

La moltiplicazione dei parentali maschiosterili e maschiofertili destinati alla produzione di seme ibrido di carciofo

Mariateresa Cardarelli¹, Guido Bernabei², Eva Svecova², Antonio Fiorillo² e Giuseppe Colla^{2*}

¹Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Ricerca per lo studio delle relazioni tra Pianta e Suolo, Roma

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Propagation of male-sterile and male-fertile parental lines for artichoke hybrid seed production

Abstract. Globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori] is one of the most important vegetable crops in Italy. Recently, new F₁ hybrids such as 'Romolo' and 'Istar' belonging to Topseed s.r.l., Sarno, have been successfully introduced in several Italian artichoke production areas. Because of the growing demand of hybrid seeds and the need to reduce the seed cost, an innovative mass production system for male-sterile and male-fertile parental lines has been proposed. The system includes the following steps: 1) male-sterile and male-fertile parental lines are cleaned from pathogens (including viruses) and micropropagated; 2) micropropagated male-sterile and male-fertile stock plants are grown in soilless culture under greenhouse equipped with insect proof net; 3) stock plants are periodically foliar sprayed with synthetic cytokinin (benzyladenine) and cut at the base to stimulate the growth of offshoots; 4) offshoots are harvested when they reach 30 g of fresh weight (3-4 leaves), and rooted in soilless culture; 5) rooted offshoots of male-sterile and male-fertile parental lines are planted in the field for production of artichoke F₁ hybrid seed. The production system permits to produce a large amount of pathogen-free male-sterile and male-fertile plants in a short time reducing the cost of traditional mass propagation techniques.

Key words: *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, F₁ hybrid, *in vitro* culture, offshoots, soilless culture.

Introduzione

La produzione del carciofo [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori] nel mondo è concentrata

nel bacino del Mediterraneo con l'Italia come primo produttore (50.000 ha e 500 mila tonnellate di capolini prodotti annualmente); altri importanti centri di coltivazione per questa ortiva sono la Spagna, l'Egitto, la Francia, il Marocco, ed anche la Cina, gli Stati Uniti, il Perù, il Cile e l'Argentina (FAOSTAT, 2014).

Il mercato dei capolini, destinati sia al consumo come prodotto fresco che alla trasformazione industriale, trae vantaggio dal fatto che il carciofo è uno degli alimenti tipici della dieta mediterranea, rientrando in molte preparazioni, ed inoltre possiede documentate proprietà antiossidanti e salutistiche per l'uomo (Coinu *et al.*, 2007; Lombardo *et al.*, 2010; Pandino *et al.*, 2011).

Tuttavia la filiera cinaricola presenta una riconosciuta criticità che riguarda la produzione vivaistica di materiale vegetale per l'impianto delle carciofaie. Infatti ad oggi la propagazione del carciofo è condotta soprattutto a partire da ovoli, carducci o parti di rizoma prelevati da colture preesistenti; in questi casi il materiale, di origine vegetativa, è spesso non uniforme e di scadente qualità fitosanitaria. Solo per alcune varietà tardive appartenenti al gruppo del Romanesco la produzione su larga scala di piantine ad elevato standard qualitativo può essere efficacemente ottenuta vegetativamente attraverso la micropropagazione (Ancora *et al.*, 1981; Cardarelli *et al.*, 2009).

Negli ultimi anni è stato perseguito l'obiettivo di sviluppare una tecnica di propagazione che utilizzi l'achenio come unità riproduttiva (Saccardo *et al.*, 2013). Il ricorso alla propagazione gamica mediante la realizzazione di ibridi F₁ e/o varietà sintetiche, che manifestano gli effetti positivi dell'eterosi, rappresenta una valida alternativa a quella agamica perché contribuisce alla razionalizzazione della tecnica colturale, al miglioramento dello stato sanitario delle piante, all'incremento delle produzioni unitarie, alla possibi-

