

Valutazione del patrimonio vegetale tipico della Sabina Reatina a rischio di erosione genetica e costituzione di protocolli di propagazione e mantenimento in coltura del germoplasma selezionato



RELAZIONE SCIENTIFICA

A cura della dr.ssa Marina de Agazio e del dr. Massimo Zacchini

I.B.E.V. – C.N.R Area della Ricerca Roma-Montelibretti

L'erosione genetica è considerata attualmente nel mondo scientifico come uno dei più fondati motivi di preoccupazione per la stabilità degli ecosistemi e per il loro inalterato mantenimento. Con il termine erosione genetica la comunità scientifica suole designare la progressiva riduzione del patrimonio genetico presente negli ecosistemi dovuta sia alla coltivazione di un numero sempre più ridotto di piante di interesse agrario sia all'alterazione antropica degli equilibri naturali con conseguente estinzione di moltissime specie vegetali spontanee.

L'importanza di preservare le specie vegetali dall'estinzione risiede, oltre che in motivazioni di ordine etico, anche nella considerazione che esse rappresentano un patrimonio genetico di caratteri potenzialmente utili (resistenze a stress, a fitopatie) che potrebbero risultare determinanti per l'agricoltura e gli ecosistemi sottoposti a modificazioni ambientali su larga scala ("Global change") causate dalle attività antropiche. In questo contesto il mantenimento della "biodiversità" interessa anche le varietà di specie di interesse agrario, a forte tipicizzazione agroambientale, che possono anche non

essere più commercialmente soddisfacenti ma che possiedono caratteristiche tali da meritare il loro mantenimento per scopi di studio scientifico (strategie evolutive e di adattamento) che potrebbero essere utilizzate per migliorare le specie vegetali attualmente coltivate qualora le loro risposte di adattamento al clima che cambia fossero insufficienti.

In campo agrario il fenomeno dell'erosione genetica consiste fondamentalmente nella tendenza all'abbandono, all'espianto e al mancato reimpianto di cultivar locali od ecotipi a favore di nuove cultivar selezionate, secondo moderni concetti di frutticoltura, sia per quanto concerne le pratiche agronomiche che le qualità organolettiche del frutto.

La tendenza all'abbandono di vecchie cultivar selezionate in ambito locale può essere dovuto anche alla naturale fine dei cicli produttivi (meno evidente per l'olivo data la pratica della "stroncatura") o ad eventi naturali particolarmente avversi (gelate od attacchi parassitari). Un altro fattore che ostacola il mantenimento

nell'agroambiente di varietà locali è la difficoltà di reperire piante certificate in vivaio, cioè virus-esenti, con cui procedere al reimpianto.

Da qui la necessità di mantenere e propagare germoplasma a rischio di erosione genetica per preservarlo dall'estinzione in modo da evitare una perdita di biodiversità.

Tale preservazione può essere ottenuta attraverso due tecniche che si differenziano sia per la metodologia utilizzata che per la qualità del risultato finale. Esiste infatti una tecnica di conservazione del germoplasma o mantenimento della biodiversità "in situ" che consiste nel mantenere presso aziende selezionate piante delle specie e varietà individuate e/o favorirne il reimpianto, laddove possibile. Questa tecnica, sicuramente caratterizzata da minori costi (professionalità coinvolte, utilizzo di sostanze chimiche e strumentazioni), preserva il materiale selezionato dall'azione antropica ma certamente non da altre possibili avversità ambientali quali la contaminazione genetica da parte di altro germoplasma, le avversità atmosferiche e fitoparassitarie.

La tecnica del mantenimento della biodiversità “ex situ” invece prevede uno stoccaggio del materiale vegetale selezionato in apposite banche del germoplasma che possono essere costituite da celle termostatiche ove possono essere conservati i semi ma, più comunemente, tessuti in coltura “in vitro”. Si tratta, quest’ultima, di un tecnica ormai nota da qualche decennio ma in continua evoluzione che permette di conservare, risanare, moltiplicare germoplasma vegetale attraverso una coltura di cellule, apici meristematici, tessuto indifferenziato (callo) in ambiente sterile su idonei substrati di crescita. I vantaggi che la tecnica offre sono legati principalmente al microambiente in cui opera che permette uno stoccaggio di grandi quantità di materiale vegetale in spazi ridottissimi, il mantenimento delle caratteristiche genetiche, l’assenza di contaminazioni fitoparassitarie, la capacità di conservare per tempi lunghissimi il materiale attraverso tecniche di crio-conservazione. È una tecnica che richiede elevata professionalità ed attrezzature scientifiche abbastanza complesse e pertanto risulta decisamente più onerosa della precedente.

Il progetto scientifico in oggetto è stato finalizzato alla sperimentazione di protocolli scientifici per la messa in coltura “in vitro”, la propagazione ed il mantenimento di germoplasma vegetale tipico della Sabina reatina che presenta in forma più o meno accentuata i rischi di una possibile erosione genetica, in modo da costituire una banca di conservazione di tale germoplasma.

Nella fase iniziale del progetto scientifico elaborato nell'ambito della convenzione CNR-IBEV/ Provincia di Rieti si è provveduto ad effettuare uno studio delle caratteristiche del patrimonio vegetale agrario tipico della Sabina. L'attenzione è stata rivolta in maniera particolare sulle colture arboree da frutto che rappresentano una percentuale molto elevata della S.A.U. (Superficie Agraria Utilizzata) del territorio analizzato.

Le condizioni climatiche, orografiche e pedologiche della Sabina hanno favorito, nel tempo, la diffusione della coltura dell'olivo, che oggi rappresenta la specie più diffusa, ma della cui importanza anche

nel passato si hanno numerose testimonianze attraverso gli scritti di Virgilio e Plinio il vecchio. È doveroso segnalare in questo contesto la presenza in località Canneto Sabino, una frazione di Fara in Sabina, di un olivo plurisecolare che viene descritto come il più grande d'Europa.

