allora, la tecnica di isolamento dei protoplasti, la loro coltura 'in vitro' e la successiva rigenerazione di piante è stata messa a punto per diverse specie. Quindi due protoplasti, anche appartenenti a specie o generi diversi, possono essere fusi, per dare origine ad un ibrido somatico, utilizzando metodi diversi. I più usati sono il trattamento con il PEG (Glicole polietilenico) e l'elettrofusione. Horita *et al.*, nel 2003, hanno eseguito ibridazione somatica con il metodo dell'elettrofusione per produrre ibridi somatici fertili fra Ibridi Orientali di *Lilium* e *Lilium* × *formolongi*. Questi trattamenti determinano un progressivo avvicinamento dei protoplasti le cui membrane cellulari vengono a contatto e quindi si fondono. In seguito alla fusione, l'eterocarion può formare una nuova parete e cominciare le divisioni, portando alla formazione di un callo.

In tutti i casi in cui l'incompatibilità sessuale preclude il naturale scambio genetico tra specie distanti e non correlate, l'ibridazione somatica si offre, quindi, come metodo utile per la manipolazione genetica. La fusione somatica è stata applicata per ottenere ibridi somatici tra piante appartenenti a specie e/o generi incompatibili nelle quali l'ibridazione per via sessuata era estremamente difficile o impossibile. Mediante fusione di protoplasti sono stati ottenuti ibridi somatici tra *Lycopersicon esculentum* (pomodoro) e *Solanum tuberosum* (patata), *Datura innoxia* e *Atropa belladonna*, *Arabidopsis thaliana* e *Brassica campestris* ed altri. L'esperienza finora accumulata ha tuttavia portato a concludere che è quasi impossibile ottenere ibridi agronomicamente validi dalla fusione di cellule appartenenti a specie molto distanti. La fusione di protoplasti viene utilmente impiegata per trasferire nel genoma di una specie, una parte limitata del genoma di una seconda specie distante geneticamente, al fine di incorporare, nella specie recipiente, pochi geni di interesse (Rossi L. *et al.*, 2001).

Qualora l'ibridazione somatica costituisca l'unico metodo per produrre un ibrido fra due piante, con ogni probabilità anche il primo reincrocio sarebbe possibile solo per fusione dei protoplasti. Si otterrebbero, in questo modo un numero troppo alto di cromosomi per essere compatibile con il normale funzionamento della pianta ibrida. L'ibridazione somatica offre invece, interessanti possibilità applicative, all'interno di una stessa specie; noti sono gli esempi di ibridazione somatica nei generi *Nicotiana*, *Petunia*. Anche il genere *Lilium* è stato oggetto di studi da parte di vari autori con l'obiettivo di rigenerare piante da protoplasti o di ottenere ibridi tra varietà Orientali ed Asiatiche, ma con un risultato ancora insoddisfacente (Simmonds *et al.*, 1976; Mii *et al.*, 1994).

3.3 Colture 'in vitro' per il miglioramento genetico

Le colture 'in vitro' di cellule, tessuti ed organi vegetali vengono ampiamente utilizzate nella ricerca di base come strumento di indagine in biologia molecolare e fisiologia cellulare. In campo

farmaceutico ed industriale viene impiegata la coltura *'in vitro'* nella produzione su larga scala di metaboliti primari e secondari quali vitamine, antibiotici, ormoni. In agricoltura le applicazioni più importanti sono diventate un supporto indispensabile per il risanamento e il miglioramento genetico. L'uso delle tecniche di coltivazione *'in vitro'* ha portato un contributo sostanziale ad alcuni aspetti del miglioramento genetico ed a quelli della propagazione. Attraverso la coltura *'in vitro'*, oltre alla rigenerazione da scaglie (Han *et al.*, 2005; Ishimori *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007), è stato possibile in *Lilium* ottenere piante aploidi da antere e da ovuli (Van Tuyl J.M., 1993); valutare la capacità generativa da altri espianti, come ad esempio da protoplasti (Simmond *et al.*, 1976; Sugiura, 1993), da foglie e da nodi (Bacchetta *et al.*, 2003).

3.3.1 Moltiplicazione di gemme da scaglie

Molti fattori influenzano la formazione di gemme e quindi anche il numero di bulbetti per espianto. La formazione di gemme avviene quasi sempre sulla superficie interna del tessuto della scaglia. Ed è stato dimostrato che bulbetti formati a partire da scaglie di Liliaceae, derivavano da cellule epidermiche più vicine al tessuto vascolare e che la maggior parte di esse si trovava vicino all'epidermide interna. Gli espianti della regione basale della scaglia formano un maggior numero di gemme e più rapidamente di quelli provenienti dalla zona apicale (Stimart e Ascher, 1978). Takayama e Misawa (1980) hanno dimostrato che le scaglie più interne al bulbo hanno una maggiore e più veloce capacità di rigenerazione rispetto alle scaglie più esterne e che anche i bulbi più giovani hanno una maggiore capacità rigenerativa rispetto ai bulbi più vecchi. Tutto ciò porta a concludere che i tessuti ontogeneticamente più giovani hanno una capacità rigenerativa più alta. Sono stati anche studiati gli effetti dei diversi costituenti del mezzo nutritivo, relativamente ai macro e micronutrienti ed ai fattori di crescita organici di MS. La presenza di questi ultimi non sembra essere essenziale, come pure quella di acido nicotinico, piridossine e glicine, mentre tiamina ed inositolo sono chiaramente benefici (Van Aatrijk e Blom-Barnhoorn, 1980).

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

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

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

3.3.2 Embriocoltura

Questa metodologia prevede l'isolamento e la coltura '*in vitro*' di embrioni per consentire il loro sviluppo e la loro successiva germinazione.

L'aborto precoce dell'embrione si può verificare per fenomeni di incompatibilità genetica in incroci interspecifici ed intergenici, come già precedentemente illustrato. Nei programmi di miglioramento genetico si ricorre spesso all'incrocio con specie affini per introdurre nuovi 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 G. *et al.*, 1994).

Le tecniche di coltura '*in vitro*' rappresentano un importante supporto al miglioramento genetico. Tra queste, l'*embryo rescue*, cioè il trasferimento dell'embrione immaturo su un substrato artificiale che consente all'embrione stesso di raggiungere il suo pieno sviluppo evitando che l'endosperma possa degenerare precocemente, rappresenta un esempio di efficace integrazione delle biotecnologie con i metodi tradizionali di miglioramento genetico (Infante e Gonzales, 2002; Mancuso *et al.*, 2002).

La coltura '*in vitro*' degli embrioni, che inizialmente aveva come scopo la comprensione dei loro meccanismi di sviluppo e delle loro esigenze nutrizionali, è stata successivamente usata per

consentire ad embrioni che non sono in grado di svilupparsi in condizioni naturali, di poterlo fare *'in vitro'* su adeguati terreni di coltura (Rossi *et al.*, 2001).

I casi più frequenti riguardano:

1. il salvataggio di embrioni derivati da incroci effettuati tra piante appartenenti a specie o generi diversi al fine di trasferire alcuni caratteri di interesse da una specie ad un'altra. Spesso in questi casi si osserva, dopo la fecondazione e lo sviluppo dello zigote, una precoce degenerazione dell'embrione, dovuta a fenomeni di incompatibilità genetica tra embrione ed endosperma;
2. l'utilizzo di embrioni di semi maturi che non sono in grado di germinare in condizioni naturali per la presenza di inibitori, o per uno sviluppo incompleto dell'embrione o per la degenerazione dell'endosperma.

Affinché le cellule *'in vitro'* subiscano l'induzione embriogenica occorre allevare l'espanto su un mezzo di coltura contenente fitoregolatori specifici. Nella maggior parte dei lavori scientifici riguardanti l'induzione in una coltura embrionale, viene impiegata una stretta cerchia di fitoregolatori di crescita addizionati al mezzo di coltura (Trigiano, Gray, 2003). Nella maggioranza dei protocolli vengono aggiunte al mezzo auxine, come l'acido 2,4-diclorofenossiacetato (2,4-D), l'acido indolbutirrico (IBA), l'acido indolacetico (IAA) e l'acido naftalenacetico (NAA). Il meccanismo attraverso cui le auxine inducono la formazione di cellule embrionali è probabilmente collegato ad un'attivazione genetica differenziale. Infatti le auxine favoriscono l'aumento numerico delle cellule attraverso ripetute divisioni cellulari.

Oltre alla classe delle auxine altri fitoregolatori, quali le citochinine, sono necessarie per indurre lo sviluppo dell'embrione; quella più comunemente utilizzata è la benziladenina (BA), ma vengono impiegate anche zeatina e chinolina.

3.3.3 Formazione di gemme avventizie da altri tessuti

E' stato dimostrato che molti altri tessuti del *Lilium* hanno capacità rigenerativa. Si sono ottenute piantine da tessuto di cotiledoni, da diverse parti del fiore (tepali, petali, ovari e stami), da foglie e da apici vegetativi di bulbi (Nhut *et al.*, 2001).

Questi ultimi sono interessanti perché non presentano dormienza. Questo sistema è più veloce della coltivazione con bulbi maturi ed permette di effettuare una propagazione in continuo e in qualsiasi momento dell'anno.

Per la formazione di gemme avventizie da vari tessuti, sono stati utilizzati vari substrati: da NAA e BA più saccarosio, MS più BA a substrato Emsweller addizionato ad una bassa concentrazione di NAA.

3.3.4 Produzione di aploidi *'in vitro'*

La 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).

Per alcune specie la costituzione di piante aploidi attraverso androgenesi è ormai una realtà. La coltura *'in vitro'* di antere permette, rispetto alle tecniche tradizionali, risparmio di tempo e precoce selezioni di caratteri di interesse pratico nei programmi di miglioramento genetico. Nel *Lilium*, sono stati ottenuti aploidi mediante la coltura di antere in substrati di MS aggiunti di 2,4 D, come fonte auxinica e BA oppure Kinetina, come citochinine. E' stata ottenuta ginogenesi a partire da giovani ovari non impollinati con substrati composti sia da MS sia da NB aggiunti di ormoni differenti (Mii *et al.*, 1994). Un completo lavoro sugli aploidi di *L. longiflorum* è stato condotto per valutare gli effetti delle più importanti variabili sull'induzione all'ottenimento di apolidi. E' stato dimostrato che lo stadio mononucleato è il più idoneo in questa specie per l'androgenesi e che oltre alla base di sali e vitamine dei substrati MS, occorrono concentrazioni ormonali relativamente elevate, in accordo con gli autori che hanno lavorato su questa specie.

Recentemente, aploidi da coltura di antere sono stati ottenuti in genotipi asiatici utilizzando, oltre alle più comuni citochinine quali la Zeatina, il Picloram che sembra essere più efficiente del 2,4 D.

3.3.5 Colture *'in vitro'* per la conservazione di germoplasma

La conservazione del germoplasma è 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 cultivars, 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 quali i calli, capaci di mantenere inalterata la proprietà di rigenerare, offre un metodo vantaggioso in quanto le colture occupano spazi molto ridotti, sono salvaguardate dall'attacco di agenti patogeni visto che sono allevate in sterilità (Damiano e Palombi, 2000).

3.3.6 Il mezzo di coltura

La crescita e lo sviluppo degli espianti *'in vitro'* sono il risultato del loro patrimonio genetico, dell'ambiente circostante e dei costituenti il mezzo di coltura; tra tali fattori, quest'ultimo è il più semplice da manipolare in funzione degli obiettivi da raggiungere.

Il mezzo di coltura è costituito per il 95% da acqua, macronutrienti e micronutrienti, fitoregolatori di crescita, vitamine, zuccheri (le piante *'in vitro'* spesso non hanno capacità fotosintetizzante) e talvolta da altri materiali organici caratterizzati da una complessità più o meno elevata (Trigiano, Gray, 2003).

La scelta del mezzo di coltura è in funzione delle specie da allevare *'in vitro'*. Alcune specie, a differenza di altre, sono sensibili ad un contenuto di sali o hanno esigenze diverse per quanto riguarda i fitoregolatori di crescita. L'età della pianta ha inoltre una sua influenza, così come il tipo di organo prescelto è importante. In funzione dell'obiettivo perseguito, l'apporto di auxine sarà necessario per l'induzione di radici, mentre l'alterazione del rapporto citochinine/auxine sarà fondamentale per l'induzione e lo sviluppo di gemme avventizie.

La tabella 2.1 mette a confronto la composizione di alcuni mezzi di coltura comunemente utilizzati nella coltura di tessuti vegetali in relazione ai loro componenti espressi in milligrammi/litro e concentrazione molare. Il mezzo di Murashige e Skoog (MS) (1962) è il mezzo base più comunemente usato e più idoneo per indurre rigenerazione da tessuti e da callo, composto da un elevato contenuto salino a causa dei sali di K e N. Altri mezzi di coltura comunemente usati sono quello di Linsmaier e Skoog (1965), fondamentalmente uguale al mezzo di Murashige e Skoog; quello di Lloyd e McCown (1980), definito Woody Plant Medium (WPM), formulato per superare la sensibilità di alcune specie arboree all'elevato contenuto salino. Il mezzo di coltura di Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) definito anche B5, fu invece ideato per l'induzione di callo nella soia e presenta un minor contenuto, rispetto al mezzo MS, di nitrati, in particolare quelli di ammonio. Infine Shenk e Hildebrandt (1972) svilupparono il mezzo SH per la coltura *'in vitro'* di calli di monocotiledoni e dicotiledoni (Trigiano, Gray, 2003).

Composti	Murashige Skoog	Gamborg B5	WPM	Nitsch e Nitsch	Schenk e Hildebrandt	White
Macronutrienti in mg/L						
NH ₄ NO ₃	1.650	-	400	-	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	-	300	-
NH ₄ SO ₄	-	134	-	-	-	-
CaCl ₂ · 2H ₂ O	332.2	150	96	166	151	-

Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	-	-	288
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	250	370	185	400	737
KCl	-	-	-	-	-	65
KNO ₃	1.900	2.500	-	950	2.500	80
K ₂ SO ₄	-	-	990	-	-	-
KH ₂ PO ₄	170.3	-	170.3	68.5	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	130.5	-	-	-	16.5
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	200
Micronutrienti in mg/L						
H ₃ BO ₃	6.2	3	6.2	10	5	1.5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	-	-	0.1	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.25	0.025	0.2	0.01
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	20.1	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	-	-	2.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	15	-
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	10	22.3	18.9	10	5.04
KI	0.83	0.75	-	-	0.1	0.75
NaMoO ₃	-	-	-	-	-	0.001
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.1	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2	8.6	10	1	2.67
Composti organici in mg/L						
Mioinositolo	100	100	100	100	1000	-
Glicina	2	-	2	2	-	3
A. nicotinic	0.5	1	0.5	5	5	0.5
Piridossina HCl	0.5	0.1	0.5	0.5	0.5	0.1
Tiamina HCl	0.1	10	1	0.5	5	0.1
Biotina	-	-	-	0.2	-	-

Tab. 3.1: Composizione di cinque dei più comunemente usati mezzi per la coltura di tessuti espressa in milligrammi/litro e concentrazioni molari.

3.3.7 Le fasi della coltura

Originariamente, Murashige (1974) aveva illustrato i tre stadi (denominati I, II, III) necessari per effettuare con successo la micropropagazione. I problemi di contaminazione associati con l'impianto della coltura asettica indussero Debergh e Maene (1991) ad includere uno stadio 0. Questo stadio illustrava specifiche tecniche colturali volte a mantenere la sanità della pianta madre e a ridurre la percentuale di contaminazione degli espianti nella fase di impianto della coltura asettica. Attualmente si è convenuto che, per effettuare con successo la micropropagazione, sono necessari cinque stadi fondamentali (da 0 a IV) (Trigiano, Gray, 2003).

Stadio 0: Selezione e preparazione della pianta madre

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

Stadio I: Impianto della coltura asettica

L'obiettivo di questo stadio è iniziare e stabilizzare una coltura priva di contaminazioni microbiche e funginee. Gli espianti primari prelevati dalle piante madri sono sottoposti a sterilizzazione della superficie esterna (De Paoli *et al.*, 1993).

Ovviamente non esiste un mezzo universale per l'impianto della coltura asettica di qualunque specie. I mezzi maggiormente usati rappresentano modificazioni della formulazione di base del mezzo Murashige e Skoog.

Le citochinine e le auxine sono aggiunte frequentemente ai mezzi di coltura utilizzati in questo stadio per favorire la sopravvivenza degli espianti e lo sviluppo dei germogli (Hu e Wang, 1983; Wang e Charles, 1991).

Stadio II: Proliferazione di germogli ascellari

Lo stadio II è caratterizzato da ripetuti cicli di proliferazione di germogli ascellari da germogli apicali o laterali, allevati in un mezzo di coltura contenete livelli di citochinina più elevati per inattivare la dominanza apicale della gemma terminale.

In questo stadio la scelta del tipo di citochinina e della sua concentrazione si basa sul tasso di moltiplicazione, sulla lunghezza dei germogli e sulla frequenza di variazioni genetiche. L'aggiunta di auxine al mezzo di coltura spesso mitiga l'effetto inibente esercitato dalle citochinine sull'allungamento dei germogli, aumentando in tal modo il numero di microtalee sufficientemente lunghe da essere utilizzate per la radicazione.

Stadio III: Pre-trapianto (radicazione)

Questo stadio consiste nel preparare i germogli o i gruppi di germogli ottenuti nel II stadio alla fase di trasferimento nel suolo. Il processo può includere: (1) l'allungamento dei germogli prima della radicazione; (2) la radicazione di germogli singoli o di gruppi di germogli; (3) il soddisfacimento mediante trattamento a freddo della dormienza degli organi di riserva; (4) il preindurimento delle colture per aumentarne la sopravvivenza (Trigiano, Gray, 2003).

La radicazione può essere considerata come la fase conclusiva della micropropagazione, prima del trasferimento all'ambiente esterno, in quanto permette di ottenere una piantina morfologicamente completa, in grado di vivere autotroficamente (De Paoli *et al.*, 1994).

Stadio IV: Trasferimento all'ambiente esterno

Il buon esito della coltura dipende dall'abilità di trasferire le plantule dai contenitori alle serre di climatizzazione e nel ristabilire una loro crescita attiva. Ciò implica acclimatizzare le plantule, cioè prepararle a condizioni di umidità relativa significativamente inferiori e di intensità luminosa superiori a quelle che si incontrano *'in vitro'*.

3.4 Ingegneria genetica

L'utilizzo di nuove tecnologie come la PCR (Polymerase Chain Reaction) e l'identificazione di nuovi marcatori molecolari ha permesso la caratterizzazione genomica di nuove varietà ed hanno contribuito ad un continuo miglioramento delle caratteristiche fisiologiche e morfologiche delle piante, permettendo anche l'abbattimento di barriere come l'autoincompatibilità e la maschiosterilità, che in passato non consentivano lo scambio genico. Per quanto riguarda l'utilizzo di tecnologie innovative riguardanti il trasferimento di geni, le piante ornamentali si trovano in una posizione favorevole visto che non sono produzioni da destinarsi all'alimentazione umana ed inoltre sono coltivate in superfici relativamente limitate ed in ambienti chiusi, le serre. Metodi di trasformazione genetica comunemente utilizzati sono quelli del trasferimento mediante *Agrobacterium (tumefaciens e rhizogenes)*, della biobalastica e della elettrotrasfezione, che permette di inserire DNA direttamente in meristemi di semi e di bulbi. La tecnologia del DNA ricombinante ha aperto nuove strade nel miglioramento genetico, grazie all'introduzione di numerosi fattori quali la resistenza ad alcune fitopatie, come pure la possibilità di intervenire sul colore, sulla forma del fiore e sulla taglia delle piante.

3.4.1 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, tra cui la mappatura genetica, analisi di linkage, ovvero riassociazione locus-malattia, genetica forense e test del DNA.

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.

Alcuni marcatori come ***RFLP*** (Restriction Fragment Length Polymorphism) e ***VNTR*** (Variable Number of Tandem Repeat o Minisatelliti), sono basati sul processo di ibridazione tipo Southern Blot.

Mentre altri, ***RAPD*** (Random Amplified Polymorphics DNA), ***AFLP*** (Amplified Fragment Length Polymorphism) e ***SSR*** (Simple sequence repeat o microsatelliti) sono basati sulla PCR (reazione a catena della polimerasi).

Marcatori RFLP: si tratta di marcatori che individuano il polimorfismo nella lunghezza dei frammenti di DNA generati dal taglio, attraverso enzimi di restrizione. L'analisi del polimorfismo del frammento di restrizione (RFLP) consiste nella digestione del DNA con endonucleasi di restrizione che hanno due caratteristiche fondamentali: la prima consiste nella notevole specificità con cui questi enzimi riconoscono brevi sequenze nucleotidiche nelle molecole di DNA; la seconda è che esistono diverse endonucleasi di restrizione, ciascuna delle

quali riconosce una sequenza specifica. I frammenti di restrizione ottenuti vengono separati in base ai pesi molecolari tramite elettroforesi. Tale tecnica si basa sul fatto che piccole differenze nella sequenza di DNA possano alterare i profili di taglio e quindi consentono un'analisi di sequenza.