* giucolla@unitus.it

lità di esprimere il potenziale produttivo già al primo anno di impianto rendendo possibile la durata di un anno della carciofaia e quindi l'avvicendamento del carciofo con altre colture, riducendo i costi di produzione (Basnizki e Zohary, 1994; Zaniboni, 2009). Oggi le cultivar propagate per seme sono molto diffuse in alcuni paesi come Israele, Stati Uniti, Spagna (Basnizki e Zohary, 1994). Ricerche condotte nell'ambito di alcune collaborazioni fra il Dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia e l'ENEA hanno permesso la definizione della tecnica di moltiplicazione gamica con la costituzione di ibridi F_1 da moltiplicare via seme ed adeguati alle esigenze del mercato nazionale (Stamigna *et al.*, 2004; Calabrese *et al.*, 2006). Contemporaneamente sono stati sviluppati genotipi maschiosterili per la costituzione di ibridi F_1 (Stamigna *et al.*, 2004; Zaniboni, 2009) in quanto la maschiosterilità genetica per la linea portaseme semplifica la moltiplicazione massale dal momento che esclude la necessità di effettuare l'emasculazione del fiore. Linee maschiosterili e maschiofertili sono state utilizzate con successo dalla Topseed s.r.l. di Sarno per la produzione di ibridi F_1 di carciofo 'Romolo' e 'Istar' idonei agli areali di coltivazione del Centro-Sud Italia.

Un ulteriore aspetto riguarda l'approvvigionamento a costi sostenibili dei parentali che, necessariamente, devono essere un numero consistente di piante maschiofertili e maschiosterili di buona qualità sanitaria ed uniformi morfologicamente. Le tecniche vivaistiche in uso prevedono una moltiplicazione agamica di tipo tradizionale ossia mediante carducci ed ovoli ma in questo modo si riscontra variabilità morfologica e fisiologica che poi si ripercuote sulla progenie e, quindi, sulla produttività e sui costi di produzione. Anche la micropropagazione non costituisce una valida alternativa considerando i costi di produzione e i fenomeni di instabilità genetica di alcuni genotipi; Pecaut e Martin (1993) hanno infatti riscontrato durante la coltivazione modificazioni dell'*habitus* morfo-fisiologico sulle piante del tipo rifiorante precedentemente moltiplicate *in vitro* con perdita sia di precocità che di rifiorenza.

Partendo da queste considerazioni, è stata definita, nell'ambito del progetto CYNASEME finanziato dalla Regione Campania, una filiera di moltiplicazione massale dei parentali destinati alla produzione del seme ibrido; tale tecnica deve prevedere la micropropagazione di genotipi maschiosterili e maschiofertili precedentemente risanati e poi l'ambientamento delle piante e la loro moltiplicazione in fuori suolo (*in vivo*) con la produzione di carducci virus-free idonei ad essere utilizzati come parentali.

Il risanamento dei genotipi maschiosterili e maschiofertili

Ricerche specifiche condotte su germoplasma di carciofo hanno individuato una tecnica adeguata di diagnosi e risanamento dai virus identificati su carciofo [virus latente (ArLV), virus italiano latente del carciofo (AILV), virus dell'arricciamento maculato del carciofo (AMCV)] (Gallitelli e Barba, 2003). In questo modo possono essere prodotti cloni virus-free di maschiosterili e maschiofertili. Il protocollo prevede termoterapia *in vitro* e coltura di apice meristemato, usati singolarmente o in sequenza (Barba *et al.*, 2004). In alternativa alcuni autori (Taglienti *et al.*, 2013; Tavazza *et al.*, 2013) hanno evidenziato come anche trattamenti di crioterapia (a basse temperature) possono contribuire alla produzione di materiale vegetale di carciofo virus-free.