Anche altri fruttiferi, quali ciliegio e pesco, rivestono una certa importanza nel comparto agrario della Sabina reatina anche se la loro diffusione tende a diminuire passando dai territori della bassa Sabina, ove si compenetra con la Sabina romana, alla alta Sabina (Scandriglia, Poggio Moiano, Pozzaglia, Torricella) in presenza di un'orografia che da collinare inizia ad assumere i tratti montani.

La coltura del melo, sicuramente più limitata, presenta nicchie di diffusione in cui è stata rilevata la presenza di accessioni di germoplasma autoctono.

L'indagine è stata poi condotta, all'interno delle specie selezionate (olivo, ciliegio, pesco e melo), con l'intento di valutare la presenza di germoplasma autoctono (cultivar, varietà ecoticipizzate) e il grado di erosione genetica che tale materiale presenta.

Uno screening varietale delle specie considerate ha evidenziato, per quanto riguarda l'olivo, la presenza di tre cultivar tipiche della Sabina denominate Carboncella, Raja e Nebbiara.

La cv Carboncella rappresenta la cultivar dominante e tipica della Sabina, pur essendo presente in forma ridotta anche in altre regioni del centro Italia. È una tipica cultivar da olio con ottime e costanti rese quali-quantitative (22-26% di resa in olio); rustica, si è ben adattata ai terreni argillosi e calcarei tipici dei luoghi (Jacoboni e Fontanazza, 1981). La Carboncella presenta una media resistenza ai principali agenti parassitari ma possiede una elevata resistenza allo stress idrico (VV.AA.,1998). Quest'ultima caratteristica risulta molto importante da preservare in quanto potrebbe essere determinante in futuro in considerazione dei cambiamenti climatici su scala globale che vedono già in atto per il nostro paese una progressiva tendenza alla desertificazione dei suoli delle regioni meridionali.

Allo stato attuale, in considerazione dell'ampia diffusione della cultivar nel territorio sabino, non si riscontrano pericoli di

significativa erosione genetica per questa cultivar. La tendenza però in atto nella moderna frutticoltura al reimpianto delle cultivar più largamente diffuse (Frantoio, Leccino, Moraiolo) a danno delle cultivar rustiche locali, come già avvenuto pure in Sabina in occasione delle recenti gelate per quanto riguarda anche la Carboncella, e le caratteristiche di particolare pregio di questa cultivar (produttività, qualità organolettiche del frutto, resistenza al calcare e alla siccità) oltre che la tipicità rispetto ai luoghi, la rendono meritevole di un'attenzione in merito alla preservazione del suo germoplasma.

La cultivar Raja è anch'essa tipica della Sabina ma la sua diffusione è minore rispetto alla Carboncella essendo presente nella bassa Sabina e prevalentemente nel comune di Casaprota, con il sinonimo di "Oliva dolce". I caratteri fenotipici ricordano molto quelli della cultivar Frantoio della quale potrebbe essere un ecotipo. La Raja è una cultivar autocompatibile, con produzione abbondante e mediamente costante. La resa in olio, che è di qualità eccellente, è generalmente intorno al 22%, ma il frutto viene consumato

essenzialmente allo stato maturo essiccato, addolcito o affumicato (Jacoboni e Fontanazza, 1981). Rispetto alla Carboncella presenta un rischio più elevato di un depauperamento del suo germoplasma, essendo ormai ridotta ad una consistenza di circa il 2-3% del patrimonio olivicolo della zona e perciò, vista la tipicità del suo areale di diffusione, si ritiene da prendere in considerazione per lo studio in oggetto al fine di preservarne il suo germoplasma.

La cultivar Nebbiara è decisamente più rustica delle precedenti e presenta caratteristiche più simili al tipo selvatico con foglie piccole. E' una cultivar molto rigogliosa con buona resa in olio della drupa (22-24%), ed ottime caratteristiche organolettiche dell'olio che tende al sapore dolce. Sensibile al ristagno d'umidità, alla fumaggine ed al cicloconio, presenta invece una buona resistenza al freddo. Necessita di forti potature. La sua diffusione nella bassa Sabina, nelle zone di compenetrazione con la Sabina romana, è ormai molto ridotta e si stima anch'essa intorno al 2-3%; per questo motivo si ritiene utile provvedere allo stoccaggio del suo germoplasma.

Per ciò che concerne il ciliegio è stata individuata la cultivar Petrocca, diffusa soprattutto nel Farense. La cultivar Petrocca presenta vigoria elevata, chioma assurgente, buona produttività in termini di quantità e pezzatura. Il frutto si presenta con buccia chiara ed ottimo sapore. La sua diffusione nel territorio sabino (circa il 2%) si sta riducendo sensibilmente anche in considerazione di una certa sensibilità della cultivar ad attacchi parassitari che recentemente hanno arrecato gravi danni alla cerasicoltura sabina (Scortichini, 1999) oltre alla più volte citata tendenza al reimpianto di cultivar più agronomicamente e commercialmente soddisfacenti. Per queste motivazioni il rischio di una erosione genetica risulta sensibile e si ritiene di dover prendere in considerazione le tecniche di conservazione del suo germoplasma "ex situ".

Per quanto riguarda il pesco è stata individuata la cultivar Seconda Reginella tipica della sabina romana e della bassa sabina reatina. E' una cultivar a precoce entrata in produzione con frutto a forma di limone, di gusto ottimo, di colore giallo-rosso e

caratteristicamente “spiccagnolo” cioè con buona separazione della polpa dal nocciolo. La scarsa capacità di conservazione e la sensibilità del frutto alle lavorazioni post-raccolta ne riducono l'importanza merceologica a livello commerciale facendone prevedere un uso sempre più locale ed una tendenza alla riduzione della sua diffusione sul territorio analizzato. Per questo motivo, anche se nel presente il rischio di una estinzione della cultivar è scarso, la tendenza all'abbandono delle cultivar locali ha già attivato, anche per la Seconda Reginella, un lento processo di erosione genetica che rende utile la conservazione del suo germoplasma “ex situ”.