L'individuazione del polimorfismo si basa sull'uso di tecniche di ibridazione con sonde specifiche opportunamente marcate e sul confronto dei profili di ibridazione ottenuti successivamente al Southern blotting. Sono fortemente affidabili e ripetibili nei risultati, ma hanno un grado di polimorfismo medio-basso, dovuto al fatto che analizzano per lo più sequenze genomiche poco ripetute o uniche. 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 digossigenina (Palombi M. A., 2000; Palombi M. A., Damiano C., 2002). Una tecnica molto diffusa, che vede l'impiego della RFLP, è la PCR-RFLP. Tale metodo è stato applicato a molti studi. Fukai e Tsuji nel 2004 hanno utilizzato questa tecnica analizzando l'rDNA per confermare l'ibridità della progenie ottenuta dagli incroci fra *L. x formolongi* 'White Lancer' e quattro *Lilium* Asiatici con fiore a tromba (*L. centifolium*, *L. sargentiae*, *L. wallichianum* e *L. regale* 'Album'). Horita *et al.* nel 2003 hanno confermato l'ibridità di alcuni ibridi di *Lilium* somatici attraverso la tecnica PCR-RFLP applicata al rDNA, dimostrando così l'utilità di questa tecnica quale metodo per confermare l'ibridità della progenie.

Marcatori molecolari basati su tecniche di amplificazione: lo sviluppo di questi marcatori è avvenuto in seguito alla scoperta della reazione a catena della polimerasi (PCR). La tecnica di PCR consente di amplificare specifiche regioni di DNA genomico grazie all'azione di un enzima ad attività polimerasica in grado di operare anche ad elevate temperature. La reazione prevede la preparazione di una miscela di reazione costituita da DNA da amplificare, 2 primer (oligo nucleotidi a singola elica), l'enzima DNA polimerasi, una miscela di quattro basi presenti nel DNA e un apposito buffer.

Tale reazione è possibile grazie alla ripetizione di tre fasi successive di temperatura controllata: denaturazione del DNA a doppia elica a 93-95°C, ibridazione dei primer al campione di DNA ad una T° compresa tra 37-65°C in funzione della T_m del primer ed estensione a 72°C. La terza fase avviene sul complesso primer-stampo in direzione 5'-3' ad opera della DNA polimerasi su entrambi i filamenti ottenuti dalla denaturazione, in modo da ottenere inizialmente 2 "long products". I cicli successivi consentono di ottenere la porzione desiderata "short products" avente la lunghezza compresa fra le due regioni su cui ibridano i due primer (Fig. 3.1).

Frammento di DNA che contiene tre geni. Solo il gene B vuole essere amplificato

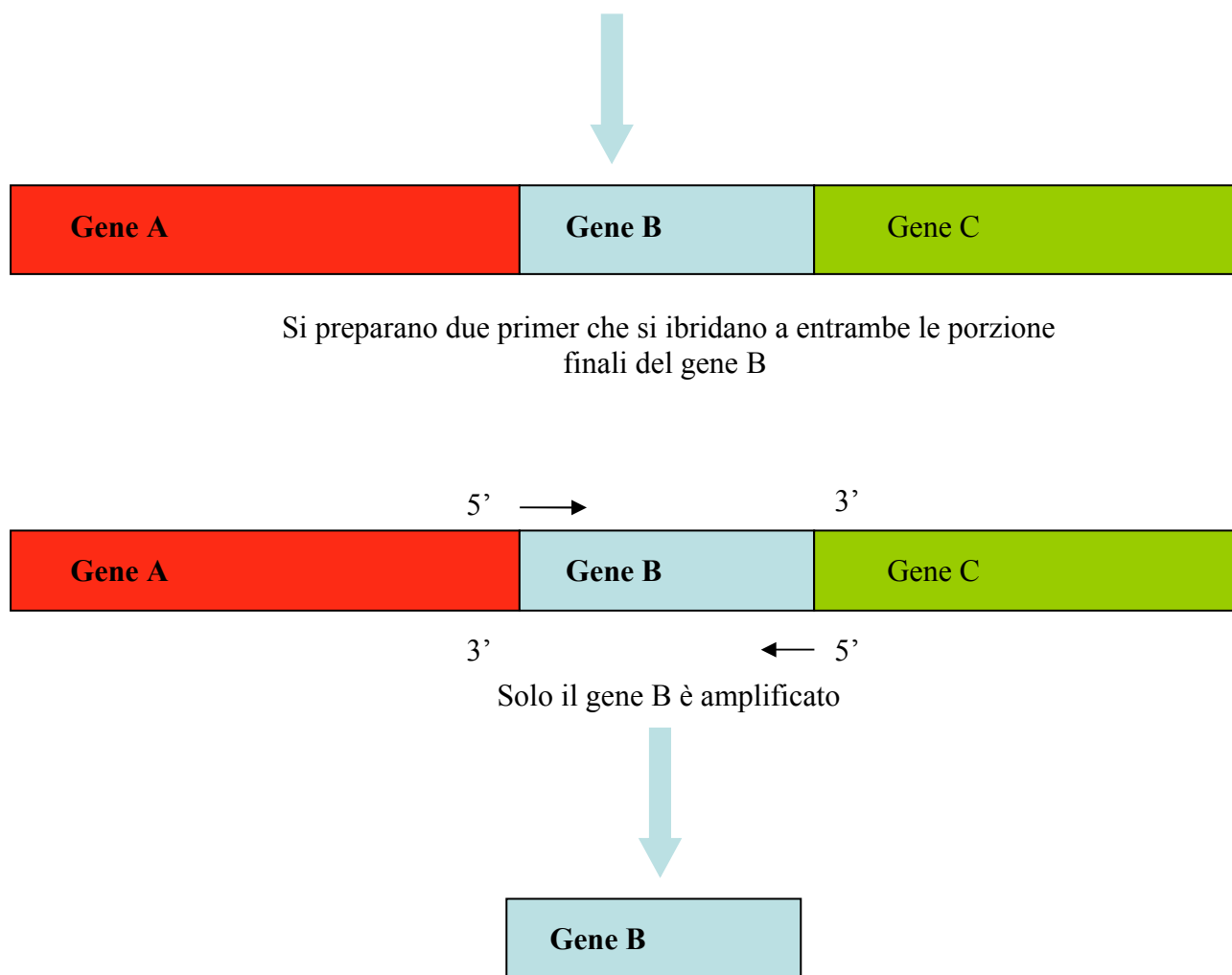


Fig. 3.1: Esempio di 'short-products' avente una lunghezza fra i 2 primers utilizzati nella PCR.

Rispetto ad una normale PCR, i marcatori RAPD richiedono l'impiego di un solo primer decamerico a sequenza casuale (Palombi M. A., 2000), avente un contenuto in GC superiore al 60% per ottimizzare l'appaiamento. Essendo il primers a corta sequenza, trova 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). I RAPD sono veloci da usare e poco costosi, anche se rispetto ad altri marcatori sono meno ripetibili nei risultati (Palombi M. A., 2000) (Fig. 3.2).

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 S. *et al.*, 2002). Nel IV convegno sulla Peschicoltura Meridionale del 2003 sono stati riportati molti lavori relativi al fingerprinting (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 M. *et al.*, 2003). Nel 1995 Yamagishi ha utilizzato la tecnica RAPD associata al Southern blotting per distinguere le diverse cultivar di *Lilium* e identificare gli ibridi interspecifici. 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 S. *et al.*, 2002) e in *Alstroemeria* (De Benedetti L. *et al.*, 2000).

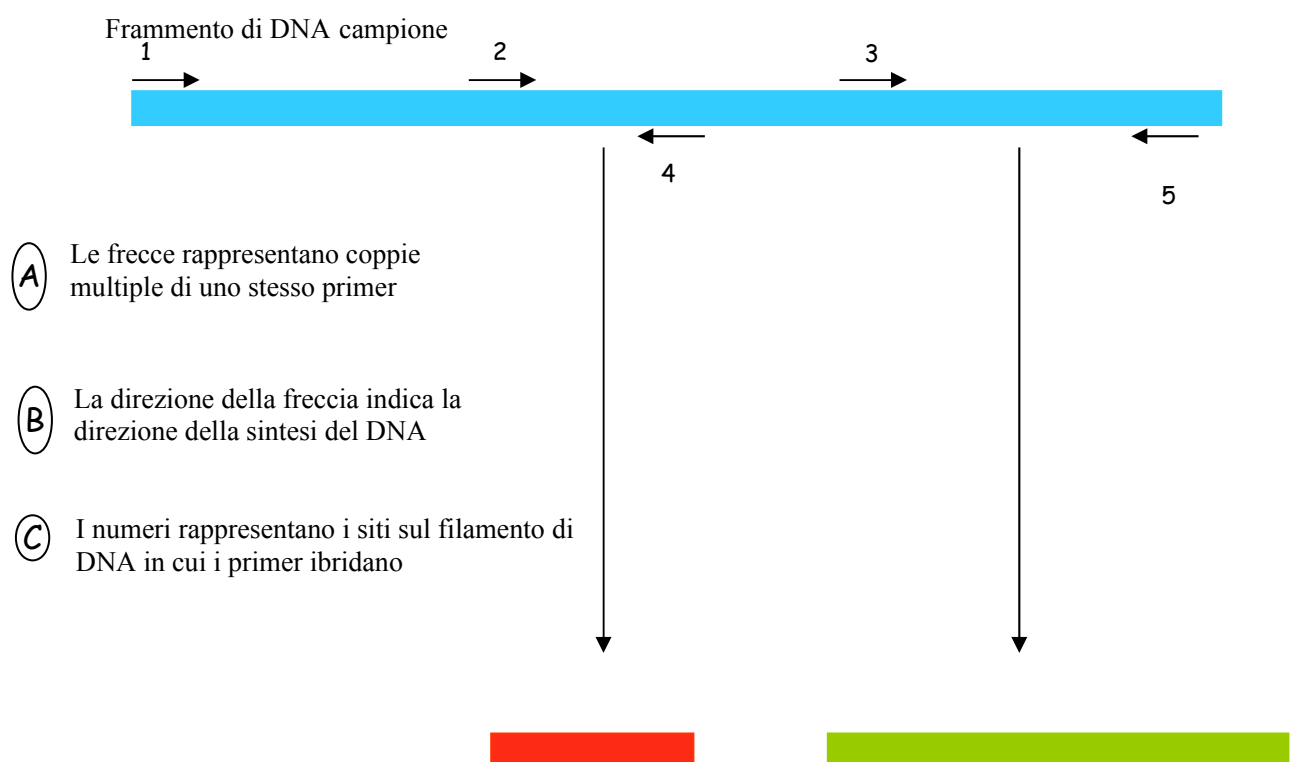


Fig. 3.2: Esempio di come agisce il primer in una reazione di RAPD.

3.4.2 Elettroforesi

L'elettroforesi in gel è il metodo standard utilizzato per separare, identificare e purificare frammenti di DNA. Il gel può essere costituito da agarosio e da poliacrilammide.

I gel di poliacrilammide sono usati per separare frammenti di DNA inferiori a 500 bp e hanno un'elevata risoluzione, ma sono più complicati e pericolosi da preparare e più difficili da maneggiare rispetto ai gel di agarosio. I gel di agarosio sono largamente utilizzati per la semplicità di preparazione e sono tipicamente usati per separare frammenti di dimensioni variabili da poche centinaia di basi a 20 kb.

La molecola di DNA è carica negativamente e quindi in un campo elettrico migrerà verso il polo positivo. La matrice porosa del gel ritarda la migrazione del DNA, consentendo ai piccoli frammenti di spostarsi più velocemente rispetto ai più grandi. Il risultato è che i frammenti di DNA si separeranno in funzione del peso molecolare e della forma.

Il tampone di elettroforesi è una soluzione salina che serve sia a condurre la corrente elettrica che a controllare il pH durante l'elettroforesi. I tamponi più comunemente usati sono il TAE e il TBE.

Il tampone di caricamento, che si aggiunge ai campioni di DNA prima dell'elettroforesi, serve ad appesantire i campioni, permettendo la loro permanenza nei pozzetti e a fornire un marker visivo del progredire della corsa elettroforetica. Il DNA può essere visualizzato, al termine della corsa elettroforetica, grazie alla colorazione con bromuro di etidio, una molecola che emette fluorescenza una volta esposta agli UV. Il bromuro di etidio è un agente che si intercala tra le basi del DNA e, quando è legato al DNA, ha uno spettro di eccitazione della fluorescenza con un massimo a 302 nm.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DEL LAVORO

Obiettivo della prova è stato la costituzione di nuovi ibridi interspecifici di *Lilium*, attraverso il superamento di barriere di incompatibilità pre- e post-zigotiche che si verificano tra i parentali. Per lo scopo di cui sopra, sono state utilizzate la tecnica del 'Cut-style' method, che ha permesso di superare le barriere pre-zigotiche e la coltura 'in vitro' di ovari ed ovuli, che ha permesso di superare le barriere post-zigotiche.

E' stato predisposto un programma di incroci diallelico completo utilizzando 6 varietà appartenenti ai tre gruppi commerciali di ibridi: Asiatici, Orientali e *L. longiflorum*. Una seconda prova, volta all'ottenimento di ibridi anche interspecifici, ha invece previsto incroci tra alcuni cloni di asiatici selezionanti negli anni precedenti per il carattere assenza di polline, con alcune specie originarie.

Infine una parte del materiale ottenuto è stato sottoposto a valutazione genotipica, attraverso analisi RAPD, per verificare la natura ibrida degli individui di nuovo ottenimento.

Gli ibridi Orientali, cultivar ‘Lombardia’, presentano fiori di colore unico prevalentemente rosa o bianchi, o multicolore, spesso profumati, con tepali espansi, eretti o rivolti all’indietro, con antere che producono elevate quantità di polline e lunghezza del ciclo colturale di 11-17 settimane (Fig. 4.1 b). Infine gli ibridi Asiatici, cvs ‘Gironde’, ‘Polyanna’ e ‘Golf’, presentano fiori eretti, in numero maggiore per infiorescenza rispetto alle precedenti classi, con un’ampia gamma di colori, dal bianco al rosso, dal giallo all’arancio, con o senza punteggiatura e con un ciclo colturale della durata di 9-13 settimane (Fig. 4.1 c).

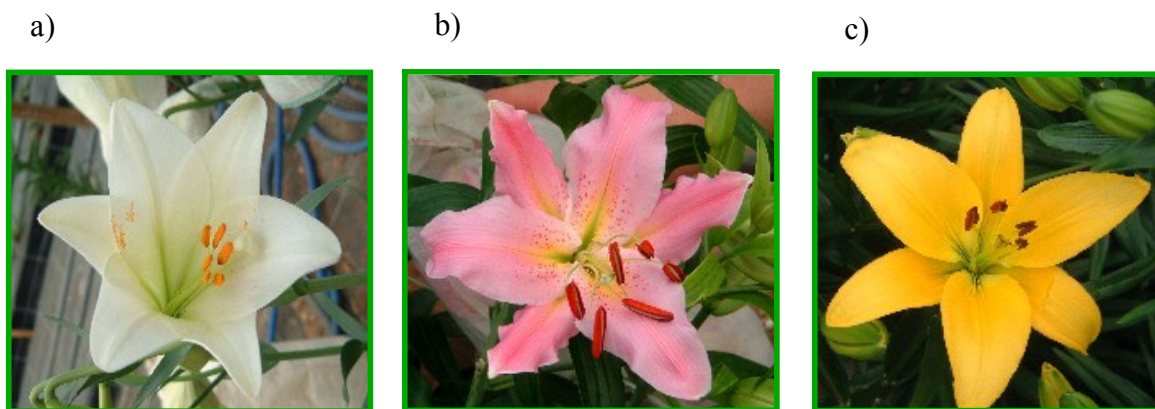


Fig. 4.1 - Cultivars di *Lilium* appartenenti a classi commerciali diverse: a) cv. ‘White Haeven’ (*L. longiflorum*), b) cv. ‘Lombardia’ (ibridi Orientali) e c) cv. ‘Gironde’ (ibridi Asiatici)

Una seconda prova, volta all’ottenimento di ibridi anche interspecifici, ha previsto incroci tra alcuni cloni di asiatici selezionati negli anni precedenti per il carattere assenza di polline, con alcune specie originarie, come si vede nella tab 4.2.

Cloni Asiatici ‘portaseme’ ♀		Specie originarie ed ibridi ‘impollinatrici’ ♂	
2005	2006	2005	2006
009 - 12 - 20 - 0049 - 0051 -	009 - 40 - 20 - 380 - 354 -	<i>L. pumilum</i>	<i>L. New Zealand</i>
409 - 599 - 00147 - 00150 -	409 - 599 - 00147 - 004 -	<i>L. regale</i>	<i>L. regale</i>
00194 - 00195 - 00207	0030 - 00195 - 00207 -	<i>L. Aurelian</i>	<i>L. ‘World’</i>
	0035 - 0043 - 0052 - 0090	<i>L. leucanthum</i>	<i>L. ‘Pink Perfection’</i>
	- 00101 - 00102 - 00111 -	<i>L. New Zealand</i>	
	00116 - 00117 - 00121 -		
	00134 - 00142 - 00159 -		
	00175 - 00176 - 00177 -		

Tab. 4.2 - Incroci di cloni asiatici e specie originarie utilizzati per l’ottenimento di ibridi.



Fig. 4.2 – Specie originarie di *Lilium*: a) *L. regale*, b) *L. pumilum* e c) *L. leucanthum* utilizzate come ‘impollinatrici’

Tra le specie originarie *L.regale* (fig. 4.2 a) è un giglio con fiore ad imbuto o a tromba, nativo di Szechuan occidentale in Cina. I fiori, di grandi dimensioni possono raggiungere 14 cm di lunghezza, sono di colore giallo all'interno, nella gola e bianco verso l'esterno. *L. pumilum* (fig. 4.2 b) è un giglio asiatico (Corea del Nord, Manciuria e Mongolia) produce infiorescenze con numerosi piccoli fiori rossi pendenti. *Lilium leucanthum* (fig. 4.2 c), proveniente dalla Cina, ha fiori ad imbuto di grandi dimensioni di colore bianco e nella parte esterna del fiore presenta delle striature color lampone.

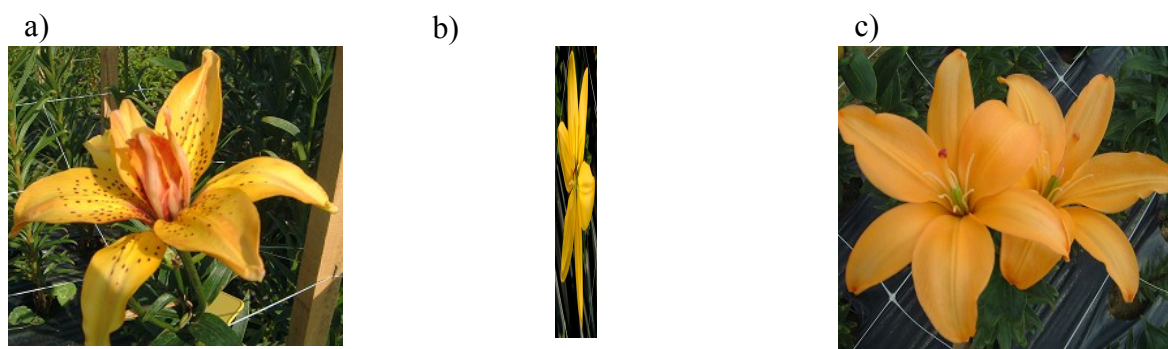


Fig. 4.3 – Cloni di asiatici di *Lilium*: a) clone '20' b) clone '409' e c) clone '40' utilizzate come 'portaseme'

Tra i cloni di asiatici selezionanti negli anni precedenti per il carattere assenza di polline, il clone '20'(fig. 4.3 a) è stato selezionato per la caratteristica forma del suo fiore. In esso i filamenti si sono trasformati in petaloidi, facendolo sembrare un fiore doppio. I cloni '409'(fig. 4.3 b) e '40'(fig. 4.3 c) sono stati selezionati perché, oltre ad essere privi di polline, sono di colore giallo intenso, il primo e albicocca, il secondo, con una colorazione pura per entrambi, cioè priva di punteggiatura, carattere particolarmente apprezzato commercialmente.

4.2 Realizzazione degli incroci

Gli incroci sono stati effettuati in serra su bocci fiorali prossimi alla fioritura, quando si aveva la certezza del completo sviluppo del gametofito femminile, mentre 1- 2 giorni prima si era proceduto alla emasculazione del gametofito maschile, per evitare una eventuale autoimpollinazione.

Si è proceduto all'impollinazione, seguendo la tecnica del 'Cut-style' method, cioè praticando un taglio dello stilo a 2 mm al di sopra dell'ovario. Il polline proveniente da specie diverse in alcuni casi, è stato prelevato nella stessa mattinata, mentre quando questo non era possibile è stato utilizzato polline raccolto in precedenza e adeguatamente conservato e posizionato sulla superficie stilare precedentemente sezionata (Fig. 4.4 e 4.5).

Una volta effettuata l'operazione di impollinazione, i tepali sono stati riavvicinati ed il fiore chiuso all'interno di un sacchetto in "tessuto non tessuto", per evitare il rischio di una impollinazione indesiderata. I singoli incroci sono stati poi etichettati per risalire, al momento della raccolta, all'epoca dell'impollinazione ed al tipo di incrocio.

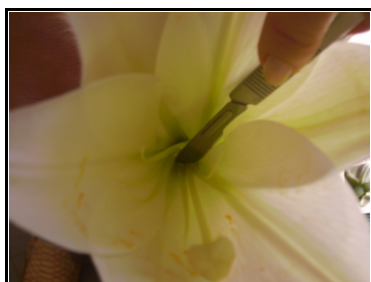


Fig. 4.4 - Taglio dello stilo con una lama al di sopra dell'ovario.

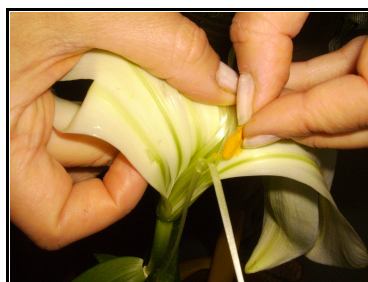


Fig. 4.5 - Impollinazione manuale eseguita su bocci fiorali precedentemente emasculati.

