

Conservazione *ex situ* di antiche varietà locali di ortaggi italiani: coltura *in vitro* e conservazione a bassa temperatura dei semi

Marco Nigro*, Anna Sgarella, Vincenzo Di Michele, Ulderico Bazzan

HortiVeS Banca semi e laboratori sperimentali di ricerca e conservazione di piante ortive e alimentari, Villa Cortese (MI)

Ex situ conservation of ancient local Italian vegetable varieties: *in vitro* culture and low temperature storage of seeds.

Abstract. Within the Seed Bank of Hortives, subsequently to the discovery of a local variety, after the first tests of germination, an investigation into the origin of the seed starts, followed by the actual identity of the vegetable and its registration; morpho-phenotypic characterization, historical and ethnobotanical investigations are conducted for the most prized varieties. Thanks to the collaboration with Technical Agrarian Institutes on the national territory and to optimized protocols of seed production, vegetables are grown in their original areas. Seeds are then cleaned, calibrated and characterized by its weight, shape, color and other typical describing parameters. Eventually the seeds are dehydrated up to an average moisture content of 10-12 % in the drying chamber and stored at $-18^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. The Seed Bank has kept the first samples of seeds in conservation in 2013, and today retains 278 typical ancient Italian vegetable varieties and an amount of 400 accessions. For the conservation of viviparous varieties of onion and garlic it has been adopted the technique of *in vitro* culture: currently 7 ancient horticultural varieties are maintained *in vitro* at $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ and under a 16/8 h photoperiod under LED lighting. Every year tests of germination are carried out on stored samples to verify their vitality, with an average germination that last year amounted to $82\pm 1\%$. In the 2018, first tests of germination on 5 years stored samples will be carried out.

Key words: Seed Bank, ecotypes, germplasm, biodiversity, genetic resource.

Introduzione

La biodiversità orticola italiana è molto vasta e diversificata e si dirama in specie orticole coltivate e

spontanee che possiedono profonde radici nella cultura locale (con prodotti o piatti tipici).

Le diverse varietà di ortaggi presenti e ampiamente coltivati in Italia sono: aglio, asparago, cipolla, porro, carota, finocchio, prezzemolo, sedano, carciofo, cardo, cicorie, indivie, lattughe, radicchi, scarole, cavolfiore, cime di rapa, cavolo broccolo, cavolo cappuccio, cavolo rapa, cavolo verza, rapa, ravanella, rucola, bietole da coste, barbabietola, spinacio, cetriolo, anguria, melone, zucca, zucchini, fagioli, fagiolini, fava, pisello, melanzana, patata, peperone, pomodoro.

Oltre alle specie più comuni, esistono numerosi ortaggi meno conosciuti ma che hanno un profondo legame territoriale a livello locale come ad esempio: pastinaca, cece, cicerchia, lampascioni, lagenarie, fagiolo dell'occhio, lenticchie, caroselli (fig. 1), tortarelli, scorzonera, scorzobianca, erba stella, raperonzolo, crescione, roscano, scalogno, lupino, capperi, radici amare di soncino, valeriana, sedano rapa, cavolo laciniato da foglia, cipolla vivipara, cipollotto, cicoria asparago o puntarelle, sechio, fagiolini serpente o stringa, mughnolo, amaranto, topinambur, bietolone degli orti, la caigua, conosciuta nella zona del triangolo Lariano in particolare della Valassina come miliun.

Altre orticole spontanee da raccolta e coltivate



Fig. 1 - Carosello medio-lungo pugliese.
Fig. 1 - Puglia medium-long Carosello.

* marco.nigro@hortives.it

limitatamente in piccoli orti amatoriali, comunque considerate orticole a tutti gli effetti dalla cultura locale, sono: rosole, finocchietto selvatico, finocchio marino, cime di luppolo (asparagi selvatici), porcellana, farinaccio, tarassaco, silene o strigoli, pimpinella, senape selvatica, carciofo selvatico, spinacio di montagna o di Enrico il Buono. Come pure si hanno parti apprezzabili delle piante da orto che normalmente non siamo abituati a considerare eduli, come: talli di aglio di Resia del Friuli, talli di Capperò, tenerumi della zucca Serpente Verde di Sicilia, fondi del Carciofo Violetto di Sant'Erasmus.