Per quanto riguarda il melo è nota la presenza di una cultivar locale denominata Mela Rosa che ormai presenta caratteristiche di diffusione che non oltrepassano l'orto familiare. Questa cultivar si presenta con caratteristiche di vigoria medio-alta con frutto a polpa soda croccante di ottimo sapore, che matura in ottobre, e che possiede discrete capacità di conservazione naturale. Di un certo rilievo anche la resistenza di questa cultivar alla ticchiolatura. Per tutte queste

motivazioni si valuta positivamente una conservazione del suo germoplasma attraverso tecniche di stoccaggio “in vitro”.

Ultimata la fase di selezione e valutazione delle specie e cultivar locali idonee per lo studio in oggetto si è perciò provveduto al reperimento del materiale vegetale mediante raccolta di idonee porzioni di rami e polloni della stagione vegetativa in corso presso aziende agrarie e vivai della zona. Tale materiale è stato poi ridotto in parti più piccole in modo da avere porzioni di ramo o pollone di circa 15-20 cm contenenti 6-8 gemme, trattato con apposito fungicida in maniera da ridurre la contaminazione patogena, chiuso in sacchetti di plastica e posto in cella frigorifera (+4°C) al buio. Tale trattamento al freddo (vernalizzazione) risulta molto importante soprattutto per pesco, ciliegio e melo in quanto permette di soddisfare il fabbisogno in freddo delle gemme e quindi di “forzarle” ad un anticipo di germogliamento. Il periodo di vernalizzazione dura in media 45-60 giorni al termine del quale le gemme possono essere indotte a germogliare in ambiente controllato in presenza di trattamenti

anticrittogamici oppure, previa sterilizzazione chimica mediante protocolli adeguati, poste in coltura “in vitro” (microtalee con una o due gemme).

Il proseguimento della ricerca in oggetto ha previsto perciò l'individuazione dei mezzi di coltura disponibili in letteratura scientifica per le specie individuate e la fase di messa in coltura del germoplasma selezionato. Questa fase si è presentata come la più delicata dell'intero progetto in quanto si è trattato di far sviluppare le gemme (espianto) delle specie selezionate su un apposito substrato di crescita posto in tubi di coltura e sterilizzato in autoclave. Poichè l'ambiente che si crea nel tubo di coltura è estremamente favorevole allo sviluppo di patogeni (funghi, batteri e virus), la presenza di tali patogeni anche in quantità minima nel materiale vegetale posto “in vitro” determina l'inquinamento della coltura e la morte dell'espianto. Purtroppo, nonostante la fase di sterilizzazione chimica a cui viene sottoposto l'espianto prima di essere posto in coltura, l'incidenza dell'inquinamento da patogeni nella fase di messa in coltura può

arrivare anche al 100% (in dipendenza di molti fattori tra cui la presenza di patogeni endofitici) costringendo a ripetere per più volte la fase di messa in coltura.

Questa fase si presenta estremamente delicata anche in funzione del materiale vegetale selezionato in quanto vi è una tendenza della specie e, all'interno della specie, delle cultivar o degli ecotipi, a possedere una minore o maggiore capacità di attecchimento e di risposta vegeto-propagativa.

Tra le piante selezionate il ciliegio, come specie, presenta una buona capacità di attecchimento e una discreta risposta vegeto-propagativa; il melo e il pesco una media capacità di attecchimento e una discreta risposta vegeto-propagativa mentre l'olivo è considerato specie recalcitrante per la coltura "in vitro", presentando una scarsa capacità di attecchimento ed una debole risposta vegeto-propagativa che però è in forte dipendenza dalla cultivar utilizzata.

Il disegno sperimentale che è stato attuato perciò ha dovuto tenere di conto delle caratteristiche delle specie selezionate in modo da

esaltare le capacità di attecchimento e le risposte vegeto-propagative attraverso l'uso di substrati con uno specifico apporto qualitativo dei principali ormoni coinvolti nei processi suddetti (auxine, citochinine, gibberelline), un appropriato rapporto tra macro e microelementi, ed un'adeguata scelta del tipo e della concentrazione di carboidrati.

Verranno di seguito descritti i risultati ottenuti per ciò che concerne la capacità di adattamento alla coltura "in vitro" delle cultivar selezionate, i substrati di coltura sperimentati e, sulla base di queste risultanze, fornito un giudizio sull'applicabilità delle tecniche di conservazione "ex situ" del germoplasma analizzato.

OLIVO

Per questa specie vegetale così diffusa nella Sabina la fase di messa in coltura del materiale selezionato si è presentata decisamente problematica per la difficoltà di sterilizzare gli espianti che presentavano una notevole contaminazione anche di tipo endofitico. Per superare questa difficoltà, dopo una serie infruttuosa di tentativi di messa in coltura previa sola sterilizzazione chimica degli espianti con cloruro di mercurio 0.1 % (5 minuti) e, successivamente, ipoclorito di sodio 15% (15 minuti), sono stati aggiunti al mezzo di coltura due antibiotici specifici, la Carbenicillina ed il Claforan alle concentrazioni rispettivamente di 0.5 grammi/litro (g/lit) e 0.1 g/lit. L'utilizzo degli antibiotici ha così consentito agli espianti di non essere invasi dallo sviluppo di funghi e batteri, permettendone così la sopravvivenza in coltura. Questi aspetti relativi alla difficoltà della messa in coltura dell'olivo sono ben noti in letteratura scientifica (Rugini, 1990; Martino *et al.*, 1999) così come la scarsa attitudine alla proliferazione

“in vitro” della maggior parte delle cultivar saggiate (Rugini e Lavee, 1992; Rugini e Panelli, 1993).

