

Acta Italus Hortus

Atti del

IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione
Un incontro tra gli operatori del settore e della ricerca
VitroSOI2022

Bari, 12-14 ottobre 2022

A cura di
Claudia Ruta e Maurizio Lambardi



Pubblicata dalla Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOI)

Acta Italus Hortus

Pubblicazione della Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI)
Numero 30

Politica editoriale. Acta - Italus Hortus è una collana dedicata agli Atti di convegni organizzati o patrocinati dalla Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI). La pubblicazione degli articoli è sotto la responsabilità dell'Organizzatore del convegno e/o del(i) curatore(i) del volume. I contributi sono di norma in italiano, con un ampio abstract e didascalie di tabelle e figure in lingua inglese. I lavori pubblicati sono soggetti a revisione da parte del Comitato Scientifico ed Editoriale del convegno prima della loro accettazione definitiva per la stampa.

Aims and Scope. Acta - Italus Hortus publishes Proceedings of Conferences organized under the aegis of Italian Society for Horticultural Sciences (SOI). Articles are reviewed by the Scientific Committee of the Conference before final acceptance. The publication of articles is under the responsibility of the Convenor and/or of the Editor(s) of the Conference Proceedings. All contributions appear in Italian with an extended summary, captions and legends in English.

Sintesi della procedura per la pubblicazione di Atti di Convegni su Acta - Italus Hortus

La richiesta di pubblicazione Atti di convegno su Acta - Italus Hortus va inviata al Direttore Responsabile e al Direttore Scientifico e deve includere l'elenco dei componenti del Comitato Scientifico ed editoriale del Convegno e l'indicazione del Curatore degli Atti. La richiesta viene esaminata dal Comitato Scientifico-Editoriale di Italus Hortus, ed accettata sulla base delle informazioni fornite dal Comitato Organizzatore del Convegno e dell'interesse per i soci SOI per la tematica proposta.

Il Comitato Organizzatore del Convegno si impegna a coprire il costo della stampa del numero di Acta - Italus Hortus e a fornire alla Segreteria Editoriale i testi e le figure in formato elettronico, redatti secondo le norme editoriali riportate in terza di copertina e sul sito web della SOI (www.soihs.it). Al Curatore degli Atti saranno inviate le bozze tipografiche per la correzione.

Direttore Responsabile / Managing Editor: Elvio Bellini, Università di Firenze

Direzione Scientifica / Editor: Emilia Caboni, CREA, e Roberta Paradiso, Università di Napoli Federico II

Segreteria Editoriale / Secretary: Francesco Baroncini, Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana

Editore: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI), Firenze

Direzione e Redazione: Viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI); tel. 055.4574067

e-mail: segreteria@soihs.org; sito web: <http://www.soihs.it>

ISBN: 978-88-32054-08-8

Finito di stampare nel mese di febbraio 2024

© 2024 by SOI - Firenze

Atti del

IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione

Un incontro tra gli operatori del settore e della ricerca
VitroSOI 2022



Bari, 12-14 ottobre 2022

Volume a cura di
Claudia Ruta e Maurizio Lambardi

Con il Patrocinio di



Golden sponsor



Silver sponsor



Atti del
IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione
Un incontro tra gli operatori del settore e della ricerca
VitroSOI 2022

Bari, 12-14 ottobre 2022

Comitato scientifico

CARLA BENELLI	CNR-IBE, Sesto Fiorentino
MARGHERITA BERUTO	Istituto Regionale per la Floricoltura, Sanremo
FEDERICA BLANDO	CNR-ISPA, Lecce
GIOVANNA BOTTALICO	Università degli Studi di Bari Aldo Moro
EMILIA CABONI	CREA-OFA, Roma
VALERIA CAVALLARO	CNR-IBE, Catania
GIULIANO DRADI	Battistini Vivai, Cesena
GIANCARLO FASCELLA	CREA-DC, Bagheria
MARIA ANTONIETTA GERMANÀ	Università degli Studi di Palermo
MAURIZIO LAMBARDI	CNR-IBE, Sesto Fiorentino
ANNA MENSUALI	Scuola Superiore di Studi S. Anna, Pisa
MAURIZIO MICHELI	Università degli Studi di Perugia
ROSARIO MULEO	Università degli Studi della Tuscia, Viterbo
ORIANO NAVACCHI	Vitroplant, Cesena
ELIF AYLIN OZUDOGRU	Istinye University Istanbul, Turchia
BARBARA RUFFONI	CREA-OF, Sanremo
EDDO RUGINI	Università degli Studi della Tuscia, Viterbo
CLAUDIA RUTA	Università degli Studi di Bari Aldo Moro
CRISTIAN SILVESTRI	Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Comitato Organizzatore

GIANLUCA BURCHI	CREA-OF, Pescia
LUIGI CATALANO	CIVI ITALIA, Roma
GIUSEPPE DE MASTRO	Università degli Studi di Bari Aldo Moro
MAURIZIO LAMBARDI	CNR-IBE, Sesto Fiorentino
MAURIZIO MICHELI	Università degli Studi di Perugia
CLAUDIA RUTA	Università degli Studi di Bari Aldo Moro
ANNA TAGARELLI	Università degli Studi di Bari Aldo Moro
LUIGI TEDONE	Università degli Studi di Bari Aldo Moro

In ricordo di Mariella Lucchesini



L'ultimo manoscritto di Mariella sull'analisi citofluorimetrica di piante di iris micropropagate è datato 29 maggio 2019... meno di 40 giorni prima della sua scomparsa! Questo dice tutto sul suo impegno e sulla profonda passione per il lavoro che ha svolto per 30 anni nel campo delle colture *in vitro* vegetali. Iniziò subito dopo la laurea in Biologia, sotto la guida esperta di Annarita Leva, a Firenze, e proseguì maturando grande esperienza in importanti aziende floricole private e pubbliche in Liguria ed in Toscana. Dal 1990 ha svolto la sua attività prima presso la Scuola Superiore Sant'Anna e poi presso l'Università di Pisa. In entrambe queste istituzioni il suo lavoro ha dato un impulso decisivo allo sviluppo dei laboratori di colture *in vitro* vegetali di cui è stata punto di riferimento assoluto. La sua grande determinazione l'ha portata a conseguire nel 1997 il dottorato di ricerca e nel 2012 l'abilitazione scientifica nazionale

nel settore AGR04. Nell'ambito delle colture *in vitro* si è dedicata a numerose tematiche, dalla moltiplicazione di orchidee alla produzione di metaboliti secondari in colture cellulari; con l'approccio del ricercatore attento e aperto al futuro, si è dedicata allo sviluppo di innovativi sistemi microponici, studiando la capacità fotosintetica nelle piante coltivate *in vitro*. Innumerevoli gli studenti dei corsi di laurea, sia di Scienze Agrarie che di Farmacia, che ha seguito con passione, pazienza e dedizione nelle tesi di laurea e di dottorato e che, grazie a lei, si sono appassionati al mondo delle piante *in vitro*. A tutti quanti, dagli studenti ai colleghi, con una presenza discreta ma attenta, disponibile all'ascolto e alla collaborazione, non ha mai fatto mancare né il suo consiglio competente, né il suo sorriso. Nella memoria di tutti noi che l'abbiamo conosciuta ed apprezzata, resta il ricordo di una donna libera e di una donna di scienza, un punto di riferimento sicuro, sia umano che scientifico.

Anna Mensuali

In ricordo di Maria Claudia Piagnani



Maria Claudia Piagnani si è laureata in Scienza Agrarie presso l'Università degli Studi di Milano nel 1985, ha frequentato il primo ciclo del dottorato di ricerca in Biologia e Produttività della Pianta Coltivata presso l'Università degli Studi di Milano e l'HR di East Malling in Kent (UK), ottenendone il titolo nel 1989. È stata una pioniera delle colture *in vitro* in Italia, come dimostra la sua tesi di laurea dal titolo "Indagini preliminari sulla micropropagazione del melo", e quella di dottorato sulla ricerca di metodologie per la propagazione e selezione di somacloni di *Castanea* spp. resistenti ad alcune patologie. Da studentessa, per poter svolgere la sua tesi sperimentale, partecipò attivamente all'avviamento operativo del laboratorio di colture *in vitro* per la micropropagazione di specie da frutto e ornamentali presso l'allora Istituto di Coltivazioni Arboree dell'Università degli Studi di Milano, precursore a livello nazionale.

Le principali linee di ricerca di Claudia si collocano nel settore della propagazione *in vitro*, miglioramento genetico, trasformazione genetica delle specie arboree da frutto e da legno, caratterizzazione degli inquinanti batterici delle colture *in vitro* e comprensione dei meccanismi di adattamento alle condizioni di stress nutrizionale e biotico. È stata autrice di più di 70 pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali. La sua lunga attività didattica ha riguardato gli insegnamenti di Frutticoltura, Coltivazioni arboree, Tecnica vivaistica, Miglioramento genetico vegetale *in vitro* per i corsi dell'area delle Scienze Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari. Claudia è stata una fondatrice del Gruppo di Lavoro "Micropropagazione e tecnologie *in vitro*" della SOI e ne è stata un'entusiasta propulsore finché le è stato possibile. Inoltre, molti di noi la ricordano come brillante animatore di molte Giornate Scientifiche della SOI. Di lei ricordiamo, insieme alle eccezionali doti scientifiche e didattiche, alla vivacità intellettuale e culturale, anche il suo carattere esuberante, autoironico e sagace. Venerdì 9 giugno 2023 ci hai lasciato, dopo una lunga e difficile malattia: ci mancherai, Claudia!

Ilaria Mignani e Gabriella De Lorenzis

Atti del IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione

Un incontro tra gli operatori del settore e della ricerca VitroSOI 2022

Sommario

Articoli

Confronto in campo di piante di nocciolo (<i>Corylus avellana</i> L.) micropropagate, innestate e autoradicate	Pag.	15
Daniela Farinelli, Chiara Traini, Adamo de Angelis, Simona Lucia Facchin, Maurizio Micheli, Massimiliano Meneghini, Fabiano Gattabria, Alice Patella, Silvia Portarena, Giuliano Dradi		
Miglioramento della micropropagazione e radicazione <i>ex vitro</i> di gelso nero (accesione “Fontanarossa nera”)	“	20
Andrea Limitone, Irene Granata, Michela Lupo, Maurizio Micheli, Maria Antonietta Germanà, Cristian Silvestri		
Influenza di microrganismi endofiti durante l’acclimatazione <i>ex vitro</i> di piante di kiwi micropropagate	“	25
Michela Lupo, Cristian Silvestri, Valerio Cristofori, Vincenzo Tagliavento, Serena Ciarroni, Giorgio Mariano Balestra, Angelo Mazzaglia		
Innovazione nella micropropagazione e nella conservazione <i>in vitro</i> di pero selvatico (<i>Pyrus pyraster</i> L.)	“	30
Valbona Sota, Brunilda Çuko, Carla Benelli, Efigjeni Kongjika, Maurizio Lambardi		
Micropropagazione del mirto (<i>Myrtus communis</i> L.) mediante coltura convenzionale in substrato gelificato e coltura liquida con bioreattore ElectIS	“	36
Elektra Papakosta, Valbona Sota, Brunilda Çuko, Efigjeni Kongjika, Maurizio Lambardi, Carla Benelli		
Colture <i>in vitro</i> di callo di olivo per la produzione di metaboliti secondari bioattivi	“	42
Federica Blando, Giovanni Colella, Giovanni Mita, Isabella Nicoletti, Enrica Donati		
Identificazione di metaboliti secondari coinvolti nella risposta a radiazione UV-B in cellule in coltura di <i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	“	49
Giulia Santunione, Giuseppe Montevecchi, Andrea Carli, Elisabetta Sgarbi		
Sviluppo di nuove tecnologie <i>in vitro</i> per il miglioramento genetico del castagno e il rilancio della castanicoltura	“	55
Vera Pavese, Andrea Moglia, Silvia Abbà, Anna Maria Milani, Elena Corredoira, Maria Teresa Martínez, Daniela Torello Marinoni, Roberto Botta		
‘Born to be white’: differenti strumenti biotecnologici per l’impiego della tecnologia CRISPR-Cas9 nell’editing genomico del mirtillo gigante	“	60
Giuseppe Vaia, Vera Pavese, Andrea Moglia, Valerio Cristofori, Cristian Silvestri		

Coltura <i>in vitro</i>, sviluppo e ambientamento di piante androgeniche di anemone a supporto del breeding	Pag.	65
Alex Alberto, Paolo Mussano, Mario Rabaglio, Fabio Brusco, Barbara Ruffoni, Marina Laura, Andrea Copetta		
Produzione di ibridi di <i>Hydrangea macrophylla</i> attraverso la tecnica di ovule culture	“	71
Beatrice Nesi, Lisetta Ghiselli, Andrea Mansuino		
Ottimizzazione dei protocolli di embriogenesi somatica e rigenerazione da protoplasti per l'applicazione delle <i>New Plant Breeding Techniques</i> (NPBTs) nel miglioramento genetico della vite	“	76
Lucia Rosaria Forleo, Margherita D'Amico, Maria Francesca Cardone, Flavia Angela Maria Maggiolini, Teodora Basile, Antonella Salerno, Antonio Domenico Marsico, Rocco Perniola, Riccardo Velasco, Carlo Bergamini		
Micropropagazione via embriogenesi somatica di piante di <i>Iris pallida</i> L. e prova di frigoconservazione	“	82
Annalisa Meucci, Rita Maggini, Fernando Malorgio, Beatrice Pezzarossa, Giorgiana Chietera, Anna Mensuali		
Embriogenesi somatica: uno strumento per il risanamento da virus e per l'analisi del chimerismo in vite	“	89
Irene Perrone, Chiara Pagliarani, Floriana Nuzzo, Amedeo Moine, Paolo Boccacci, Luca Nerva, Walter Chitarra, Ivana Gribaudo, Giorgio Gambino		
Effetti di diverse concentrazioni di NaCl applicate su <i>Morus nigra</i> L. attraverso la tecnologia dell'incapsulamento	“	94
Irene Granata, Cristian Silvestri, Maurizio Micheli, Simona Lucia Facchin, Maria Antonietta Germanà		
Studi preliminari per la messa a punto di un protocollo per la micropropagazione di <i>Humulus lupulus</i> L.	“	99
Adriana Viridis, Antonella Sirigu, Silvana Manca, Roberto Pilia, Anna Maria Repetto		
Micropropagazione di <i>Vaccinium myrthillus</i> L. originario dell'Altopiano di Asiago	“	103
Pietro Carraro, Diego Bujazha, Leonardo Bisson, Elena Sgaravatti, Andrea Rigoni, Marina Panozzo, Benedetto Ruperti, Silvia Quaggiotti		
Micropropagazione e conservazione <i>in vitro</i> della specie endemica <i>Forsythia europaea</i> Degen et Bald.	“	108
Efigjeni Kongjika, Valbona Sota		
Germinabilità <i>in vitro</i> e vitalità di polline conservato a diverse temperature in specie arboree da frutto	“	114
Carla Benelli, Edgardo Giordani, Daniele Bonetti, Stefania Nin		
Produzione di fonti primarie di vitigni autoctoni pugliesi	“	119
Leonardo Susca, Giovanna Bottalico, Antonia Campanale, Massimo Morano, Oriana Potere, Pasquale Saldarelli, Raied Abou Kubaa, Pasquale Venerito, Antonia Saponari, Vito Nicola Savino, Pier Federico Lanotte		