Dalla micropropagazione all'ambientamento

I germogli risanati possono poi essere propagati in camera di crescita utilizzando il substrato di moltiplicazione individuato da Ancora *et al.* (1981) ed efficacemente utilizzato da altri autori (Rey *et al.*, 2003; Cardarelli *et al.*, 2009) per i Romaneschi; per i rifioranti è disponibile il protocollo messo a punto da Morone-Fortunato *et al.* (2005). I rilievi biometrici mettono in evidenza un coefficiente medio di proliferazione di 3,9 con germogli alti almeno 1 cm e senza malformazioni (Cardarelli *et al.*, 2009). Oltre alla definizione del mezzo di coltura appropriato e delle condizioni ambientali ottimali (25°C, fotoperiodo di 16 ore a 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di radiazione fotosinteticamente attiva) per favorire un elevato coefficiente di moltiplicazione, la definizione della tecnica di moltiplicazione *in vitro* implica l'individuazione delle condizioni che possono favorire la radicazione *in vitro* e l'ambientamento in serra ad oggi considerati punti deboli della micropropagazione del carciofo (Pacifici *et al.*, 2007; Castiglione *et al.*, 2009). Cardarelli *et al.* (2009) hanno riscontrato che la formulazione del substrato di radicazione (saccarosio 30 g L⁻¹ e agar 0,6%) durante l'ultima subcoltura *in vitro* è determinante nel modulare la risposta di adattamento all'ambiente *in vivo* e, quindi, la possibilità di sopravvivenza delle piantine di carciofo. È noto infatti come le piante ottenute per micropropagazione siano estremamente vulnerabili durante l'ambientamento in quanto caratterizzate da una morfologia e fisiologia peculiari, determinate da un microambiente in camera di crescita con scarsità di luce, elevata umidità relativa e pronta disponibilità di zucchero nel substrato come fonte

di carbonio; in tale ambiente i tessuti vegetali vivono in condizioni eterotrofiche con scarsa efficienza fotosintetica, malfunzionamento degli stomi e insufficiente protezione delle cere epicuticolari scarsamente depositate sulla parte esterna delle cellule dell'epidermide (Hazarika, 2006). Mentre Apóstolo *et al.* (2005) avevano dimostrato come le modificazioni strutturali che si verificano nel tessuto fogliare durante la fase di radicazione *in vitro* favoriscono la percentuale di sopravvivenza durante l'ambientamento, recentemente Cardarelli *et al.* (2009) hanno confermato che i trattamenti di radicazione *in vitro* influenzano la risposta di ambientamento delle piantine nei primi mesi mentre successivamente non si osservano ulteriori differenze morfologiche a carico delle foglie riconducibili alle precedenti condizioni di crescita *del vitro* (Van Huylenbroeck e Debergh, 1996). La risposta all'ambientamento può essere ottimizzata anche aggiungendo inoculi micorrizici (*Glomus* spp.) con il substrato nei vasi, come dimostrato da Morone Fortunato *et al.* (2005) per i rifioranti. Nella figura 1 sono riportate diverse linee parentali micropropagate.

La moltiplicazione vegetativa in fuori suolo di piante madri risanate

Dopo l'ambientamento, i germogli risanati possono essere coltivati fuori suolo in serra e moltiplicati su larga scala inducendo la produzione dei carducci (Temperini *et al.*, 2000; Colla *et al.*, 2003; Micozzi *et al.*, 2003; Cardarelli *et al.*, 2005a; Albani *et al.*, 2006). Il sistema, *in vivo*, implica che le piante madri maschiofertili e maschiosterili siano mantenute in ambiente protetto in vasi su substrato idoneo (Cardarelli *et al.*, 2005a) e siano previsti trattamenti irrigui e di fertilizzazione tramite impianto a goccia



Fig. 1 - Piantine micropropagate delle linee parentali di carciofo.
Fig. 1 - Micropropagated plants of artichoke parental lines.