HortiVeS nasce nel 2012 come semplice progetto e negli anni si struttura sempre più, raccogliendo partner e collaboratori sino a diventare oggi una Banca Semi i cui scopi principali sono:

- recupero di antiche varietà di ortaggi italiani e piante alimentari della tradizione,
- raccolta di campioni di seme,
- conservazione di germoplasma orticolo,
- coltura *in vitro*,
- conservazione di semi a basse temperature,
- divulgazione e formazione,
- campi - catalogo.

La *mission* è la valorizzazione e la conoscenza delle varietà orticole locali e antiche attraverso la riscoperta delle “tradizioni alimentari” come elementi culturali ed etnici del nostro Paese. L'obiettivo di Hortives è di creare un archivio di informazioni biologiche, botaniche, agronomiche e storiche legate a ciascun ortaggio, con un attento riferimento al legame esistente tra le varietà in questione, il territorio e la sua tradizione.

Non ultima è la realizzazione di una Banca del germoplasma come riserva genetica della biodiversità orticola italiana. Da qui si potrà attingere ad una ampia varietà di specie rustiche, adattabili, resistenti e produttive al fine di rispondere alla crescente richiesta di nuove varietà che, negli ultimi anni, sia il mercato, sia i cambiamenti climatici stanno imponendo ai produttori agricoli.

Materiali e metodi

Reperimento del germoplasma e catalogazione

Al ritrovamento di una varietà locale, grazie ad associazioni locali, coltivatori e collaboratori, il campione viene registrato nella Banca Semi ed è fornito di un codice identificativo. In seguito si conduce un'indagine sulla provenienza della semente e viene redatta una scheda identificativa del seme con riportati i seguenti dati: produttore, luogo e anno di raccolta/produzione.

Grazie al codice identificativo è possibile risalire, oltre al nome della varietà e a tutte le informazioni botaniche ed agronomiche, a: accessioni, “donatore”, provenienza, anno di produzione del campione, data di essiccazione, data di “sottovuoto”, data di congelamento, ricongelamenti e numero campioni/accesione. La gestione del sistema è eseguita con l'ausilio del programma di calcolo *excel* e un programma *database access*.

Coltivazione e produzione dei semi

Sono allestiti dei campi di coltivazione per la produzione della semente in purezza (“capannine”). Le piantine sono prodotte in serre sperimentali in condizioni di coltivazione controllate. Grazie alle collaborazioni con Istituti Tecnici Agrari sul territorio nazionale e ad opportuni protocolli di produzione della semente, gli ortaggi sono coltivati nelle specifiche zone di origine. I semi ottenuti sono puliti, calibrati e caratterizzati in base a peso, forma, colore e altri parametri descrittivi tipici (CREA-GV Montanaso Lombardo).

Conservazione dei semi e prove di germinabilità

Infine i semi sono disidratati (fig. 2) fino ad un'umidità media del 10 - 12 % in camera di essiccazione a 20°C costanti per circa 10 giorni. Lo stoccaggio avviene in freezer a colonna di tipo domestico con cassette interne e no-frost (Rossi e Mondoni, 2012) e i semi sono conservati a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ in buste sottovuoto (fig. 3) termosaldate (usate anche presso il CREA-GV di Montanaso Lombardo e alla Svalbard Global Seed Vault). Si è osservato che minori temperature non allungano significativamente la vitalità del campione conservato (Dickie *et al.*, 1990).

Ogni anno vengono effettuate prove di germinabilità (G.U. 2/93) sui campioni di semi conservati per



Fig. 2 - Particolare di un essiccatore.
Fig. 2 - Detail of a dryer.

verificarne la vitalità (DM 22/92 ‘Metodi ufficiali di analisi per le sementi’). Per valutare la facoltà germinativa dei campioni conservati nella Banca è stato effettuato uno *screening* con le seguenti condizioni standard: semi non trattati, temperatura costante di $23\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16/8 h, capsule Petri sterili da 9 cm di diametro, contenenti un doppio strato di carta da filtro sterile, mantenuta umida con 3 ml di acqua distillata sterile o microfiltrata a $20\ \mu\text{m}$. Rilievi effettuati ogni 30-60 giorni. Il seme è considerato germinato quando la radice primaria è visibile. Trattandosi di varietà di ortaggi antichi, rari da reperire e molto preziosi, vengono utilizzati un numero minimo di campioni per avere dati sperimentalmente validi (100 semi per varietà suddivisi in 4 piastre Petri da 25 semi ciascuno) (Mascarello *et al.*, 2013). La germinabilità media degli ortaggi conservati nella Banca semi nell’anno 2015 è stata pari all’ $82\pm 1\%$.