Effetto della composizione dell'endosperma artificiale sulla conversione di microtalee incapsulate di luppulo, var. Cascade e Columbus	Pag.	125
Leandra Leto, Simona Lucia Facchin, Chiara Ledda, Maurizio Micheli, Benedetta Chiancone		
Micropropagazione dell'olivo: innovazioni metodologiche nella fase di proliferazione	“	130
Maurizio Micheli, Martina Burnelli, Simona Lucia Facchin, Fabiano Gattabria, Massimiliano Meneghini		
Ottimizzazione di un protocollo di <i>embryo rescue</i> per il miglioramento di uve da tavola apirene (<i>Vitis vinifera</i> L.)	“	137
Angelica Giancaspro, Andrea Mazzeo, Agata Gadaleta, Giuseppe Ferrara		
Dati preliminari di propagazione <i>in vitro</i> di <i>Chimonanthus praecox</i> nell'ambito della identificazione di specie ornamentali multifunzionali e analisi dei metaboliti secondari	“	142
Elena Balzani, Marco Savona, Laura De Benedetti, Valentina Santoro, Valentina Parisi, Valeria Iobbi, Carlo Mascarello, Andrea Copetta, Angela Bisio, Barbara Ruffoni		
La tecnica dell'<i>embryo rescue</i> come strumento per l'ottenimento di nuove varietà di uve da tavola apirene	“	147
Lucia Rosaria Forleo, Antonio Domenico Marsico, Margherita D'Amico, Maria Francesca Cardone, Teodora Basile, Riccardo Velasco, Carlo Bergamini, Rocco Perniola		
Effetto del fluoroglucinolo sulla radicazione <i>in vitro</i> di Tonda Gentile Romana (<i>Corylus avellana</i> L.) e Dundee (<i>C. colurna</i> L. × <i>C. avellana</i> L.)	“	152
Michela Lupo, Valerio Cristofori, Cristian Silvestri		
Embriogenesi somatica diretta da foglie di caffè in differenti stadi di sviluppo	“	156
Patrick Angelo Guarini, Giuseppe Basile, Giuseppe De Mastro, Claudia Ruta		
Moltiplicazione <i>in vitro</i> di <i>Salvia oxyphora</i> Briq., <i>S. karwinskii</i> Benth. e <i>S. discolor</i> Kunth.	“	162
Poonam Devi, Andrea Copetta, Barbara Ruffoni, Angela Bisio		
Tecniche di evoluzione assistita (TEA) per il miglioramento genetico di melo e pero	“	167
Cecilia Domenichini, Paola Negri, Marco Defrancesco, Sara Alessandri, Lorenzo Bergonzoni, Ignazio Verde, Mickael Malnoy, Giovanni A.L. Broggin, Andrea Patocchi, Andreas Peil, Ofere Francis Emeriewen, Luca Dondini, Stefano Tartarini		
Propagazione <i>in vitro</i> di cultivar locali di <i>Castanea sativa</i> Mill. 1768	“	174
Marco Nigro, Vincenzo Di Michele, Anna Sgarella, Luca Colombo		
Ottimizzazione di un protocollo per la micropropagazione di varietà italiane di <i>Cannabis sativa</i> L. per uso medico	“	181
Roberta Paris, Flavia Fulvio, Anna Moschella, Cristina Baldin, Ilaria Alberti		

Valutazione della presenza di batteri endofiti in tessuti di piante micropropagate di quattro portinnesti di <i>Prunus</i>	Pag.	187
Catia Fausto, Alba N. Mininni, Nikolaos I. Katis, Varvara I. Maliogka, Evangelos Ballas, Alkiviadis Diamantopoulos, Christoforos Xylogiannis, Bartolomeo Dichio		
Messa a punto di protocolli di rigenerazione <i>in vitro</i> in <i>Ocimum basilicum</i> cv. FT Italiko, finalizzati al miglioramento genetico via <i>genome editing</i>	“	193
Chiara Forti, Sara Barberini, Marina Laura, Roberto Ciorba, Carlo Mascarello, Annalisa Giovannini, Barbara Ruffoni, Marco Savona		
 Riassunti		
La micropropagazione nel vivaismo frutticolo italiano	“	199
Luigi Catalano		
Vitroplant: esperienze di 40 anni di attività nella micropropagazione industriale dell'olivo e altre piante da frutto	“	200
Oriano Navacchi		
Application of plant cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, production, virus eradication and as a tool for modern breeding techniques	“	201
Bart Panis		
La coltura <i>in vitro</i> delle piante officinali ed esempi di sviluppo commerciale	“	202
Barbara Ruffoni		
Innovazione nell'acclimatazione delle piante da vitrocoltura	“	203
Andrea Vitale		
Somatic embryogenesis: great potential with limited commercial exploitation	“	204
Traud Winkelmann		
Micropropagazione del noce: ottimizzazione delle fasi di immissione, risanamento e radicazione <i>in vitro</i>	“	205
Daniele Vichi, Cecilia Domenichini, Filippo Dalmonte, Paola Negri, Stefano Tartarini		
Propagazione <i>in vitro</i> di <i>Tanacetum cinerariaefolium</i> (Trev.) Schultz-Bip.	“	206
Patrick Angelo Guarini, Giuseppe De Mastro, Claudia Ruta		
Adattabilità del timo toscano alla coltura <i>in vitro</i>: induzione e <i>scale-up</i>	“	207
Waed Tarraf, Tolga Izgu, Gabriele Cencetti, Felicia Mencucci, Eleonora Palagano, Marco Michelozzi, Alfonso Crisci		
Recupero da conservazione a 4°C di mora di rovo (<i>Rubus fruticosus</i>) mediante coltura liquida in immersione temporanea in bioreattore ElecTIS	“	208
Doaa Elazab, Claudio Depaoli, Tommaso Falciani, Maurizio Capuana, Elif Aylin Ozudogru, Maurizio Lambardi		

Studi preliminari sull'incapsulamento di propaguli vitro-derivati di <i>Rubus fruticosus</i> (L.)	Pag.	209
Luca Regni, Simona Lucia Facchin, Antonello Marinotti, Primo Proietti, Maurizio Micheli		
Uso dei protoplasti nel gene editing della vite (<i>Vitis vinifera</i> L.)	“	210
Floriana Nuzzo, Chiara Pagliarani, Amedeo Moine, Paolo Boccacci, Giorgio Gambino, Irene Perrone		
La tecnologia dei protoplasti, strumento indispensabile nell'era del <i>Next Generation Breeding</i>	“	211
Cristian Silvestri, Andrea Limitone, Michela Lupo, Vera Pavese, Giuseppe Vaia		
Biotechnology in biodiversity conservation: an overview of its application for the conservation of the critically endangered conifer <i>Abies nebrodensis</i> (Sicilian Fir) in Sicily	“	212
Tolga Izgu, Carla Benelli, Waed Tarraf, Nourhen Jouini, Maria Antonietta Germanà, Maurizio Lambardi		
Assessment of salicylic acid as a pretreatment on alleviating cadmium toxicity on <i>in vitro</i> banana shoots	“	213
Doaa Elazab, Marwa El-Mahdy, M. Youssef, M.A. Eissa, Ahmed Amro, Maurizio Lambardi		
Germinazione simbiotica e asimbiotica di otto specie di orchidee spontanee incluse nel progetto LIFEorchids	“	214
Andrea Volante, Laura Cornara, Claudia Turcato, Samuele Voyron, Martino Adamo, Mariangela Girlanda, Miriam Bazzicalupo		
La luce e il processo di proliferazione delle colture <i>in vitro</i>	“	215
Rosario Muleo, Ivano Forgione, Alessandra Pellegrino, Valeria Cavallaro		
Interazione pianta-patogeno: caso studio su <i>Mentha arvensis</i> L. e <i>Mentha × piperita</i> L. tramite tecniche di micropropagazione e biosensoristica	“	216
Matteo Caser, Guido Pivaro, Marcello Valente, Kieran Maede, Alan O’Riordan, Paola Maria Chiavazza		
Valorizzazione della biodiversità di ecotipi di carciofo pugliese, mediante risanamento e caratterizzazione molecolare	“	217
Roberta Spanò, Antonia Campanale, Giovanna Bottalico, Tiziana Mascia		
La coltura <i>in vitro</i>, uno strumento utile per lo studio dei biostimolanti: gli essudati di <i>Pantoea agglomerans</i> e la radicazione avventizia in microtalee di pero	“	218
Gabriele Medori, Caterina Valerio, Francesca Luziatelli, Ivano Forgione, Anna Grazia Ficca, Maurizio Ruzzi, Rosario Muleo		
Innesto erbaceo di nocciolo cv. Tonda Francescana® su portainnesto clonale CoCo4® (<i>Corylus colurna</i> L.)	“	219
Katuscia Zuccherelli, Vita Capaccio, Roberto Cappelletti, Daniela Farinelli, Maurizio Micheli, Oriano Navacchi, Giuseppe Zuccherelli		

Ottimizzazione della radicazione <i>in vivo</i> del portainnesto ibrido euro-giapponese Marsol (<i>Castanea sativa</i> × <i>Castanea crenata</i>)	Pag.	220
Giuseppe Zuccherelli, Massimo Bastianelli, Vita Capaccio, Roberto Cappelletti, Oriano Navacchi, Katuscia Zuccherelli		
Germinazione asimbiotica di specie di orchidee italiane per l'alimentazione	“	221
Maurizio Antonetti, Domenico Prisa, Stefania Nin, Ilaria Landi, Gianluca Burchi		
Duplicazione cromosomica in <i>Actinidia chinensis</i> var. <i>Rufopulpa</i>	“	222
Gloria De Mori, Guido Cipriani		
Effetti della qualità della luce sull'accrescimento e la moltiplicazione <i>in vitro</i> di ananas [<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.]	“	223
Valeria Cavallaro, Giancarlo Fascella, Alessandra Pellegrino, Roberto Rapisardi, Anita Ierna		
Messa a punto del processo di propagazione <i>in vitro</i> di carrubo (<i>Ceratonia siliqua</i> L.) in relazione anche alla coltura su un sistema a immersione temporanea	“	224
Valeria Cavallaro, Alessandra Pellegrino, Salvatore La Rosa, Gaetano Giardina, Giancarlo Fascella		
Applicazione dell'embriocoltura per una più veloce produzione di F1 nel miglioramento genetico dell'olivo	“	225
Leonardo Susca, Vito Montilon, Vincenzo Roseti, Giovanna Bottalico, Antonia Campanale, Cinzia Montemurro		
Fattori che influenzano la radicazione <i>in vitro</i> di <i>Juglans microcarpa</i>, un portainnesto per cultivar di <i>J. regia</i> promettente per il controllo di <i>Phytophthora cinnamomi</i>	“	226
Gaia Urbinati, Adele Gentile, Simona Lucioli, Andrea Frattarelli, Emilia Caboni		
Studio della crescita <i>in vitro</i> dell'orchidea <i>Himantoglossum robertianum</i> (Loisel.) P. Delforge: comparazione tra un sistema a immersione temporanea e uno convenzionale	“	227
Elisabetta Sgarbi, Raffaella Ranieri, Giulia Santunione		
La coltura <i>in vitro</i> delle piante da frutto a servizio del risanamento per la qualificazione del materiale vivaistico	“	228
Giorgio De Paoli, Elena Tura, Pierluigi Lucchi		
Prove di risanamento di varietà antiche di crisantemo da fiore reciso	“	229
Andrea Copetta, Paolo Mussano, Laura Miozzi, Manuela Pamato, Pasquale Restuccia, Daniele Marian, Gianluca Vinci, Anna Maria Vaira		
Allestimento in coltura <i>in vitro</i>, moltiplicazione e radicazione per la propagazione e conservazione di varietà e accessioni della biodiversità olivicola	“	230
Muhammad Ajmal Bashir, Samanta Zelasco, Amelia Salimonti, Kamel Atrouz, Valerio Cristofori, Cristian Silvestri		

Ottimizzazione del protocollo di micropropagazione per diverse cultivar di nocciolo presso Battistini Vivai	Pag.	231
Massimiliano Meneghini, Fabiano Gattabria, Alice Patella, Gianluca Magnani, Eva Herrmannová, Romano Roncasaglia, Giuliano Dradi		
Studio di un protocollo di micropropagazione per il recupero di accessioni di mandorlo a fioritura tardiva	“	232
Michela Lupo, Vera Pavese, Cristian Silvestri, Antonella Minandri, Eddo Rugini, Valerio Cristofori		
Embriogenesi somatica per l'editing genetico in <i>Vitis vinifera</i> (cv. Aglianico e Primitivo)	“	233
Adriana Lucia Stigliani, Vitale Nuzzo, Giovanni Giorio, Caterina D'Ambrosio		
New developments in the micropropagation and selection of <i>Corylus colurna</i> clonal rootstocks towards the improvement of hazelnut yield	“	234
Doaa Elazab, Claudio Todeschini, Giuliano Dradi, Romano Roncasaglia, Massimiliano Meneghini, Fabiano Gattabria, Alice Patella, Maurizio Lambardi		
Colture <i>in vitro</i> e rigenerazione in carota di Polignano	“	235
Claudia Ruta, Simona Ancona, Anna Tagarelli, Federica Blando		
Micropropagazione di varietà di <i>Cannabis sativa</i> L. subsp. <i>ruderalis</i>	“	236
Giuseppe Basile, Giuseppe De Mastro, Claudia Ruta		
Coltura <i>in vitro</i> di due Lamiaceae da fiore edule: <i>Agastache aurantiaca</i> e <i>A. mexicana</i>	“	237
Andrea Copetta, Paolo Mussano, Poonam Devi, Angelo Lanteri, Ilaria Marchioni, Laura Pistelli, Angela Bisio, Marco Savona, Barbara Ruffoni		
Morphophysiological response of <i>in vitro</i> sugar cane plants (<i>Saccharum</i> spp. <i>Hybrids</i>) with sodium silicate (Na_2SiO_3)	“	238
Gael F. García-Merino, Gianluca Burchi, Otto R. Leyva-Ovalle, Noé Aguilar-Rivera, Juan V. Hidalgo-Contreras, Marco A. Ramírez-Mosqueda		
<i>In vitro</i> effect of silicon on vanilla plants (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks.) under water stress conditions	“	239
Arturo A. Armas Silva, Gael F. García Merino, Joaquín Murguía González, Marco V. Rodriguez Demeneghi, Pablo Andres Meza, Marco A. Ramírez Mosqueda		

Presentazione

Il Gruppo di Lavoro SOI ‘Micropropagazione e tecnologie in vitro’ e il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti dell’Università degli Studi di Bari Aldo Moro hanno organizzato il “IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione: un incontro tra gli operatori di settore e della ricerca – VitroSOI 2022”, un evento prestigioso che ha seguito le precedenti edizioni di Legnaro (2008), Sanremo (2011) e Pescia (2017).