Per quanto riguarda i mezzi di coltura e le tecniche utilizzate dobbiamo distinguere la fase di messa in coltura da quella di propagazione. Nella prima fase infatti si è adottato un mezzo di coltura MS (Murashige e Skoog, 1962) diluito a metà ed addizionato con 36 g/lit di mannitolo e 1 milligrammi/litro (mg/lit) di zeatina, corretto ad un valore di pH di 5.8, e solidificato con agar allo 0.8%. Tale substrato è stato sterilizzato mediante autoclave e posto, in ambiente sterile (cappa a flusso laminare), in piastre petri od in tubi di coltura dove sono stati posizionati rispettivamente piccoli germogli o microtalee uninodali provenienti dalla fase di sterilizzazione chimica. Successivamente, per quanto concerne la fase di proliferazione, è stato utilizzato un mezzo di coltura OM (Rugini, 1984) addizionato con 36 g/lit di mannitolo, 3 mg/lit di zeatina, 2 mg/lit di acido gibberellico (GA3) e 0.1 mg/lit di acido indolbutirrico (IBA) e solidificato in vasi di coltura con agar 0.8%, nel caso della micropropagazione; per la coltura di cellule

indifferenziate (callo), invece, e' stato adottato un mezzo di coltura OM con l'aggiunta di 36 g/lt di mannitolo, 1 mg/lt di acido 2,4 diclorofenossiacetico (2,4 D) e di 1 mg/lt di zeatina, e solidificato in piastre petri con agar 0.8%.

Le colture in proliferazione, germogli e callo, sono state mantenute in una camera di crescita a temperatura controllata di 24 gradi centigradi e ad un ciclo di luce giornaliero (fotoperiodo) di 16 ore di luce ed 8 di buio e trasferite su un nuovo substrato di coltura ogni 3 settimane (subcoltura).

La risposta di attecchimento e proliferazione "in vitro" e' stata molto diversificata nelle tre cultivar saggiate che saranno così trattate in maniera separata.

cv. NEBBIARA

Questa cultivar dalle caratteristiche fenotipiche simili al tipo selvatico, e caratterizzata da una spiccata rusticità, ha manifestato una buona capacità di adattamento alla coltura “in vitro” (fig. 1) ed alla proliferazione sia in termini di micropropagazione (fig. 2) che di coltura di callo (fig 3). Per questo motivo e’ stata utilizzata come modello per studiare le condizioni per ottimizzarne la risposta alla conservazione del suo germoplasma mediante coltura “in vitro”.

In fase di messa in coltura la cultivar ha mostrato percentuali di attecchimento elevate anche in assenza di antibiotici nel substrato; questa positiva capacità di adattamento degli espianti alla coltura “in vitro” e’ stata mostrata sia dalle microtalee uninodali che dai giovani germogli. Nella successiva fase di micropropagazione è stata riscontrata una decisa influenza sia del mezzo di coltura utilizzato (OM, MS), sia dalla tecnica di moltiplicazione adottata in fase di trasferimento dei germogli in coltura (germoglio integro, germoglio “capitozzato”), sia



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

della composizione ormonale del mezzo (maggiore o minore concentrazione di acido gibberellico e acido indolbutirrico).

Per quanto riguarda il mezzo di coltura utilizzato, l'OM è risultato decisamente più efficace nel promuovere un maggiore sviluppo delle gemme ascellari, e cioè una maggiore proliferazione di nuovi germogli, di circa il 40% rispetto ad un altro comunissimo mezzo di coltura per specie arboree quale il MS. Questo effetto del substrato OM sulla capacità proliferativa degli espianti è stata esaltata dalla tecnica di "capitozzatura" del germoglio al momento del trasferimento sul substrato rinnovato. Questa tecnica è nota in letteratura scientifica per ridurre la dominanza apicale, che consiste nell'inibizione da parte della gemma apicale allo schiudersi delle gemme ascellari sottostanti lungo l'asse del germoglio. L'adozione del substrato OM insieme alla tecnica di "capitozzatura" ha permesso, oltre ad una percentuale di proliferazione, più elevata anche una distribuzione in classi di lunghezza dei germogli più interessante per la micropropagazione.

Infatti mentre la proliferazione degli espianti posti su mezzo di coltura MS era caratterizzata da germogli che, al termine di una subcoltura, avevano una lunghezza inferiore ad 1 cm, la proliferazione sul substrato OM evidenziava una maggiore lunghezza dei germogli che per oltre il 50% si distribuivano nelle classi tra 1 e 3 cm ed in quella oltre 3 cm. L'attitudine di questi germogli ad una crescita in altezza molto sostenuta ha reso necessario modificare l'apporto della componente ormonale che influenza tale fenomeno, ovvero l'acido gibberellico, che è stato diminuito da 1 mg/lit a 0.8 mg/lit riducendo altresì l'acido indolbutirrico da 0.1 mg/lit a 0.08 mg/lit per mantenere inalterati i loro rapporti relativi. Tale modifica ha fornito risultati soddisfacenti.

Anche per quanto riguarda la coltura di cellule indifferenziate (callo), che si sono sviluppate dal tessuto cambiale degli espianti, sono stati saggiati i due substrati già menzionati ovvero l'OM ed il MS addizionati con mannitolo 36 g/lit e 2,4D 1 mg/lit come componente ormonale auxinica. E' stata verificata anche l'efficacia, in termine di proliferazione cellulare, di due sostanze ormonali appartenenti al

gruppo delle citochinine ovvero la zeatina e la kinetina, rispettivamente ad una concentrazione di 1 mg/lt e 0.5 mg/lt. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza una buona attitudine della cv. Nebbiara alla proliferazione in coltura di cellule indifferenziate che si è manifestata in misura maggiore con l'adozione del substrato OM. Discreti risultati sono stato ottenuti anche con il mezzo di coltura MS mentre una decisa influenza si è osservata a carico del tipo di citochinina utilizzata. Infatti, in questi studi, la zeatina ha evidenziato un'efficacia decisamente superiore alla kinetina in termini di tasso di proliferazione cellulare e resistenza all'invecchiamento cellulare.