Per ciascuna combinazione di incrocio, sono stati eseguiti gli incroci diretti ed i corrispondenti incroci reciproci. Ognuno di essi è stato ripetuto un numero variabile da 12 a 18 volte, in modo che al momento della raccolta a 7, 14 e 21 giorni dall'impollinazione (Days After Pollination, DAP), è stato possibile raccogliere da 4 a 6 capsule per ogni incrocio.

Questo è stato fatto con l'obiettivo di individuare l'epoca migliore per il prelevamento degli ovari dalla pianta madre, cioè il momento più adatto a fornire la più alta percentuale di ovuli rigonfi.

Per quanto riguarda gli incroci tra ibridi 'Asiatici' e alcune specie originarie, sono stati eseguiti in pien'aria una sola volta nell'arco della stagione estiva, intorno a metà giugno. Ciascun incrocio è stato ripetuto 6 volte nel 2005 e 12 volte nel 2006 ed è stato effettuato prelevando il polline dalle specie selvatiche ('impollinatrici') ed andando a praticare l'impollinazione manuale sui cloni di asiatici ('portaseme'), quindi ciascun incrocio è stato effettuato in una sola direzione (tab. 4.2). In questo caso il prelievo degli ovari, visto il più basso numero di incroci effettuati per

ciascun gruppo di parentali, è avvenuto solamente in due momenti, a 7 e 14 giorni dopo l'impollinazione.

Per ciascun incrocio effettuato, una parte degli ovari è stata prelevata dalla pianta e messa *'in vitro'*, una parte è stata invece lasciata *'in situ'* per verificare la remota possibilità di accrescimento delle capsule sulla pianta madre e per poter raccogliere i semi eventualmente prodotti.

Nei due anni sono stati eseguiti tra le cultivars commerciali di *Lilium* 1561 incroci (836 nel 2005 e 725 nel 2006), distribuiti come riportato in tabella 4.3. Il 37.2% degli incroci effettuati era rappresentato dal gruppo degli LA (*Longiflorum* x Asiatici), il 27.9 % dal gruppo degli LO (*Longiflorum* x Orientali) e il 34.9 % dal gruppo degli AO (Ibridi Asiatici x Ibridi Orientali).

Gruppo Ibridi	Tipo di incrocio	N° di incroci effettuati	
		2005	2006
<i>Longiflorum</i> x Orientale LO	'Lombardia' x 'White Haeven'	79	82
	'White Haeven' x 'Lombardia'	46	54
	'Lombardia' x 'White Magic'	47	-
	'White Magic' x 'Lombardia'	62	-
TOTALE LO		234	136
Asiatico x Orientale AO	'Lombardia' x 'Golf'	66	-
	'Golf' x 'Lombardia'	75	-
	'Lombardia' x 'Polyanna'	79	73
	'Polyanna' x 'Lombardia'	72	66
	'Lombardia' x 'Gironde'	-	78
	'Gironde' x 'Lombardia'	-	78
TOTALE AO		292	295
<i>Longiflorum</i> x Asiatico LA	'Polyanna' x 'White Haeven'	44	60
	'White Haeven' x 'Polyanna'	34	66
	'White Haeven' x 'Golf'	29	-
	'Golf' x 'White Haeven'	36	-
	'Polyanna' x 'White Magic'	34	-
	'White Magic' x 'Polyanna'	44	-
	'White Magic' x 'Golf'	50	-
	'Golf' x 'White Magic'	39	-
	'Gironde' x 'White Haeven'	-	96
	'White Haeven' x 'Gironde'	-	72
TOTALE LA		310	294
TOTALE		836	725

Tab. 4.3: Totale degli incroci effettuati nei due anni della prova.

4.3 Prelievo degli ovari

Il prelievo degli ovari impollinati dalla pianta madre è avvenuto dopo 7, 14 e 21 giorni dall'impollinazione (Days After Pollination, DAP), per verificare il livello di fertilità, raccogliendo 4-6 ovari, per ogni tipo di incrocio. Da questo momento le capsule fecondate sono state asportate dalla pianta madre e portate in laboratorio.

4.4 Coltura 'in vitro' di sezioni di ovari ed ovuli

La tecnica impiegata per ottenere ibridi interspecifici è stata quella della coltura 'in vitro' degli ovari fecondati (*ovary culture*) e successivamente dei singoli ovuli, testando quattro differenti substrati, di cui un controllo e tre con l'aggiunta di differenti tipi e concentrazioni di ormoni e di saccarosio.

4.3.1 Sterilizzazione degli ovari

Gli ovari prelevati dalla piante madre sono stati sterilizzati in una soluzione di etanolo al 70% per 30 secondi, successivamente in una soluzione di ipoclorito di sodio diluita 1:3 per 10 minuti ed infine sono stati sottoposti, sotto cappa a flusso laminare, a due lavaggi in acqua sterile, di 10 minuti ciascuno.

4.3.2 Substrati usati per indurre la germinazione dell'embrione

Per tutti i substrati saggiati sono stati utilizzati i microelementi, i macroelementi e le vitamine di Murashige & Skoog (MS), in accordo con le informazioni bibliografiche raccolte su *Lilium*, che indicano questo mezzo di coltura particolarmente adatto al genere. Sono stati quindi preparati quattro substrati differenti: il primo, denominato **MS0** costituito da 4,4 g/l di MS e 30 g/l di saccarosio, ma senza aggiunta di ormoni, rappresenta il Testimone; il secondo, denominato **LO₁**, in cui sono presenti, oltre a 4,4 g/l di MS, ormoni quali BA (Benziladenina), in concentrazione di 0,05 mg/l, NAA (Acido Naftalenacetico) in concentrazione di 0,5 mg/l e saccarosio 30 g/l; il terzo, denominato **IAA_{0,5}**, costituito da 4,4 g/l di MS con l'aggiunta di 0.5 mg/l di Zeatina, 0.05 mg/l di BA, 0.5 mg/l di IAA (M. S. Ahn *et al.*, 2003) e 60 g/l di saccarosio; il quarto, denominato **NAA₁** (Fukai S., Tsuji K., 2004), contenente 4,4 g/l di MS, NAA in concentrazione di 1 mg/l e saccarosio 100 g/l. Tutti i substrati impiegati sono stati solidificati con agar 6-8 g/l e sterilizzati in autoclave a 120°C per 20 minuti. Dopo la sterilizzazione, i substrati sono stati piastrati, sotto cappa a flusso laminare, in piastre Petri e fatti solidificare. La composizione dei substrati impiegati per la coltura di sezioni di ovario è riportata in tabella 4.4.

Componenti	MSO	LO₁	IAA_{0,5}	NAA₁
MS	4.400	4.400	4.400	4.400
Saccarosio	30 . 10 ³	30 . 10 ³	60 . 10 ³	100 . 10 ³
Agar	7.000	6.000	8.000	7.000
NAA	-	0.5	-	1
IAA	-	-	0.5	-
Zeatina	-	-	0.5	-
BA	-	0.05	0.05	-
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

Tab. 4.4: Composizione in mg/l dei diversi substrati utilizzati per la coltura di sezioni di ovario.

4.3.3 Trasferimento e sviluppo degli espianti

a) Coltura di ovari

Gli ovari, dopo essere stati sottoposti a sterilizzazione sotto cappa a flusso laminare, sono stati sezionati in fettine di spessore 2-3 mm ciascuna e di diametro variabile in base alla diversa natura dei parentali coinvolti nell'incrocio. Le sezioni di ovario, contenente ciascuna 25-30 ovuli per segmento, sono state inserite, mantenendo la stessa successione che era presente nell'ovario, nelle piastre Petri su terreni di coltura precedentemente descritti e preparati con anticipo (1-2 giorni prima) (Fig. 4.6).

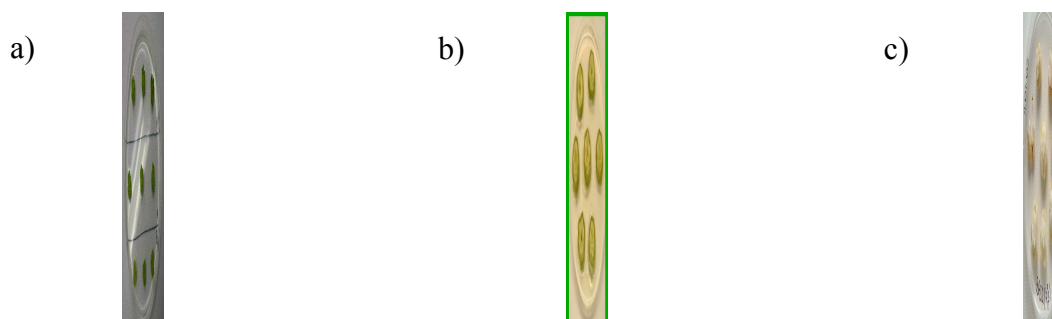


Fig. 4.6 – Capsule di *Lilium* in coltura di ovari: a) capsula dopo 1-2 giorni di coltura, b) capsula dopo 15-20 giorni di coltura e c) capsula dopo 40-50 giorni di coltura

Gli ovari sono stati mantenuti in cella climatica ad una temperatura di 22-23°C, al buio per circa 50-60 giorni. Trascorso tale periodo, è stata effettuata una prima valutazione delle piastre per individuare i terreni risultati più idonei alla coltura *in vitro*, gli incroci che hanno fornito

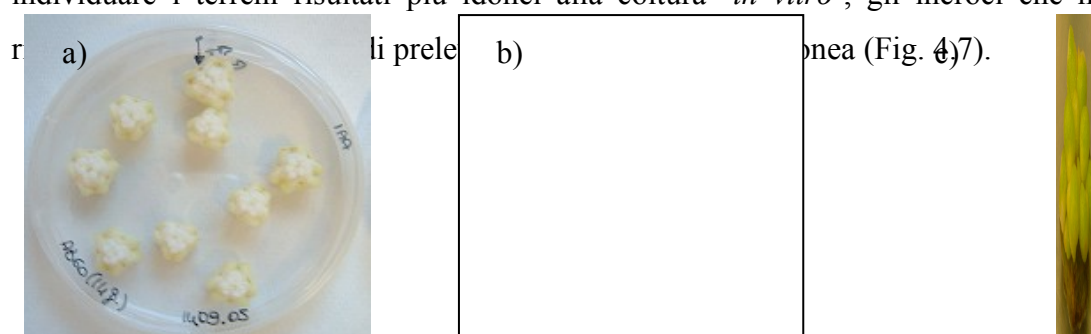


Fig. 4.7 - Sezioni di ovario con ovuli rigonfi (a), ogni segmento contiene circa 25-30 ovuli (b, c)

b) Coltura di ovuli

In questa fase gli ovuli risultati particolarmente rigonfi e di colore bianco sono stati estratti dall'ovario e trasferiti singolarmente ancora su piastre Petri, costituendo così una 'coltura di ovuli'. In questa seconda fase sono stati saggiati 2 terreni di coltura diversi (Tab. 4.5): il primo, *IBA*_{0,5} (4.4 g/l di MS, 0.5 mg/l di IBA e 30 g/l di saccarosio), il secondo substrato *NAA*_{0,1} (4.4 g/l di MS, 0.1 mg/l di NAA e 50 g/l di saccarosio) (Fukai S., Tsuji K., 2004). Per entrambi i terreni di coltura l'azione della auxina, IBA (nel 1° caso) ed NAA (nel 2° caso), è stata quella di stimolare l'allungamento delle radici e quindi lo sviluppo degli eventuali embrioni presenti all'interno degli ovuli fecondati (Fig. 4.8).



Fig. 4.8 - Coltura di ovuli allevati 'in vitro' (a), particolare di ovuli isolati (b) .

Gli ovuli allevati 'in vitro' sono stati ancora mantenuti in cella climatica ad una temperatura di 22-23°C, al buio per un ulteriore periodo di 10-12 settimane. Trascorso tale periodo gli ovuli, da cui si è sviluppato l'embrione con relativa radichetta embrionale, sono stati trasferiti su differenti terreni di coltura, denominati *IBA*_{0,5} e *MS0*.

Componenti	<i>IBA</i> _{0,5}	<i>NAA</i> _{0,1}
MS	4.400	4.400
Saccarosio	30 . 10 ³	50 . 10 ³
Agar	6.000	7.000

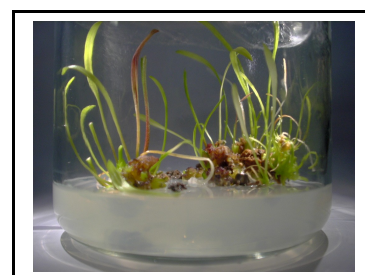
NAA	-	0.1
IBA	0.5	-
pH	5.8	5.8

Tab. 4.5: Composizione in mg/l dei substrati utilizzati per la coltura di ovuli.

Il primo terreno, denominato *IBA*_{0,5}, contenente 0.5 mg/l di IBA, aveva la funzione di moltiplicare i piccoli germogli per ottenere un certo numero di individui, il secondo terreno denominato *MS0*, aveva come obiettivo l'ingrossamento dei nuovi bulbetti ottenuti (Fig. 4.9).

Gli embrioni, trasferiti sui nuovi mezzi di crescita, sono stati posizionati in cella climatica, a temperature di 22-23°C, con un fotoperiodo di 16 ore.

Fig. 4.9 - Bulbetti ottenuti da coltura di ovuli e trasferiti su MS0 per il loro ingrossamento.



Gli altri ovuli presenti che non avevano ancora germinato, sono stati nuovamente trasferiti in una nuova subcoltura su *NAA*_{0,1} e *IBA*_{0,5}, mantenendoli nelle stesse condizioni di crescita precedentemente utilizzate, in vista di una loro germinazione (Fig. 4.10).

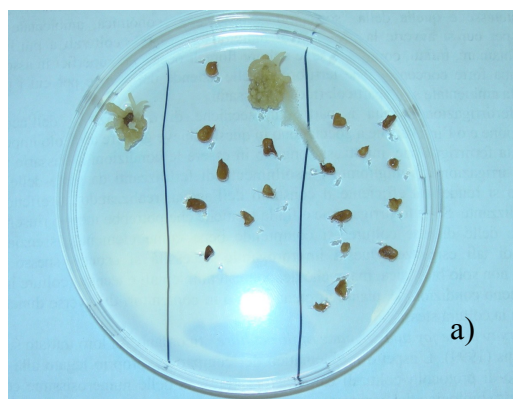


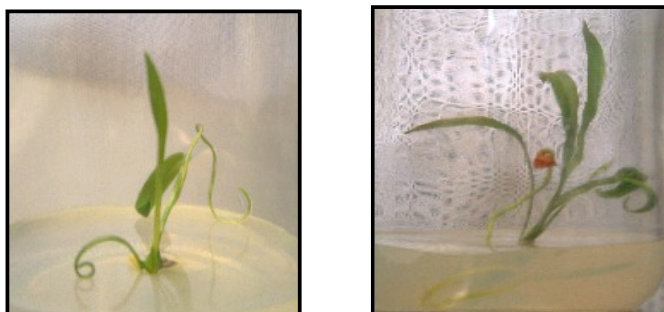
Fig. 4.10 - Subcoltura di ovuli (a) con ovuli in germinazione (b).

4.4 Identificazione genotipica del materiale ottenuto

Una parte del materiale ottenuto dalla germinazione di embrioni è stato sottoposto ad identificazione genotipica mediante analisi RAPD. L'analisi molecolare ha previsto, prima di tutto, l'estrazione del DNA dalle foglie (Fig. 4.11), mentre la parte restante è stata portata in

serra di ambientamento, in vista di un loro successivo trasferimento direttamente in pieno campo e per sottoporre il materiale ottenuto ad una valutazione fenotipica.

Fig. 4.11 - Bulbetti sviluppati 'in vitro' da destinare ad estrazione del DNA.



Il DNA è stato estratto, sia dalle foglie dei parentali utilizzati nel programma di incroci, che dalle foglie degli ipotetici ibridi ottenuti. Per quanto riguarda gli ibridi, sono state utilizzate foglie da bulbi coltivati e moltiplicati 'in vitro' seguendo la metodologia riportata nel capitolo precedente.

Le foglie dei parentali sono state invece prelevate da bulbetti ottenuti partendo da rigenerazione di scaglie. In questo caso i bulbi dei parentali sono stati lavati sotto acqua corrente e scagliati. Le scaglie sono state sterilizzate in una soluzione di etanolo al 70% per 30 secondi, poste in agitazione per 10 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio 1:2 e trasferite in ambiente sterile, dove sono state sottoposte a due lavaggi in acqua sterile di 10 minuti ciascuno. Le scaglie sterili sono state trasferite su un terreno idoneo allo sviluppo dei bulbetti, denominato LS_1 , (4.4 g/l di MS, 2 mg/l di BA, 0.2 mg/l di NAA e 60 g/l di saccarosio) e mantenute in cella climatica, ad una temperatura di 22-23 °C con un fotoperiodo di 16 ore di luce. Dopo 25-30 giorni, alla base delle scaglie, si sono formati nuovi bulbetti che stati trasferiti su $MS0$ e $IBA_{0,5}$, in modo da indurre accrescimento dei bulbetti, nel primo caso e loro moltiplicazione, nel secondo (Fig. 4.12).

Fig. 4.12 - Bulbetti sviluppati alla base delle scaglie e trasferiti su $MS0$ e $IBA_{0,5}$.



4.4.1 Estrazione DNA dai parentali e dagli ibridi

Il DNA è stato estratto partendo da materiale ottenuto *'in vitro'* in quantità di 100 mg di foglie dei parentali e degli ipotetici ibridi. Per l'estrazione del DNA è stato seguito il protocollo riportato all'interno del kit NucleoSpin^R Plant (buffer di lisi C0) della ditta Macherey-Nagel November 2006/Rev. 05, usato per estrazioni di DNA genomico da piante.

4.4.2 Quantificazione del DNA

La concentrazione e la qualità del DNA estratto, sia dai parentali, che dagli ipotetici ibridi è stata determinata mediante due metodologie.

La prima metodologia, seguita per la determinazione della concentrazione e della qualità del DNA in soluzione, è stata quella che ha previsto il ricorso alla spettrofotometria degli ultravioletti (UV).

La seconda metodologia ha previsto invece, l'uso di Lambda, con elettroforesi in gel d'agarosio.

1. Determinazione della concentrazione di DNA in soluzione attraverso spettrofotometria.

La valutazione quali/quantitativa del DNA estratto è stata stimata attraverso il valore di Assorbanza misurato ad una lunghezza d'onda di 260 nm e 280 nm, con lo spettrofotometro "*RNA/DNA calculator*" (Pharmacia Biotech Gene Quant II) a luce UV. Lo strumento è in grado di stimare sia la concentrazione di DNA presente all'interno dei campioni estratti in µg/ml, sia la Ratio, cioè un valore che stima la purezza del DNA, espressa attraverso un rapporto di Assorbanza calcolata a 260 nm e 280 nm. Un DNA puro ha un rapporto 260/280 compreso tra 1.5 (valore accettabile) e 2.00. Se tale rapporto risulta inferiore a 1.5, significa che la presenza di proteine nel campione è alta.

Occorre considerare che di solito la lettura della concentrazione può essere sovrastimata di circa 1:3, poiché lo strumento legge nello stesso modo il DNA intero e porzioni di esso.

2. Valutazione della concentrazione di DNA attraverso l'utilizzo di DNA Lambda.

Per valutare la concentrazione di DNA dei campioni si è ricorsi alla quantificazione mediante elettroforesi su gel d'agarosio, prendendo come riferimento un DNA Lambda a concentrazione nota. In questo caso, sono state preparate 3 diverse diluizioni a concentrazioni note di DNA Lambda Marker (0,3 µg/µl) di riferimento e sono state poste a confronto con il DNA estratto dei campioni da quantificare. In questo caso la valutazione è stata più approssimativa, ma può essere resa più precisa se si effettua un'analisi elettroforetica densitometrica dell'intensità delle bande di DNA.

Preparazione del gel (agarosio 1%) 80 ml e corsa elettroforetica:

L'agarosio, in quantità 0.8 g, è stato sciolto in 72 ml di H₂O distillata e in 8 ml di tampone TBE 5x [0.045 M Tris-borato, 0.001 M EDTA] in un forno a microonde per 2 minuti. La soluzione è stata lasciata raffreddare, prima di aggiungervi 4 µl di Bromuro di Etidio, un intercalante che emette luce a 590 nm (giallo-arancio) sotto l'illuminazione con UV. Il gel è stato lasciato polimerizzare nell'apposita cella dotata di pettine, per circa 40/50 minuti al buio. Trascorso tale periodo, sono stati caricati nel gel sia i campioni di DNA estratti, sia le tre soluzioni a concentrazione nota di Lambda Marker (0.3 µg/µl). L'intensità della luminosità delle bande è proporzionale alla quantità di DNA presente in quella banda. L'elettroforesi è stata eseguita a 90 V (voltage costante)/ 10 mA per circa 1 ora, a temperatura ambiente in un tampone di corsa TBE 0.5x, utilizzando la cella "Vari-gel". Al termine della corsa elettroforetica, il DNA è stato evidenziato esponendo il gel a luce ultravioletta (260 nm). Il colorante (BE) legato al DNA emette la luce fluorescente rendendo così visibili i frammenti. Tramite il Transilluminator TFM 20 UVP sono state effettuate le foto del gel e l'acquisizione dell'immagine.