VitroSOI 2022 si è articolato in cinque sessioni e sei relazioni ad invito di studiosi di livello internazionale, su tematiche particolarmente innovative. Le giornate del Convegno hanno rappresentato un’occasione di aggiornamento e scambio di conoscenze interdisciplinari nel settore della micropropagazione con l’intento di stimolare il confronto e la collaborazione tra addetti ai lavori del comparto del vivaismo orto-floro-frutticolo e dell’imprenditoria di settore, rivolgendosi sia al mondo della ricerca che a quello della produzione.

Un elemento di novità di questa IV edizione è stata la Tavola Rotonda sul tema della formazione professionale nella micropropagazione, che ha visto confrontarsi esperienze italiane ed internazionali sull’importanza della richiesta di professionalità specifiche, favorendo un’interazione sistematica ed efficace con il mondo del lavoro per la progettazione e/o il miglioramento dei corsi di studio dedicati.

L’attenzione degli Organizzatori si è rivolta in particolare alla partecipazione di giovani ricercatori, dottorandi, assegnisti, borsisti e studenti, finalizzata a creare nuovi stimoli nel settore, in perfetto allineamento con le esigenze professionali rivolte alla formazione, ricerca e mondo produttivo. A tal fine sono stati assegnati 4 premi, finanziati dall’Università degli Studi di Bari Aldo Moro, a giovani ricercatori per le migliori comunicazioni orali e poster.

Al Convegno hanno partecipato oltre 140 persone, con una importante presenza internazionale, rappresentata da Albania, Belgio, Egitto, Germania, Grecia, Messico, Siria, Spagna, Turchia. Il Programma del Convegno, con 34 Comunicazioni Orali e 40 Poster, si è articolato in Sessioni che hanno affrontato le seguenti tematiche: (1) Protocolli di micropropagazione, (2) Coltura liquida, semi sintetici, metaboliti secondari, (3) Colture *in vitro* applicate alla biologia molecolare, (4) Embriogenesi somatica nella conservazione e nel miglioramento genetico, (5) Effetto di fattori biotici ed abiotici nelle colture in vitro.

Un caloroso ringraziamento alle numerose aziende che hanno contribuito alla realizzazione dell’evento con le loro sponsorizzazioni, agli Enti che l’hanno patrocinato e ai colleghi del Comitato Scientifico e Organizzatore che hanno condiviso e attivamente sostenuto le finalità del IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione.

Grazie a tutti i partecipanti.

Claudia Ruta e Giuseppe De Mastro

Saluto dei Coordinatori del Gruppo di Lavoro SOI ‘Micropropagazione e tecnologie in vitro’

La pubblicazione del volume di *Acta Italus Hortus* (collana ufficiale della Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana), contenente 33 articoli e 41 riassunti, è l'ultimo atto del IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione: un incontro tra gli operatori del settore e della ricerca - VitroSOI 2022, tenutosi presso l'Università degli Studi di Bari Aldo Moro nei giorni 12-14 ottobre 2022.

Il Convegno Nazionale, certamente l'evento più importante del Gruppo di Lavoro SOI “Micropropagazione e tecnologie in vitro”, è stato eccellentemente organizzato da Claudia Ruta e Giuseppe De Mastro. Giunto dopo il lungo e oscuro periodo del Covid, durante il quale ogni attività convegnistica è stata impedita, il Convegno di Bari ha ribadito il piacere e l'utilità, scientifica e professionale, di ritrovarsi insieme, in presenza, a discutere e approfondire argomenti legati agli aspetti sia scientifici, sia applicativi della micropropagazione. Alle tre giornate di lavori hanno partecipato oltre 140 tra ricercatori, studenti, manager di laboratori commerciali, operatori del settore e appassionati di colture *in vitro*. Ben 15 gli sponsor al Convegno che, doverosamente, occorre ricordare: Battistini Vivai, SETIS, Agrochimica, Mignano e Seneco (Golden Sponsor), nonché Apice Piante, c-led, Denkenitalia, Lapietra, Meristema, MicroFruit, Microplant, Micropoli, Vivai Milone, Vitroplant (Silver Sponsor). Dando seguito alle prerogative del Gruppo di Lavoro e a quanto già accaduto nelle precedenti edizioni del Convegno, gli organizzatori hanno fortemente voluto promuovere la partecipazione di giovani dottorandi, assegnisti, borsisti, contrattisti o semplici studenti, istituendo un premio riservato alle quattro migliori comunicazioni, due orali e due poster, certi che questo settore sia in grado di garantire occupazione nei settori della ricerca e della produzione, come dimostrato, in quest'ultimo caso, dalla sempre elevata numerosità dei laboratori commerciali, di frequente affidati alla responsabilità di giovani manager. E la storia del nostro Convegno Nazionale non si ferma: è infatti già “in costruzione” la V edizione del Convegno Nazionale che si terrà presso l'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo dal 14 al 16 ottobre 2024, con Convenor Cristian Silvestri. Tutti i membri del Gruppo di Lavoro saranno puntualmente informati sull'evento che, ne siamo sicuri, rinnoverà in tutti noi il desiderio di incontrarci.

Per finire, un sincero ringraziamento agli autori degli articoli di questo volume che, con il loro contributo, ne hanno permesso la realizzazione.

Arrivederci a Viterbo a VitroSOI 2024!!

Maurizio Lambardi e Maurizio Micheli
Coordinatori del GdL SOI
“Micropropagazione e tecnologie in vitro”

Articoli

Confronto in campo di piante di nocciolo (*Corylus avellana* L.) micropropagate, innestate e autoradicate

Daniela Farinelli¹, Chiara Traini^{1*}, Adamo de Angelis¹, Simona Lucia Facchin¹, Maurizio Micheli¹, Massimiliano Meneghini², Fabiano Gattabria², Alice Patella², Silvia Portarena³, Giuliano Dradi²

* trainichiara@gmail.com

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università di Perugia

² Vivai Piante Battistini Società Agricola S.S, Cesena (FC)

³ Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Porano (TR)

Riassunto

La propagazione del nocciolo in Italia avviene, tradizionalmente, dai polloni, e sempre di più attraverso la micropropagazione e per innesto su portainnesto non pollonifero. Per la prima volta, in uno stesso ambiente, sono state confrontate piante micropropagate con piante innestate e autoradicate (pollone) di quattro varietà. I risultati, dopo tre anni di crescita, indicano che le piante micropropagate sono più piccole all'impianto, ma si sviluppano rapidamente. Le piante da pollone hanno minore uniformità e maggiori fallanze. In tutte le tre tipologie di piante, al terzo anno di sviluppo, sono presenti frutti.

Parole chiave: Tonda Gentile delle Langhe, Tonda di Giffoni, Tonda Romana, Tonda Francese[®]

Comparison in the field of micropropagated, grafted and own-rooted hazelnut plants

Abstract: Three different types of hazelnut plants, from four Italian high-quality cultivars (Tonda di Giffoni, Tonda Gentile delle Langhe, Tonda Romana and Tonda Francese[®]) were obtained by layering, micropropagation and grafting, and compared, in order to evaluate their vegetative and productive parameters from the plantation, as well as their adaptation to the environment. Tree height, canopy volume, trunk diameter and yield per each studied tree were measured during the growing seasons of 2020, 2021 and 2022. The planting period dates back to January 2020. The obtained results indicated that the micropropagated plants, although smaller at plantation, showed a rapid growth rate in terms of diameter and height and showed greater uniformity. On the contrary, considering the planting period, own-rooted plants, showed less uniformity, in terms of diameter and height, and the highest number of dead plants. The grafted plants, resulted to be higher than the two other types in all the studied period and have not showed death of plants. All the types of hazelnut plants started to produce fruits at the end of the third growing season.

Keywords: Tonda Gentile delle Langhe, Tonda di Giffoni, Tonda Romana, Tonda Francese[®]

Introduzione

Tradizionalmente, la propagazione del nocciolo (*Corylus avellana* L.), in Italia, era eseguita dagli stessi agricoltori attraverso l'utilizzo di polloni prelevati da "piante madri vigorose" selezionate negli appezzamenti (Bacchetta et al., 2008). Attualmente, il nocciolo viene propagato principalmente per margotta di ceppaia, ma la necessità di un numero elevato di piante madri rende difficile assicurare che il materiale di propagazione sia sano (per esempio, trasmissione di batteri o virus). Diversi metodi di propagazione sono stati sviluppati, nel tempo, come l'innesto, utilizzando portainnesti non polloniferi, o, più recentemente, la micropropagazione (Damiano et al., 2005; Prando et al., 2014; Silvestri et al.,

2020). Nonostante sia sempre più diffusa la necessità di coltivare la pianta con forma ad alberello a singolo tronco (Miletic et al., 2009; Cerović et al., 2009), l'innesto, per il nocciolo, non è ancora considerata una pratica comune e ciò è dovuto principalmente all'elevato costo della tecnica di propagazione (Tombesi et al., 2015; Rovira, 2021). Per quanto riguarda la micropropagazione, essa garantisce la produzione di materiale sano e di origine geneticamente certa ed è un metodo valido per la moltiplicazione in ampia scala di materiale certificato e di nuove cultivar ottenute dai programmi di selezione (es. Tonda Franciscana[®]) (Bacchetta et al., 2008; Prando et al., 2014; Silvestri et al., 2020). La micropropagazione del nocciolo è di fatto un'alternativa alle tradizionali tecniche di propagazione usate per questa specie (Nas et al., 2004).

Per il nocciolo, i confronti in campo sono stati precedentemente svolti da Portarena e collaboratori (2022) e da Rovira e collaboratori (2022) che hanno studiato piante autoradicate e innestate in Italia e in Spagna. Ad oggi, non sono stati effettuati studi di comparazione su piante di nocciolo ottenute con tecniche di propagazione tradizionali e mediante micropropagazione, per indagare eventuali differenze in termini di crescita vegetativa e produttività.

Per valutare l'influenza della tecnica di propagazione sullo sviluppo vegeto-produttivo di noccioli propagati per innesto, per margotta di ceppaia e micropropagazione, appartenenti a quattro delle più importanti varietà italiane di nocciolo di alta qualità (Tonda Romana, Tonda di Giffoni, Tonda Gentile delle Langhe e Tonda Franciscana[®]) è stato condotto uno studio nel periodo compreso tra il 2020 e il 2022, dall'impianto fino al terzo anno di sviluppo.

Materiali e metodi

Questo studio preliminare è stato condotto su nocciolo realizzato presso il campo sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università di Perugia, in Centro Italia (42°58'22.82"N, 12°24'13.02"E) con schema sperimentale a parcella suddivisa, dove la finalità principale era rappresentata dal confronto tra piante propagate con tre metodi diversi e, secondariamente tra quattro diverse varietà. L'impianto è stato realizzato nel febbraio 2020, con una densità d'impianto di 714 piante per ettaro. I parametri vegeto-produttivi sono stati misurati durante le stagioni vegetative del 2020, 2021 e 2022. In particolare, nel primo anno, sono stati misurati l'altezza delle piante e il diametro del tronco, su piante non potate. Poi, dalla seconda stagione di crescita in poi, l'altezza, la larghezza e lo spessore della chioma sono stati utilizzati per calcolarne il volume, assimilandone la forma a un cilindro secondo Farinelli et al. (2004). Ogni anno sono state registrate le fallanze di piantagione, cioè la percentuale di piante morte rispetto al totale, calcolata per ogni varietà e tipologia di pianta. L'ultimo parametro misurato è stata la resa produttiva, a partire dal terzo anno dopo la piantagione. La produzione è stata determinata, per ogni pianta, pesando i frutti prodotti ed espressa in kg di nocciole per pianta. I dati delle diverse tipologie di piante sono stati statisticamente analizzati con ANOVA e le medie sono state confrontate utilizzando il test Student-Newman-Keuls.

Risultati

Le piante micropropagate hanno mostrato valori significativamente inferiori di altezza e diametro del tronco rispetto agli altri due tipi di piante (da innesto e autoradicazione) durante il primo anno di crescita dopo il trapianto, ma alla fine del terzo anno non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i tre tipi di piante (Fig. 1). Nel primo anno di crescita, solo le piante autoradicate hanno mostrato fallanze di piantagione, con una percentuale dell'8,3%; in particolare, le varietà che hanno mostrato fallanze importanti sono state Tonda Gentile delle Langhe (22,2%) e Tonda Romana (11,1%). Inoltre, all'impianto, le piante micropropagate erano più uniformi: infatti il 70,8% delle piante erano nella classe di dimensioni tra 40-60 centimetri di altezza. Nelle stagioni vegetative successive, l'altezza delle piante micropropagate ha raggiunto i valori delle altre, mantenendo l'uniformità (Fig. 1).

I valori di volume della chioma e della larghezza, riportati in Fig. 2, sono riferiti alla seconda e alla

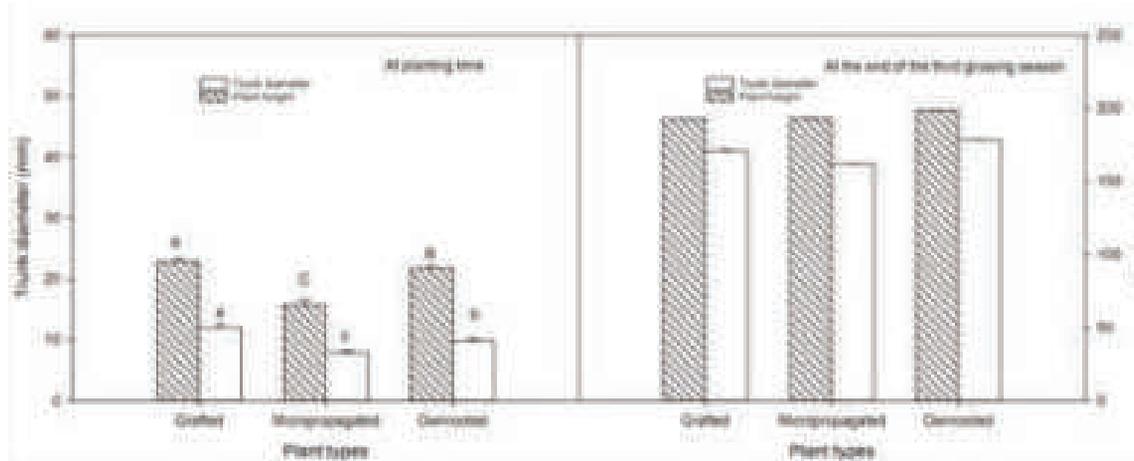


Fig. 1. Caratteristiche dei diversi tipi di pianta al momento dell'impianto (a sinistra) e alla fine della terza stagione di crescita (a destra). Le colonne con lettere diverse sono statisticamente diverse per $p < 0.05$.