Dalle prove effettuate e' possibile perciò stabilire che la cv. Nebbiara presenta un'elevata attitudine alla coltura "in vitro" sia in termini di micropropagazione che di coltura di callo e che la conservazione del suo germoplasma tramite tecniche "ex situ" risulta una metodologia altamente praticabile. Queste caratteristiche rendono la cv. Nebbiara un interessante modello di studio per tecniche e metodologie riguardanti la propagazione "in vitro" dell'Olivio.

cv. CARBONCELLA

Le prove di adattamento alla coltura “in vitro” della cultivar Carboncella hanno fornito risultati più contenuti rispetto alla cultivar Nebbiara. La fase di messa in coltura e’ stata notevolmente laboriosa e solo l’aggiunta al substrato degli antibiotici ha permesso di ottenere espianti sterili.

Com’è noto l’importanza di prelevare il materiale vegetale per la coltura da piante sane riveste, per le cultivar che non hanno elevate capacità di adattamento “in vitro”, un ruolo fondamentale per il successo della tecnica e questo si è potuto riscontrare anche per la cultivar Carboncella. La ricerca di piante apparentemente non contaminate, il trattamento del materiale prelevato con fungicidi e l’uso di antibiotici nel substrato di messa in coltura sono risultati aspetti determinanti per ottenere la costituzione di espianti sterili per la propagazione “in vitro” di questa cultivar. Altrettanto determinante, comunque, è risultato il tipo di espianto utilizzato per la messa in

coltura. Infatti mentre le talee uninodali hanno mostrato severe difficoltà di adattamento alla coltura, sia per lo sviluppo dei patogeni che per la scarsa capacità delle gemme di schiudersi in coltura, l'utilizzo di germogli di appena 1-2 cm di lunghezza ha permesso un buon attecchimento nell'ambiente "in vitro" (fig.4). A questo buon attecchimento non ha corrisposto però una capacità proliferativa soddisfacente a causa della lentezza delle gemme ascellari a schiudersi e dei germogli ad accrescersi su di un mezzo di coltura OM. Per superare tali difficoltà sono state effettuate prove specifiche sia aumentando la componente ormonale che capitozzando i germogli durante la propagazione, ma non sono stati evidenziati significativi miglioramenti (fig. 5).

Oltre alla debole attitudine alla propagazione "in vitro" la cultivar Carboncella si è caratterizzata per un ridotta "miniaturizzazione" dei suoi organi in coltura, in particolare delle foglie, e questo aspetto, ben conosciuto nella tecnica di micropropagazione, e' senza dubbio un fattore negativo sia durante la

coltura, sia nelle fasi di stoccaggio e conservazione che in quelle di un eventuale trasferimento "ex vitro".

L'attitudine della cultivar Carboncella alla proliferazione in coltura di cellule indifferenziate è invece risultata discreta (fig 6). Anche in questo caso, come per la cultivar Nebbiara, l'adozione del mezzo di coltura OM addizionato con acido 2,4-diclorofenossiacetico 1 mg/lt e zeatina 1 mg/lt ha fornito i migliori risultati.

Dalle ricerche effettuate e' stato quindi possibile attribuire alla cultivar Carboncella una attitudine media alla coltura "in vitro" con una più elevata potenzialità per quanto riguarda la coltura di callo rispetto alla micropropagazione. Per questi motivi quindi la conservazione del suo germoplasma tramite tecniche "ex situ" risulta una metodica da poter adottare.



Fig. 4

Fig. 5

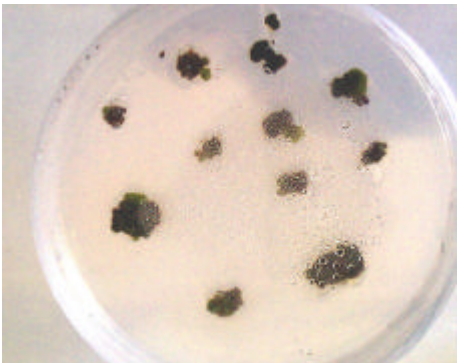


Fig. 6

cv. RAJA

Anche per quanto riguarda questa cultivar le difficoltà per la messa in coltura sono state notevoli. Così come per la Carboncella, il materiale vegetale raccolto e da porre in coltura (microtalee e giovani germogli) è risultato pesantemente infettato da funghi endofitici che hanno reso la fase di decontaminazione (trattamento delle marze con fungicidi, sterilizzazione degli espianti con cloruro di mercurio e ipoclorito di sodio) inefficiente se non congiunta all'utilizzo di antibiotici nel mezzo di coltura. Tuttavia, anche in presenza di antibiotici, la percentuale di attecchimento in coltura degli espianti di questa cultivar (Fig.7) è risultata molto ridotta (6 %). Anche la successiva fase di induzione allo schiudersi delle gemme ascellari, su di un substrato di crescita OM, ha evidenziato tutte le difficoltà già emerse nella precedente fase di messa in coltura. Infatti la quasi totalità delle gemme presenti sugli espianti non ha manifestato alcun processo di germogliamento mentre, in quei pochi casi in cui si è

instaurato, tale processo si è caratterizzato per un'estrema lentezza, inadeguata per gli scopi della tecnica colturale adottata. Anche il successivo allungamento dei germogli non ha dato esiti soddisfacenti risolvendosi spesso in formazioni di callo o, nel peggiore dei casi, in necrosi diffuse sino alla morte dell'espianto. Meno insoddisfacente è invece apparsa la callogenesi, ottenuta da tessuti cambiali nel punto di taglio degli espianti, che è occorsa, comunque, con una debole capacità proliferativa, sia su substrato OM che MS (fig. 8).