Etichettatura dei campioni di semi

Utilizzando bustine termosaldate e sottovuoto, i campioni vengono mantenuti in ambiente asciutto, evitando la reidratazione accidentale e mantenendo l’umidità del seme costante. Su ciascuna bustina viene posta un’etichetta resistente alle basse temperature (etichette Avery). L’etichetta riporta il *QR code* (fig. 4) e alcuni dati relativi al campione (osservando la figura 4, a partire dall’alto a destra):

- ID 205: codice identificativo attraverso il quale si può risalire oltre al nome della varietà e a tutte le informazioni botaniche e agronomiche, anche all’accessione, al “donatore” o provenienza delle semente, all’anno di produzione del campione, alle date di essiccazione, “sottovuoto”, congelamento e ricongelamento ed al numero di campione/accessione;



Fig. 3 - Procedura di sottovuoto.
Fig. 3 - *Vacuum procedure.*

ID 205 01/06 V1 serie 200-250



002A 20500001

Fig. 4 - *QR code* utilizzato per l’etichettatura e catalogazione dei campioni di semi.

Fig. 4 - *QR code* used for labeling and cataloging seed samples.

- 01/06 V1 serie 200-250: coordinate del seme, cella di conservazione, ripiano e serie;
- 002A: codice dell’operatore;
- 20500001: codice partita.

Inquadrando il *QR code* con una semplice applicazione libera dello *smartphone* (applicazione *Quick Scan*) compare il *record* dei dati del campione, estratti dal *database* della Banca Semi.

Conservazione del germoplasma in vitro

Per la conservazione di varietà vivipare di cipolla (fig. 5) e di aglio si è adottata la tecnica della coltura *in vitro*. Le prime prove sperimentali sono state condotte sul Cavolo Laciniato Nero Toscano - *Brassica oleracea* susp. *achephala* DC. (Nigro *et al.*, 2017). Partendo da semi selezionati ed esenti da patogeni (Franchi Sementi Spa) sono state prodotte le piante madri in ambiente di serra controllato da cui sono stati prelevati gli espianti di partenza (getti terminali di 5 - 20 mm) utilizzati per la messa in coltura *in vitro*. La sterilizzazione degli espianti scelti è stata condotta utilizzando una soluzione di ipoclorito di sodio (1% di cloro attivo) per 20 minuti, seguita da due risciacqui in acqua distillata sterile da 10 minuti ciascuno. La fase di adattamento e stabilizzazione *in vitro* è stata eseguita su un substrato contenente sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), saccarosio ($30\ \text{g l}^{-1}$) e agar ($8\ \text{g l}^{-1}$), pH $5,6 \pm 0,1$ (mod. Metrohm 713 pH Meter). I vasi di coltura contenenti gli espianti sono stati posti in cella termostatica ad una temperatura costante di $24\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo 16/8 h. I germogli sterili sono stati utilizzati per prove di moltiplicazioni a diverse concentrazioni di 6-benziladenina



Fig. 5 - Cipolla Egiziana Ligure.
Fig. 5 - Egyptian Ligure Onion.

(BA). In seguito si procederà all'individuazione del miglior protocollo per la conservazione del germoplasma *in vitro* utilizzando la tecnica della crescita rallentata (*Slow Growth Storage*) (Gianni e Sottile, 2015; Srivastava M. *et al.*, 2013; Lambardi e Ozudogru, 2013); ciò sarà di estrema utilità per tutte quelle specie sterili o vivipare, di cui non è possibile ottenere il seme. Saranno ridotti il numero delle subcolture, i costi di mantenimento, le incidenze di vitropatologie e le variazioni genetiche spontanee.

Tra le varietà orticole antiche più particolari conservate *in vitro* vi sono la Lenticchia di Ustica, il Cavolo Nero Tosano e l' Anguria di Calvenzano.

Caratterizzazione

Periodicamente vengono scelte alcune varietà di maggior pregio economico e alimentare per effettuare delle caratterizzazioni fenotipiche dei frutti/parti eduli delle piante. La caratterizzazione morfo-fenotipica viene effettuata secondo tabelle specifiche, utili anche per l'eventuale registrazione nei registri regionali delle Varietà da Conservazione (DM 28672/2009; DIRETTIVA UE 57/2013; Tabelle CPVO e UPOV). A fini divulgativi vengono redatte delle semplici schede informative (Bianco e Pimpini, 1990; Bianco V.V., 2009; Marino e Trisorio, 2009) e diffuse gratuitamente durante le campagne di promozione e diffusione della conoscenza (fig. 6).