Fig. 1. Characteristics of the different types of plant at planting time (left) and at the end of third growing season (right). Columns with different letters are statistically different for $p < 0.05$.

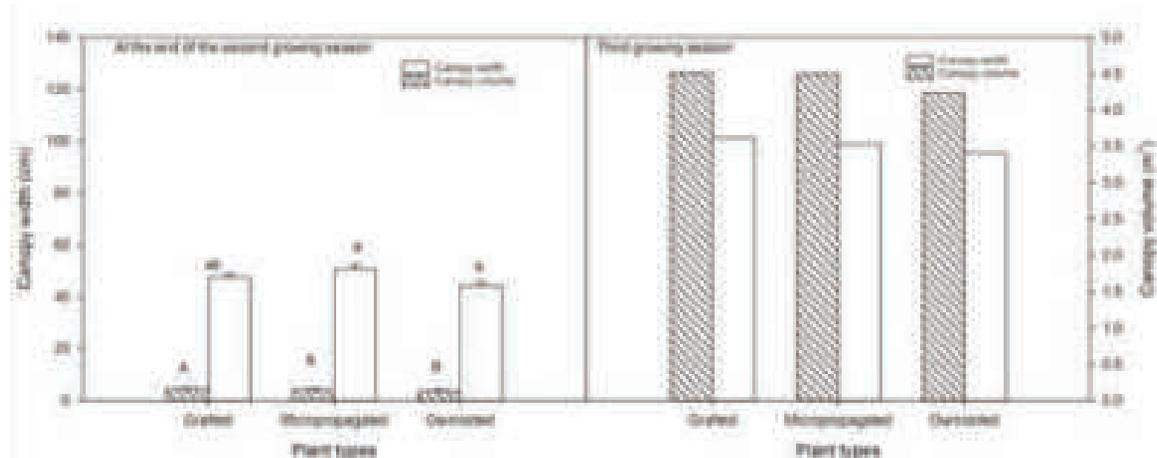


Fig. 2. Caratteristiche dei diversi tipi di pianta alla fine della seconda stagione di crescita (a sinistra) e alla fine della terza stagione di crescita (a destra). Le colonne con lettere diverse sono statisticamente diverse per $p < 0.05$.

Fig. 2. Characteristics of the different types of plant at the end of the second growing season (left) and at the end of third growing season (right). Columns with different letters are statistically different for $p < 0.05$.

terza stagione di crescita. Nella seconda stagione il volume delle chiome delle piante micropropagate, indipendentemente dalla varietà, era significativamente superiore a quello delle piante autoradicatee non differente da quello delle piante innestate. Al terzo anno non sono state rilevate differenze tra le chiome nelle tre tipologie di pianta (Fig. 2). Considerando, invece, la larghezza della chioma questa risulta essere significativamente maggiore nelle piante micropropagate, rispetto a quelle innestate e autoradicate, al secondo anno di piantagione. Al contrario, al terzo anno di piantagione, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra le tipologie.

I risultati inerenti alla fase riproduttiva riportati in Fig. 3 hanno evidenziato come tutti i tipi di piante di nocciolo hanno iniziato a produrre frutti alla fine della terza stagione di sviluppo con differenze tra le cultivar selezionate. In particolare, nelle piante innestate la cultivar che ha prodotto la maggiore quantità di frutti è stata la Tonda Franciscana, seguita dalla Tonda di Giffoni e dalle altre due varietà; lo stesso è stato osservato nelle piante autoradicate. Tra le piante micropropagate, invece, la Tonda di Giffoni e la Tonda Franciscana hanno prodotto più delle altre due cultivar (Fig. 3).

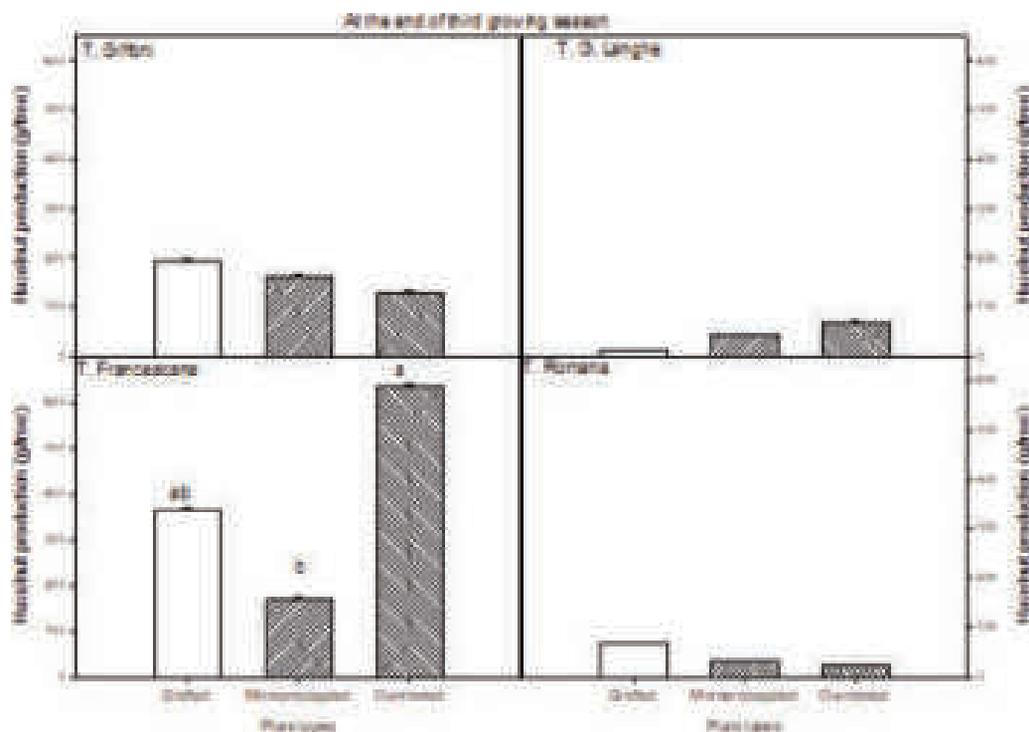


Fig. 3. Produzione di nocciole da diversi tipi di piante alla fine della terza stagione di crescita in ogni cultivar studiata. Le colonne con lettere diverse sono statisticamente diverse per $p < 0.05$.

Fig. 3. Hazelnut production from different types of plant at the end of third growing season in each studied cultivar. Columns with different letters are statistically different for $p < 0.05$.

Discussione e conclusioni

Sebbene questo sia il primo studio in cui vengono confrontati gli accrescimenti e le produzioni di piante di differenti varietà di nocciolo ottenute mediante tre diversi metodi di propagazione, altri lavori mostrano che in altre specie le performances migliori conseguite in campo sono attribuibili alle piante micropropagate, come nel *Rubus* (Leposavic et al., 2016). Nel cachi giapponese (*Dyospiros kaki* L. cv. Nishimurawse), le piante micropropagate hanno mostrato maggiore vigore, crescita più veloce e più uniformità (Tetsumura et al., 2004). In questo studio si è osservato che le piante micropropagate generalmente, più piccole alla piantagione, si sviluppano rapidamente sia in termini di diametro che di altezza complessiva della pianta. Infatti, alla fine della terza stagione di crescita queste hanno raggiunto lo stesso volume della chioma delle piante ottenute con altri metodi di propagazione (innesto e autoradicazione); inoltre hanno mostrato una maggiore uniformità e producono frutti come negli altri casi. Le falanze sono state osservate solo nelle piante autoradicate. Occorre, tuttavia, osservare che al terzo anno di sviluppo non è ancora possibile determinare se vi siano o meno differenze nell'efficienza produttiva degli impianti di nocciolo con piante micropropagate rispetto a quelli realizzati con materiale da ceppaia o innestato e ulteriori studi sono in corso.

Bibliografia

- Bacchetta L., Aramini M., Bernardini C., Rugini E., 2008. In vitro propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources. *HortScience*, 43(2): 562-566.
- Cerović S., Ninić-Todorović J., Gološin B., Ognjanov V., Bijelić S., 2009. Grafting methods in nursery production of hazelnut grafted on *Corylus colurna* L. *Acta Horticult.*, 845: 279-282.

- Damiano, C., Catenaro, E., Giovinazzi, J., Frattarelli, A., Caboni, E., 2005. Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Acta Hort.* 686: 221-226.
- Leposavić A., Ružić D., Karaklajić-Stajić Z., Cerović R., Vujović T., Žurawicz E., Mitrović O., 2016. Field performance of micropropagated *Rubus* species. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15(5): 3-14.
- Miletić R., Rakicević M., Mitrović M., Pesaković M., 2009. Physiological and pomological properties of the hazelnut grafted on *Corylus colurna* L. seedling. *Acta Horticult.*, 825:191–194.
- Nas N. M., Read P.E., 2004. Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots. *HortScience*, 39(7):1688-1690.
- Portarena S., Gavrichkova O., Brugnoli E., Battistelli A., Proietti S., Moscatello S., Farinelli D., 2022. Carbon allocation strategies and water uptake in young grafted and own-rooted hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Tree Physiology*, 42(5): 939-957.
- Prando M. S., Chiavazza P., Faggio A., Contessa C., 2014. Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticult.*, 171: 91-94.
- Rovira M., Hermoso J.F., Rufat J., Cristofori V., Silvestri C., Romero A., 2022. Agronomical and physiological behavior of spanish hazelnut selection “Negret-N9” grafted on non-suckering rootstocks. *Frontiers in Plant Science*, 1,12: 813902.
- Rovira M., 2021. Advances in hazelnut (*Corylus avellana* L.) rootstocks worldwide. *Horticulturae*, 7(9): 267.
- Silvestri C., Rugini E., Cristofori V., 2020. The effect of CuSO₄ for establishing in vitro culture, and the role nitrogen and iron sources in in vitro multiplication of *Corylus avellana* L. cv. Tonda Gentile Romana. *Plant Biosystems* 154(1): 17-23.
- Tetsumura T., Koyanagi Y., Ito S., Habu T., Kawase K., 2004. Comparative field performance of mature japanese persimmon trees grafted on seedling rootstock vs. micropropagated ones. *Japanese Society for Horticultural Science*, 73(2): 134-136.
- Tombesi S., Palliotti A., Poni S., Farinelli D., 2015. Influence of light and shoot development stage on leaf photosynthesis and carbohydrate status during the adventitious root formation in cuttings of *Corylus avellana* L. *Frontiers in Plant Science*, 6: 973.

Miglioramento della micropropagazione e radicazione *ex vitro* di gelso nero, accessione “Fontanarossa nera”

Andrea Limitone^{1*}, Irene Granata², Michela Lupo¹, Maurizio Micheli³, Maria Antonietta Germanà², Cristian Silvestri¹

* andrea.limitone@unitus.it

¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF), Università di Palermo

³Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (DSA3), Università di Perugia

Riassunto

Il gelso (*Morus* spp.) è una pianta arborea da frutto di elevata importanza economica e viene di solito propagato per talea o per innesto. La micropropagazione rappresenta ad oggi la strategia migliore per una moltiplicazione rapida per la produzione di materiale sano. In questo studio è stato ottimizzato un protocollo di moltiplicazione, radicazione *ex vitro* e acclimatazione per il genotipo “Fontanarossa nera” (*Morus nigra* L.). È stato studiato l’effetto dei sali minerali di Murashige e Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) e Driver e Kuniyuki Walnut Medium (DKW), e di diverse concentrazioni di citochinine quali la 6-benzilamminopurina (BAP) e la [6-(3-hydroxybenzylamino) purina] (meta-topolina - mT). I germogli così ottenuti sono stati sottoposti a radicazione *ex-vitro*, valutando l’effetto di due diverse illuminazioni LED (Valoya LED Grow Lights, Valoya Oy, Helsinki Finland): G2, ricca in rosso e rosso lontano, e NS1, ricca in blu e verde.

Parole chiave: *Morus nigra* L., moltiplicazione, acclimatazione, qualità della luce

Improvement of micropropagation and *ex vitro* rooting of black mulberry (“Fontanarossa nera” accession)

Abstract: Mulberry (*Morus* spp.) is a species of high economic importance due to its many uses, ranging from the consumption of the fruit, which is very rich in antioxidants, to the silk industry, and in woodworking for the excellent quality of the wood. Mulberry is usually propagated by cuttings or grafting, but it is often characterized as being rather recalcitrant to rooting. Micropropagation could be a good choice for rapid multiplication to produce healthy material. In this study, a multiplication, *ex vitro* rooting, and acclimatization protocol was optimized for the genotype “Fontanarossa nera” (*Morus nigra* L.). The effect of the basal salts: Murashige and Skoog (MS) Medium, Woody Plant Medium (WPM) and Driver and Kuniyuki Walnut (DKW) Medium, supplemented with 20 g/L sucrose and with different concentrations of the cytokinins 6-benzylaminopurine (BAP) or [6-(3-hydroxybenzylamino) purine] (meta-topolin) have been studied, with the aim to determine the best combination among the formulation of basal salts and the growth regulator concentrations. Both morphological (new shoots, shoot length, number of nodes) and physiological (% dry matter, chlorophylls, carotenoids) traits have been evaluated. The shoots obtained were used to set up *ex vitro* rooting, and the effect of two LED (light emitting diodes) light sources was studied: NS1 (high composition in blue and green and low composition in far red) and G2 (strong presence of red and far-red, with low percentages of blue and green). After 5 weeks, the rooting and acclimatization traits of the young plantlets were evaluated. Results showed that MS medium basal salts was the most effective. Among the growth regulators, meta-topolin at the concentration of 5 μ M resulted the most effective and it is proposed as a viable alternative to the most used BAP with a view to a highly efficient and economically sustainable propagation protocol. In addition, the use of LED light sources rich in red and far-red during the *ex vitro* rooting-acclimatization

phase is proposed as an alternative to the more traditional use of auxins, to reduce the cost and the timing of the process, combining two very delicate phases into one.