4.4.3 Amplificazione dei campioni mediante RADP-PCR

La Polymerasi chain reaction (PCR) è stata eseguita in un volume di 25 µl di reazione, contenenti 30 ng del DNA campione, 1x Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM di dCTP, dGTP, dATP e dTTP, 120 ng di primer e 2 unità di Taq-polymerase (5- Prime). Il Master Mix è stato trasferito in un termociclatore, "T personal BIOMETRA", in cui è stato programmato il seguente ciclo:

- denaturazione iniziale a 92°C per 3 minuti;
- 46 cicli di :

Denaturation	per 15 sec a 92°C,
Annealing	per 30 sec a 35°C,
Extension	per 1 min a 72°C.
- estensione finale a 75°C per 10 min, seguita da 10 min a 65°C.

4.4.5 Primer

I primer testati per l'amplificazione del DNA estratto dai parentali e dagli ipotetici ibridi sono stati 39 diversi con sequenze nucleotidiche comprese tra 10 e 18 basi acquistate presso la ditta Operon Biotechnologies GmbH (Tab. 4.6).

Primer code	Sequenza nucleotidica da 5' a 3' (basi)
Y3	GAG GGT GGC GGT TCT (15)

Y7	TCG TGG CTG ACT TAC CTG (18)
Y8	TGC T _T ^G T G _T T _T ^G T _T ^G T GCA GGT (18)
Y14	AGA GCC ACC ACC CTC (15)
Y24	AAC CGC GCT C (10)
Y29	TTC GGG CCG T (10)
Y35	TGG TAT CAG AGC C (13)
Y37	GTC AAG CGC G (10)
Y38	TAA CCG CGC C (10)
Y41	GCG TCC TGG G (10)
Y45	GTC GTC GTC GTC (12)
OPA 01	CAG GCC CTT C (10)
OPA 02	TGC CGA GCT G (10)
OPA 03	AGT CAG CCA C (10)
OPA 04	AAT CGG GCT G (10)
OPA 05	AGG GGT CTT G (10)
OPA 06	GGT CCC TGA C (10)
OPA 07	GAA ACG GGT G (10)
OPA 08	GTG ACG TAG G (10)
OPA 09	GGG TAA CGC C (10)
OPA 10	GTG ATC GCA G (10)
OPA 11	CAA TCG CCG T (10)
OPA 12	TCG GCG ATA G (10)
OPA 13	CAG CAC CCA C (10)
OPA 14	TCT GTG CTG G (10)
OPA 15	TTC CGA ACC C (10)
OPA 16	AGC CAG CGA A (10)
OPA 17	GAC CGC TTG T (10)
OPA 18	AGG TGA CCG T (10)
OPA 19	CAA ACG TCG G (10)
OPA 20	GTT GCG ATC C (10)
OPB 01	GTT TCG CTC C (10)
OPB 02	TGA TCC CTG G (10)
OPB 03	CAT CCC CCT G (10)
OPB 04	GGA CTG GAG T (10)
OPB 05	TGC GCC CTT C (10)
OPB 06	TGC TCT GCC C (10)
OPB 07	GGT GAC GCA G (10)
OPB 08	GTC CAC ACG G (10)

Tab. 4.6 - Primer impiegati nell'amplificazione del DNA estratto.

4.4.6 Riconoscimento di un ibrido

I prodotti di RAPD sono stati separati mediante elettroforesi, su gel di agarosio 1.5%, usando come tampone per la corsa elettroforetica il TBE 5x e colorando il gel con bromuro di etidio. L'elettroforesi è stata eseguita utilizzando una cella elettroforetica "Vari-gel" con un tampone di corsa TBE 0.5x a 90 V (voltage costante)/ 10 mA per circa 2 h, a temperatura ambiente. Come marker è stato usato 100 bp DNA ladder concentrato 1 µg/µl, di peso molecolare compreso tra

100 e 1500 bp, più un frammento aggiuntivo a 2072 bp, della ditta Invitrogen. Al termine della corsa elettroforetica, i campioni sono stati evidenziati esponendo il gel a luce ultravioletta (260 nm). Il colorante (BE) legato ai prodotti di amplificazione emette la luce fluorescente rendendo così visibili i frammenti. Tramite il Transilluminator *TFM 20 UVP* è stata effettuata una foto del gel e l'acquisizione dell'immagine attraverso il programma Doc – It LS Image Acquisition Software, Life Science Software UVP.

Gli amplificati che hanno mostrato bande significative durante la corsa in gel di agarosio all'1.5%, sono stati fatti correre nuovamente su un gel di agarosio al 3%, in modo da permettere una migliore separazione di quelle bande che potevano risultare significative ai fini della valutazione dell'ibrido.

CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Coltivazione di piante di *Lilium*

Il ciclo colturale dei bulbi di *Lilium* coinvolti nel programma di incroci è risultato di lunghezza variabile tra i 110 giorni per le cultivars di orientali ‘Lombardia’ e di *longiflorum* ‘White Heaven’ e ‘White Magic’ ed i 90 giorni per le cultivars di asiatici ‘Gironde’, ‘Polyanna’ e ‘Golf’. I cloni di asiatici senza polline sono stati coltivati in pien’aria e la loro fioritura è avvenuta dopo un ciclo di coltivazione di 90 giorni circa, tra metà maggio e metà giugno. Le specie originarie sono state allevate in serra con un ciclo variabile tra 90 e 110 giorni, dipendente dalla specie considerata.

Sono state osservate condizioni colturali analoghe ai normali cicli di coltivazione senza particolari problemi di natura fitopatologica. Un’adeguata programmazione degli impianti ha permesso di ottenere la fioritura quasi contemporanea per tutte le varietà in coltivazione e per ciascuna epoca di impianto.

5.2 Programmazione degli incroci e successivo prelievo degli ovari

Per la prima prova, riguardante le cultivars commerciali, sono stati realizzati 1561 incroci, rispettivamente 836 nel 2005 e 725 nel 2006, mentre per la seconda prova, riguardante incroci tra alcuni cloni di asiatici selezionanti negli anni precedenti per il carattere assenza di polline con alcune specie originarie, sono stati realizzati 144 incroci nel 2005 e 348 nel 2006.

L’impollinazione manuale è stata eseguita su bocci fiorali prossimi alla fioritura, le capsule, una volta impollinate, sono rimaste sulla pianta madre per un ulteriore periodo e sono state prelevate poi successivamente ad intervalli di 7, 14 e 21 DAP per la prima prova e a 7 e 14 giorni DAP per la seconda. Infine sono state trasferite ‘*in vitro*’ utilizzando i substrati nutritivi precedentemente descritti.

Trascorsi 50-60 giorni dalla messa ‘*in vitro*’ degli ovari si è proceduto ad una prima valutazione delle piastre per individuare gli incroci che avevano fornito i risultati migliori, l’epoca più idonea per il prelievo degli ovari ed i terreni risultati più idonei allo sviluppo degli ovari stessi.

In tabella 5.1 sono riportate le combinazioni di incrocio, relative all’anno 2005, che hanno fornito i risultati migliori. Le più alte percentuali di incroci riusciti sono state osservate nell’incrocio ‘Lombardia’ x ‘White Magic’ con il 93.6% di ovari raccolti e in ‘Lombardia’ x ‘Golf’, con una percentuale del 92.4%.

Al contrario la percentuale più bassa di incroci riusciti si è verificata nelle combinazioni di incrocio ‘White Magic’ x ‘Golf’ e ‘White Magic’ x ‘Polyanna’, con valori rispettivamente del 18

e del 34.1%, seguiti dall'incrocio 'White Magic' x 'Lombardia' con una percentuale di incroci andati a buon fine pari a 37.1%.

2005							
Gruppo Ibridi interspecifici	Tipo di incrocio	Incroci effettuati (n)	Incroci/Ovari raccolti per il 'vitro' (n)	incroci riusciti %	incroci/ ovari abortiti nei 3 DAP %		
					7°	14°	21°
LO	'Lombardia' x 'White Haeven'	79	71	89.9	0	10.4	18.7
	'White Haeven' x 'Lombardia'	46	25	54.3	8.3	38.1	92.3
	'Lombardia' x 'White Magic'	47	44	93.6	0	7.7	16.7
	'White Magic' x 'Lombardia'	62	23	37.1	37.5	75.8	89.9
Totale LO		234	163	69.6			
AO	'Lombardia' x 'Golf'	66	61	92.4	0	13.9	0
	'Golf' x 'Lombardia'	75	37	49.3	19	44.4	100
	'Lombardia' x 'Polyanna'	79	71	89.9	7.7	15.8	0
	'Polyanna' x 'Lombardia'	72	52	72.2	22.7	14.3	66.7
Totale AO		292	221	75.7			
LA	'Polyanna' x 'White Haeven'	44	34	77.3	6.7	28.6	37.5
	'White Haeven' x 'Polyanna'	34	24	70.6	25	25	100
	'White Haeven' x 'Golf'	29	15	51.7	0	86.6	20
	'Golf' x 'White Haeven'	36	27	75	40	0	50
	'Polyanna' x 'White Magic'	34	27	79.4	0	0	58.3
	'White Magic' x 'Polyanna'	44	15	34.1	22.2	94.4	100
	'White Magic' x 'Golf'	50	9	18	77.8	76.2	100
	'Golf' x 'White Magic'	39	34	87.2	0	14.3	66.6
Totale LA		310	185	59.7			
Totale Incroci		836	569	68.1			

Tab. 5.1: 2005, incroci tra cultivars commerciali di *Lilium*: percentuale di ovari raccolti per il trasferimento 'in vitro' rispetto al totale di incroci effettuati.

Prendendo in considerazione i risultati ottenuti all'interno di ciascuna classe di ibridi si può osservare come i risultati migliori siano stati ottenuti nella classe degli ibridi **AO**, in cui la percentuale di incroci riusciti si attesta al 75.7%, seguita dalla classe degli ibridi **LO**, con un valore del 69.6%, fino ad arrivare al gruppo degli **LA**, con una percentuale del 59.7 %.

Tali risultati sono da considerarsi piuttosto elevati tenuto conto del verificarsi di fenomeni di incompatibilità interspecifica del *Lilium* e sono in larga misura dipendenti dal tipo di parentali coinvolti nell'incrocio.

Considerando gli incroci effettuati nel corso del 2006, si può osservare in tabella 5.2 come i risultati migliori si siano verificati nel gruppo di ibridi **AO** ed, in particolare, negli incroci 'Lombardia' x 'Gironde' e 'Lombardia' x 'Polyanna' in cui sono state raggiunte percentuali rispettivamente del 97.4 e 91.8% di incroci riusciti. La percentuale di riuscita dei diversi incroci sembra confermare anche in questo secondo anno l'andamento dell'anno precedente.

2006							
Gruppo Ibridi interspecifici	Tipo di incrocio	Incroci effettuati (n)	Incroci/Ovari raccolti per il 'vitro' (n)	% incroci riusciti	%incroci/ ovari abortiti nei 3 DAP		
					7°	14°	21°
LO	'Lombardia' x 'White Haeven'	82	68	82.9	18.8	21.9	5.6
	'White Haeven' x 'Lombardia'	54	15	27.8	62.5	66.7	100
Totale LO		136	83	61.0			
AO	'Lombardia' x 'Gironde'	78	76	97.4	0	4.2	4.2
	'Gironde' x 'Lombardia'	78	42	53.8	16.7	58.3	70.8
	'Lombardia' x 'Polyanna'	73	67	91.8	28.0	0	4.2
	'Polyanna' x 'Lombardia'	66	59	89.4	0	11.1	20.8
Totale AO		295	244	82.7			
LA	'Polyanna' x 'White Haeven'	60	43	71.7	0	33.3	50.0
	'White Haeven' x 'Polyanna'	66	30	45.4	40.0	66.7	66.7
	'White Haeven' x 'Gironde'	72	25	34.7	58.3	62.5	75.0
	'Gironde' x 'White Haeven'	96	52	54.2	12.5	41.7	72.2
Totale LA		294	150	51.0			
Totale Incroci		725	477	65.8			

Tab. 5.2: 2006, incroci tra cultivars commerciali di *Lilium*: percentuale di ovari raccolti per il trasferimento 'in vitro' rispetto al totale di incroci effettuati.

2005	Tipo di incrocio	Incroci effettuati (n)	Incroci/Ovari raccolti per il 'vitro' dopo 7 gg. (n)	incroci riusciti %
	♀ 009 X ♂ <i>L. Leucanthum</i>	6	6	100
	♀ 009 X ♂ <i>L. New Zealand</i>	6	5	83.3
	♀ 0049 X ♂ <i>L. Pumilum</i>	6	6	100
	♀ 0049 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	6	100
	♀ 0049 X ♂ <i>L. Aurelian</i>	6	6	100
	♀ 0051 X ♂ <i>L. Aurelian</i>	6	5	83.3
	♀ 12 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	6	100
	♀ 12 X ♂ <i>L. Leucanthum</i>	6	6	100
	♀ 20 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	6	100
	♀ 20 X ♂ <i>L. Aurelian</i>	6	6	100
	♀ 409 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	6	100
	♀ 409 X ♂ <i>L. Leucanthum</i>	6	6	100
	♀ 599 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	6	100
	♀ 599 X ♂ <i>L. New Zealand</i>	6	6	100
	♀ 599 X ♂ <i>L. Leucanthum</i>	6	6	100
	♀ 00147 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	6	100
	♀ 00147 X ♂ <i>L. New Zealand</i>	6	6	100
	♀ 00150 X ♂ <i>L. Leucanthum</i>	6	6	100
	♀ 00150 X ♂ <i>L. New Zealand</i>	6	5	83.3
	♀ 00194 X ♂ <i>L. Leucanthum</i>	6	4	66.6
	♀ 00194 X ♂ <i>L. Regale</i>	6	4	66.6
	♀ 00195 X ♂ <i>L. New Zealand</i>	6	6	100
	♀ 00195 X ♂ <i>L. Aurelian</i>	6	6	100
	♀ 00207 X ♂ <i>L. Pumilum</i>	6	6	100
	Totale	144		95.1

Tab. 5.3: Esito degli incroci riusciti sul totale di quelli effettuati nella prova tra cloni di asiatici senza polline e alcune specie selvatiche, nel 2005.

Dai dati riportati in tabella 5.3 e 5.4 si può osservare, per entrambi gli anni 2005 e 2006, come in queste combinazioni di incrocio, che hanno riguardato cloni di asiatici selezionanti negli anni precedenti per il carattere assenza di polline con alcune specie originarie, si siano ottenute percentuali di incroci riusciti nettamente superiori a quelle verificatesi nella prova precedente, ma che purtroppo non si sono tradotte in un altrettanto elevata percentuale di germinazione, come si vedrà in seguito, probabilmente per il verificarsi di barriere di incompatibilità post-zigotica, che hanno impedito l'ulteriore sviluppo dell'ovulo ingrossatosi in un primo momento.

Dai dati riportati nelle tab. 5.1 e 5.2 è emerso che la più alta percentuale di incroci riusciti si è verificata, quando nell'incrocio è stata impiegata come 'portaseme' la cultivar 'Lombardia', un ibrido Orientale. Al contrario, quando veniva utilizzato come 'portaseme' un ibrido di *Longiflorum* ('White Magic' nel 2005 e 'White Haeven' nel 2006), si è verificata la più alta percentuale di aborti.

Tale comportamento può essere dovuto a fattori come la diversa reazione del genotipo a condizioni esterne quali luce e temperatura, ma più spesso ciò è attribuibile alla natura dei parentali coinvolti nell'incrocio che influenzano la riuscita dell'incrocio stesso (Van Tuyl *et al.*, 2001).

Quindi si può concludere che il ruolo svolto dalla cultivar all'interno di un incrocio, cioè quello di cv 'portaseme' o di cv 'impollinatrice', influenza fortemente la percentuale di riuscita dello stesso.

2006	Tipo di incrocio	Incroci effettuati (n)	Incroci/Ovari raccolti per il 'vitro' dopo 7 e 14 gg. (n)	incroci riusciti %
	♀ 009 x ♂ <i>L. Regale</i>	12	11	91.6
	♀ 0030 X ♂ L. 'World'	12	12	100
	♀ 0035 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	10	83.3
	♀ 354 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	10	83.3
	♀ 0043 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 0052 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	12	100
	♀ 004 X ♂ L. Regale	12	12	100
	♀ 0090 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 20 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	12	100
	♀ 40 X ♂ L. World	12	12	100
	♀ 380 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	12	100
	♀ 409 X ♂ L. World	12	12	100
	♀ 00101 X ♂ L. 'Pink Perfection'	12	12	100
	♀ 599 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00102 X ♂ L. 'World'	12	12	100
	♀ 00111 X ♂ L. 'World'	12	12	100
	♀ 00147 X ♂ L. New Zealand	12	9	75
	♀ 00116 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00121 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00117 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00195 X ♂ L. 'World'	12	12	100
	♀ 00134 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00159 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	11	91.6
	♀ 00175 X ♂ <i>L. Regale</i>	12	12	100
	♀ 00142 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00208 X ♂ L. 'Pink Perfection'	12	12	100
	♀ 00216 X ♂ L. 'World'	12	12	100
	♀ 00236 X ♂ L. New Zealand	12	12	100
	♀ 00207 X ♂ L. 'Pink Perfection'	12	12	100
	Totale	348		97.4

Tab. 5.4: Incroci riusciti sul totale degli incroci effettuati nella prova tra cloni di asiatici senza polline ed alcune specie selvatiche nel corso del 2006.

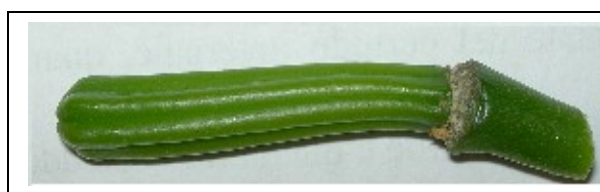


Fig. 5.1: Cultivar 'Lombardia' come cv. 'portaseme'
In



Fig. 5.2: Cultivar 'Lombardia' come cv. 'impollinatrice'
, se

come la tendenza generale si traduca in un aumento di ovari abortiti all'aumentare del numero di giorni che intercorrono tra l'impollinazione e la raccolta della capsula dalla pianta madre. Facendo riferimento all'incrocio 'Golf' x 'Lombardia' del 2005, la percentuale di aborti degli ovari varia dal 19% per quelli raccolti a 7 giorni dall'incrocio, al 44.4% per quelli raccolti dopo 14 giorni, fino a raggiungere il 100%, per quelli prelevati dopo 21 giorni. Stessa tendenza si è

verificata nell'incrocio 'White Haeven' x 'Lombardia' del 2006 in cui il numero di ovari abortiti è passato dal 62.5% per quelli raccolti dopo 7 giorni dall'impollinazione fino a raggiungere il 100% di ovari abortiti per quelli raccolti dopo 21 giorni dall'impollinazione.

In riferimento alle 3 epoche di prelievo, si osserva quindi come il numero di aborti aumenti già a partire dal 7° giorno dal momento dell'impollinazione e che tale valore raggiunge il massimo (in alcuni casi con il 100% di aborti) in corrispondenza del 21° giorno dall'avvenuta impollinazione. L'esame dei dati riportati portano a concludere che il momento più idoneo per la raccolta degli ovari dalla pianta madre è, per la maggior parte degli incroci, tra il 7° e il 14° giorno dal momento dell'impollinazione. Dopo tale periodo la capsula fecondata, che rimane sulla pianta madre, comincia ad ingiallire per poi degenerare rapidamente, fino a disseccarsi completamente se lasciata oltre il 21° giorno sulla pianta madre, per il verificarsi fenomeni di incompatibilità interspecifica (Fig. 5.3 a, b, c, d).



Fig. 5.3 a: 'Gironde' x 'Lombardia': capsula raccolta dalla pianta madre a 7 giorni dall'impollinazione

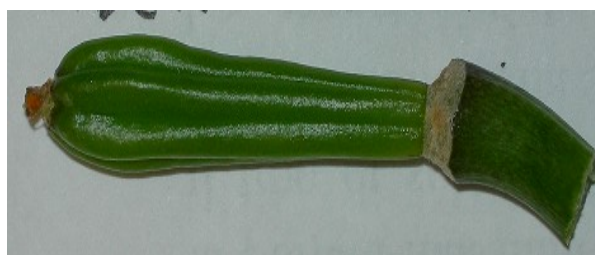


Fig. 5.3 b: 'Gironde' x 'Lombardia': capsula raccolta dalla pianta madre a 14 giorni dall'impollinazione



Fig. 5.3 c: 'Gironde' x 'Lombardia': capsula raccolta dalla pianta madre a 21 giorni dall'impollinazione



Fig. 5.3 d: 'Gironde' x 'Lombardia': capsula raccolta dalla pianta madre ad oltre 21 giorni dall'impollinazione

5.3 Substrati utilizzati per la coltura di ovari e di ovuli

5.3.1 Coltura di sezioni di ovario

Dopo 50-60 giorni dalla messa *'in vitro'*, le sezioni di ovario presentavano un aspetto diverso in relazione al tipo di substrato da cui provenivano e dal genotipo dei parentali.

In generale, l'ovario era aumentato di volume, accrescendosi fino ad arrivare ad oltre un cm di diametro (Fig. 5.4). Alcuni ovuli, all'interno delle sezioni di ovario, aumentavano di volume diventando turgidi e rigonfi (Fig. 5.5), provocando in qualche caso la rottura dell'ovario stesso, in altri casi gli ovarii tendevano invece ad imbrunire, disfacendosi.



Fig. 5.4: Aumento di volume dell'ovario dopo 50-60 giorni dalla messa *'in vitro'*.



Fig. 5.5: Aumento di volume dell'ovario con ovuli turgidi e rigonfi.

Per gli scopi del presente lavoro, la rigenerazione dalla superficie dell'ovario riveste scarsa rilevanza in quanto in questo caso possono rigenerare soltanto piante geneticamente uguali al parentale femminile. Al contrario, lo sviluppo di ovuli e la loro successiva germinazione potrebbe originare bulbetti da considerarsi possibili ibridi tra i due parentali dell'incrocio.