(fig. 2). Quando le piante madri hanno sviluppato circa 10 foglie si applica per via fogliare una soluzione di benziladenina (BA), preferibilmente alla dose di 200 mg L⁻¹, per favorire l'emissione dei carducci dalle gemme ascellari. A distanza di una settimana dal trattamento ormonale e a circa 60-70 giorni dall'impianto in vaso delle piante madri si può effettuare la prima capitozzatura ossia l'asportazione della parte epigea della pianta, compresa la gemma apicale, per stimolare lo sviluppo di altri germogli dalle altre gemme presenti sul rizoma (fig. 3). A distanza di 30-40 giorni dalla capitozzatura, i nuovi germogli avranno sviluppato 3-4 foglie con un peso di almeno 30 grammi e potranno essere asportati come nuovi carducci (fig. 4) per favorire, anche in questo modo, l'emissione di ulteriori germogli. I carducci sono privati di parte delle foglie per ridurre le perdite per traspirazione e vengono quindi posti in radicazione su sub-



Fig. 2 - Piantine madri di carciofo in fuori suolo sotto serra.
Fig. 2 - Artichoke stock plants in soilless culture under greenhouse conditions.



Fig. 3 - Emissione di carducci dalla pianta madre capitozzata.
Fig. 3 - Emission of artichoke offshoots from stock plant cut at the base.



Fig. 4 - Carducci raccolti da piante madri.
Fig. 4 - Artichoke offshoots harvested from stock plants.

strato a base di torba e perlite in rapporto 2:1 (fig. 5); per migliorare l'emissione delle radici si consiglia di applicare nel substrato un inoculo micorrizico (*Glomus* spp.) (Morone-Fortunato *et al.*, 2005). Cardarelli *et al.* (2005b) hanno inoltre valutato la risposta agronomica del materiale prodotto evidenziando come la tecnica del fuori suolo non alteri le caratteristiche delle piante madri.

Questa tecnica consente una elevata produzione di parentali in tempi più brevi rispetto alle tecniche che si basano su metodi tradizionali in quanto i carducci possono essere raccolti dalla stessa pianta in tre momenti diversi dell'anno (generalmente novembre, febbraio e maggio-giugno in colture impiantate a fine agosto). Nella figura 6 sono riportati i carducci radicati e pronti per essere trapiantati in campo. Considerando un investimento di 8 piante per metro quadrato e che per ogni ciclo colturale si ottengono in media 4-5 carducci per pianta, praticamente da ogni

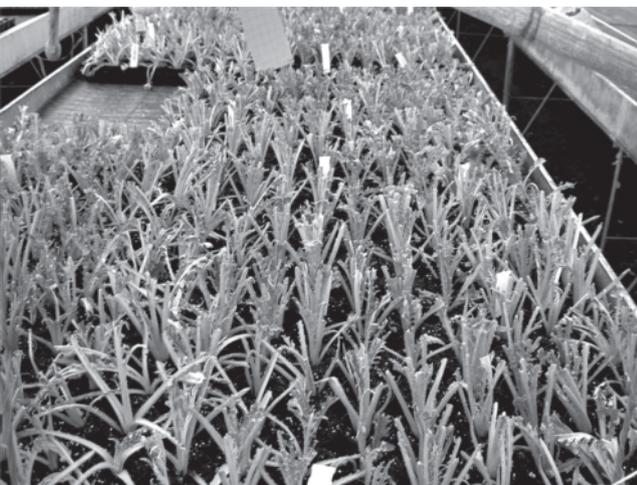


Fig. 5 - Carducci in radicazione.
Fig. 5 - Artichoke offshoots in rooting.



Fig. 6 - Carducci radicati di linee parentali.
Fig. 6 - Rooted artichoke offshoots of parental lines.

metro quadrato utile di serra si ottengono circa 100-120 carducci di parentali maschiofertili e/o maschiosterili per anno (Cardarelli *et al.*, 2005b).

Conclusioni

La possibilità di conciliare insieme i vantaggi della micropropagazione e della tecnica del fuori suolo permette di definire una filiera produttiva di parentali di carciofo per produrre seme ibrido con i seguenti vantaggi: elevata produzione di individui in tempi più brevi rispetto alle altre tecniche vivaistiche tradizionali; elevata qualità sanitaria (piante virus-free) ed uniformità del materiale vegetale anche per il minor numero di subcolture necessarie durante la micropropagazione; convenienza economica del processo di produzione rispetto alla sola micropropagazione o ad altre tecniche di propagazione convenzionali.