Keywords: *Morus nigra* L., multiplication, acclimatization, light quality

Introduzione

Il gelso nero (*Morus nigra* L.) è una specie arborea da frutto caratteristica della biodiversità mediterranea. La propagazione del gelso viene effettuata mediante le convenzionali tecniche di innesto e talea. Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi protocolli per la micropropagazione di diverse specie appartenente al genere *Morus*, tutti accomunati dall'utilizzo di fitoregolatori quali la benzilamminopurina (BAP), o il thidiazuron (Larekeng et al., 2021; Litwińczuk e Jacek, 2020; Memete et al., 2022).

Questa specie non sembra presentare importanti difficoltà di moltiplicazione *in vitro*; tuttavia, come per molte specie arboree da frutto, il successo di questa tecnica è genotipo-dipendente.

La meta-topolina è una citochinina aromatica di sintesi che sembra avere effetti positivi sul tasso di moltiplicazione dei germogli, sul mantenimento della stabilità genetica e soprattutto sull'efficienza di radicazione e di ambientamento *ex vitro* (Amoo et al., 2011). La citochinina come la BAP utilizzata durante la fase di moltiplicazione, tende ad avere effetti inibitori sulla radicazione e sull'ambientamento, probabilmente a causa della formazione di prodotti di degradazione che risultano tossici. La meta-topolina invece, a causa del gruppo ossidrilico che la caratterizza, viene glicosilata e non viene degradata a metaboliti tossici (Werbrouck et al., 2008). Questa caratteristica si ripercuote positivamente sulla fase di radicazione e di acclimatazione, abbattendo i costi di gestione di queste due fasi delicate (Aremu et al., 2012; Magyar-Tábori et al., 2001).

In questo lavoro è stato studiato un protocollo di micropropagazione di *Morus nigra* L. "Fontanarossa Nera", genotipo locale Siciliano, mediante l'impiego di diversi sali e fitoregolatori durante la fase di moltiplicazione *in vitro* e di una fase di radicazione diretta *ex vitro* caratterizzata dall'utilizzo di due diverse illuminazioni LED.

Materiali e Metodi

Sono stati inizialmente impiegati espianti micropropagati di *Morus nigra* L. accessione Fontanarossa nera, stabilizzati *in vitro* e subcolturali ogni 28 giorni. Per le subcolture e per le prove, di seguito descritte, sono stati utilizzati vasi in vetro da 500 mL contenenti ciascuno 100 mL di terreno di coltura. Al termine del ciclo di subcoltura delle prove (28 gg) sono stati rilevati i parametri morfometrici ed ecofisiologici. In particolare, si è valutato il numero di nuovi germogli, il numero dei nodi e l'altezza e il peso medio dei singoli espianti fresco e secco (PF e PS). Per quanto riguarda i parametri eco-fisiologici, sono state indicizzate le clorofille, i flavonoli, gli antociani, espressi in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, e il Nitrogen Balance Index (NBI), risultante del rapporto tra clorofille e flavonoli, che fornisce un rapporto tra metabolismo primario e secondario, mediante lo strumento Dualex®.

Regolatori di crescita

È stato valutato l'effetto delle citochinine BAP e mT alle concentrazioni di 2, 5 e 7 μM . Le due citochinine sono state addizionate ad un terreno base di moltiplicazione composto da sali MS, 20 g/L di saccarosio, 0,5 μM IBA e Agar (B&V Italia), 6 g/L. Il pH è stato aggiustato a 5,8 prima della sterilizzazione in autoclave.

Sali minerali

Sono stati valutati i sali commerciali (macroelementi, microelementi e vitamine) dei terreni di coltura DKW, MS e WPM. I substrati sono stati addizionati di mT, 5 μM e IBA 0,5 μM , quale migliore combinazione di fitoregolatori osservata dalle prove precedenti, e di 6 g/L di Agar (B&V Italia). Il pH è stato aggiustato a 5,8.

Radicazione ex vitro – acclimatazione

Gli espianti sono stati prelevati da germogli in moltiplicazione dopo 4 settimane, e posti in radicazione in condizioni *ex vitro* in contenitori alveolari QPD144 QuickPot (HerkuPlast-Kubern, Germania) con terriccio commerciale Brill® TypicalTonerde 3 senza l'aggiunta di ormoni. Gli espianti sono stati posti in camera di crescita con due diverse illuminazioni LED (Valoya LED Grow Lights, Valoya Oy, Helsinki Finland): G2, ricca in rosso e rosso lontano, e NS1, ricca in blu e verde. Dopo 5 settimane, sono stati effettuati dei rilievi riguardanti lo sviluppo dell'apparato radicale mediante il software WinRHIZO™, e i parametri ecofisiologici con lo strumento DUALEX®.

Analisi statistica

I dati acquisiti durante i rilievi sono stati sottoposti ad analisi della varianza (one-way ANOVA) mediante il pacchetto DSAASTAT (Onofri, 2007). La separazione delle medie è stata effettuata mediante il test di Duncan ($P < 0,05$).

Risultati

La prova per la valutazione delle citochinine ha evidenziato che i parametri morfologici non sono stati influenzati significativamente dal tipo di citochinina e dalla sua concentrazione, a parte per il contenuto di acqua dei germogli (dati non mostrati). Da un punto di vista qualitativo, invece, i germogli cresciuti in presenza di mT alla concentrazione di 5 μM mostravano un contenuto più alto di clorofille e, conseguentemente, un indice NBI più alto (Tab. 1). I risultati ottenuti con la concentrazione di mT 5 μM sono confrontabili con quelli ottenuti con BAP 2 μM e 5 μM ma, considerata l'efficacia di meta-topolina, le prove successive sono state effettuate con questo regolatore di crescita.

Tab. 1. Valutazione eco-fisiologica dell'effetto di BAP e mT a diverse concentrazioni effettuata con lo strumento Dualex®.

Tab. 1. Ecophysiological evaluation of the effect of BAP and mT at different concentrations measured with the Dualex® instrument.

	Clorofille ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flavonoli ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Antocianine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NBI
2 μM BAP	12,68 \pm 2,87 ab	0,36 \pm 0,12 bc	0,15 \pm 0,02 bc	39,47 \pm 15,55 b
5 μM BAP	10,99 \pm 2,06 ab	0,39 \pm 0,05 abc	0,17 \pm 0,02 ab	29,16 \pm 7,93 bc
7 μM BAP	8,45 \pm 6,05 b	0,51 \pm 0,16 a	0,20 \pm 0,03 a	16,36 \pm 9,17 c
2 μM mT	11,30 \pm 4,90 ab	0,38 \pm 0,12 abc	0,16 \pm 0,04 bc	29,88 \pm 10,55 b
5 μM mT	13,77 \pm 2,29 a	0,48 \pm 0,12 ab	0,14 \pm 0,02 bc	30,09 \pm 8,49 b
7 μM mT	12,53 \pm 3,42 ab	0,44 \pm 0,10 ab	0,14 \pm 0,04 bc	29,88 \pm 10,02 b
<i>Control</i>	14,69 \pm 4,59 a	0,27 \pm 0,03 c	0,13 \pm 0,02 c	53,90 \pm 14,02 a

Il confronto effettuato con i diversi sali minerali ha evidenziato come quelli di MS si confermano i più efficaci per questa specie e, nello specifico, anche per questo genotipo. Il contenuto in clorofilla e l'indice NBI misurati su questi germogli, infatti, risultano essere superiori rispetto a quelli registrati in quelli cresciuti utilizzando sali DKW e WPM (Tab. 2).

La radicazione *ex vitro* dei germogli provenienti dal substrato di proliferazione contenente mT alla concentrazione di 5 μM ha prodotto risultati molto soddisfacenti, con percentuali di radicazione superiori al 95% in condizioni di *ex vitro* e senza l'impiego di auxine esogene. In particolare, gli espianti radicati sotto il LED G2, ricco in lunghezze d'onda del rosso e rosso lontano, presentavano un apparato radicale di volume significativamente maggiore rispetto a quelli radicati utilizzando il LED NS1 (Tab. 3). A livello ecofisiologico, l'apparato epigeo degli espianti radicati sotto il LED G2 ha mostrato una maggiore attività del metabolismo secondario rispetto al primario, spiegabile dalla forte componente nello spettro del rosso e del rosso lontano (Tab. 4).

Tab. 2. Valutazione eco-fisiologica dell'effetto di DKW, MS e WPM a concentrazione piena effettuata con lo strumento Dualex®.

Tab. 2. *Ecophysiological evaluation of the effect of DKW, MS and WPM, fully concentrated measured with Dualex® instrument.*

	Clorofille ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flavonoli ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Antocianine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NBI
DKW	6,79 \pm 2,71 b	0,41 \pm 0,03 b	0,22 \pm 0,06 a	20,57 \pm 5,13 b
MS	16,36 \pm 4,02 a	0,39 \pm 0,07 b	0,11 \pm 0,02 b	41,92 \pm 9,81 a
WPM	7,75 \pm 2,52 b	0,56 \pm 0,07 a	0,22 \pm 0,03 a	14,80 \pm 2,1 b

Tab. 3. Analisi morfologica dell'apparato radicale misurata mediante il software WinRHIZO™ di espianti radicati sotto i LED NS1 e G2 (Valoya LED Grow Lights, Valoya Oy, Helsinki Finland).

Tab. 3. *Morphological analysis of the root system of explants rooted under the NS1 and G2 LEDs (Valoya LED Grow Lights, Valoya Oy, Helsinki Finland), measured using WinRHIZO™ software.*

	Lunghezza (cm)	Volume (cm^3)	Apici (n)
NS1	94,83 \pm 46,39 a	0,133 \pm 0,07 b	471,4 \pm 131,1 a
G2	130,96 \pm 49,93 a	0,237 \pm 0,076 a	325,1 \pm 93,82 b

Tab. 4. Valutazione eco-fisiologica degli espianti radicati sotto i LED NS1 e G2 (Valoya LED Grow Lights, Valoya Oy, Helsinki Finland) effettuata con lo strumento Dualex®.

Tab. 4. *Ecophysiological evaluation of the explants rooted under the NS1 and G2 LEDs (Valoya LED Grow Lights, Valoya Oy, Helsinki Finland) measured with the Dualex® instrument.*

	Clorofille ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flavonoli ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Antocianine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NBI
NS1	11,17 \pm 1,96 a	0,35 \pm 0,14 b	0,18 \pm 0,03 b	34,88 \pm 12,63 a
G2	6,23 \pm 0,68 b	0,79 \pm 0,075 a	0,30 \pm 0,03 a	8,02 \pm 1,71 b

Discussione e Conclusioni

Questo lavoro propone l'utilizzo della micropropagazione come metodo valido per la propagazione del gelso nero genotipo o accessione Fontanarossa nera. Il substrato di crescita più efficace risulta essere quello composto da sali MS, con aggiunta di 20 g/L di saccarosio, 5 μM di mT, 0,5 μM IBA e 6 g/L di Agar (B&V Italia). Le fasi di radicazione e ambientamento possono essere condotte in condizioni di *ex vitro* e mediate da stimoli luminosi e non dall'aggiunta di auxine.

Questo protocollo di propagazione si propone come alternativa per mantenere i costi più contenuti e completare il ciclo di produzione in modo più rapido, combinando la fase di radicazione con quella di acclimatazione e utilizzando sorgenti luminose LED, ben più economiche ed ecosostenibili delle lampade a fluorescenza. Ulteriori studi saranno necessari per testare l'efficacia di questo protocollo anche su altre specie e varietà di *Morus* spp. e, in particolare, per verificare se l'utilizzo di meta-topolina in fase di moltiplicazione degli espianti permette di semplificare la radicazione *ex vitro*.

Bibliografia

- Amoo S.O., Finnie J.F., Van Staden J., 2011. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regulation*, 63: 197–206.
- Aremu A.O., Bairu M.W., Doležal K., Finnie J.F., Van Staden J., 2012. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108: 1–16.
- Larekeng S.H., Arsyad M.A., Annisa A.M., Restu M., 2021. *In vitro* shoot multiplication of *Morus nigra* by combinations of plant growth regulators. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 921.

- Litwińczuk W., Jacek B., 2020. Micropropagation of mountain mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) 'Kenmochi' on cytokinin-free medium. *Plants* 9: 1–13.
- Magyar-Tábori K., Dobránszky J., Jámor-Benczúr É, Bubán T., Lazányi J., Szalai J., Ferenczy A., 2001. Post-effects of cytokinins and auxin levels of proliferation media on rooting ability of *in vitro* apple shoots (*Malus domestica* Borkh.) "Red Fuji." *International Journal of Horticultural Science*, 7(3-4): 26-29.
- Memete A.R., Timar A.V., Vuscan A.N., Miere F., Venter A.C., Vicas S.I., 2022. Phytochemical composition of different botanical parts of morus species, health benefits and application in food industry. *Plants*, 11(2):152.
- Werbrouck, S.P.O, Strnad, M., Van Onckelen, H.A., Debergh, P.C., 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*. 98: 291-297.

Influenza di microrganismi endofiti durante l'acclimatazione *ex vitro* di piante di kiwi micropropagate

Michela Lupo^{1*}, Cristian Silvestri¹, Valerio Cristofori¹, Vincenzo Tagliavento², Serena Ciarroni², Giorgio Mariano Balestra^{1,2}, Angelo Mazzaglia¹

* michela.lupo@unitus.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

² PhyDia – Phytoparasites Diagnostics, Viterbo

Riassunto

Nel presente lavoro due ceppi endofiti identificati come *Pseudomonas fluorescens* (PF6 e PF25), putativi antagonisti del patogeno *P. syringae* pv. *actinidiae*, sono stati utilizzati durante la fase di acclimatazione di giovani piantine micropropagate di *Actinidia chinensis* Planch, per verificarne 1) la capacità di colonizzare l'apparato ipogeo ed epigeo e 2) l'effetto su alcuni parametri fisiologici della pianta. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la biotizzazione risulta semplice, senza alcun effetto negativo sull'acclimatazione delle giovani piante. Tali risultati, da considerarsi preliminari, suggeriscono la possibilità di impiegare tali batteri per la biotizzazione di piante di actinidia. Le piante biotizzate verranno sottoposte ad infezioni con *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* per verificare se la presenza dell'endofita è capace di contrastare l'applicazione artificiale del patogeno.