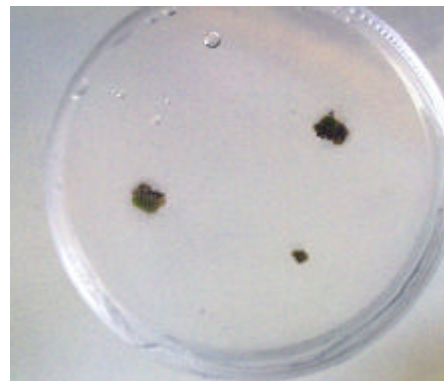
Dalle ricerche effettuate sulla cultivar Raja è apparso abbastanza chiaramente come la possibilità di conservazione del suo germoplasma attraverso tecniche "in situ" di coltura "in vitro" risulti, allo stato attuale, difficilmente praticabile. Ulteriori approfondimenti sono comunque necessari al fine di valutare se l'uso di altri tipi di citochinine o l'adozione di accorgimenti tecnici particolari (coltura liquida ecc.) possano rendere più soddisfacente la fase di moltiplicazione dei germogli, una volta ottenuto l'attecchimento in coltura degli espianti che rimane un altro fattore limitante. La

possibilità di coltivare e stoccare colture di callo appare più praticabile ma richiede senz'altro una messa a punto delle condizioni ottimali per ottenere un tasso di proliferazione cellulare più sostenuto. Sulla base del presente studio appare evidente che le tecniche di conservazione del germoplasma della cultivar Raja "ex situ" non possono sostituire le tradizionali pratiche di pieno campo ("in situ").



Fig. 7

Fig. 8



PESCO

(cv. Seconda Reginella)

Questa specie vegetale di cui è ben nota in letteratura la buona adattabilità alla coltura “in vitro”, sia delle cultivar che dei portinnesti (Hammerschlag *et al.*, 1987), ha manifestato, nei nostri esperimenti, molte difficoltà per la messa in coltura degli espianti. La notevole carica patogena presente nel materiale vegetale reperito della cultivar selezionata, la Seconda Reginella, ha costituito un deciso ostacolo per l’attecchimento in coltura e, come già visto per la cultivar di olivo Carboncella, solo l’aggiunta al substrato degli antibiotici Carbenicillina e Claforan (0.5 g/lt e 0.1 g/lt rispettivamente) ha permesso, previa sterilizzazione chimica degli espianti (vedi olivo), l’ottenimento di espianti sterili in coltura.

Il mezzo di coltura adottato per questa fase e’ stato l’ MS (Murashige e Skoog, 1962) diluito a metà ed addizionato con 30 g/lt di saccarosio, 10 mg/lt di acido ascorbico, 10 mg/lt di acido citrico e,

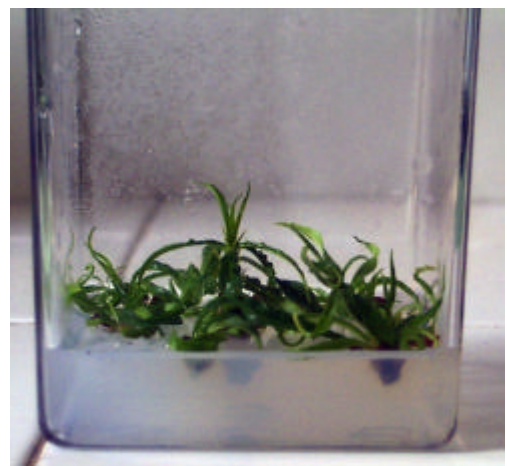
come componente ormonale, 1 mg/lt di benzilamminopurina (BAP), 0.05 mg/lt di acido gibberellico (GA3), 0.01 mg/lt di acido indolbutirrico (IBA), corretto ad un valore di pH di 5.7, e solidificato con agar allo 0.8%. Il materiale vegetale posto in coltura era costituito da germogli originatisi da gemme presenti sulle marze raccolte dalle piante selezionate, sottoposte a trattamento di vernalizzazione e successivamente a trattamento fungicida (fig.9).

L'adattamento degli espianti della cultivar Seconda Reginella alla coltura "in vitro" e' stato discreto. In questo caso il substrato utilizzato e' stato l' MS come per la fase di messa in coltura ma con macro e micronutrienti in concentrazione intera e con la BAP 1.2 mg/lt, la GA3 0.1 mg/lt e l'IBA 0.01 mg/lt. L'adozione di questo substrato ha determinato un buon tasso di proliferazione di nuovi germogli attraverso lo schiudersi delle gemme ascellari (fig.10). Questo fenomeno è stato reso ancora piu' evidente dall'adozione della metodica della "capitozzatura" del germoglio che, come gia' detto, contrasta, in associazione con le citochinine, la dominanza apicale. Non



Fig. 9

Fig. 10



molto soddisfacente è risultato inizialmente l'allungamento dei germogli in coltura ma l'aumento della concentrazione di acido gibberellico nel substrato da 0.1 mg/lt a 0.2 mg/lt ha migliorato notevolmente questo aspetto. Particolare negativo per la tecnica di micropropagazione e' risultato l'eccessivo accrescimento delle foglie, particolarmente lunghe, che possono creare difficoltà sia in fase di accrescimento del germoglio nel vaso di coltura, sia durante il trasferimento al termine della subcoltura che nella fase di trasferimento "ex vitro".

Decisamente negative sono risultate le prove effettuate per ottenere la proliferazione di callo sviluppatosi da piantine in micropropagazione. Infatti la risposta di queste cellule alla coltura su di un substrato MS con acido 2,4-diclorofenossiacetico 1 mg/lt e kinetina 0.5 mg/lt è stata molto debole con evidenti fenomeni di necrosi. Studi più approfonditi si renderebbero necessari al fine di valutare se altri tipi di espianti o variazioni del substrato adottato possano avere esiti migliori.