Riassunto

A fronte dell'importanza economica del carciofo, la filiera cinaricola presenta ancora alcune criticità che riguardano la produzione vivaistica di materiale vegetale per l'impianto delle carciofaie. Su questa base e considerando l'interesse per il seme ibrido da utilizzare in coltura annuale, è stata definita una filiera di moltiplicazione efficace dei parentali destinati alla produzione del seme ibrido F_1 ; tale tecnica prevede la micropropagazione di genotipi maschiosterili e maschiofertili precedentemente risanati da patogeni e poi l'ambientamento delle piante e la loro coltivazione fuori suolo in serra. Durante la coltivazione in serra, le piante sono trattate a livello fogliare con una citochinina di sintesi (benziladenina) e quindi capitozzate al fine di favorire l'emissione dei carducci. I carducci sono periodicamente raccolti staccandoli alla base dalle piante madri e quindi avviati alla radica-

ne in serra. I carducci radicati maschiosterili e maschiofertili sono quindi utilizzati come parentali per la produzione di seme ibrido F₁.

Parole chiave: *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, ibridi F₁, coltura *in vitro*, carducci, fuori suolo.

Bibliografia

- ALBANI M., ATZORI A., SACCARDO F., MICOZZI F., TEMPERINI O., CARDARELLI M., BARBA M., DI LERNIA G., 2006. *Applicazione in vivaio di una nuova tecnica di propagazione in vivo del carciofo*. Convegno conclusivo Progetto MiPAF "Carciofo", Roma: 58-60.
- ANCORA G., BELLI-DONNINI M.L., CUOZZO L., 1981. *Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid in vitro micropropagation*. Scientia Horticulturae, 14 (3): 207-213.
- APÓSTOLO N.M., BRUTTI C.B., LORRENTE B.E., 2005. *Leaf anatomy of Cynara scolymus L. in successive micropropagation stages*. In Vitro Cell. Dev. Biol. (Plant), 41: 307-313.
- BARBA M., DI LERNIA G., BABES G., CITRULLI F., 2004. *Produzione e conservazione di germoplasma di carciofo di tipo romanesco esente da virus*. Italus Hortus, 11(5): 5-10.
- BASNIZKI J., ZOHARY D., 1994. *Breeding of seed-plants artichoke*. Plant Breeding Rev., 12: 253-268.
- CALABRESE N., STAMIGNA C., MICOZZI F., CAMPION B., 2006. *Propagazione per seme*. Convegno conclusivo Progetto MiPAF "Carciofo", Roma: 38-40.
- CARDARELLI M., ROUPHAEL Y., SACCARDO F., COLLA G., 2005a. *An Innovative Vegetative Propagation System for Large-scale Production of Globe Artichoke Transplants. Part I Propagation System Setup*. HortTechnology, 15(4): 817-819.
- CARDARELLI M., ROUPHAEL Y., SACCARDO F., COLLA G., 2005b. *An Innovative Vegetative Propagation System for Large-scale Production of Globe Artichoke Transplants. Part II Propagation System Validation*. HortTechnology, 15(4): 817-819.
- CARDARELLI M., MONCINI L., COLLA G., 2009. *Radicazione in vitro ed ambientamento del carciofo micropropagato: influenza della concentrazione di saccarosio e di agar nel substrato*. Atti del Convegno "Il vivaismo orticolo: Innovazione e Nuove Esigenze". 11 dicembre 2009, Grugliasco (TO).
- CASTIGLIONE V., CAVALLARO V., DI SILVESTRO I., BARBERA A.C., 2009. *Acclimatization of micropropagated globe artichoke (Cynara cardunculus L. subsp. scolymus (L.) Hegi) plantlets as affected by mycorrhizal inoculum, transplantation time and genotype*. Acta Horticulturae, 812: 461-466.
