

Un protocollo di routine per la propagazione *in vitro* di portinnesti clonali di castagno

Paola Maria Chiavazza¹, Dario Donno^{1,2,*}, Jacopo Rossi¹, Elisabetta Cayre¹, Maria Gabriella Mellano^{1,2}, Gabriele Loris Beccaro^{1,2}

¹Department of Agriculture, Forestry and Food Science – DISAFA, University of Torino

²Chestnut R&D Center, Chiusa Pesio (CN)

Introduzione

Per micropropagazione si intende la propagazione di piante per via vegetativa mediante la coltura *in vitro* di singole cellule o di gruppi di cellule o di piccole porzioni di tessuto, di organi delle piante che si intendono moltiplicare. Ci sono vari fattori che influenzano sull'efficacia della tecnica di micropropagazione; i principali possono essere rappresentati dalla componente minerale del substrato di coltura, dal bilancio ormonale e dalle condizioni ambientali della camera di crescita. Nella propagazione le condizioni ambientali (ad esempio, le condizioni di luce, temperatura e composizione del gas all'interno del contenitore), hanno un ruolo importante nella crescita delle piantine (Scalzo *et al.*, 2016).

La micropropagazione del castagno è un'opportunità esplorata da tempo, con scarso successo, essendo una specie fortemente recalcitrante. Tuttavia, l'utilizzazione di materiale genetico (i portinnesti ibridi) a basso contenuto di tannino, che è uno dei principali responsabili dell'inibizione della moltiplicazione *in vitro*, unitamente all'affinamento delle tecniche, sta permettendo di accedere ad interessanti prospettive (Beccaro *et al.*, 2018a). L'interesse ad utilizzare portinnesti di castagno clonali è sempre più evidente soprattutto al fine di realizzare castagneti ad alta densità. Portinnesti ibridi nanizzanti, selezionati per la loro resistenza al mal dell'inchiostro ed al cancro della corteccia, sono attualmente propagati soprattutto per talea. Tuttavia, lo sviluppo negli ultimi 20 anni di differenti procedure di moltiplicazione *in vitro* ha aperto la possibilità di micropropagare in maniera efficiente diverse specie legnose, incluso il castagno (Mellano e Donno, 2015).

Scopo della ricerca, condotta dal Centro Regionale di Castanicoltura, è sviluppare un protocollo di micro-

propagazione efficiente per i portinnesti di castagno, utilizzabile nei vivai commerciali.

Materiali e metodi

Al momento il protocollo sperimentale messo a punto ed in fase di validazione consiste in quattro fasi: 1) messa in coltura (crescita *in vitro* degli espianti primari); 2) risveglio di gemme già presenti e proliferazione di gemme avventizie; 3) radicazione delle micro-talee; 4) acclimatamento delle nuove plantule. Il materiale iniziale è rappresentato da germogli apicali prelevati da piante madri prodotte per talea, per enfatizzare il carattere di giovanilità di partenza. Nelle prove effettuate sono state utilizzate piante madri da talea di 1, 2 e 3 anni di età, per verificare se sussistessero differenze nelle performance di radicazione dovute alla giovanilità del materiale di partenza, mantenuto in ambiente protetto e sottoposto a protocolli di concimazione e difesa.

Gli espianti, prelevati settimanalmente dalle piante madri coltivate in serra, sono lavati in acqua corrente e sterilizzati in soluzione di ipoclorito di sodio (0,5%). Risciacquati e suddivisi in porzioni di 1-2 nodi, sono posti su mezzo di coltura addizionato di auxine e citochinine in diverse concentrazioni (tab. 1). Ad intervalli regolari gli espianti sono stati divisi per ottenere nuovo materiale e spostati su mezzo fresco.

Dopo circa un mese di crescita ed eventuale suddivisione secondo il numero di nuovi internodi, gli espianti sono stati spostati su mezzo fresco.

Risultati e discussione

I primi risultati hanno permesso di evidenziare come il fenomeno di imbrunimento del mezzo di coltura sia maggiore durante le prime fasi, mentre vada progressivamente diminuendo nei passaggi colturali successivi e come la composizione del mezzo influen-

* dario.donno@unito.it

Tab. 1 - Protocollo sperimentale relativo ai mezzi di coltura utilizzati e concentrazioni di auxine e citochinine addizionate.

| Operazione | Substrato | Ormoni utilizzati e dose | | Durata |
|------------------|-----------|--------------------------|-------------|--------|
| | | Auxina | Citochinina | |
| Messa in coltura | CLP + PPM | NAA 1 mg/L | BA 2 mg/L | 30 d |
| | MS + PPM | NAA 1 mg/L | BA 2 mg/L | 30 d |
| Sub-coltura | CLP | NAA 1 mg/L | BA 2 mg/L | 30 d |
| Allungamento | MS | - | - | 30 d |

PPM = Plant Preservative medium
 MS= Murashige & Skoog's medium
 CLP= Chalupa's medium
 BA= benzyladenine (cytokinin)
 NAA= naphthaleneacetic acid (auxin)

zi fortemente l'accrescimento e la produzione di nodi (figg. 1 e 2). In figura 3 è possibile osservare meglio come l'età delle piante madri da talea non influenzi invece significativamente la crescita e la proliferazione degli espianti.