Dopo questa prima fase dell'attività, è stata fatta una valutazione relativa alla capacità dei terreni di coltura riguardo allo sviluppo di ovarii, al rigonfiamento di ovuli e talvolta alla comparsa di bulbetti.

I risultati riportati in tabella 5.5, evidenziano come i terreni migliori, in termini di sviluppo di ovarii, siano risultati quello denominato IAA_{0,5} e quello denominato NAA₁ (terreni già riportati in tabella 4.4). Lo stadio di sviluppo degli ovarii per i diversi terreni può essere osservato in figura 5.6.

	MSO		LO₁		IAA_{0,5}		NAA₁	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
Capsule 'in vitro' in coltura di ovari	138	79	165	77	193	137	69	152
Ovari rigonfi dopo 50 giorni di coltura	34	5	55	11	102	41	45	78
Percentuale di ovari sviluppati	24.6%	6.3%	33.3%	14.2%	52.8%	29.9%	65.2%	51.3%

Tab. 5.5: Effetto del substrato di coltura sullo sviluppo di ovari derivanti da incroci interspecifici di *Lilium* effettuati nel corso del 2005 e del 2006.

Il terreno denominato IAA_{0,5} ha determinato una percentuale di sviluppo di ovari pari al 52.8%, mentre si è raggiunto il 65.2%, per quanto riguarda il terreno denominato NAA₁. I substrati di crescita hanno confermato una tendenza simile nell'anno successivo (tab. 5.5).

Questo dato conferma quanto già riportato in letteratura da studi precedenti (Van Tuyl *et al.*, 1991; Grassotti e Babes, 2000 e da Grassotti e Nesi, 2007) e cioè che un substrato ottimale per la coltura degli ovuli di *Lilium* deve contenere concentrazioni di auxine comprese tra 0,1 e 1 mg/l .

5.3.2 Coltura di ovuli isolati

Dopo una valutazione della piastre contenenti la coltura di ovuli, si è proceduto alla messa in coltura di quegli ovuli che risultavano accresciuti, di colore verde e turgidi, circa 10-15 per ogni segmento di ovario. Questi sono stati trasferiti singolarmente su idonei terreni di coltura, cioè su IBA_{0.5} e NAA_{0.1}. In questo caso i primi ovuli fecondati hanno cominciato a germinare dopo 180 giorni circa dalla loro messa in coltura, durante i quali l'ovulo si è sviluppato ed ha subito una trasformazione fino allo sviluppo dell'embrione ed all'emissione della radichetta (Fig. 5.7).

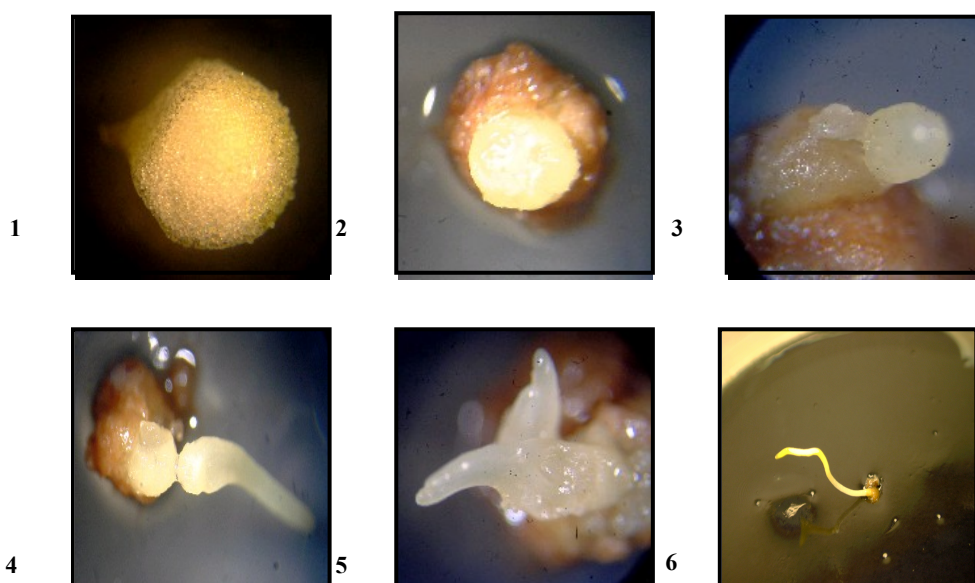


Fig. 5.7: Fasi di sviluppo di un ovulo fecondato: 1) l'ovulo diventa verde, leggermente ingrossato e turgido. 2) e 3) l'ovulo si ingrossa ulteriormente. 4) embrione in germinazione con emissione di apice radicale. 5) embrione in germinazione con emissione apice del germoglio e apice radicale. 6) plantula già completa di apparato radicale e apparato aereo.

5.4 Ottenimento di piante da ovuli

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la modalità con cui una cultivar viene utilizzata in un incrocio, cioè se 'portaseme' o se 'impollinatrice', influenza la percentuale di riuscita

dell'incrocio stesso (Tab. 5.6). Soltanto gli incroci 'Lombardia' x 'Polyanna' e 'Lombardia' x 'Gironde' hanno determinato lo sviluppo di embrioni sia nell'incrocio diretto che nel reciproco. In tutte le altre combinazioni, l'incrocio ha dato buoni risultati solo in una direzione. In particolare le due cultivars *Longiflorum*, 'White Haeven' e 'White Magic', sono risultate efficienti solo quando venivano utilizzate come 'impollinatrici', mentre la cultivar Orientale 'Lombardia', ha dato buoni risultati solo come 'portaseme', fatta eccezione per l'incrocio 'Lombardia' x 'White Magic' (tab. 5.6).

A questo riguardo anche studi precedenti (Van Tuyl *et al.*, 1991) hanno evidenziato che i risultati delle combinazioni interspecifiche dipendono in gran parte dai partners coinvolti nell'incrocio.

Il mancato sviluppo di ovuli del gruppo ibrido LO, con l'incrocio 'Lombardia' x 'White Magic' e del gruppo ibrido LA, con l'incrocio 'Polyanna' x 'White Haeven', è probabilmente imputabile al verificarsi di fenomeni di incompatibilità post-zigotica che in un primo tempo avevano permesso lo sviluppo degli ovari e dei relativi ovuli, ma che successivamente non si è tradotto nella loro germinazione. In questi casi non essendo sufficiente la coltura di ovari e di ovuli per il superamento delle barriere di incompatibilità, potrebbe essere opportuno ricorrere a tecniche alternative, come ad esempio la coltura di protoplasti.

Gruppo ibridi interspecifici	Incrocio diretto	Esemplari con sviluppo bulbetti	Incrocio reciproco	Esemplari con sviluppo bulbetti
LO	'Lombardia' x 'White Haeven'	6	'White Haeven' x 'Lombardia'	-
	'Lombardia' x 'White Magic'	-	'White Magic' x 'Lombardia'	-
AO	'Lombardia' x 'Golf'	1	'Golf' x 'Lombardia'	-
	'Lombardia' x 'Polyanna'	3	'Polyanna' x 'Lombardia'	1
	'Lombardia' x 'Gironde'	5	'Gironde' x 'Lombardia'	2
LA	'Polyanna' x 'White Haeven'	-	'White Haeven' x 'Polyanna'	-
	'White Haeven' x 'Golf'	-	'Golf' x 'White Haeven'	1
	'Polyanna' x 'White Magic'	1	'White Magic' x 'Polyanna'	-
	'White Magic' x 'Golf'	-	'Golf' x 'White Magic'	1
	'Gironde' x 'White Haeven'	6	'White Haeven' x 'Gironde'	-

Tab. 5.6: Comportamento delle cultivars impiegate come 'portaseme' o come 'impollinatrice'.

Inoltre è emerso che negli incroci tra cloni di 'Asiatici' e le specie originarie, la frequenza di germinazione è risultata molto più bassa, rispetto agli incroci effettuati tra ibridi commerciali, attestandosi nel primo caso intorno all'1 %, nel secondo al 2%.

Negli incroci tra cloni di 'Asiatici' e le specie originarie, i fenomeni di incompatibilità si sono verificati in fase più tardiva, in un primo momento infatti gli ovari si sono rigonfiati, determinando un'alta percentuale di incroci riusciti (tab. 5.3 e 5.4); in coltura di ovari, i tessuti materni hanno influenzato positivamente lo sviluppo dei semi, promuovendo un ulteriore loro

ingrossamento, che però non si è concretizzato in una loro successiva germinazione, in coltura di ovuli.

Cloni Asiatici 'portaseme' X Specie originarie 'impollinatrici'	Incrocio diretto	Esemplari con sviluppo bubetti
	♀ 354 X ♂ <i>L. Regale</i>	
♀ 00147 X ♂ <i>L. New Zealand</i>		1
♀ 00207 X ♂ <i>L. 'Pink Perfection'</i>		1
♀ 00207 X ♂ <i>L. Pumilum</i>		1

Tab. 5.7: Esempari ottenuti dagli incroci tra cloni di asiatici senza di polline con alcune specie originarie.

5.5 Moltiplicazione di piante ottenute da incroci e loro ambientamento

I bulbetti ottenuti dalla coltura di ovuli sono stati propagati, ingrossati e radicati con i substrati precedentemente descritti. Una volta ottenuti, per ciascun ipotetico ibrido, 50-60 individui, una parte di questi sono stati mantenuti 'in vitro' per sottoporli ad analisi genotipica e una parte ambientata (Fig. 5.8), per poi essere coltivati con la normale tecnica agronomica del *Lilium* al fine di valutare il fenotipo del materiale ottenuto da incroci (Fig. 5.9).



Fig. 5.8: Bulbetto in ambientamento derivante da incroci interspecifici.



Fig. 5.9: Piante di *Lilium* derivanti da incroci interspecifici in pieno campo.

5.6 Analisi molecolare degli ipotetici ibridi

L'identificazione genotipica è stata effettuata utilizzando la tecnica di analisi molecolare RAPD, che ha consentito una verifica precoce della natura ibrida in progenie F₁ derivanti da incroci interspecifici. In particolare l'analisi RAPD ha consentito di ottenere un profilo molecolare specifico per ogni nuovo individuo e per i propri parentali, così da poter valutare l'avvenuta fusione dei gameti e quindi l'effettivo ottenimento di un ibrido, attraverso il superamento delle barriere sessuali tipiche dell'incrocio interspecifico.

La valutazione genotipica è stata condotta su sei ipotetici ibridi due per ciascun incrocio ‘Lombardia’ x ‘Gironde’ (di tipo AO), ‘Gironde’ x ‘White Haeven’ (di tipo LA) e ‘Lombardia’ x ‘White Haeven’ (di tipo LO).

5.7 Estrazione del DNA da parentali ed ibridi

È stato scelto un campione rappresentativo per ogni tipo di incrocio da valutare e per i rispettivi parentali.

La qualità e la quantità di DNA estratto da 100 mg di foglie dei bulbetti fatti crescere *‘in vitro’*, è stata stimata sia attraverso lettura allo spettrofotometro (Tab. 5.8), che mediante elettroforesi su gel di agarosio mediante confronto con quantità note di DNA del fago Lambda.

CAMPIONE	Concentrazione DNA (µg/ml)	Ratio
		OD 260/OD 280
Gironde	80.2	1.807
White Haeven	82.1	1.820
Lombardia	36.5	1.953
‘Gironde’ x ‘White Haeven’ (CB ₄₆)	74.6	1.834
‘Gironde’ x ‘White Haeven’ (CB ₄₇)	67.4	1.862
‘Lombardia’ x ‘Gironde’ (AC ₄₂)	65.0	1.743
‘Lombardia’ x ‘Gironde’ (AC ₄₄)	31.8	1.851
‘Lombardia’ x ‘White Haeven’ (AB ₃₀)	28.3	1.383
‘Lombardia’ x ‘White Haeven’ (AB ₅₀)	34.0	1.277

Tab. 5.8: Concentrazione del DNA estratto dai parentali e dagli ipotetici ibridi ottenuti mediante lettura allo spettrofotometro.

5.8 Identificazione dei primer informativi

L’analisi RAPD è stata effettuata sulle sei progenie e sui tre rispettivi parentali. Per ciascuna tipologia di incrocio sono stati testati 39 primer (per l’incrocio ‘Lombardia’ x ‘White Haeven’ 35 primer), in modo da individuare quelli informativi, cioè in grado di generare pattern polimorfici dai prodotti di amplificazione. Soltanto 25 primer sono riusciti a produrre bande informative, mentre i restanti 14 hanno fallito nell’amplificazione.

In particolare i primer che hanno generato bande significative sono risultati Y24, Y35, Y37, Y38, Y41, OPA01, OPA02, OPA03, OPA06, OPA07, OPA09, OPA10, OPA11, OPA12, OPA14, OPA17, OPA18, OPA20, OPB01, OPB02, OPB04, OPB05, OPB06 e OPB07, OPB08, viceversa i primer che hanno fallito nell’amplificazione sono stati Y3, Y7, Y8, Y14, Y29, Y45, OPA04, OPA05, OPA08, OPA13, OPA15, OPA16, OPA19 e OPB03 (tab. 5.9).

Incroci saggiati Primer	'Gironde'x'White Haeven'		'Lombardia'x'Gironde'		'Lombardia'x 'White Haeven'	
	CB46	CB47	AC42	AC44	AB30	AB50
Y3	-	-	-	-	-	+
Y7	-	-	-	-	-	-
Y8	-	-	-	-	-	-
Y14	-	-	-	-	-	-
Y24	-	+	+	+	-	-
Y29	-	-	-	-	-	-
Y35	+	+	-	-	-	-
Y37	-	-	+	+	+	+
Y38	-	-	+	-	-	-
Y41	+	+	-	-	-	-
Y45	-	-	-	-	-	-
OPA 01	-	-	-	-	+	+
OPA 02	-	-	-	-	+	+
OPA 03	-	+	-	-	-	-
OPA 04	-	+	-	-	-	+
OPA 05	-	-	-	-	-	-
OPA 06	-	+	-	-	-	-
OPA 07	-	+	-	+	-	+
OPA 08	-	-	-	-	-	-
OPA 09	+	+	+	+	-	-
OPA 10	-	-	-	+	-	-
OPA 11	+	+	-	+	+	+
OPA 12	-	+	-	-	-	-
OPA13	-	-	-	-	-	-
OPA14	+	+	-	-	-	-
OPA15	-	-	-	-	-	-
OPA16	-	-	-	-	-	-
OPA17	-	-	+	+	-	-
OPA18	-	-	-	-	+	+
OPA19	-	-	-	-	-	-
OPA20	-	-	+	+	+	+
OPB01	+	+	+	+	*	*
OPB02	-	+	-	-	*	*
OPB03	-	-	-	-	*	*
OPB04	-	+	-	-	*	*
OPB05	-	-	+	+	+	+
OPB06	-	-	+	+	-	-
OPB07	+	+	-	-	+	+
OPB08	-	+	+	+	*	*

Tab. 5.9: Diversi primer utilizzati nelle 3 tipologie di incrocio in *Lilium*: (+) primer che hanno generato bande significative; (-) primer che non hanno generato bande informative; (*) non saggiati perché mancavano foglie degli ibridi per estrarre il DNA.

Si può osservare inoltre, come il numero di primer significativi per i due ipotetici ibridi denominati CB₄₆ e CB₄₇, derivati dall'incrocio 'Gironde' x 'White Haeven' siano 16, per i due

putativi ibridi denominati AC₄₂ e AC₄₄ derivati dall'incrocio 'Lombardia' x 'Gironde' siano 13 mentre, per gli ultimi due putativi ibridi denominati AB₃₀ e AB₅₀, derivanti dall'incrocio 'Lombardia' x 'White Haeven', ne siano risultati 11.

Questi primer hanno prodotto da un minimo di 49 a un massimo di 96 bande (Tab. 5.10).

I pattern elettroforetici dei parentali mostrano bande tipiche del genitore femminile, bande specifiche del genitore maschile, più alcune bande presenti in entrambi i parentali.

Ibrido putativo	Bande presenti solo nella pianta madre ereditate dalla progenie (n)	Bande presenti solo nella pianta donatrice di polline ereditate dalla progenie (n)	Bande presenti in entrambi i genitori (n)	Numero totale di bande
'Gironde' x 'White Haeven' (CB ₄₆)	43	15	38	96
'Gironde' x 'White Haeven' (CB ₄₇)	32	23	38	93
'Lombardia' x 'Gironde' (AC ₄₂)	36	16	27	79
'Lombardia' x 'Gironde' (AC ₄₄)	39	18	19	76
'Lombardia' x 'White Haeven' (AB ₃₀)	28	14	10	52
'Lombardia' x 'White Haeven' (AB ₅₀)	23	16	10	49

Tab 5.10: Analisi RAPD sugli ipotetici ibridi interspecifici: sono riportate il numero di bande in comune tra ogni individuo ed i rispettivi parentali.

5.9 Analisi della progenie

I profili RAPD, ottenuti attraverso i gel elettroforetici, impiegando i primer sopra descritti, mostrano per gli ibridi presi in esame differenze significative tra i parentali, molte bande omogenee tra gli ibridi e i parentali femminili e alcune bande in comune solo tra gli ibridi e i parentali maschili. Sono queste ultime bande che confermano l'avvenuta fecondazione e quindi l'effettivo ottenimento di un ibrido.

5.9.1 Analisi delle progenie CB₄₆ e CB₄₇

Nelle pagine seguenti vengono analizzati più nel dettaglio i profili RAPD ottenuti attraverso l'amplificazione del DNA delle due progenie, 'CB₄₆' e 'CB₄₇' ottenute dall'incrocio 'Gironde' x 'White Haeven' di tipo LA e dei loro rispettivi parentali, femminile 'Gironde' e maschile 'White Haeven', con alcuni dei primer risultati informativi (tab. 5.9). In particolare i primi due primer utilizzati per l'amplificazione sono Y24 e OPB08 figura 5.10. L'amplificazione con il primer

Y24 (fig. 5.10 a), ha evidenziato una banda sia nell'ibrido 'CB₄₇' che nel parentale maschile, appena al di sopra di 200 bp. In figura 5.10 (b), l'amplificazione con il primer OPB08, ha generato ancora una banda comune all'ibrido 'CB₄₇' e alla specie impollinatrice 'White Haeven' poco al di sotto di 500 bp.

La figura 5.11 mostra l'amplificazione dei campioni 'Gironde', 'CB₄₆', 'CB₄₇' e 'White Haeven' con il primer Y41 e OPA06. In particolare il primer Y41 ha generato in entrambi gli ibridi una banda in comune con il parentale maschile in corrispondenza di 200 pb, mentre il primer OPA06 una banda comune soltanto all'ibrido 'CB₄₇' ed al parentale maschile, 'White Haeven', intorno a 1000 pb.

Nella figura 5.12 l'amplificazione con il primer OPA07 (a), ha generato una banda poco al di sopra di 500 pb in comune tra la progenie 'CB₄₇' e il parentale maschile 'White Haeven', mentre l'amplificazione con il primer OPA09 (b), ha generato un'unica banda comune ad entrambi gli ibridi, 'CB₄₆' e 'CB₄₇' e la specie impollinatrice, 'White Haeven', poco sopra le 300 pb.

In figura 5.13, la RAPD con il primer OPA14 (a) ha prodotto una banda informativa tra le due progenie 'CB₄₆' e 'CB₄₇' e il parentale maschile 'White Haeven' poco al di sotto di 300 pb, mentre l'amplificazione con il primer OPA11(b) ha prodotto una banda in comune tra 'CB₄₆' e 'CB₄₇' e il parentale maschile 'White Haeven' intorno a 300 pb ed una seconda banda in comune solo tra la progenie 'CB₄₆' e il parentale maschile 'White Haeven' tra 300 e 400 pb.

Quindi, sulla base di quanto precedentemente preso in esame, è possibile affermare la natura ibrida delle 2 progenie 'CB₄₆' e 'CB₄₇', derivate dagli incroci 'Gironde' x 'White Haeven', dal momento che i risultati dell'analisi molecolare mostrano come queste siano caratterizzate da 15 a 23 bande comuni con la specie impollinatrice 'White Haeven'.