Parole chiave: *Actinidia chinensis* Planch, *Pseudomonas fluorescens*, biotizzazione, interazione pianta-endofita, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Influence of endophytic microorganisms during *ex vitro* acclimatization of micropropagated kiwi plants

Abstract: Acclimatization is a crucial phase of micropropagation. The product losses during the transition from *in vitro* to *ex vitro* can be considerable because *in vitro* the shoots grow in artificial environmental conditions such as synthetic culture media, low light intensity and low CO₂. These conditions can lead to physiological imbalances and stress when plantlets are placed in a different environment such as greenhouses or open fields where there is the necessity to photosynthesize and adapt to situations of higher light intensity and lower relative humidity. Various technologies are currently being studied to alleviate the difficulties of this crucial phase and, for some years now, it has been shown that the biotisation of micropropagated plants can lead to better acclimatization and growth of these plants under *ex vitro* conditions. Endophytes gained a lot of interest in the last years because they have many important activities like bio-stimulant and bioprotective for the host plant, thanks to the production of phytohormones, contributing to the transport of water and nutrients, activating the biological protection mechanisms and inducing systemic resistance to phytopathogens. In the present work, two endophyte strains of the species *Pseudomonas fluorescens* (PF6 and PF25), putative antagonists of *P. syringae* pv. *actinidiae* pathogen, were used during the *ex vitro* acclimatization phase of *Actinidia chinensis* Planch plantlets, to verify 1) their capacity to colonize the epigeal and hypogean apparatus and 2) their effect on physiological parameters of the plants, like chlorophylls, anthocyanins and flavanols content and NBI index. *Pseudomonas fluorescens* is a bacterial endophyte and these two particular strains were isolated from kiwifruit asymptomatic plants affected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA), the causal agent of the bacterial canker of kiwifruit. The obtained results showed that biotisation is very easy, with no negative effect on shoot acclimatization. In particular, plantlets containing the PF25 strain showed higher values for total chlorophyll than the other treatments, as well as for the nitrogen balance

index (NBI), which can suggest a better physiological condition of the plantlets. These results, to be considered preliminary, suggest the possibility of using these bacteria for the biotisation of actinidia plants in the acclimatization phase. Subsequently, the resulting plants will be subjected to infection with PSA to test whether the presence of the endophyte can counteract the artificial infection with PSA. The use of microorganisms to improve plant fitness and to control any diseases already in the nursery is indeed an economical and ‘eco-friendly’ strategy.

Keywords: *Actinidia chinensis*, *Pseudomonas fluorescens*, biotisation, growth parameters, plant-endophyte interaction, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Introduzione

L’acclimatazione *ex vitro* delle piante micropropagate è una fase cruciale dell’intero processo di micropropagazione in quanto le plantule *in vitro*-derivate sono acclimatate in ambiente controllato caratterizzato da elevata umidità relativa, intensità luminosa più bassa di quella naturale e con substrati ricchi di zuccheri. Nel passaggio all’ambiente *ex vitro* le piante subiscono diversi stress dovuti al cambiamento dei parametri ambientali e devono necessariamente passare da una condizione eterotrofa ad una condizione autotrofa e per recuperare la capacità fotosintetica (Abdalla et al., 2022). I microrganismi endofiti sono presenti in tutti i tessuti della pianta e spesso giocano un ruolo chiave nella fase di acclimatazione in quanto esercitano ruolo di biostimolanti (Nadal et al., 2022), promuovendo la crescita e lo sviluppo della pianta ospite tramite biosintesi di fitormoni, migliorano il trasporto dell’acqua e dei nutrienti, attivano i meccanismi di difesa e inducono il sistema di resistenza sistemica indotta (ISR) della pianta (Samarina et al., 2017).

Lo scopo di questo lavoro è stato di saggiare la tollerabilità e l’efficienza di biotizzazione di espianti micropropagati di kiwi giallo (*A. chinensis* Planch) con due ceppi ad habitus endofita, appartenenti alla specie *Pseudomonas fluorescens* (PF6 e PF25) nella fase di acclimatazione *ex vitro*. Tali ceppi erano stati precedentemente isolati da piante di actinidia risultate infette da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, ma asintomatiche.

Materiali e Metodi

Germogli di *Actinidia chinensis* micropropagati su substrato di proliferazione composto da MS (Murashige and Skoog, 1962), addizionato di saccarosio (3%), BAP (0,7 mg/L) e Plant Agar (DUCHEFA-NL) (5,5 g/L), sono stati posti su un terreno di radicazione composto da ½ MS, arricchito di saccarosio (2%), IBA (0,7 mg/L) e Plant Agar (DUCHEFA-NL) (5,5 g/L). In entrambi i substrati il pH è stato pari a 5,8.

Gli espianti, quindi, sono stati mantenuti al buio per sei giorni e successivamente trapiantati in contenitori alveolari QPD144 QuickPot (HerkuPlast-Kubern, Germania) contenenti terriccio commerciale Brill® TypicalTonerde 3 autoclavato e arricchito con le sospensioni degli isolati PF6 e PF25, ad una concentrazione di ciascun batterio pari a 10^7 UFC/mL. Prima del trapianto, i substrati sono stati lasciati a riposo per 72 ore ed è stata analizzata la loro carica microbica.

Gli espianti trapiantati sono stati posti in camera di crescita con luce artificiale ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) alla temperatura costante di $24 \pm 1^\circ\text{C}$, con fotoperiodo di 16 ore di luce. Dopo quattro settimane dal trapianto sono stati condotti i rilievi biometrici delle piante, misurando il numero di nuovi nodi, il contenuto di acqua nei germogli, la percentuale di attecchimento dei germogli in fase di acclimatazione e il peso secco delle foglie dopo essiccazione in stufa ventilata per un periodo di 48 ore a 105°C . Inoltre, tramite impiego di un analizzatore fogliare (DUALEX PLUS®) sono stati misurati gli indici relativi a contenuto in clorofille, flavonoli e antocianine e indice NBI (Indice di Bilancio Azotato) sulle prime due foglie espansive degli espianti.

Al fine di verificare l’effettiva biotizzazione degli espianti, le piantine sono state lavate e immerse in una soluzione contenente ipoclorito di sodio all’1% per 5 minuti, sciacquate in acqua sterile e asciuate.

gate. Poi, foglie, fusto e radici sono stati divisi in tre porzioni, le quali sono state separatamente omogeneizzate in buffer salino (0,85% NaCl) e diluite 1/10 e 1/100. L'omogenizzato tal quale e le prime due diluizioni sono stati posti in coltura su terreno agarizzato King's B e lasciati ad incubare a 26°C per 24 ore; successivamente è stato effettuato il conteggio delle UFC (Unità Formanti Colonie) al fine di determinare la carica microbica. I dati acquisiti durante i rilievi sono stati sottoposti ad analisi della varianza (one-way ANOVA) mediante il pacchetto DSAASTAT (Onofri, 2007). La separazione delle medie è stata effettuata mediante il test di Duncan ($P < 0,05$).

Risultati

L'analisi della carica microbica totale dei terreni addizionati con i due ceppi PF6 e PF25 e del controllo a 72 ore dal dispensamento nei contenitori alveolari è risultata rispettivamente di $8,19 \times 10^7$ e $8,23 \times 10^7$ UFC/g per i terreni addizionati con PF6 e PF25 mentre nel controllo era pari a $7,2 \times 10^7$ UFC/g. Tuttavia, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i due terreni arricchiti con gli endofiti ed il relativo controllo.

In particolare, il numero di nodi è risultato inferiore negli espianti acclimatati su terreno arricchito con PF6, mentre è risultato comparabile al controllo nel caso di PF 25 (Fig. 1). L'analisi dei parametri ecofisiologici, invece, ha evidenziato come gli espianti acclimatati in associazione con il ceppo PF25 mostrino livelli più elevati di clorofille e un più alto NBI (Fig. 2). Tali informazioni inducono ad ipotizzare un migliore stato fisiologico degli espianti ambientati su PF25 e quindi ad una possibile attività biostimolante di questo ceppo nella fase di acclimatazione nei confronti degli espianti micropropagati di actinidia (var. kiwi giallo).

La verifica dell'effettiva biotizzazione degli espianti ha confermato la presenza dei ceppi inoculati anche nelle foglie, dimostrando l'efficacia del trasporto dei due ceppi batterici grazie al sistema dei vasi dell'ospite (Fig. 3).

Discussione e Conclusioni

Una micropropagazione di successo dipende significativamente dalla possibilità di ottenere un numero elevato di piante, in breve tempo, e con alte percentuali di ambientamento; tuttavia numerosi stress biotici e abiotici possono intervenire e ridurre la capacità di acclimatazione delle piante *vitro*-derivate. L'utilizzo della biotizzazione degli espianti con microrganismi, aventi funzione di biostimolanti e agenti bioprotettivi, rappresenta una strategia utile per contrastare questi stress nella fase di acclimatazione.



Fig. 1. Parametri morfologici misurati sugli espianti a 4 settimane dal trapianto. a) numero di nodi; b) contenuto in acqua (%) dato dal rapporto tra peso secco/peso fresco; c) espianti acclimatati con successo (%).

Fig. 1. Morphological traits measured on explants after 4 weeks from transplant. a) number of nodes; b) water content (%) calculated on the ratio dry weight/fresh weight; c) explants successfully acclimatized (%).

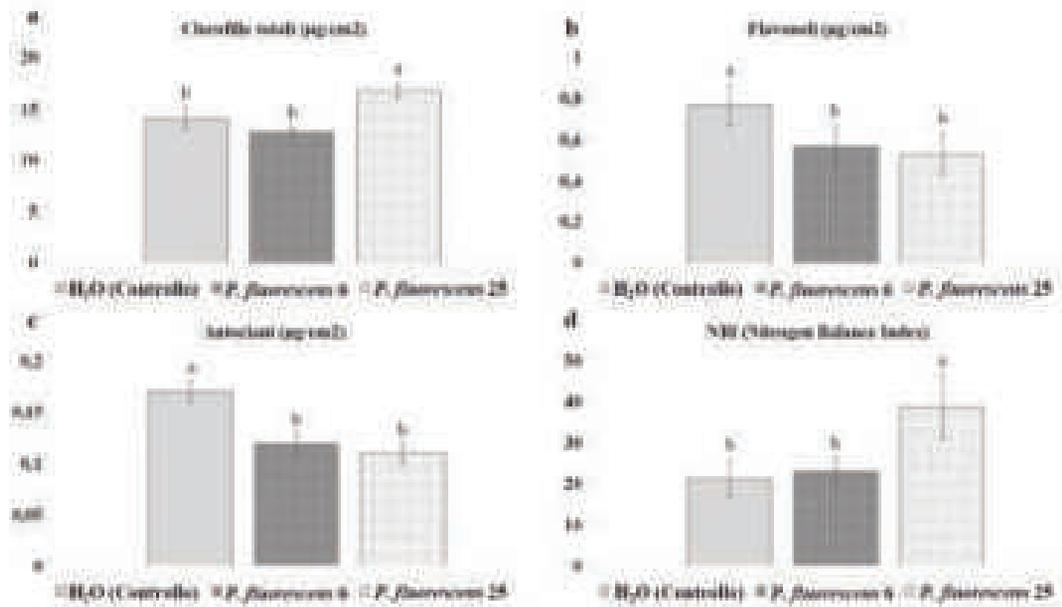


Fig. 2. Parametri ecofisiologici misurati sugli espianti a 4 settimane dal trapianto. a) Contenuto in clorofille totali ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); b) Contenuto in flavonoli ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); c) Contenuto in antociani ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), d) NBI.
 Fig. 2. Ecophysiological traits measured on explants after 4 weeks from transplant. a) Total chlorophyll content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); b) Flavanols content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); c) Anthocyanins content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), d) NBI.

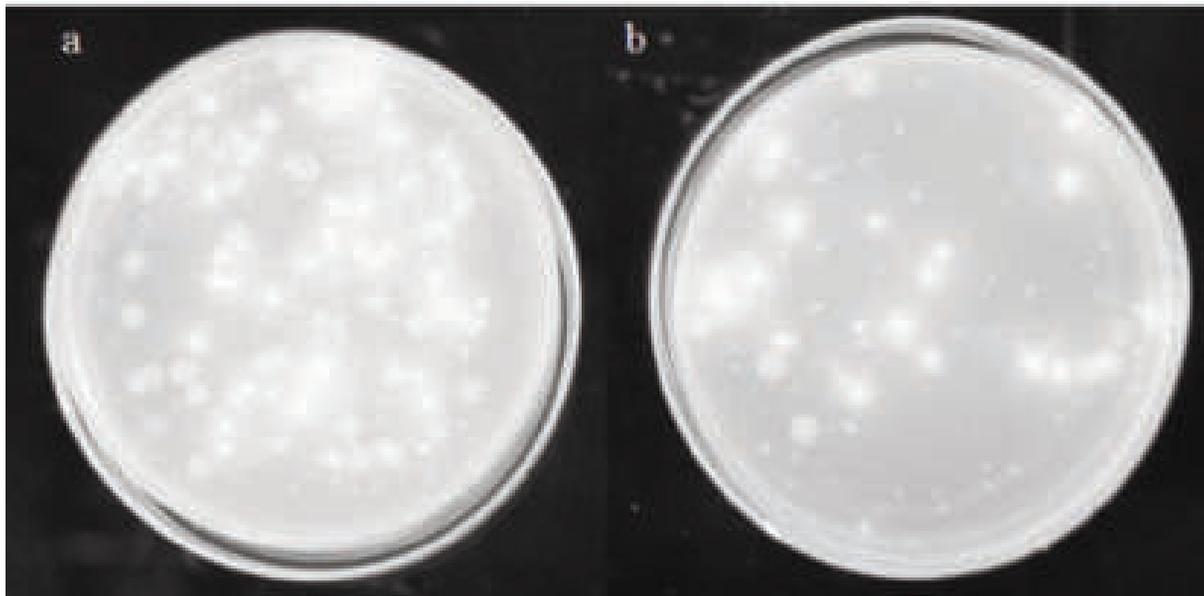


Fig. 3. Colonie di PF6 (a) e di PF25 (b) isolate da foglie di espianti biotizzati.
 Fig. 3. Colonies of PF6 (a) and PF25 (b) isolated from leaves of biotised explants.

Il presente lavoro fornisce una indicazione positiva sull'impiego di ceppi diversi, in particolare il ceppo 25 di *Pseudomonas fluorescens*, per favorire il processo di acclimatazione e il successivo sviluppo delle piante. La biotizzazione, infatti, è un processo che in questo caso avviene in maniera estremamente semplice, essendo i microrganismi utilizzati degli endofiti originariamente isolati dalla medesima specie vegetale. Le indagini future concorreranno a definire la reale possibilità di applicare tali strategie a livello commerciale e, soprattutto, sarà valutata la capacità di tale materiale biotizzato di contrastare il patogeno *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* (PSA), attualmente considerato uno dei principali patogeni su actinidia.