I risultati preliminari (le prove sono iniziate nel 2016) permettono di affermare che il protocollo messo a punto favorisce un ottimale risveglio e sviluppo delle gemme prelevate dalle piante madri (Beccaro *et al.*, 2018b).

Sulla base di questi primi risultati, si ritiene che la tecnica sviluppata nell'ambito delle attività del Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte sia perfettibile tuttavia meno efficiente della propagazione per taleaggio effettuata secondo il protocollo C-ROOTS,



Fig. 1 - Moltiplicazione *in vitro* di portinnesti del castagno: espianti in accrescimento.

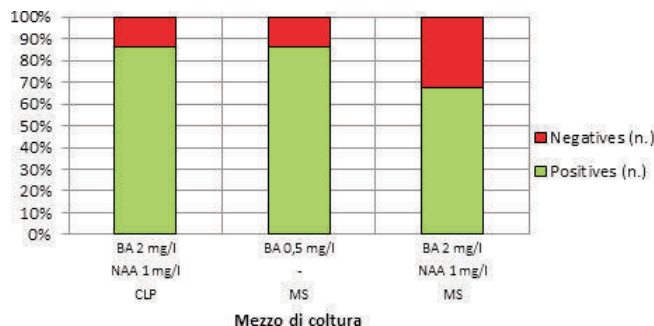


Fig. 2 - Espianti vitali (colore verde) in base alla diversa composizione dei substrati utilizzati.

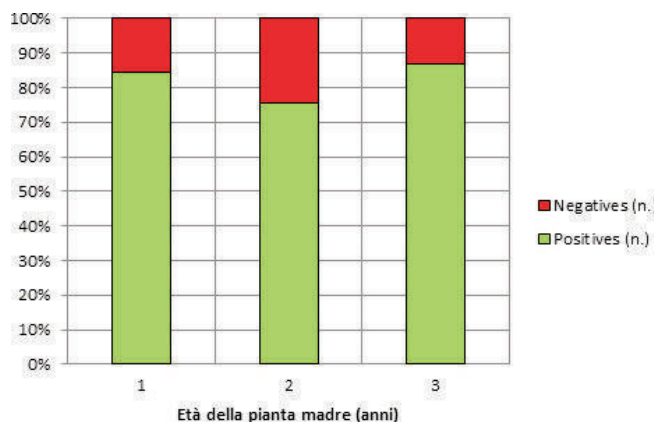


Fig. 3 - Risultati della messa in coltura suddivisi per età della pianta madre (in verde sono indicati gli espianti vitali).

messo a punto dallo stesso Centro Regionale di Castanicoltura e già utilizzato routinariamente con buona efficienza. Il taleaggio, inoltre, può essere effettuato dai vivaisti senza l'ausilio di strutture complesse come quelle richieste per la micropropagazione.

Bibliografia

BECCARO, G.L., ALMA, A., GONTHIER, P., MELLANO, M.G., FERRACINI, C., GIORDANO, L., LIONE, G., DONNO, D., BONI, I., EBONE, A. 2018a. Chestnut R&D Centre, Piemonte (Italy): 10 years of activity. In *VI International Chestnut Symposium 1220* pp. 133-140.

BECCARO, G.L., MELLANO, M.G., ROSSI, J., CHIAVAZZA, P.M., DONNO, D. 2018b. Evoluzione della castanicoltura intensiva con portinnesti ibridi clonali. *Rivista Di Frutticoltura E Di Ortofloricoltura* **3**, 60-62.

MELLANO, M.G., DONNO, D. 2015. Centro Regionale di Castanicoltura: nuove tecniche per la propagazione. *CASTA-NEA* **3**, 8 – 9.

SCALZO, J., DONNO, D., MILLER, S., GHEZZI, M., MELLANO, M.G., CERUTTI, A.K., BECCARO, G.L. 2016. Effect of genotype, medium and light on *in vitro* plant proliferation of *Vaccinium* spp. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1-16.