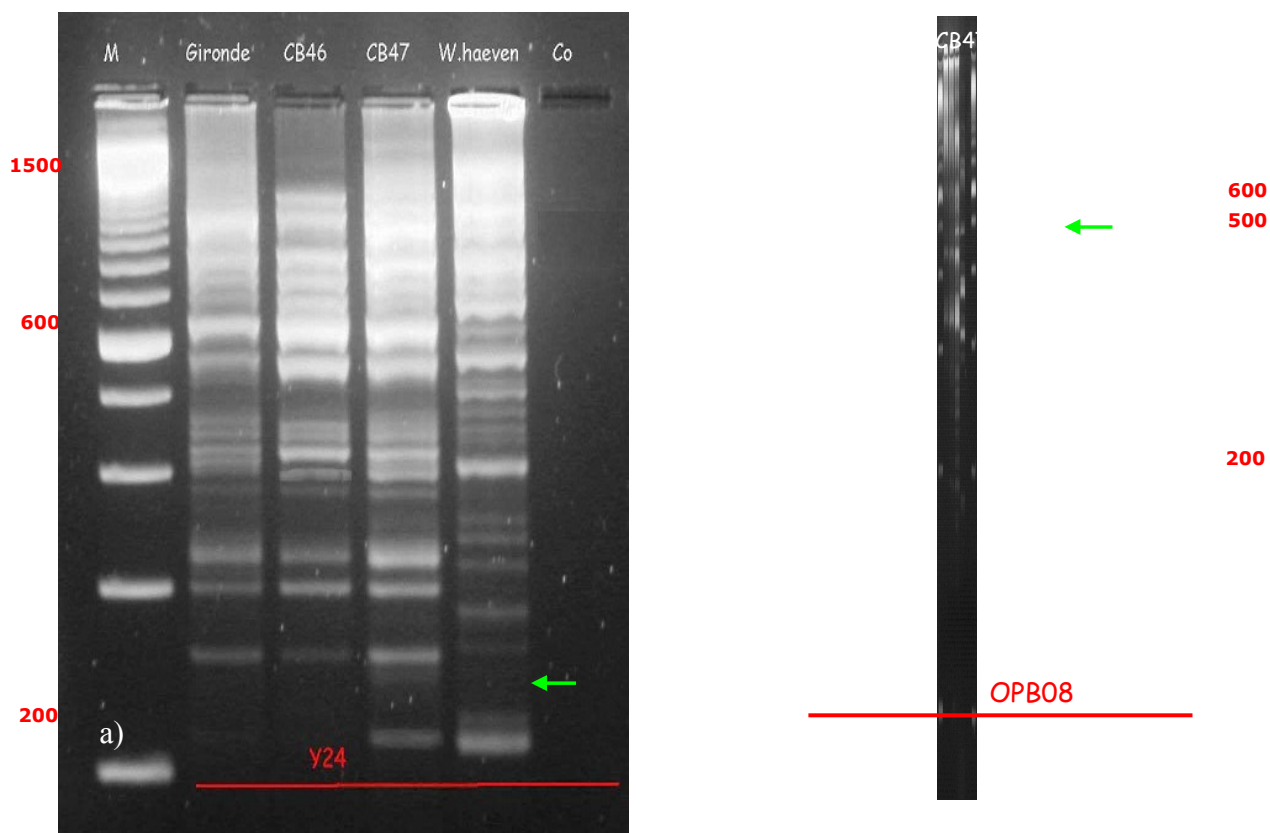


Fig. 5.10: Pattern elettroforetici generati dai primer Y24 (a) e OPB08 (b) per 'Gironde' e 'White Haeven' e le loro progenie ibride ['Gironde' x 'White Haeven' (CB₄₆) e 'Gironde' x 'White Haeven' (CB₄₇)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

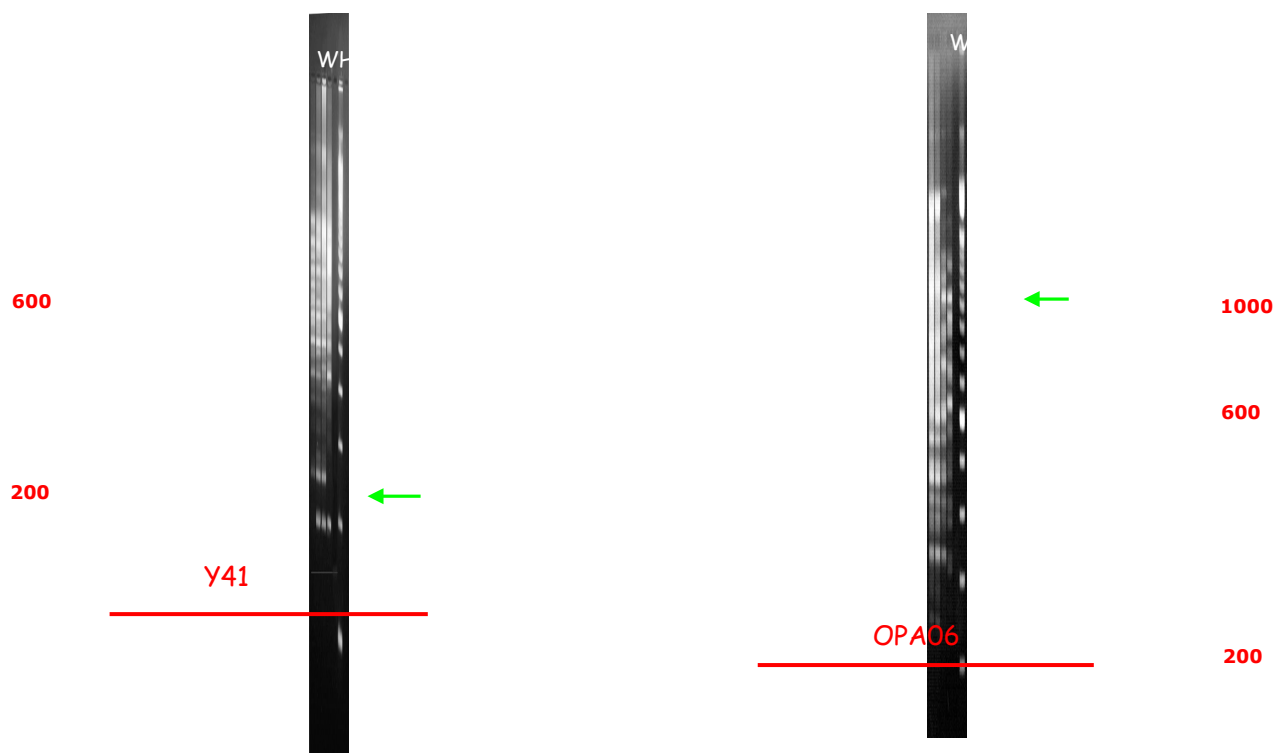


Fig. 5.11: Pattern elettroforetici generati dai primer Y41 (a) e OPA06 (b) per 'Gironde' e 'White Haeven' e le loro progenie ibride ['Gironde' x 'White Haeven' (CB₄₆) e 'Gironde' x 'White Haeven' (CB₄₇)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

5.9.2 Analisi delle progenie AC₄₂ e AC₄₄

Passiamo ora ad analizzare più nel dettaglio i profili RAPD ottenuti attraverso l'amplificazione delle due progenie denominate 'AC₄₂' e 'AC₄₄' derivati dall'incrocio 'Lombardia' x 'Gironde' di tipo AO-

In figura 5.14, l'amplificazione con il primer Y37 (a), ha generato due bande per entrambe le progenie e per la specie impollinatrice, rispettivamente all'altezza di 400 bp e 700 bp; inoltre, intorno a 650 bp, si evidenzia anche un'altra banda comune soltanto all'ibrido 'AC₄₄' e al parentale maschile 'Gironde'.

Nella figura 5.14, il primer Y38 (b) ha generato nell'ibrido 'AC₄₄' una banda in comune a quella del parentale maschile poco al di sopra delle 600 bp.

La figura 5.15, mostra come il primer Y24 (a) utilizzato per l'amplificazione, evidenzi una banda al di sopra delle 300 bp in entrambi gli ibridi, 'AC₄₂' e AC₄₄, e nel parentale maschile 'Gironde'.

Dall'analisi del primer OPA09 (b), riportato in figura 5.15, si possono individuare tre bande, rispettivamente a 150bp, 250 bp e 350bp in ciascun ibrido e nel relativo parentale 'Gironde'.

In figura 5.16 sono riportati i profili elettroforetici generati dai primer OPA17 e OPA20 per 'Lombardia', 'Gironde' e le loro progenie 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂) e 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄). In particolare l'amplificazione con il primer OPA17 ha prodotto una banda in comune a 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂), 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄) ed il parentale maschile 'Gironde' tra 500 e 600 pb, mentre l'amplificazione con il primer OPA20 ha generato 2 bande in comune a 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂), 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄) ed il parentale maschile 'Gironde', la prima appena sotto 600 pb e la seconda appena sopra 500 pb.

In figura 5.17 sono riportati i profili elettroforetici generati dai primer OPB05 e OPB08 per 'Lombardia', 'Gironde' e le loro progenie 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂) e 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄). In particolare l'amplificazione con il primer OPB05 ha prodotto una banda in comune a 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂), 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄) ed il parentale maschile 'Gironde' tra 500 e 600 pb, mentre l'amplificazione con il primer OPB08 ha generato 2

bande, la prima in comune tra 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂), ed il parentale maschile 'Gironde', in corrispondenza di 1400 pb e la seconda in comune tra 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄) ed il parentale maschile 'Gironde', tra 400 e 500 pb.

Anche per le 2 progenie AC₄₂ e AC₄₄, derivate dagli incroci 'Lombardia' x 'Gironde', è possibile

confermare la loro natura di ibrido interspecifico. I risultati dell'analisi RFLP mostrano come gli ibridi

presentano 18 bande tipiche del pattern della specie impollinatrice.

700
600
400
300

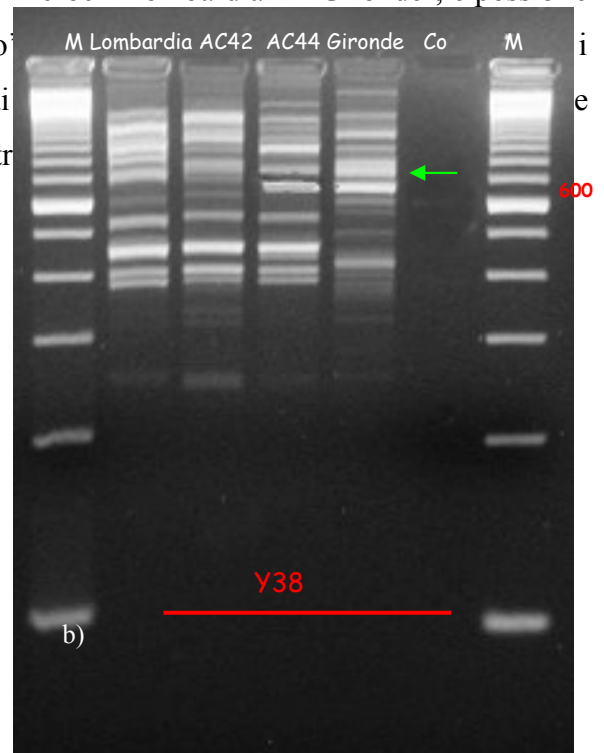
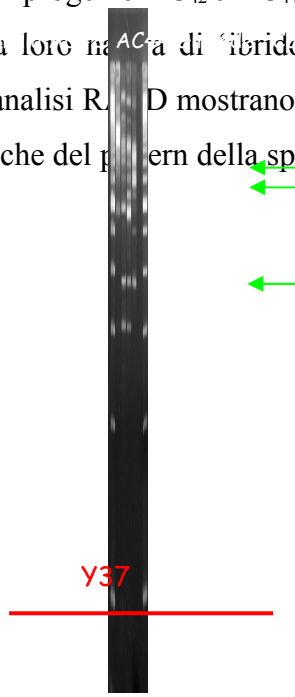


Fig. 5.14: Pattern elettroforetici generati dai primer Y37 (a) e Y38 (b) per 'Lombardia' e 'Gironde' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂) e 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

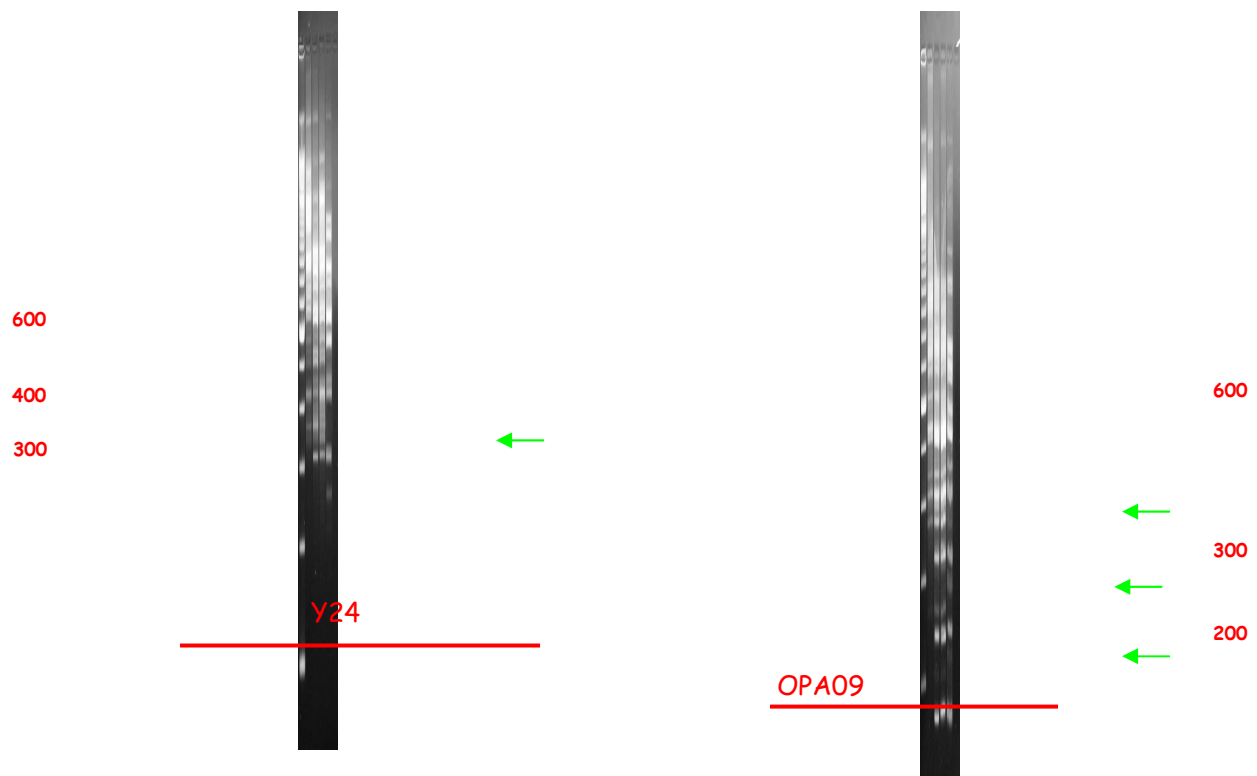


Fig. 5.15: Pattern elettroforetici generati dai primer Y24 (a) e OPA09 (b) per 'Lombardia' e 'Gironde' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂) e 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

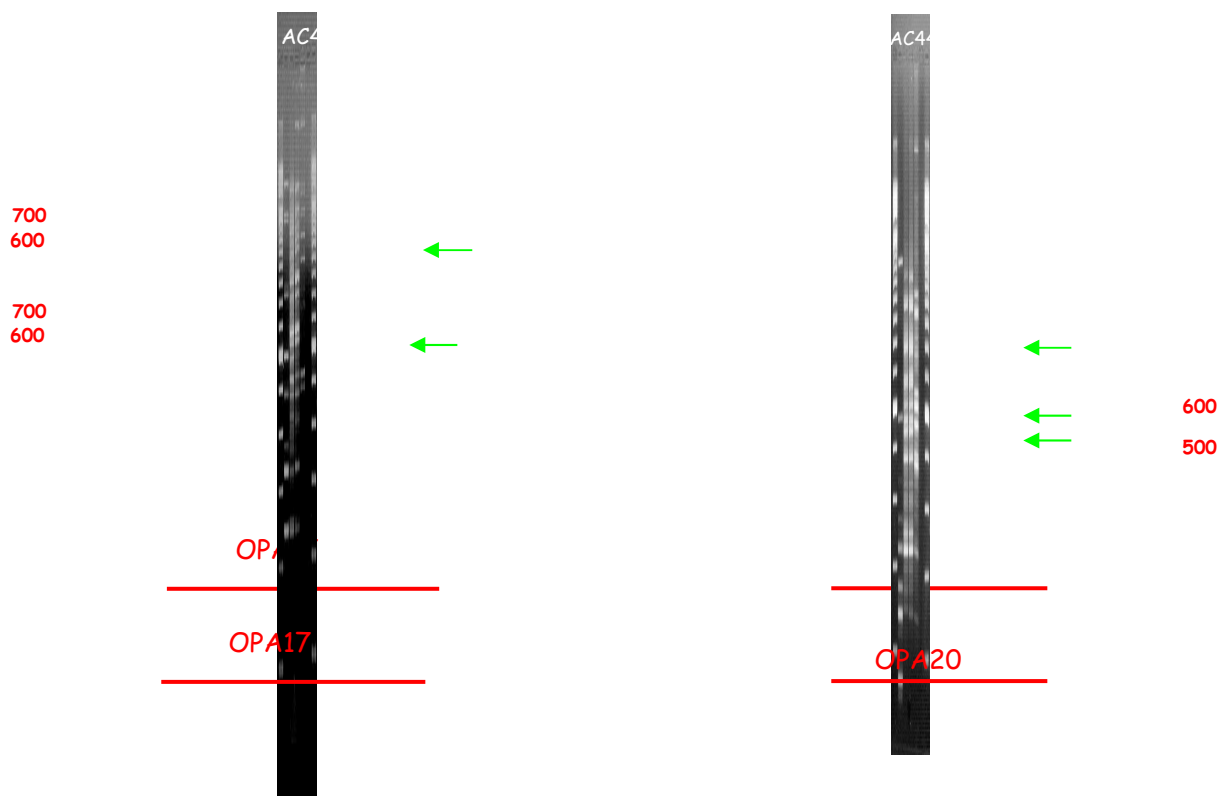


Fig. 5.16: Pattern elettroforetici generati dai primer OPA17 (a) e OPA20 (b) per 'Lombardia' e 'Gironde' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂) e 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

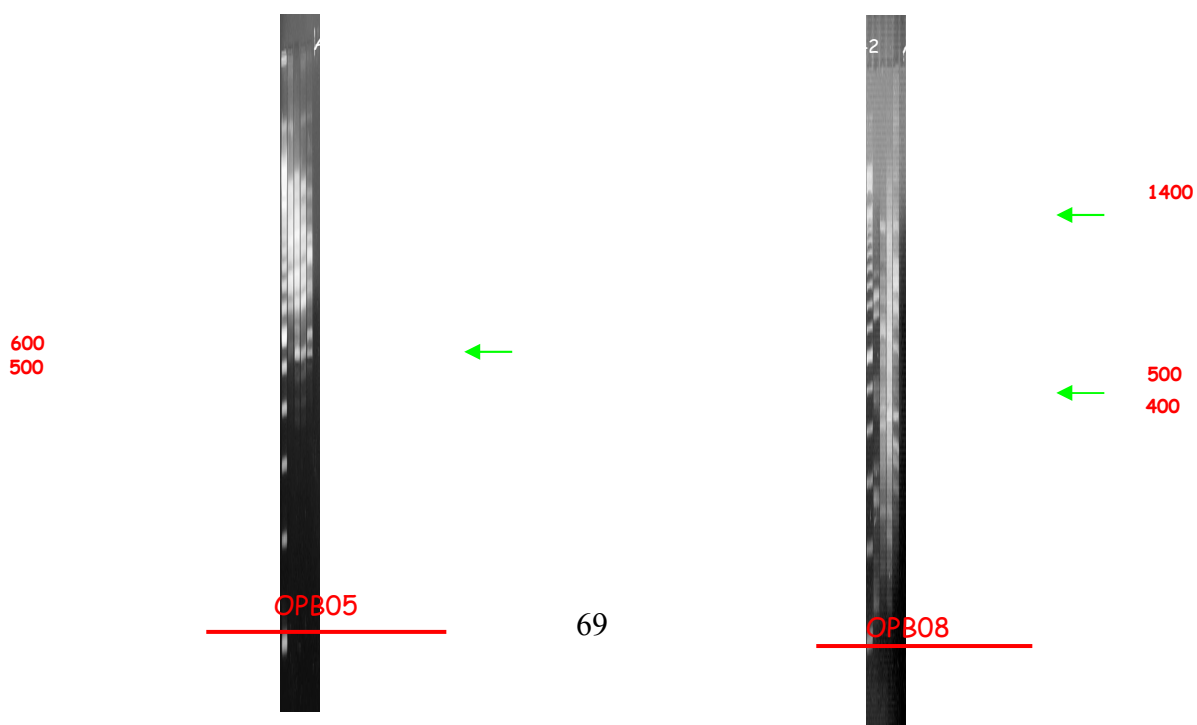


Fig. 5.17: Pattern elettroforetici generati dai primer OPB05 (a) e OPB08 (b) per 'Lombardia' e 'Gironde' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₂) e 'Lombardia' x 'Gironde' (AC₄₄)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

5.9.3 Analisi delle progenie AB₃₀ e AB₅₀

Infine restano da analizzare i profili RAPD ottenuti attraverso l'amplificazione delle due progenie, 'AB₃₀' e 'AB₅₀', derivanti dall'incrocio 'Lombardia' x 'White Haeven', di tipo LO. In questo caso la progenie è stata testata con 34 dei 39 primer utilizzati per le progenie precedenti, a causa della scarsità del materiale vegetale da utilizzare per estrarre DNA prima ed effettuare l'analisi RAPD successivamente. I primer risultati informativi sono stati 11 (tab. 5.9).

In figura 5.18 (a) l'amplificazione con il primer Y37 ha generato una banda comune al parentale maschile 'White Haeven' ed ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀', appena sotto 800 pb, mentre la figura 5.18 (b) mostra l'amplificazione con il primer OPA01 che ha generato 3 bande informative: la prima, in corrispondenza di 600 pb in comune ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' con il parentale maschile 'White Haeven', la seconda, appena sopra le 600 pb, in comune solo all'ibrido 'AB₃₀' ed al parentale maschile ed infine la terza banda informativa si trova sopra le 700 pb, ancora in comune ad entrambi gli ibridi, 'AB₃₀' e 'AB₅₀', ed al parentale maschile 'White Haeven'.

In figura 5.19 (a) l'amplificazione con il primer OPA02 mostra una banda informativa in corrispondenza di 600 pb ed in comune ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' ed al parentale maschile 'White Haeven'. Il primer OPA04, figura 5.19 (b), ha prodotto una banda significativa in corrispondenza di 600 pb, in comune ancora ai due putativi ibridi, 'AB₃₀' e 'AB₅₀', ed al parentale maschile.