- COINU R., CART S., URGEGHE P., MULINACCI N., PINELLI P., FRANCONI F., ROMANI A., 2007. *Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke*. Food Chemistry, 101: 524-531.
- COLLA G., MICOZZI F., CARDARELLI M., TEMPERINI O., SACCARDO F., 2003. *Studi sulla radicazione e la frigoconservazione di carducci di carciofo "Romanesco"*. Italus Hortus, 10: 149-151.
- GALLITELLI D., BARBA M., 2003. *Normativa vivaistica in Italia*. Atti Giornate Nazionali di studi sul Carciofo, Vivaismo e strategie di sviluppo del Carciofo, Samassi (Ca) 4-5 dicembre 2003, pp. 47-51.
- HAZARIKA B.N., 2006. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants*. Scientia Horticulturae, 108: 105-120.
- LOMBARDO S., PANDINO G., MAUROMICALE G., KNODLER M., CARLE R., SCHIEBER A., 2010. *Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [Cynara cardunculus L. var. scolymus (L.) Fiori]*. Food Chemistry, 119: 1175-1181.
- MICOZZI F., SACCARDO F., TEMPERINI O., 2003. *Studio di una nuova tecnica di propagazione vegetativa del carciofo*. Atti vivaismo e strategie di sviluppo del carciofo. 4-5 Dicembre, Samassi: 28-31.
- MORONE-FORTUNATO I., RUTA C., CASTRIGNANÒ, A., SACCARDO F., 2005. *The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichoke*. Scientia Horticulturae 106: 472-483.
- PACIFICI S., LUCCHESINI M., CURADI M., GRAIFENBERG A., 2007. *Influence of medium composition and vessel ventilation during the micropropagation stages of Cynara scolymus L. cv. Grato I*. Adv. Hort. Sci., 21 (2): 83-88.
- PANDINO G., LOMBARDO S., MAUROMICALE G., 2011. *Chemical and morphological characteristics of new clones and commercial varieties of globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus)*. Plant Food Hum. Nutr., 66: 291-297.
- PECAUT P., MARTIN F., 1993. *Variation occurring after natural and in vitro multiplication of early Mediterranean varieties of globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Agronomie, 13: 909-919.
- Rey N.A., Papacchioli V., Tavazza R., Pagnotta M.A., 2013. *Gauging the genetic changes occurring across globe artichoke micropropagation towards an appropriate variety registration and nursery* Acta Horticulturae, 156: 121-126.
- SACCARDO F., JORDAN J.R., JORDAN A., CRINÒ P., MICOZZI F., LO BIANCO C., TEMPERINI A., REY N.A., PAGNOTTA M.A., 2013. *Innovative strategy to obtain F1 hybrids of globe artichoke*. Acta Horticulturae, 983: 159-172.
- STAMIGNA C., MICOZZI F., PANDOZY G., CRINÒ P., SACCARDO F., 2004. *Produzione di ibridi F₁ di carciofo mediante impiego di cloni maschiosterili*. Italus Hortus, 11 (5): 29-33.
- TAVAZZA R., LUCIOLI A., BENELLI C., GIORGI D., D'ALOISIO E., PAPACCHIOLI V., 2013. *Cryopreservation in artichoke: Towards a phytosanitary qualified germplasm collection*. Annals of Applied Biology, 163 (2): 231-241.
- TAGLIENTI A., TIBERINI A., BARBA M., 2013. *Cryotherapy: A new tool for the elimination of artichoke viruses*. Journal of Plant Pathology, 95 (3): 597-602.
- TEMPERINI O., MICOZZI F., MARIOTTI R., COLLA G., SACCARDO F., 2000. *Messa a punto di una nuova tecnica di moltiplicazione agamica del carciofo*. L'Informatore Agrario, 26: 54-57.
- VAN HUYLENBROECK J.M., DEBERGH P.C., 1996. *Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of Spathiphyllum plantlets*. Physiologia Plantarum, 96: 298-304.
- ZANIBONI R., 2009. *Ibridi commerciali*. AA.VV. Il carciofo e il cardo. Collana Coltura e cultura. Bayer CropScience. Ed.Script, Bologna, 160.