Bibliografia

- Abdalla N., El-Ramady H., Seliem M.K., El-Mahrouk M.E., Taha N., Bayoumi Y., Shalaby T.A., Dobránszki J., 2022. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae* 8.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473–497.
- Nadal M.C., Dos Reis Ferreira G.M., Andrade G.V.S., Buttrós V.H., Rodrigues F.A., Da Silva C.M., Martins A.D., Rufato L., Luz J.M.Q., Dória J., Pasqual M., 2022. Endophytic Bacteria Can Replace the Need for Synthetic Auxin during *In Vitro* Rooting of *Pyrus communis*. *Agronomy*, 12: 1–17.
- Samarina L.S., Malyarovskaya V.I., Rogozhina E.V., Malyukova L.S., 2017. Endophytes, as promoters of *in vitro* plant growth (review). *Agric. Biol.*, 52: 917-927.

Innovazione nella micropropagazione e nella conservazione *in vitro* di pero selvatico (*Pyrus pyraeaster* L.)

Valbona Sota^{1*}, Brunilda Çuko¹ Carla Benelli², Efigjeni Kongjika³, Maurizio Lambardi²

* valbona.sota@fshn.edu.al

¹Dipartimento di Biotecnologia, Facoltà di Scienze Naturali, Università di Tirana, Albania

²IBE-CNR, Istituto per la BioEconomia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino (FI),

³Sezione di Scienze Naturali e Tecniche, Accademia delle Scienze d'Albania, Tirana, Albania

Riassunto

Per mantenere in sicurezza le risorse genetiche di *Pyrus pyraeaster*, possono essere utilizzati vari metodi quali la coltura e la conservazione *in vitro*. In questo studio, sono stati utilizzati due diversi tipi di bioreattori, SETIS ed ElecTIS, effettuando anche un confronto con la coltura convenzionale su substrato agarizzato. Le colture di *P. pyraeaster* hanno mostrato un RGR (i.e., Relative Growth Rate – Tasso di Crescita Relativo) alto in SETIS. Per la conservazione *in vitro* dei germogli è stato osservato l'effetto della bassa temperatura (4°C) per 3, 6 e 10 mesi. I risultati ottenuti attestano le reali opportunità della sua applicazione per il mantenimento delle colture a medio-termine.

Parole chiave: bioreattore, coltura liquida, ElecTIS, tasso di crescita relativo, TIS

Innovation in micropropagation and *in vitro* conservation of wild pear (*Pyrus pyraeaster* L.)

Abstract: The wild pear (*Pyrus pyraeaster*, syn. *P. communis* var. *Pyraeaster*) is considered an important form that gave rise to the genotypes of the genus *Pyrus*. *P. pyraeaster* is a species of great importance both for its proximity to the cultivated pear tree and its multiple uses: as a rootstock, an ornamental tree for the reforestation of marginal agricultural lands and the production of timber. In addition to clonal collections in the field, other methods, such as micropropagation and *in vitro* conservation, can safely maintain the genetic resources of this species. In particular, the application of *in vitro* methodologies via Temporary Immersion System (TIS) offers many advantages and proves effective for the propagation of different fruit species. In this study, to evaluate the effect of liquid culture in TIS in wild pear micropropagation, two different types of bioreactors, SETIS and ElecTIS, were used, also making a comparison with conventional culture on agarized medium (control). In both bioreactors and control groups, the MS medium was supplemented with 1 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA. The immersion frequency of the shoots in the two bioreactors was 6 minutes every 6 hours. Micropropagation by liquid culture in TIS showed higher relative growth rates (RGR) than the conventional system. The cultures on agar medium showed an RGR of 8.7, while in the two bioreactors, the RGR index was 20.9 and 15.4, respectively, in SETIS and ElecTIS. Regarding the *in vitro* conservation of *P. pyraeaster* shoots, the effect of low temperature (4°C), in combination with darkness, was observed for 3, 6, and 10 months. At the end of each storage period, the percentage of survival and regrowth of the shoots were recorded. The highest values of survival (94%) and regrowth (91%) were observed in cultures stored for 3 months. Proceeding with conservation, the percentage of survival and regrowth was reduced to 42% after 6 and to 20% after 10 months. In conclusion, these results show that the use of TIS bioreactors improves the *in vitro* propagation of *P. pyraeaster* compared to the conventional method in agar medium due to the more effective use of nutrients and growth regulators, which is reflected in the increase in the RGR index, the reduction of production costs, etc. These aspects are considered essential, especially for commercial micropropagation laboratories. Furthermore, thanks to the simplicity and effectiveness of the slow-growing *in vitro*

conservation technique, the results obtained attest to the real opportunities for its application to mid-term maintenance of this species.

Keywords: bioreactor, liquid culture, ElecTIS, relative growth rate, TIS

Introduzione

Pyrus pyraeaster L. è originario dei paesi dell'Europa centrale, occidentale e meridionale ed in Albania è diffuso soprattutto nella sottozona bassa del faggio (Qosja et al., 1992). Il pero selvatico è una specie importante, sia per la sua relativa vicinanza al pero coltivato, sia per il rimboschimento di terreni agricoli, come albero ornamentale nei parchi, produzione di legname, ecc. (Stephan et al., 2003; Gordana, 2019).

La biodiversità delle risorse vegetali è a rischio d'estinzione a causa della deforestazione, delle attività antropogeniche, dell'introduzione di nuove varietà e della modernizzazione dell'agricoltura su scala mondiale. La sicurezza delle collezioni di risorse genetiche richiede la loro propagazione e conservazione mediante diverse tecniche. Per il mantenimento in sicurezza delle risorse genetiche vegetali, la coltura *in vitro* può essere considerata un metodo alternativo ai campi collezione (Sedlak et al., 2001; Ahmed et al. 2010; Kameswara, 2004; Bell e Reed, 2002). E' infatti un metodo efficace per la micropropagazione e la conservazione *ex situ* della diversità genetica delle piante, consentendo una rapida moltiplicazione da pochissimo materiale vegetale, con un basso impatto sulle popolazioni selvatiche. Diversi autori hanno riportato l'efficace micropropagazione del pero selvatico in mezzi agarizzati con diversi substrati nutritivi come MS (Thakur et al., 2008), WPM (Wang, 1991) e LP (Palombi et al., 2007; Caboni et al., 1999). L'applicazione della micropropagazione convenzionale può però comportare alcuni svantaggi, come gli alti costi di manodopera per l'esecuzione delle subcolture su substrati agarizzati; ciò deve agire da stimolo per trovare soluzioni alternative. Il Sistema ad Immersione Temporanea (TIS) con coltura liquida in condizioni ambientali controllate (Mehrotra et al., 2007; Lambardi, 2012; Benelli e De Carlo, 2018) può essere un'alternativa per la propagazione *in vitro* su larga scala di colture vegetali. Nel tempo sono stati proposti diversi bioreattori TIS (Georgiev et al., 2014; Ramirez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016), tra cui quelli basati su un singolo contenitore (es. RITA[®], Plantform[™]) o su doppio contenitore (ad esempio, Twin flasks, SETIS[™]). Questi bioreattori consentono alle colture vegetali di avere accesso temporaneo al mezzo liquido, con vantaggi riguardanti l'assorbimento dei nutrienti da tutta la superficie dell'espianto e la diluizione dei fenoli che possono determinare l'ossidazione e l'imbrunimento dei tessuti (Lambardi, 2012; Capuana et al., 2018).

Lo scopo di questa ricerca è confrontare l'efficienza del sistema TIS, utilizzando due bioreattori, SETIS ed ElecTIS, con il sistema convenzionale (coltivazione in substrato agarizzato) su pero selvatico. Inoltre lo studio indaga l'opportunità di conservazione a medio-termine, mediante la tecnica di crescita rallentata *in vitro*, mantenendo i germogli a 4°C in oscurità.

Materiali e Metodi

Propagazione in vitro in diversi sistemi di coltivazione

Per questo esperimento sono stati usati germogli derivati da gemme apicali e laterali cresciuti *in vitro*. Inizialmente, le colture di *Pyrus pyraeaster* L. sono state costituite da gemme apicali e laterali rimosse da alberi adulti coltivati in campo. I germogli attivi sono stati tagliati in sezioni a due o tre nodi, lavati accuratamente con acqua; successivamente gli espianti sono stati agitate per 5 minuti in etanolo al 70%, seguito da un trattamento di 20 minuti con HgCl₂ allo 0,01% con due gocce di Tween 20. Infine gli espianti sono stati risciacquati tre volte con acqua distillata sterile e sono stati coltivati in substrato nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato con 1 mg/L 6-benzilamminopurina (BAP), 0,1 mg/L acido 1-naftaleneacetico (NAA), 100 mg/L mio-inositolo, 3% saccarosio e 0,57% agar (Sigma-Aldrich). Dopo la rigenerazione *in vitro*, le piantine sono state usate per la coltura nei bioreattori TIS.

Due sistemi di coltura sono stati posti a confronto: a) sistema convenzionale in substrato agarizzato

(sistema semisolido) in provette con agar 0,7% considerato come controllo, e b) sistema TIS, utilizzando due tipologie di bioreattori: ElecTIS (www.explanta.com/bioreactor-electis/) e SETIS (<https://setis-systems.be>). La frequenza di immersione è stata di 6 min ogni 6 ore. Il substrato nutritivo usato nei diversi sistemi di coltura era lo stesso della rigenerazione *in vitro*. Il peso totale fresco degli espianti è stato valutato all'inizio e fine esperimento, dopo 21 giorni, ed è stato calcolato l'RGR delle colture (Benelli e De Carlo, 2018). Le colture sono state mantenute nella camera di crescita a temperatura di 25°C in un regime luce/buio di 16/8 h, con luce fluorescente bianca fredda di intensità 43,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Condizioni di crescita rallentata

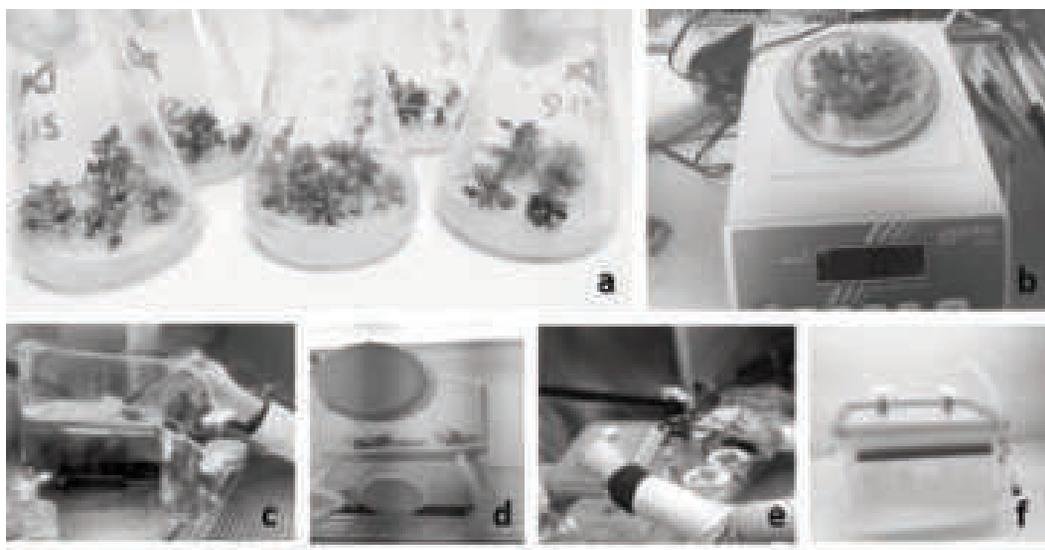
Quattro settimane dopo l'ultima subcoltura, i germogli derivati da coltura *in vitro* sono stati trasferiti in substrato nutritivo agarizzato con la stessa composizione sopra menzionata e mantenuti in condizioni di completa oscurità e temperatura ridotta (4°C). La percentuale di sopravvivenza, subito dopo i diversi periodi di conservazione (3, 6 e 10 mesi) e la percentuale di ricrescita, dopo la prima subcoltura dei germogli in condizioni standard di coltura (25°C; luce/buio di 16/8 h), sono state valutate.

Risultati

L'indice RGR dopo 21 giorni di coltura in SETIS, ElecTIS e substrato agarizzato (Fig. 1) ha evidenziato differenze apprezzabili. Le differenze si evidenziano non solo nel sistema di coltivazione (TIS o agarizzato), ma anche tra diversi bioreattori TIS. Il valore RGR più elevato (11,3) è stato registrato nei germogli cresciuti nel bioreattore SETIS, mentre il valore più basso (6,9) risultava nel substrato agarizzato. Anche la coltura nel bioreattore ElecTIS è da considerarsi efficace, con un RGR di 8,4 (Tab. 1).

Fig. 1. Moltiplicazione *in vitro* di pero selvatico: a) Crescita in substrato agarizzato; b) misurazione del peso per l'indice RGR; c, d) inoculazione e moltiplicazione in SETIS; e, f) inoculazione e moltiplicazione in ElecTIS.

Fig. 1. Multiplication of wild pear: a) shoot growth in agar medium; b) weight of explants for RGR index; c, d) inoculation and multiplication in SETIS; e, f) inoculation and multiplication in ElecTIS.



Tab. 1. Tasso di Crescita Relativo (RGR; Relative Growth Rate) per i diversi sistemi di coltivazione.
Tab. 1. Relative Growth Rate (RGR) for different cultivation systems.

No.	Frequenza di immersione	Sistema di coltura	Peso iniziale	Peso finale	Numero di piantine	Giorni di coltura	Indice RGR
1	6 min/6 h	ElectIS	2,00 g	7,01 g	30	21	8,4
2	6 min/6 h	SETIS	1,61 g	8,81 g	30	21	11,3
3	-	Substrato agarizzato	1,57 g	4,47 g	30	21	6,9

Nei bioreattori SETIS ed ElecTIS, gli espianti sono periodicamente immersi nel mezzo liquido, quindi la superficie di contatto degli espianti con il substrato nutritivo è maggiore; ciò permette al substrato di entrare in contatto con l'intero germoglio e non solo alla base, come invece accade in coltivazione su semisolido. Questo aspetto, produce effetti positivi negli espianti di pero selvatico, ottenendo un RGR più alto, fattore importanti per la successiva fase di acclimatazione delle colture.

Oltre al valore più elevato di RGR, nei sistemi TIS il processo di inoculo degli espianti viene effettuato molto più velocemente che nei mezzi agarizzati. Inoltre, il tempo di preparazione e riempimento dei contenitori di coltura con mezzi liquidi è molto più efficace. Però, è opportuno sottolineare che quando si lavora con i sistemi TIS, il controllo di qualità del materiale di partenza è fondamentale, in quanto anche un singolo germoglio contaminato può provocare la contaminazione e la conseguente perdita di un'elevata quantità di materiale coltivato in un unico contenitore.