Il primer OPA18, figura 5.20 (a), utilizzato per l'amplificazione evidenzia due bande informative: la prima, tra 400 e 500 pb in comune tra 'White Haeven', parentale maschile, con il putativo ibrido 'AB₅₀' e la seconda, in corrispondenza di 600 pb, in comune tra 'White Haeven', parentale maschile, con il putativo ibrido 'AB₃₀'.

In figura 5.20 (b) l'amplificazione con il primer OPA20 ha generato tre bande informative: la prima tra 900 e 1000 pb in comune ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' ed al parentale maschile 'White Haeven', la seconda, ancora in comune ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' ed al parentale maschile 'White Haeven', appena sotto 600 pb e la terza, in corrispondenza di 500 pb, in comune tra 'White Haeven', parentale maschile, con il putativo ibrido 'AB₅₀'.

In figura 5.21 (a) la RAPD con il primer OPB07 (a) ha prodotto due bande informative, la prima, tra 400 e 500 pb, in comune ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' ed al parentale maschile 'White Haeven', la seconda, tra 500 e 600 pb, ancora in comune ad entrambi i putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' ed al parentale maschile 'White Haeven'. Infine l'amplificazione con il primer OPB05, figura 5.21 (b), ha generato tre bande informative: la prima, tra 300 e 400 pb, la seconda, tra 500 e 600 pb, entrambe in comune in comune ai due putativi ibridi 'AB₃₀' e 'AB₅₀' ed al parentale maschile 'White Haeven'.

Anche per le 2 progenie, 'AB₃₀' e 'AB₅₀', derivate dagli incroci 'Lombardia' x 'White Haeven', è possibile confermare la loro natura di 'ibrido interspecifico', dal momento che anche in questo caso i risultati dell'analisi RAPD mostrano come i 2 ibridi siano caratterizzati da 30 bande, 14 per la progenie 'AB₃₀' e 16 per la progenie 'AB₅₀', tipiche del pattern della specie impollinatrice 'White Haeven'.

La verifica della natura ibrida nelle 6 progenie derivanti da incroci interspecifici, 2 di tipo LA, 2 di tipo AO e due di tipo LO, mostra come in nessuna di esse si evidenzino bande ereditate dal solo parentale femminile e che quindi non si tratti di autofecondazioni.

La valutazione genotipica sembra quindi confermare l'ottenimento di 6 nuovi ibridi interspecifici differenti, grazie alla presenza in essi di bande ereditate dal solo parentale maschile, come dimostra l'esame dei profili elettroforetici analizzati in precedenza.

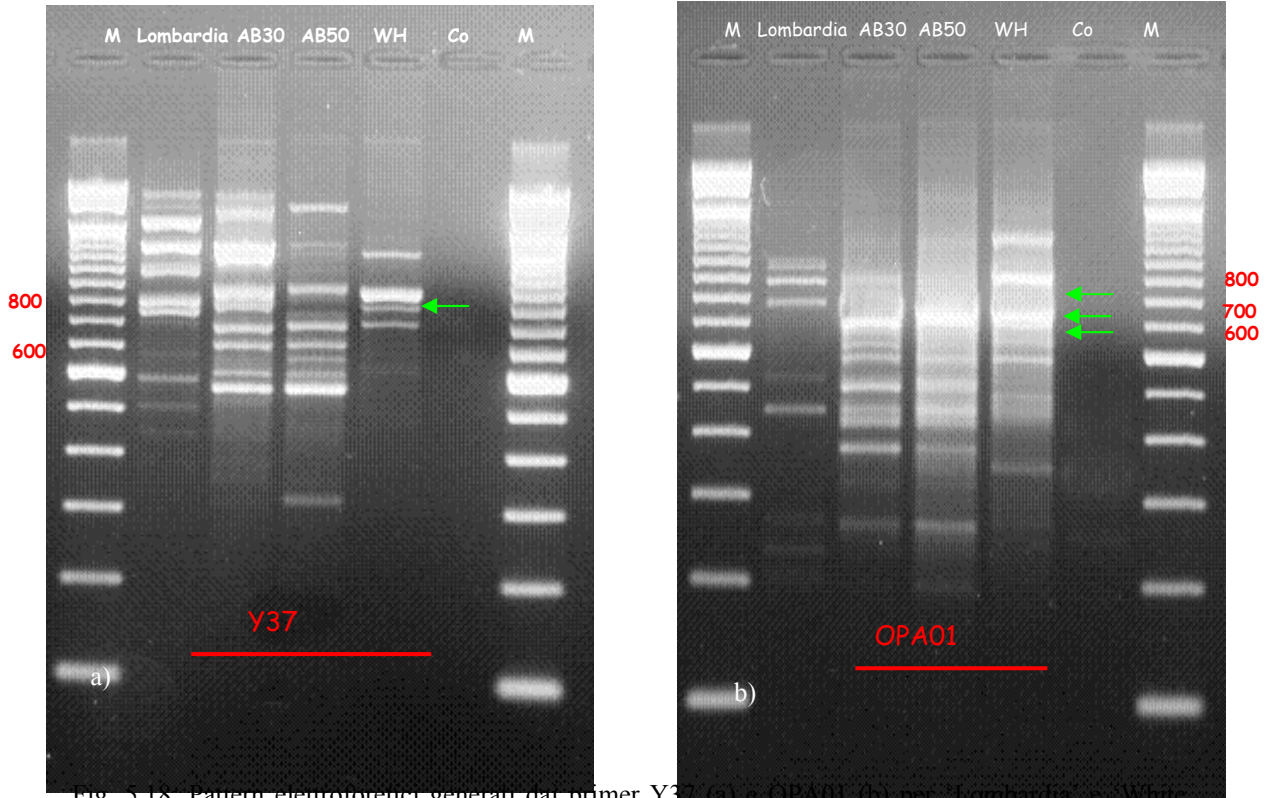


Fig. 5.18. Pattern elettroforetici generati dai primer Y37 (a) e OPA01 (b) per 'Lombardia' e 'White Haeven' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'White Haeven' (AB_{30}) e 'Lombardia' x 'White Haeven' (AB_{50})]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

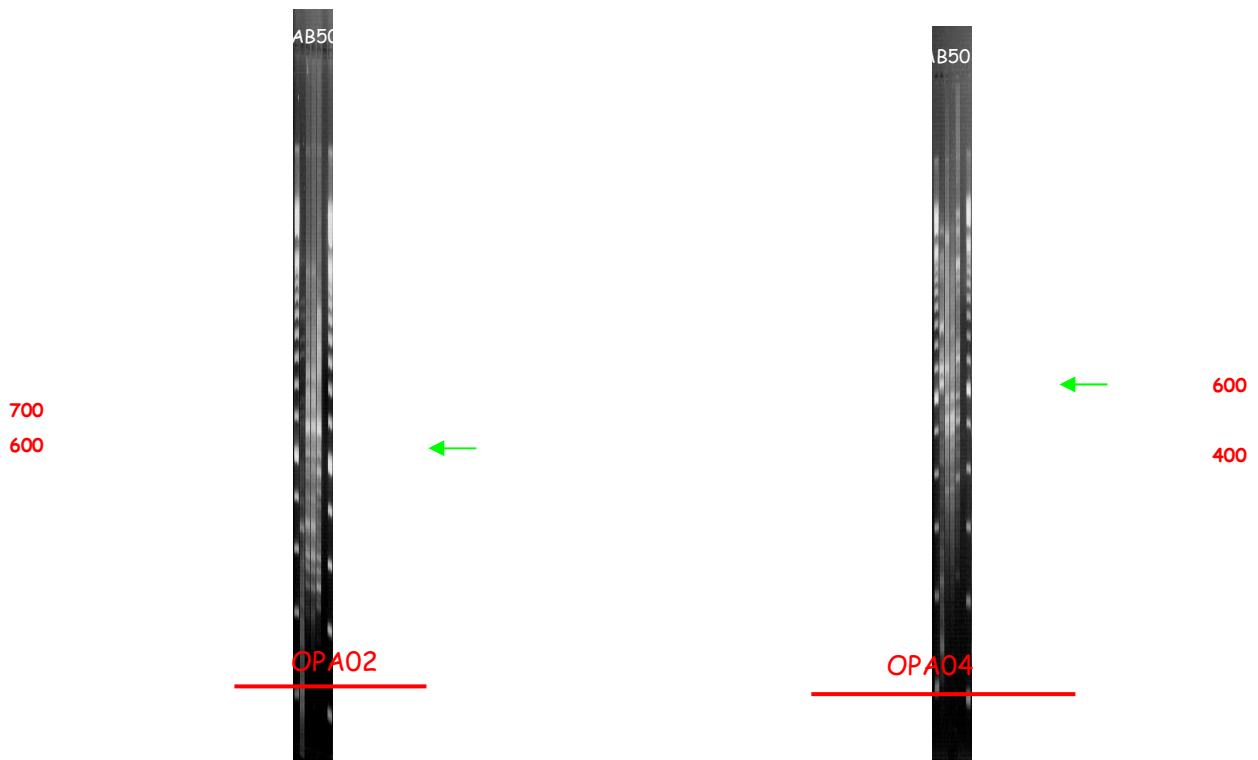


Fig. 5.19. Pattern elettroforetici generati dai primer ⁷²OPA02 (a) e OPA04 (b) per 'Lombardia' e 'White Haeven' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'White Haeven' (AB_{30}) e 'Lombardia' x 'White Haeven' (AB_{50})]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

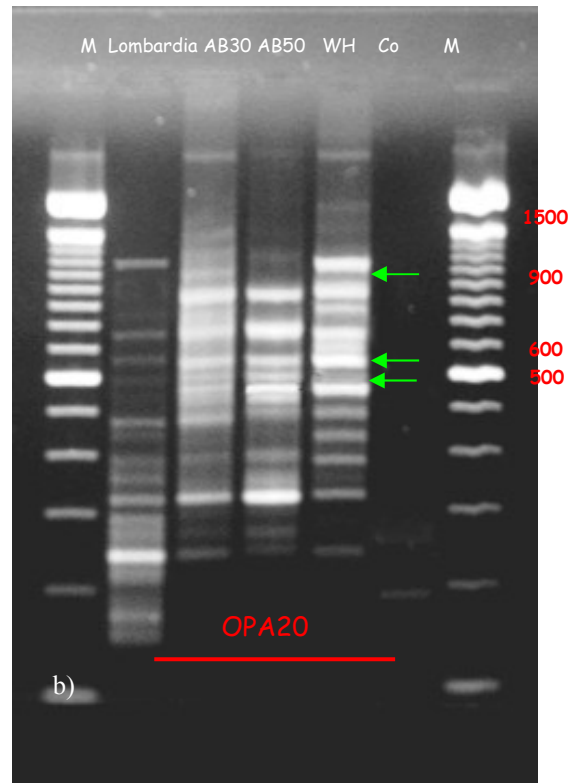
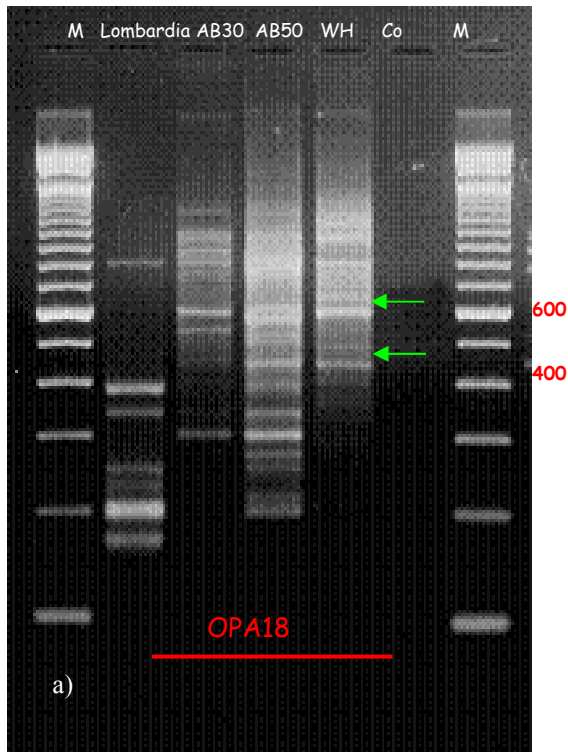


Fig. 5.20: Pattern elettroforetici generati dai primer OPA18 (a) e OPA20 (b) per 'Lombardia' e 'White Haeven' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'White Haeven' (AB₃₀) e 'Lombardia' x 'White Haeven' (AB₅₀)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

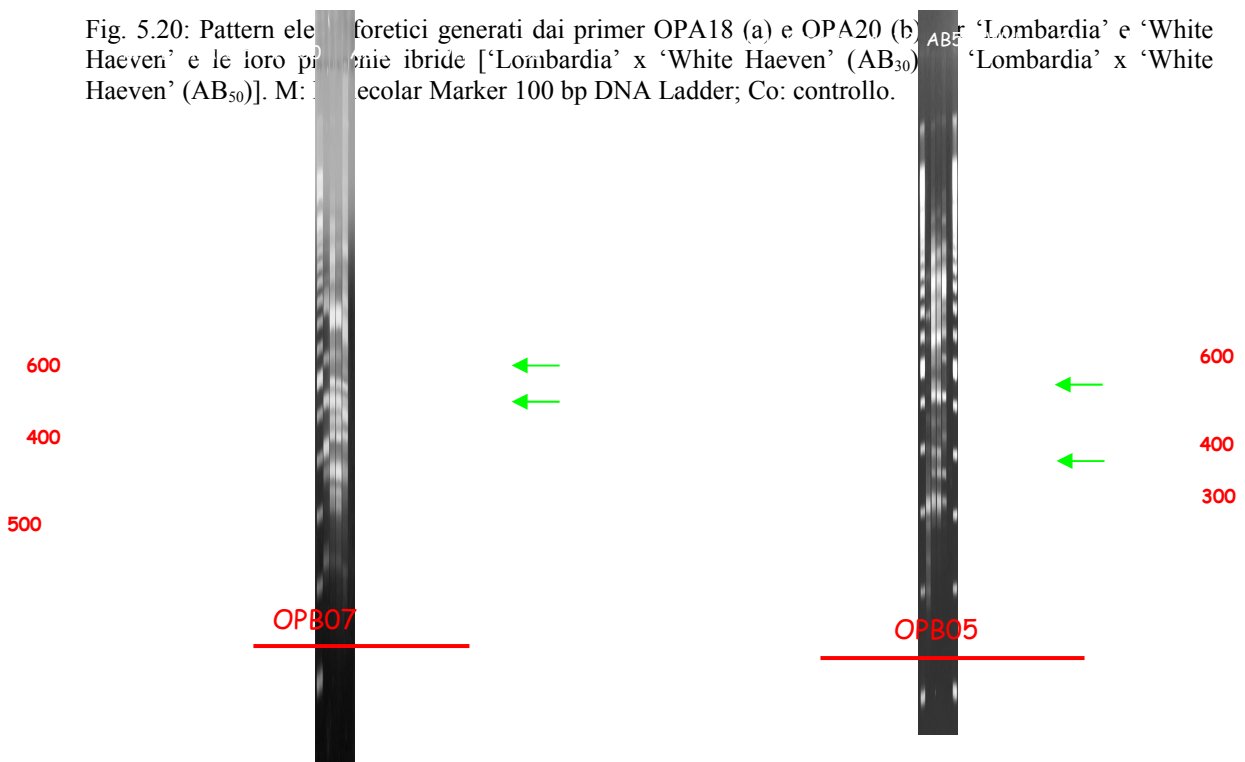


Fig. 5.21: Pattern elettroforetici generati dai primer⁷³OPB07 (a) e OPB05 (b) per 'Lombardia' e 'White Haeven' e le loro progenie ibride ['Lombardia' x 'White Haeven' (AB₃₀) e 'Lombardia' x 'White Haeven' (AB₅₀)]. M: Molecular Marker 100 bp DNA Ladder; Co: controllo.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la messa a punto di un protocollo che permettesse di ottenere ibridi interspecifici di *Lilium* attraverso il superamento di barriere di incompatibilità pre e post-zigotiche che si verificano tra i parentali.

Infatti in un primo momento, mediante l'uso della tecnica del 'Cut-style' method si è avuto, il superamento delle barriere di incompatibilità pre-zigotiche; successivamente, la coltura 'in vitro' di ovari e di ovuli ha permesso il superamento delle barriere post-zigotiche, almeno nei casi in cui si è ottenuto sviluppo dell'embrione.

Nella prima prova che prevedeva incroci tra cultivars commerciali di *Lilium* che su un totale di 1561 incroci eseguiti, di cui 370 di tipo LO, 587 di tipo AO e 604 di tipo LA, si sono ottenuti 27 nuovi individui, di cui il 22.2% di LO, il 44.4% di AO e il 33.3% di LA. La percentuale di germinazione degli ovuli risultati turgidi e rigonfi si è attestata intorno al 2%.

Nelle seconda prova, volta all'ottenimento di ibridi anche interspecifici, che prevedeva incroci tra alcuni cloni di asiatici selezionati negli anni precedenti per il carattere assenza di polline con alcune specie originarie, è stata osservata, su un totale di 492 incroci, una percentuale di germinazione di ovuli intorno all'1%.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la modalità con cui una cultivar viene utilizzata in un incrocio, cioè 'portaseme' o 'impollinatrice', influenza fortemente la percentuale di riuscita dell'incrocio stesso, a dimostrazione dell'importanza del genotipo dei parentali e del loro ruolo all'interno dell'incrocio stesso. In particolare la cultivar 'White Haeven' ha dato buoni risultati solo come 'impollinatrice', mentre le altre varietà si sono comportate diversamente a seconda della specifica combinazione di incrocio.

Il substrato risultato più efficiente per indurre lo sviluppo degli ovari, con il 65.2%, si è dimostrato quello contenente sali e vitamine MS, con l'aggiunta di NAA₁ (1 mg/l) e di elevate dosi di saccarosio (100 g/l) rispetto al controllo e agli altri substrati saggiati.

L'epoca migliore per il prelevamento degli ovari dalla pianta madre è risultata essere tra il 7° e il 14° giorno DAP, cioè dal momento dell'impollinazione (Days After Pollination). Dopo tale

periodo, la capsula fecondata non raccolta, comincia ad ingiallire per poi degenerare rapidamente, per il verificarsi di fenomeni di incompatibilità interspecifica

Il materiale ottenuto è stato sottoposto ad ambientamento ed a successivo ingrossamento dei bulbeti in campo per la valutazione fenotipica (colore e tipo di infiorescenza, portamento della pianta e resistenza alle malattie).

La valutazione genotipica è stata condotta su alcune progenie e sui loro rispettivi parentali mediante analisi molecolare RAPD per consentire una verifica precoce della loro effettiva ibridità.

I profili RAPD, impiegando 39 primer differenti, hanno mostrato molte bande in comune (da 10 a 38) tra gli ibridi e i rispettivi parentali e alcune bande (circa 17) in comune solo con il parentale maschile, a conferma della loro condizione di ibridi interspecifici.

I risultati ottenuti evidenziano l'utilità dell'analisi RAPD nella determinazione della condizione ibrida di un genotipo. La possibilità di usufruire di uno strumento di selezione relativamente rapido, non eccessivamente costoso ed applicabile nelle fasi precoci di sviluppo della progenie (bulbeti), consente una notevole riduzione di tempo e di costi aumentando l'efficienza della selezione, anche se l'analisi RAPD non sempre assicura una ripetibilità dei risultati. Il lavoro prosegue quindi, per superare i problemi associati alla scarsa riproducibilità dell'analisi RAPD, con il tentativo di produrre markers SCAR. I primer costruiti sulla base della sequenza nucleotidica di frammenti RAPD, saranno utilizzati in un protocollo di PCR, dalla quale ci si aspetta di ottenere una sola banda identificativa di un determinato ibrido.

A completamento della ricerca è prevista una valutazione degli altri genotipi ottenuti, ma non ancora saggiati. Verrà inoltre valutato l'effetto di una temperatura di annealing diversa (54 °C) rispetto a quella testata nel ciclo di amplificazione precedentemente descritto (35 °C), su quei prodotti di RAPD che hanno manifestato uno smear pattern. Infatti in questi casi è possibile che aumentando la temperatura di annealing si abbia un aumento del numero di bande distinguibili nei prodotti di RAPD.

BIBLIOGRAFIA

- Abbruzzetti G., 2000 - Avversità e difesa del *Lilium*. *Lilium*: elementi di tecnica vivaistica – indicazioni per una innovazione culturale. *CO.VI Plant scrl* 93-124.
- Ahn M. S., Lee K. J. and Jeong J. S., 2003 - Investigation on pollination methods for the intergeneric hybrid between *Hemerocallis* and *Lilium*. *Acta Hort.* 620: 305-310. ISHS 2003.
- AIPH/Union Fleurs, 2005 - International Statistics Flowers and Plants. Volume 53.
- Anderson N., 1986 - The distribution of the genus *Lilium* with reference to its evolution. *The Lily Yearbook of the North America Lily Society.* 42:1-18.
- Asano Y., 1980 - Studies on crosses between distantly related species of lilies. I. For the intrastylar pollination technique. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 46:59-65.
- Babes I. G, Massa C., Bacchetta L., Berdini C., Tucci M., Saccardo F., Grassotti A., 2000. Sviluppo di metodologie 'in vitro' per l'ottenimento di aploidi ed ibridi interspecifici in *Lilium* spp. Convegno della Società Italiana di Genetica Agraria – SIGA, Bologna 2000.
- Bacchetta L., Remotti P. C., Bernardini C., Saccardo F., 2003 - Adventitious shoot regeneration from leaf explant and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell Tissue and Org. Culture* 74 (1): 37-44.
- Beattie D. J. e White J. W., 1993 - *Lilium* hybrids and species. In: *The physiology of flower bulbs.* ELSEVIERSCIENCE PUBLISHERS, 423-454.
- Bridgen M. P., Langhans R. and Graig R., 1989 - Biotechnological breeding techniques for *Alstroemeria*. *Herbertia* 45: 93-96.
- Brown C. R. e Adiwilaga K. D., 1991 - Use of rescue pollination to make a complex interspecific cross in potato. *American Potato Journal* 68:813-820.
- 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.
- Buitendijk, J. H., Ramanna, M. S. & Jacobsen, E., 1992 - Micropropagation ability : towards a selection criterion in *Alstroemeria* breeding. *Acta Hort.* 325:493-498.
- Chi H. S., 2000 - Interspecific crosses of lily by in vitro pollinated ovules. *Bot.Bull. Acad.Sin.* 41: 143-149.