Risultati e discussione

La Banca Semi:

- conserva ad oggi 278 varietà orticole tipiche e antiche italiane e, complessivamente, 400 accessioni e più di 1000 campioni di seme;
- nel 2013 ha avviato i primi campioni di semi alla



Pomodoro Pendolino Vesuviano

ID 15

Famiglia Solanaceae
Genere Solanum
Specie lycopersicum L.
Origine Campania

Caratteristiche Il pomodoro Pendolino Vesuviano è caratterizzato da una forma ovale, con apice appuntito e frequente cartilagineità dalla parte peduncolare; buccia spessa di colore rosso vermiglio, polpa soda di colore rosso, sapore vivace e intenso. Il peso non supera i 25 grammi.

In Cucina L'elevata consistenza della buccia, la forza di attacco al peduncolo, l'alta concentrazione di zuccheri e acidi permettono la conservazione del pomodoro pendolino vesuviano per lunghi periodi. La conservazione avviene tradizionalmente tramite la raccolta dei grappoli che vengono poi appesi in locali con adeguata temperatura e umidità.

HORTIVES RetiVes - Laboratorio di ricerca e conservazione di piante edibili e alimentari
48100015 - 02 26020 982 - Corchiani (RM) - Via V.lli. Tecnici Agrari - Giuseppe Mendola
Fondazione e Direzione: Associazione - Italia - Napoli - Via Feltrina/100 - 80138 - 081 220 432044
www.ortodiversita.com

© 2014, Marco Negro, anno 15 gennaio - Tutti i diritti sono riservati. Circolo di legge e circolo di copyleftisti in Rete. Napoli, 14 maggio 2014.

Fig. 6 - Scheda descrittivo-divulgativa.
Fig. 6 - Descriptive and dissemination sheet.

conservazione a bassa temperatura;

- dal 2013 ad oggi possiede 33 collaborazioni con orti sperimentali, tra privati e Istituti Agrari sparsi sul il territorio nazionale;
- ha catalogato e caratterizzato 125 ortaggi negli anni 2015-2016;
- ha prodotto e distribuito oltre 5000 piantine tra privati, associazioni, Istituti Agrari ed enti di ricerca per scopi scientifici o didattico-formativo;
- nel 2015 ha avviato campagne di promozione e diffusione della conoscenza di queste antiche varietà a livello nazionale grazie alla collaborazione e sostegno di Confartigianato Altomilanese;
- dal 2013 organizza mostre, convegni ed eventi volti a promuovere l'attività della Banca Semi e le antiche varietà orticole conservate;
- nel 2015 è stato fondato il Comitato Scientifico, costituito da tre ricercatori del CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria), una professoressa di un Istituto Agrario di Milano, un imprenditore ligure e una giornalista milanese. Il comitato ha la funzione di coordinare le attività di ricerca e programmare le attività di divulgazione al grande pubblico e a studenti delle scuole agrarie superiori.

Le principali difficoltà nella gestione di un unico centro di stoccaggio italiano di semi di piante orticole e alimentari sta nella continuità della produzione di seme fresco e nel mantenimento della produzione

stessa presso i luoghi e territori di origine delle varietà. Proprio grazie alla collaborazione con Istituti Agrari e coltivatori custodi, organizzati in una rete nazionale, questo si ritiene sarà possibile.

Sviluppi futuri

La Banca Semi, ancora giovane, vedrà i suoi sviluppi futuri in funzione dei finanziamenti che riceverà per il mantenimento delle attività di ricerca, studio e conservazione. Ad oggi i fondi sono pochi ed erogati unicamente da privati. Tra gli obiettivi più rilevanti posti per il 2020 vi sono:

- la sperimentazione delle tecniche di “*Slow Growth Storage*” per la conservazione del germoplasma orticolo viviparo e per ortaggi che non producono seme o di cui è difficoltosa la conservazione e la produzione del seme;
- l’implementazione delle collezioni di ortaggi, con particolare riferimento ad aglio, carota, piante alimentari spontanee e, ancora, patate, carciofi e ortaggi da foglia (lattughe, indivie, cicorie e radicchi);
- nuove campagne di promozione ed eventi divulgativi, in particolare mostre itineranti e convegni;
- ampliamento della camera di essiccazione e acquisto di nuovi apparecchi per la misura dell’U.R. nei semi;
- l’allestimento di un campo catalogo con ortaggi spontanei da raccolta, patate e carciofi;
- la continua creazione di copie di campioni di semi preso altre banche semi e possibili distaccamenti di Hortives;
- l’acquisto di un gruppo di continuità/generatore per mantenere i freezer in funzione in caso di *black-out*;
- entrare nelle reti nazionali ed internazionali di banche semi per avviare collaborazioni e rendere disponibile il materiale conservato;
- l’assunzione di un *team* operativo stabile composto da un tecnico di laboratorio, un ricercatore, un tecnico per la serra sperimentali e i campi-catalogo e un direttore.

Dal 2018 saranno effettuate le prime prove di germinabilità sui campioni conservati da 5 anni, per valutarne stato di germinabilità e vitalità.

Riassunto

All’interno della Banca Semi di Hortives (Hortives Seed Bank), al ritrovamento di una varietà locale, dopo le prime prove di germinabilità, viene avviata un’indagine sulla provenienza della semente, verifi-

cata l’effettiva identità dell’ortaggio e si procede, infine, alla registrazione; per le varietà più pregiate vengono condotte caratterizzazioni morfo-fenotipiche, indagini storiche ed etnobotaniche. Grazie alle collaborazioni con Istituti Tecnici Agrari sul territorio nazionale e a protocolli ottimizzati di produzione della semente, gli ortaggi sono coltivati nelle specifiche zone di origine. La semente ottenuta viene pulita, calibrata e caratterizzata in base a peso, forma, colore e altri parametri descrittivi tipici. Infine i semi disidratati in camera di essiccazione vengono conservati a $-18\pm 1^{\circ}\text{C}$. La Banca Semi ha avviato i primi campioni di semi alla conservazione nel 2013. Per la conservazione di varietà vivipare di cipolla e degli aglio si è adottata la tecnica della coltura *in vitro*. Ogni anno vengono effettuate prove di germinabilità sui campioni di semi conservati per verificarne la vitalità. Dal prossimo anno saranno effettuate le prime prove di germinabilità sui campioni conservati da 5 anni.

Parole chiave: Banca Semi, ecotipi, germoplasma, biodiversità, risorsa genetica.

Bibliografia

- BIANCO V. PIMPINI F., 1990. *Orticoltura*. Ed. Pàtron.
- BIANCO V.V., 2009. *Le specie ortive minori in Italia*. Italus Hortus 16 (1): 1-21.
- DICKIE J.B., ELLIS R.H., KRAAK H.L., RYDER K. & TOMPSETT P.B., 1990. *Temperature and seed longevity*. Ann Bot-London, 65: 197-204.
- GIANNI S., SOTTILE F., 2015. *In vitro storage of plum germplasm by slow growth*. Hort. Sci., 42 (2): 61-69.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2013. *Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature*. Acta Hort., 988: 29-42.
- MARINO M., TRISORIO A., 2009. *Linee Guida per la Conservazione e la Caratterizzazione della Biodiversità vegetale interesse per l’Agricoltura*. Piano Nazionale sulla Biodiversità di interesse agricolo (DM 28672 del 14/12/2009 del Mipaaf).
- MASCARELLO C., SACCO E., ZAPPA E., SUFFIA G.I., MARIOTTI M.G., RUFFONI B., 2013. *Osservazioni morfologiche e valutazione della germinazione dei semidi alcune specie liguri*. Informatore botanico italiano, 45 (1) 27-34.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*. Phisiol. Plant., 15: 473-497.
- NIGRO M., DI MICHELE V., SGARELLA A., BAZZAN U., BARLETTA A., 2017. *Propagazione in vitro di Brassica oleracea subsp. acephala DC*. Atti III Convegno Nazione sulla Micropropagazione 29-31 maggio Pesca (PT) – VitroSOI 2017.
- ROSSI G., MONDONI A., 2012. *Lombardy Seed Bank - Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia*. Studi Trent. Sci. Nat., 90: 53-61.
- SRIVASTAVA M., PURSHOTTAM D.K., SRIVASTAVA A.K. & MISRA P., 2013. *In vitro conservation of Glycyrrhiza glabra by slow growth culture*. International Journal of Bio-Technology & Research (IJBTR), 3 (1): 49-58.