Come già visto per l'olivo le colture in proliferazione sono state mantenute in una camera di crescita a temperatura controllata di 24 gradi centigradi e ad un ciclo di luce giornaliero (fotoperiodo) di 16 ore di luce ed 8 di buio e trasferite su un nuovo substrato di coltura ogni 3 settimane (subcoltura).

In definitiva si può ritenere che la cultivar Seconda Reginella presenti una buona adattabilità alla coltura "in vitro" e che la conservazione del suo germoplasma "ex situ" in apposite banche di apici vegetativi micropropagati sia una metodologia da privilegiare.

MELO

(cv. Mela Rosa)

La specie vegetale e' nota in letteratura da tempo per avere una buona adattabilita' alla coltura "in vitro" (Jacoboni e Standardi, 1982; Barbieri e Morini, 1989), variabile però in funzione del portinnesto o della cultivar saggiata.

La cultivar selezionata in questo studio, la Mela Rosa, ha presentato, per la messa in coltura, le stesse problematiche già analizzate per il pesco. Anche in questo caso i germogli prelevati dalle marze vernalizzate presentavano una notevole carica patogena che ha reso necessario l'aggiunta degli antibiotici nel mezzo di coltura adottato, dopo la fase di sterilizzazione chimica degli espianti. Il substrato adottato è stato l'MS con le stesse caratteristiche già analizzate per il pesco. Una difficoltà peculiare per il melo, evidenziatasi in questa fase, è stata la notevole produzione di composti fenolici degli espianti che, diffondendo nel mezzo di coltura, oltre a

modificarne il colore facendolo virare verso un giallo carico, ne alteravano presumibilmente le caratteristiche nutritive portando alla morte gli espianti con una progressiva necrosi delle foglie (fig. 11). La presenza nel substrato di due antiossidanti quali l'acido citrico e l'acido ascorbico non ha migliorato le percentuali di attecchimento in coltura. Solo gli espianti che non manifestavano una tendenza così accentuata al rilascio di composti fenolici nel mezzo sono sopravvissuti a questa fase e sono stati trasferiti nel mezzo di moltiplicazione. La fase di micropropagazione ha evidenziato però una debole capacità dei germogli in coltura di schiudere le gemme ascellari (fig. 12) che non è migliorata né con l'adozione della tecnica di "capitozzatura" né con l'aumento delle concentrazioni della citochinina (BAP) di un substrato MS con composizione uguale a quello utilizzato per il pesco. L'aumento della BAP ha invece determinato un processo di alterazione della consistenza dei tessuti fogliari, denominato "vitrescenza" dall'aspetto traslucido che assumono le foglie, che ha portato ad un blocco della crescita dei germogli. Alla scarsa attitudine alla micropropagazione di

questa cultivar ha corrisposto invece una notevole produzione di callo dai margini fogliari dei germogli in coltura. Questa coltura di cellule indifferenziate è stata trasferita su di un substrato MS con 2,4-D 1 mg/lt e kinetina 0.5 mg/lt dove ha manifestato un elevato tasso di crescita ed un aspetto compatto, nodulare (fig. 13). Una prova di crescita in presenza od assenza di luce ha poi mostrato come il callo della cv. Mela Rosa si adatti meglio al buio ad una temperatura di 28°C. Le colture di germogli, invece, sono state mantenute in camera di crescita a temperatura controllata di 24°C con un fotoperiodo di 16 ore di luce ed 8 di buio e con una subcoltura di 3 settimane.

La cv. Mela Rosa ha presentato una buona adattabilità alla coltura “in vitro” anche se occorre ottimizzare le condizioni per una migliore proliferazione dei germogli in coltura. L’elevata attitudine alla callogenesi da parte dei tessuti di questa cultivar la rendono idonea ad una conservazione del suo germoplasma “ex situ” in celle climatiche o, mediante opportuni trattamenti, in crioconservazione.



Fig. 11

Fig. 12

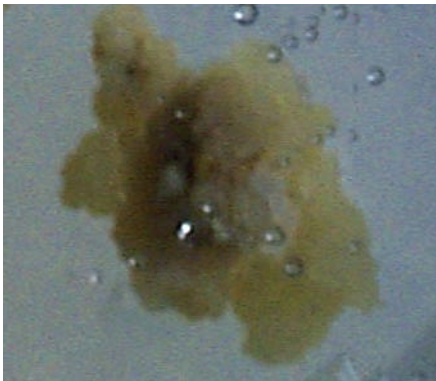
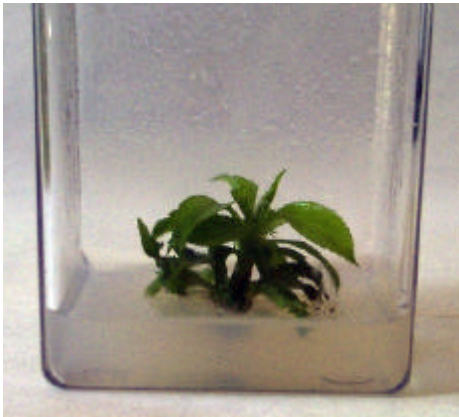


Fig. 13

CILIEGIO

(cv. Petrocca)