- Chi H. S., 2002 - The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. Bot.Bull. Acad.Sin. 43: 139-146.
- Custers J. B. M., Eikelboom W., Bergervoet J. H. W., Van Eijk J. P., 1995 - Embryo-rescue in the genus *Tulipa* L.; successful direct transfer of *T. kaufmanniana* Regel germplasm into *T. gesneriana* L. Euphytica 82:253-261.
- 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.
- Daniels L. H., 1986 - The Lily plant. The Lily Yearbook of the North America Lily Society, 39: 6-17.
- 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.
- Debergh P. C., Maene L. J., 1981 - A scheme for commercial propagation of ornamental plant by tissue culture. *Sci. Hort.* 14: 335-345.
- Deberg P. C., Read P. E., 1991 - Micropropagation. In: *Micropropagation Technology and application*. Eds., Kluwer Academic Publishers, Boston.
- De Paoli G., Rossi V., Scozzoli A., 1994 - Micropropagazione delle piante ortoflorofrutticole. Edagricole-Edizione Agricole della Calderini.
- Di Genova G., 2000 - La tecnica colturale per l'ingrossamento dei bulbi. *Lilium: elementi di tecnica vivaistica – indicazioni per una innovazione colturale. CO.VI Plant scl: 73-92.*
- Di Genova G., 2000 - Il genere *Lilium*: cenni botanici. *Lilium: elementi di tecnica vivaistica – indicazioni per una innovazione colturale. CO.VI Plant scl : 43-55.*
- Di Genova G., Grassotti A., 2000 - La bulbicoltura: tecniche di propagazione. *Lilium: elementi di tecnica vivaistica – indicazioni per una innovazione colturale. CO.VI Plant scl : 57-72.*
- Emsweller S. L., 1963 - Propagation of lilies. The Lily Yearbook of the North American Lily Society. 16: 143-155.
- Fernandez A. M., Nakazaki T., and Tanisaka T., 1996 - Development of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. concolor* by ovary slice culture. Plant Breeding. 115: 167-171.
- Fukai S., Abe Y., 2002 - Discrimination of lily fragrance by use of an electron nose. Acta Hort. 572: 75-79.

- Fukai S., Tsuji K., 2004 - Interspecific hybrids between *Lilium x formolongi* and some Asian Trumpet species. – J. Japan Soc. Hort. Sci. 73 (5): 447-452.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., 1968 - Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.
- Garibaldi A., Rapetti S., 1984 - Malattie crittogamiche dei *Lilium* di importanza economica in Italia. Società Orticola Italiana, sezione floricoltura. *Lilium* – giornate di floricoltura, Viareggio 13-14 giugno 1984: 67-74.
- 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.
- Grassotti A., 1996 - Economics and culture techniques of *Lilium* production in Italy. In International symposium on the genus *Lilium*, Taejon, Korea Republic, 28 Aug. - 1 Sep. 1994 Ed. by Lee JongSuk; Roh, M.S. *Acta Horticulturae* (1996) No. 414, 25-34.
- Grassotti A. e Nesi B., 2002 - Il miglioramento Genetico del *Lilium*: un 'esperienza italiana. – *Atti del Workshop: "Lo stato dell'arte nel miglioramento genetico delle principali specie ortofrutticole d'interesse mediterraneo"*: 71-79.
- Grassotti A., Nesi B., 2002 - Nuove varietà di *Lilium*. Principali caratteri e possibili impieghi. Atti del Convegno 'Florovivaismo tra innovazione e novità' - Ercolano Novembre 2002.
- Grassotti A., Nesi B., Trinchello D., Lazzereschi S., 2007 - Ottenimento di ibridi interspecifici di *Lilium* mediante coltura 'in vitro' di ovuli. *Italus Hortus*, 14 (2): 35.
- Han B. H., Yae B. W., Yu H. J., Peak K. Y., 2005 - Improvement of 'in vitro' micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. *Sci. Hort.* 103: 351-359.
- Haw S. G., 1986 - The Lilies of China. Timber Press. Portland, Oregon. 172.
- Hicks G. S., 1980 - Patterns of organ development in tissue culture and the problem of organ determination. In: *The Botanical Review*, Vol. 46, Edi. New York Botanical Garden, 1-23.
- Horita M., Morohashi H., Komai F., 2003 - Production of fertile somatic hybrid plants between Oriental Hybrid lily and *Lilium x formolongi*. *Planta* 217: 597-601.
- Hu C. Y., Wang P. J., 1983 - Meristem, shoot tip and bud cultures. In: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. I. Techniques for Propagation and Breeding*. Eds.: 177-227.
- 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.

- Inomata N., 1980 - Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* X *B. oleracea* by culture 'in vitro' of excised ovaries. I. Development of excised ovaries in the crosses of various cultivars. *Japan. J. Genetics* 53: 161-173.
- Ishimori T., Niimi Y., Han D. S., 2007 - Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium x formolongi* 'White Aga' cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Org Culture*.
- ISMEA, 2004 - Filiera piante e fiori.
- I.S.T.A.T., 1994 - Statistiche dell'agricoltura, della zootecnia e dei mezzi di produzione.
- Iwai S., Kishi C., Nakata K. & Kawashima N., 1986 - Production of *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana acuminata* hybrid by ovule culture. *Plant Cell Reports* 5: 403-404.
- Janson J., Reinders M. C., Van Tuyl J. M., Keijzer C. J., 1993 - Pollen tube growth in *Lilium longiflorum* following different pollination techniques and flower manipulations. *Acta Bot. Neerl.* 42: 461-472.
- Kumar S., Awasthi V., Kanwar J. K., 2007 - Influence of growth regulation and nitrogenous compounds on 'in vitro' bulblet formation and growth in oriental lily. *Hort. Sci.* 34 (2): 77-83.
- Marani F., Bertaccini A., 1984 - Infezioni da virus e virus-simili nelle colture di *Lilium*. Società Orticola Italiana, sezione floricoltura. *Lilium – giornate di floricoltura*, Viareggio 13-14 giugno 1984: 75-88.
- Maesato K., Sharada K., Fukui H., Hara T., and Sarma K. S., 1994 'In vitro' bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb.: Effect of plant growth regulators and culture environment. *J. Hort. Sci.* 69: 289-297.
- 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.
- Mii M., Yuzawa Y., Suetomi H., Motegi T., Godo T., 1994 - Fertile plant regeneration from protoplasts of a seed-propagated cultivar of *Lilium x formolongi* by utilizing meristematic nodular cell clumps. *Plant Sci.* 100: 221-226.
- Monticelli S., Festa S. e 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.
- Murashige T., Skoog F., 1962 - A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nhut D. T., Le B. V., De Silva J. A. T., Aswath C. R., 2001 - Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspectives. *'In Vitro' Cellular and Developmental Biology – Plant* 37 (5): 516-523.
- Niimi Y. and Onozawa T., 1979 - In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Horticulturae* 11: 379-389.
- Nomura Y., Oosawa K., 1990 - Production of interspecific hybrids between *Allium chinense* and *A. thunbergii* by *in ovulo* embryo culture. *Japan. J. Breed.* 40: 531-535.
- Okazaki K., Umada Y., Urashima O., Kawada J., Kunishige M., Murakami K., 1992 - Interspecific Hybrids of *Lilium longiflorum* and *L. x formolongi* with *L. rubellum* and *L. japonicum* through embryo culture. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 60: 997-1002.
- Okazaki K., Asano Y., Oosawa K., 1994 - Interspecific Hybrids between *Lilium* “Oriental” hybrid and *L.* “Asiatic” hybrid produced by embryo culture with revised media. *Breeding Science* 44:59-64.
- 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 MA, 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
- 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.
- Pergola G. e Grassotti A., 1984 - Le tecniche di coltivazione dei *Lilium* per la produzione di fiore reciso. Società Orticola Italiana, sezione floricoltura. *Lilium – giornate di floricoltura*, Viareggio 13-14 giugno 1984: 53-65.
- Rossi L., Ancora G., Benvenuto E., Giorgi B., 2001 - ‘Biotecnologie vegetali’, ENEA. 21^{mo} Secolo Scienza e Tecnologia.
- Read P. E., 1988 - Stock plants influence micropropagation success. *Acta Hort.* 226: 41-52.

- Roh S. M., 1982 - Propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. by leaf cutting. HortScience. 17: 607-609.
- Simmond J. A., Cumming B. G., 1976 - Propagation of *Lilium* hybrids II. Production of plant from bulb scale callus cultures for induced propagation rate. *Scientica Horticulture* 5: 161-170.
- Stebbins G. L., 1958 - The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. Adv. Genet. 9: 147-215.
- Stimart D. P. and Ascher P. D., 1978 - Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. Journal of the American Society for Horticultural Science 103: 182-184.
- Sugiura H., 1993 - Plant regeneration of *Lilium speciosum* and *L. x elegans* from protoplast. *Journal of the Japanese Society for Breeding Science* 43: 429-437.
- Takayama S. and Misawa M., 1979 - Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiol Plant* 46: 184-190.
- Takayama S. and Misawa M., 1980 - Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiol Plant* 48: 121-125.
- Trehane P., 1989 - Index Ortensis. Volume 1: Perennials. Quarterjack Publishing, Wimborne. 509. ELSEVIERSCIENCE PUBLISHERS.
- Trigiano R. N., Gray D. J., 2003 - La coltura dei tessuti vegetali. Edagricole II. EDAGRICOLE
- Van Aartrijk J. and Blom- Barnhoorn G. J., 1980 - Effects of sucrose, mineral salts, and some organic substances on the adventitious regeneration *in vitro* of plantlets from bulb scale tissue of *Lilium speciosum* 'Rubrum'. *Acta Horticulturae* 109: 297-302.
- Van Creij M. G. M., Kerckhoffs D. M. F. J., Van Tuyl J. M., 1996a - Interspecific crosses in the genus *Tulipa* L.: localisation of pre-fertilization barriers. *Sex Plant Reprod.*
- Van Creij M. G. M., Kerckhoffs D. M. F. J., Van Tuyl J. M., 1996b - Ovary-slice culture and ovule culture in intraspecific and interspecific crosses with *Tulipa gesneriana*: influence of culture date. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Van Creij M. G. M., Kerckhoffs D. M. F. J., Van Tuyl J. M., 2000 - Application of four pollination techniques and of Hormone treatment for bypassing interspecific crossing barriers in *Lilium* L. *Acta Hort.* 508: 267-274. ISHS 2000.

- Van Tuyl J. M., Marcucci M. C., Visser T., 1982 - Pollen and pollination experiments. VII. The effect of pollen treatment and application method on incompatibility and incongruity in *Lilium*. *Euphytica* 31: 613-619.
- Van Tuyl J. M., 1989 - Research on mitotic and meiotic polyploidization in lily breeding. *Herbertia* 45: 97-103.
- Van Tuyl J. M., Van Dien M. P., Van Creij M. G. M., Van Kleinwee T. C. M., Franken J., Bino R. J., 1991 - Application of 'in vitro' pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses – *Plant Science* 74: 115-126.
- Van Tuyl J. M., Ingrid W. G. M., Maas and Ki-Byung Lim, 1992 - Introgression in interspecific hybrids of Lily. *Acta Hort.* 570: 213-218 ISHS 2002.
- Van Tuyl J. M., Meijer H., Van Diën M.P., 1992 - The use of oryzalin as an alternative for colchicine 'in vitro' chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Hort.* 325: 625-630.
- Van Tuyl J. M., Van Creij M. C. M., Eikelboom W., Kerckhoffs D. M. F. J., Meijer B., 1993 - New genetic variation in the *Lilium* and *Tulipa* assortment by wide hybridization. In *Proceedings XVIIth Eucarpia Symp.*, ed. T. Schiva & A. Mercuri: 141-149, Italy, Sanremo, Istituto sperimentale per la Floricoltura.
- Van Tuyl J. M., Chi H. S., Van Kronenberg B. C. M., and Meijer B., 1994 - Interspecific lily hybrids: a promise for the future. *Acta Hort.* 430: 539-544.
- Van Tuyl J. M., 1997 - Interspecific Hybridization of flower bulbs: a review. *Acta Hort.* 430: 465-476. ISHS 1997.
- Van Tuyl J. M., Chi H. S., Van Kronenberg B. C. M., and Meijer B., 1997 - Interspecific lily hybrids: a promise for the future. *Acta Hort.* 430: 539-544.
- Van Tuyl J. M., Van Dijken A., Chi H. S., Lim K. B., Villemoes S. e Kronenburg B. C. E., 2000 - Breakthroughs in interspecific hybridization of lily. *Acta Hort.* 508: 83-88.
- Wang P. J., Charles A., 1991 - Micropropagation through meristem culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17, High-Tech and Micropropagation. I. Ed.: Springer-Verlag, Berlin.
- Williams E. G., Maheswaran G., Hutschinson J. F., 1987 - Embryo and ovule culture in crop improvement. *Plant Breeding Reviews* 5: 181-236.

- Yamagishi M., 1995 - Detection of section-specific random amplified polymorphis DNA (RAPD) markers in *Lilium*. Theor. Appl. Genet. 91: 930-935.
- Yao J. L., Cohen D., Rowland R. E., 1995 - Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia*. Plant Science 109(2): 199-206.

Metodologie per l'ottenimento di ibridi interspecifici di *Lilium* spp. e per la verifica dello stato ibrido delle progenie

Riassunto

L'importanza del *Lilium* per la produzione di fiori recisi è andata enormemente aumentando negli ultimi 30 anni grazie ai progressi del miglioramento genetico, consentendo di immettere sul mercato nuovi ibridi di elevato interesse commerciale. Tra le bulbose il *Lilium* risulta la specie più importante dal punto di vista economico e, grazie al continuo lavoro di ibridazione, le varietà oggi coltivate sono diventate centinaia, appartenenti generalmente a tre gruppi commerciali di cui il 70% è rappresentato dal gruppo degli 'ibridi asiatici', il 20% dal gruppo degli 'ibridi orientali' e per il 10% dal gruppo degli 'ibridi *longiflorum*'. Recentemente si è andato affermando un quarto gruppo, quello degli 'LA', ibridi interspecifici tra '*L.longiflorum*' e 'ibridi asiatici'. L'interesse principale dei miglioratori è attualmente rivolto all'ottenimento di nuove ricombinazioni interspecifiche che rappresentano uno strumento necessario al fine di introdurre nuova variabilità genetica all'interno della specie, anche se ciò può essere limitato dal verificarsi di fenomeni di incompatibilità. Le principali difficoltà riscontrate nel raggiungere l'ibridazione interspecifica sono dovute infatti alla comparsa di barriere sessuali, pre- e post-zigotiche, ed è proprio la natura di queste barriere che determina la necessità di individuare il metodo più opportuno da usare per poterle superare. Le barriere di pre-fecondazione sono dovute all'impossibilità del tubetto pollinico di attraversare lo stilo, ad incompatibilità intrinseche nel polline stesso ed ad aborto dell'ovario, quelle post zigotiche sono dovute alla degenerazione dell'endosperma.

Presso il CRA-VIV di Pescia, ex ISFlor, è stato avviato un programma di miglioramento genetico, con l'obiettivo di ottenere nuovi ibridi di *Lilium* di elevato interesse commerciale, per colore, forma e dimensione del fiore. La presente ricerca ha avuto come obiettivo la messa a punto di metodologie per l'ottenimento di nuovi ibridi interspecifici, attraverso il superamento delle barriere sessuali che si verificano tra i parentali. Sono state utilizzate la tecnica del 'Cut-style' method, per superare le barriere pre-zigotiche, e la coltura '*in vitro*' di ovari ed ovuli, per superare le barriere post-zigotiche. È stato predisposto un programma di incroci diallelico completo, utilizzando sei varietà appartenenti ai tre principali gruppi commerciali, oltre ad una serie di incroci che hanno interessato cloni di ibridi asiatici, selezionati precedentemente per il carattere assenza di polline, con alcune specie originarie. Si è proceduto alla realizzazione di incroci manuali, mediante il 'cut-style method'. Dopo 7, 14 e

21 giorni dal momento dell'impollinazione (DAP), le capsule fecondate sono state prelevate dalla pianta madre e trasferite 'in vitro' sui idonei substrati nutritivi. Si è allestita quindi una coltura 'in vitro' di sezioni di ovari fecondati, seguita da coltura di ovuli, che dopo circa 180 giorni ha dato luogo, in alcuni casi, a sviluppo dell'embrione. Una parte dei bulbetti ottenuti è stata ambientata in campo per una valutazione fenotipica, mentre la parte restante è stata sottoposta ad analisi del genotipo. Per verificare l'avvenuta fusione dei gameti tra gli individui ottenuti si è proceduto all'esame del loro DNA e dei rispettivi parentali, utilizzando marcatori molecolari (RAPD). L'analisi ha permesso di identificare l'ibrido attraverso la sua 'caratterizzazione' con la produzione di un profilo molecolare specifico. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la modalità con cui una cultivar viene utilizzata in un incrocio, cioè come portaseme oppure come impollinatrice, ne influenza la percentuale di riuscita. La cultivar 'Lombardia' ad esempio ha dato buoni risultati come portaseme, ma non come impollinatrice. E' stato osservato che il momento più idoneo per la raccolta degli ovari dalla pianta madre è, per la maggior parte degli incroci, tra il 7° e il 14° giorno dall'impollinazione e che il substrato di coltura ottimale per la coltura degli ovari deve contenere una concentrazione di NAA pari a 1 mg/l. Infine, i profili RAPD, ottenuti impiegando 39 primers sui tre diversi tipi di incrocio testati, uno di tipo LA, uno di tipo AO e uno di tipo LO, hanno evidenziato differenze tra i parentali, molte bande omogenee tra gli ibridi e i parentali femminili ed alcune bande in comune solo tra gli ibridi e i parentali maschili. Queste ultime bande hanno confermato l'avvenuta fecondazione e quindi l'effettivo ottenimento di un ibrido interspecifico.

Methods for obtaining interspecific hybrids of *Lilium* spp. and for identification of their hybrid condition

Abstract

The importance of *Lilium* for cut flowers production has been increased over the last 30 years thanks to the progress in genetic improvement, allowing to put on the market new hybrids of high commercial interest. Among the bulbous plants, *Lilium* is the most important species from an economic point of view and, thanks to the continuous work of hybridisation, several hundreds cultivars are grown today. Generally they belong to three commercial groups: 70% is represented by the "Asiatic hybrids" group; 20% by the "Oriental hybrids" group and 10% by the "Longiflorum hybrids" group. Recently a fourth group has started to be considered, the

LA group, interspecific hybrids between ‘*Longiflorum*’ and ‘Asiatic’. In breeding programmes for ornamental bulbs, interspecific hybridisation is one of the most important ways to introduce new genetic variations, although this may be restricted because of incompatibility. The genus *Lilium* generally includes allogamous species that because of self incompatibility problems are not able to produce seeds when they are self pollinated. The intraspecific crosses produce a large quantity of seeds, whereas crosses among different species create many problems caused by sexual barriers that hamper interspecific hybridisation, and that can be distinguished between pre-fertilization and post-fertilisation barriers. Pre-fertilisation barriers are due to the impossibility of pollen tube to cross the stylus, to incompatibility between the stylus and the pollen itself, and to ovary abortion. The post-fertilization barriers are due to the degeneration of the endosperm in the developing embryo. A breeding programme on lily was carried out at the CRA-VIV, former ISFlor, with the aim to obtain new *Lilium* hybrids with high commercial traits, as colour, shape and flowers size. The goal of this research was to develop some methods to obtain new interspecific hybrids of *Lilium* overcoming the sexual barriers that occur among parental and to verify their hybrid condition. Ovary and ovule culture have been applied to produce interspecific *Lilium* hybrids. Several crosses among Asiatic hybrids (‘Golf’, ‘Polyanna’ and ‘Gironde’), Oriental hybrids (‘Lombardia’), and *Longiflorum* hybrids (‘White Heaven’ and ‘White Magic’) were made using just breaking flower buds and cut-style-method. Other crosses were carried out using clones previously selected at the CRA-VIV for several flower traits like colour, shape and pollen absence. Several wild species like *L. pumilum*, *L. regale*, *L. aurelian*, *L. leucanthum* and *L. New Zealand* were included. Seven, fourteen and twenty - one DAP (Days After Pollination) ovaries were cut and cultivated ‘*in vitro*’ using 4 different substrates (MSO, LO₁, IAA_{0.5} and NAA₁) for 50 and 60 days. Subsequently the most swollen ovules were taken out from ovary and subcultivated on two substrates, IBA_{0,5}, and NAA_{0,1}. In some cases, after 180 days an embryo developed.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used for early identification of interspecific hybrids. RAPD profiles obtained using 39 primers on 3 different types of cross combinations (LA, AO and LO), have highlighted differences between parentals, many homogeneous bands between hybrids and female parents and some bands in common only between hybrids and male parents. These last bands have confirmed an occurred fertilization and the hybrid condition of the progenies.