Il ciliegio è una specie arborea di cui è nota da tempo in letteratura la buona attitudine alla coltura “in vitro” (Skirvin e Rukan, 1979), anche se non tutte le cultivar ed i portinnesti saggiati hanno fornito risultati soddisfacenti. Il materiale vegetale raccolto della cultivar Petrocca ha manifestato, come per le altre specie analizzate nel presente studio, un elevato grado di infezione patogena che ha reso molto difficile le operazioni di decontaminazione chimica degli espianti, realizzata prima con incubazioni in cloruro di mercurio e ipoclorito di sodio, e poi con la presenza di antibiotici nel substrato di messa in coltura. Il mezzo di coltura utilizzato, come per pesco e melo, è stato l’MS diluito a metà ed addizionato con 30 g/lt di saccarosio, 10 mg/lt di acido ascorbico, 10 mg/lt di acido citrico e, come componente ormonale, 1 mg/lt di benzilamminopurina (BAP), 0.05 mg/lt di acido gibberellico (GA3), 0.01 mg/lt di acido indolbutirrico (IBA), corretto

ad un valore di pH di 5.7, e solidificato con agar allo 0.8%. Come per pesco e melo il materiale vegetale posto in coltura era costituito da germogli originatisi dalle gemme presenti sulle marze raccolte da piante selezionate. Tali marze erano state sottoposte a trattamento di vernalizzazione e successivamente a trattamento fungicida. L'attecchimento in coltura degli espianti è risultato soddisfacente (fig. 14) mentre la successiva fase di micropropagazione ha evidenziato una scarsa attitudine di questa cultivar per questa tecnica. Su di un substrato MS con composizione uguale a quella adottata per pesco e melo, infatti, gli espianti saggiati non hanno mostrato un significativo germogliamento ma semmai una tendenza alla "vitrescenza" (fig. 15) con successiva morte degli espianti. Variazioni della concentrazione della BAP non hanno modificato sostanzialmente il fenomeno che di fatto limita pesantemente la possibilità di utilizzare questa tecnica ai fini della conservazione del germoplasma della cultivar saggiata. Ulteriori studi si rendono necessari ai fini di una rimozione dell'effetto di dominanza apicale evidenziatosi nel materiale vegetale studiato



Fig. 14

Fig. 15



mediante, ad esempio, una differente composizione qualitativa dell'apporto ormonale.

La debole attitudine morfogenetica "in vitro" di questa cultivar si è confermata anche per quanto riguarda la proliferazione di colture di callo. Piccole aggregazioni di cellule indifferenziate che si erano evidenziate ai margini della lamina fogliare e nei punti di taglio degli espianti in coltura sono state infatti raccolte e coltivate su un mezzo MS addizionato con acido 2,4-diclorofenossiacetico 1 mg/lt e kinetina 0.5 mg/lt, saccarosio 30 gr/lt, corretto ad un valore di pH di 5.7 e solidificato con agar 0.7%. Le colture sono state mantenute in una camera di crescita a temperatura e luce controllata con le stesse caratteristiche delle altre specie già descritte. La successiva fase di proliferazione del callo ha però confermato, come detto, la debole risposta morfogenetica degli espianti di questa cultivar con aumenti ponderali del callo durante la subcultura appena percettibili e con l'instaurarsi invece di fenomeni di senescenza e necrosi che hanno fortemente condizionato la fase sperimentale. Anche in questo caso si

rende necessaria, al fine del possibile utilizzo della tecnica per scopi di conservazione del germoplasma, un'ulteriore fase di studio per poter comprendere e rimuovere le difficoltà evidenziate in questa ricerca ai fini di una più efficace capacità proliferativa.

Per la cultivar Petrocca, quindi, non e' stato possibile ottimizzare le condizioni sperimentali per ottenere una proliferazione "in vitro" adeguata alle tecniche di conservazione del germoplasma "ex situ" che quindi non può, allo stato attuale, essere indicata come metodica alternativa, per questa cultivar, ai tradizionali sistemi di pieno campo ("in situ").

Bibliografia

- Barbieri C., Morini S. (1989) In vitro regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. *Adv. Hort. Sci.* 1:8-10
- Hammerschlag F.A., Bauchan G.R., Scorza R. (1987) Factors influencing in vitro multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 8:235-242
- Jacoboni N., Fontanazza G. (1981) Cultivar, in: "L'olivo" di Baldini e Scaramuzzi, *Collana Frutticoltura anni 80*, Ed. REDA, Roma
- Jacoboni A., Standardi A. (1982) La moltiplicazione "in vitro" del melo cv. Wellspur, *Rivista Ortoflorofrutt. Ital.* 66: 217-229
- Martino L., Cuozzo L., Brunori A. (1999) Establishment of meristem tip culture from field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Moraiolo, *Agricoltura Mediterranea* 129: 193-198
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Rugini E. (1984) *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Hort.* 24:123-134
- Rugini E. (1990) *In vitro* culture of the olive: an overview of the present scientific status, *Acta Horticulturae* 286: 93-96
- Rugini E., Lavee S. (1992) In: Hammerschlag FA, Litz R (eds), *Biotechnology of perennial fruit crops*, Hardwick T Book Pub., pp 371-382

- Rugini E., Panelli G. (1993) Olive (*Olea europaea* L.) biotechnology for short term genetic improvement, *Agro-food Industry Hi-tech*, pp 3-5
- Scortichini M. (1999) Il deperimento del ciliegio dolce nella Sabina, *L'informatore Agrario*, ed. Calderini, Bologna
- Skirvin R.M., Rukan H. (1979) The culture of peach, sweet and sour cherry, and apricot shoot tips. *State Hort. Soc.* 113:30-38
- VV. AA. (1998) Olive germplasm – cultivars and world-wide collections”, FAO, Roma

Un sentito ringraziamento da parte degli autori al Prof. Eddo Rugini dell'Università della Tuscia di Viterbo per le preziose informazioni sulle metodologie ed i protocolli della coltura “in vitro” delle cultivar di olivo, al Dott. Giulio Frappetta dei Vivai Frappetta di Montelibretti per l'assistenza prestata nella raccolta ed identificazione del materiale vegetale, al Sig. Agostino Filippi della Cooperativa Olivicola di Casaprota per le informazioni specifiche sulla cultivar Raja.