Per quanto riguarda la conservazione *in vitro* dei germogli di *P. pyraster* sono state osservate differenze significative legate al periodo di conservazione (Fig. 2). Il periodo di conservazione ha avuto un apprezzabile effetto sui tassi di sopravvivenza e rigenerazione. Tali valori (94% e 91%, rispettivamente) risultavano elevati dopo un periodo di 3 mesi. Il 63,3% dei germogli rimanevano sani e verdi dopo 6 mesi di conservazione a 4°C al buio; una percentuale simile è stata osservata per la ricrescita (62,3%), dopo il ritorno alle colture in condizioni standard. I tassi di sopravvivenza e ricrescita più bassi (42 % e 20,1%) sono stati osservati dopo 10 mesi di conservazione.

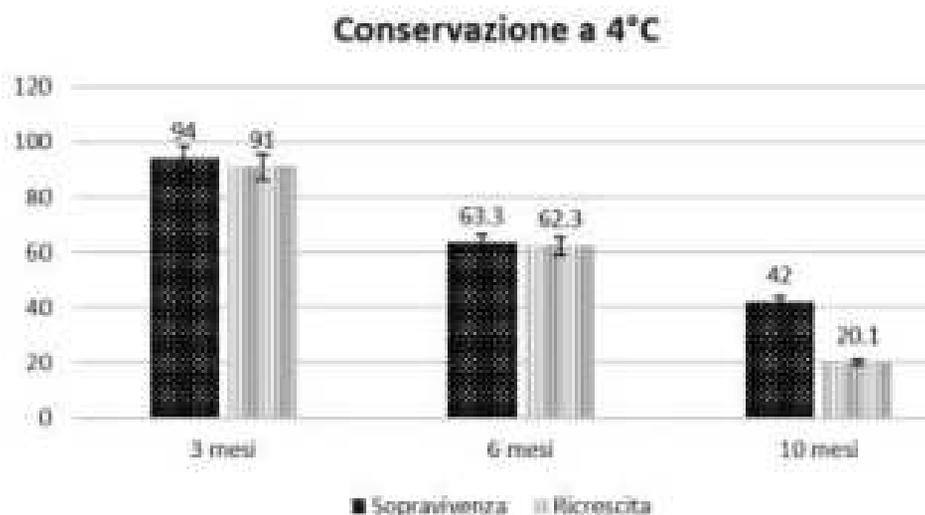


Fig. 2. Percentuale di sopravvivenza e ricrescita dei germogli dopo diversi periodi di conservazione in crescita rallentata.

Fig. 2. Survival and regrowth rates for different slow growth conservation periods.

La conservazione a 4°C al buio è risultata un metodo efficiente per lo stoccaggio dei germogli fino a 10 mesi. I germogli conservati presentavano una buona percentuale di ricrescita dopo ogni periodo di conservazione, anche se, con l'aumentare del periodo di conservazione, iniziavano a manifestarsi i primi segni di necrosi.

Discussione e Conclusioni

Per la produzione su larga scala di materiale vegetale *in vitro* le caratteristiche più importanti sono la qualità, l'interesse economico, il mantenimento della stabilità genetica e la conservazione a lungo termine. Calcolando la riduzione del costo del lavoro in diversi sistemi, si evidenzia che l'utilizzo dei bioreattori SETIS ed ElecTIS risultano più convenienti (Sota et al., 2021; Lambardi, 2012). Il maggior valore di RGR ottenuto in questi sistemi di coltivazione, consente di ottenere inoltre una maggiore quantità di materiale vegetale. Attualmente, la necessità di un'adeguata e conveniente propagazione *in*

in vitro per molte specie vegetali ha aumentato l'interesse della ricerca di base e applicata verso il superamento di alcune problematiche, quali la vitrificazione, il fenomeno dell'imbrunimento degli espianti, gli elevati costi di manodopera, la qualità del materiale vegetale e la variazione somaclonale (Mehrotra et al., 2007; Ziv, 2005; Lambardi, 2012; Benelli e De Carlo, 2018).

Le basse temperature, unite ad una assenza o diminuzione della luce, sono state applicate con successo alle colture *in vitro* di molte specie vegetali per la conservazione a medio termine. In queste condizioni, la crescita delle piante è limitata, riducendo così il numero di subcolture. La temperatura e la durata del periodo di conservazione dipendono fortemente dal genotipo e dalla qualità del materiale vegetale. In questo esperimento, questi due fattori influenzano significativamente la percentuale di sopravvivenza e ricrescita di *Pyrus pyraster*. I periodi di conservazione ottimali sono stati 3 e 6 mesi, ma i germogli sono riusciti comunque a sopravvivere e ricrescere fino ai 10 mesi di stoccaggio. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da altri autori sulla conservazione di *Pyrus* sp. (Moriguchi et al., 1990; Oka e Niino, 1997; Tahtamouni e Shibli, 1999; Ahmed et al., 2010; Reed e Denoma, 2014).

Bibliografia

- Ahmed, M., Anjum, M.A. 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pak. J. Bot., 42(3): 1639 – 1650.
- Bell R.L., Reed B.M. 2002. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Acta Hort. 596: 412-418.
- Benelli, C., De Carlo, A. 2018. *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). 3 Biotech, 8(7): 317.
- Caboni, E., Tonelli, M.G., Lauri, P., D'angeli, S., Damiano, C. 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 1–7
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engineering in Life Sciences, 14: 607–621.
- Gordana, S.T. 2019. The phenological and pomological traits of selected genotypes of wild pear [*Pyrus pyraster* (L.) Du Roi] important for the production of generative rootstocks. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 18.
- Kameswara N.R. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, Vol. 3(2): 136 – 145.
- Lambardi, M. 2012. Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura, 12: 32-38 (with English abstract).
- Mehrotra S., Goel M.K., Kukreja A.K., Mishra B.N., 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology, 6(13): 1484-1492.
- Moriguchi T., Kozaki S., Yamaki S., Sanada T. 1990. Low temperature storage of pear shoots *in vitro*. Bull. Fruit Tree Res. Stat, 17: 11-18.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15: 473-497.
- Oka S., Niino T. 1997. Long term storage of pear (*Pyrus* sp.) shoot cultures *in vitro* by minimal growth method. Japan Agr. Res. Quart, 31: 1-7.
- Palombi, M.A., Lombardo, B., Caboni, E. 2007. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd.) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analyses by RAPD markers. Plant Cell Rep., 24(4): 489-496.
- Qosja Xh., Papparisto. K., Demiri M., Vangjeli J., Balza E. 1992. Flora e Shqipërisë 4, Akademia e Shkencave të Republikës së Shqipërisë. Qendra e Kërkimeve Biologjike, Tiranë. (In Albanian).
- Ramírez-Mosqueda M.A., Iglesias-Andreu L.G. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant, 52: 154-160.

- Reed, B. M., Denoma, J. 2014. Medium-term in vitro storage of pear as a complementary germplasm preservation technique. *Acta Hort.* 1113: 251-256.
- Sota V., Benelli C., Çuko B., Papakosta E., Depaoli C., Lambardi M., Kongjika E. 2021. Evaluation of ElecTIS bioreactor for the micropropagation of *Malus sylvestris* (L.) Mill., an important autochthonous species of Albania. - *Hort. Sci. (Prague)*, 48: 12–21.
- Stephan B.R, I Wanger And J. Kleinschmit, 2003. Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild apple and pear (*Malus sylvestris* and *Pyrus pyraster*).
- Tahtamouni R.W., Shibli R.A. 1999. Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (*Pyrus syriaca*). *Adv. Hortic. Sci.*, 13: 156-160.
- Thakur, A., Kanwar, J.S. 2008. Micropropagation of 'Wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. Electronic ISSN 1842-4309. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 36 (2): 104-111.
- Wang, Q. 1991. Shoot multiplication of pear in double-phase medium culture. *Acta Hort.* 289: 349-350.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3): 277.

Micropropagazione del mirto (*Myrtus communis* L.) mediante coltura convenzionale in substrato gelificato e coltura liquida con bioreattore ElecTIS

Elektra Papakosta^{1*}, Valbona Sota², Brunilda Çuko², Efigjeni Kongjika³, Maurizio Lambardi⁴, Carla Benelli⁴

*elektrakrist@yahoo.com

¹ Centro di Trasferimento di Tecnologie Agricole di Valona, Base di Shamogjin, Vlora, Albania

² Dipartimento di Biotecnologia, Facoltà di Scienze Naturali, Università di Tirana, Albania

³ Sezione di Scienze Naturali e Tecniche, Accademia delle Scienze di Albania, Tirana, Albania

⁴ Consiglio Nazionale delle Ricerche, IBE-Istituto per la BioEconomia, Sesto Fiorentino, Firenze

Riassunto

Scopo di questo studio è il miglioramento della micropropagazione del mirto, impiegando anche la coltura liquida in immersione temporanea. I risultati dopo 4 subcolture in substrato gelificato mostrano che i valori più alti come tasso di proliferazione (4,5) e numero medio dei germogli sono stati ottenuti con substrato MS, addizionato di BAP a 1,0 mg/L. La migliore radicazione dei germogli, in termini di percentuale di radicazione (77%) e numero medio di radici, è stata ottenuta con IBA a 0,3 mg/L. Il substrato con la combinazione ottimale di ormoni dalla fase di moltiplicazione è stato poi impiegato con la coltura liquida con bioreattore ElecTIS. Più efficace è risultata la coltura ElecTIS con frequenza d'immersione di 10 min/8h, ottenendo un tasso di crescita relativa (TCR) di 6,2, rispetto alla coltura in substrato gelificato con 7,0 g/L oppure 3,5 g/L agar (TCR rispettivamente di 5,3 e 4,5).

Parole chiave: MS, auxina, proliferazione, coltura liquida, ElecTIS

Micropropagation of myrtle (*Myrtus communis* L.) using conventional culture in gelled medium and liquid culture with the ElecTIS bioreactor

Abstract: Myrtle (*Myrtus communis* L.) is a spontaneous specie of the Mediterranean region, widespread in Italy and also in Albania. The interest in this specie is linked to its uses as an aromatic medicinal plant in medicine, food, industry, handicrafts and cosmetics. Micropropagation is considered a useful method for producing clonal plants for large-scale cultivation. The aim of this work is the improvement of myrtle micropropagation by comparing conventional propagation method in agar medium with the liquid culture by temporary immersion system, using the ElecTIS bioreactor. The explants (1.5-2.0 cm) were sterilized and inoculated in an MS nutrient medium, where different concentrations of BAP (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/L), combined with GA₃ at 0.1 mg/L and NAA at 0.03 mg/L, were evaluated. After 5 weeks, the developed shoots were transferred to the nutrient medium for multiplication which had the same composition as in the first stage of micropropagation. The results obtained after 4 subcultures show the highest proliferation rate (4.5) and the highest mean number of shoots (4.5) when the medium containing 1,0 mg/L BAP was used. In the rooting phase, at different concentrations of IBA (0.1; 0.2; 0.3; 0.5 mg/L) and IAA at 0.1 mg/L, the highest average number of roots (3.6) and satisfactory rooting rate (77%) was obtained using the treatment with 0.3 mg/L IBA. The nutrient medium with the optimal combination of hormones from the multiplication phase was also used in liquid culture with ElecTIS, where 3 immersion frequencies (8 min/8 h; 10 min/8 h; 12 min/16 h) were analyzed, by evaluating the Relative Growth Rate (RGR). The results show that the micropropagation in ElecTIS with the immersion frequency of 10 min/8 h was more effective (RGR of 6.2) than the one in solid (7.0 g/L of agar) and semi-solid (3.5 g/L) substrates (RGR of 5.3 and 4.5, respectively). Given the different RGR as

a parameter of comparison between micropropagation in agar media and in liquid culture in temporary immersion system, it is concluded that the *in vitro* propagation of myrtle using the ElecTIS bioreactor is a very promising method.

Keywords: MS, auxin, proliferation, liquid medium, ElecTIS

Introduzione

Il mirto (*Myrtus communis* L.) è una specie spontanea del Mediterraneo, molto diffusa in Italia e Albania. L'interesse per questa specie è legato ai suoi usi come pianta medicinale, aromatica, industriale, cosmetica, per alimentazione e artigianato (Scortichini, 1986). Le foglie di mirto ed i suoi frutti contengono una combinazione unica di ingredienti alimentari biologici, ma sono anche fonte di oli essenziali, antiossidanti e flavonoidi. La conservazione della flora spontanea è importante per i nostri Paesi e, pertanto, le conoscenze e gli studi su questa specie mirano all'applicazione di nuove tecniche di coltivazione.

Il mirto presenta difficoltà di adattamento alla propagazione vegetativa e comporta una significativa perdita di materiale vegetale. Per questo motivo, una possibile alternativa è la tecnica di micropropagazione (propagazione *in vitro*) e buoni risultati con genotipi di mirto sono stati ottenuti, ad esempio, da Ruffoni et al. (1994). Peraltro, di recente, al fine di ridurre i costi di micropropagazione delle varie specie, si sono sperimentate tecniche di coltura liquida con sistema ad immersione temporanea (TIS/Temporary Immersion System; Welander et al., 2013; Lambardi, 2012). I bioreattori per coltura in TIS si dividono in sistemi ad un solo contenitore (RITA[®], Platform, ElecTIS), oppure a due contenitori (Fiasche Gemelle, SETIS[™]). ElecTIS (brevetto n° 2617282) è una nuova proposta di bioreattore TIS, nato dalla collaborazione di Claudio Depaoli con il CNR-IBE di Sesto Fiorentino (FI). Le parti di ElecTIS sono realizzate in polipropilene trasparente e resistente al calore, quindi possono essere sterilizzate in autoclave (Capuana et al., 2018).

Materiali e metodi

I. Coltura convenzionale in substrato gelificato

Fase di allestimento della coltura

Il materiale di partenza proveniva dal popolamento di mirto della zona di Dajt, in Albania. Sono stati prelevati germogli ascellari in aprile, da piante mantenute in serre sperimentali del CTTA di Valona. Come espianti iniziali sono state usate gemme (1,5-2 cm di lunghezza), sterilizzate e inoculate in substrato MS (Murashige e Skoog, 1962), addizionato con GA₃ a 0,1 mg/L, BAP (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) e NAA a 0,03 mg/L, agar a 7 g/L, saccarosio al 3%; il pH è stato regolato a 5,7. Dopo 5 settimane, i germogli sviluppati sono trasferiti in substrato MS di moltiplicazione.

Fase di moltiplicazione

I germogli sono stati subcoltivati (4 volte) ogni 20 giorni in substrato MS con BAP, alle dosi sopra indicate, valutando in ogni subcoltura il tasso di moltiplicazione, il numero medio e la lunghezza dei germogli. Tutte le prove sono state fatte in 4 ripetizioni da 25 piante.

Fase di radicazione e di acclimatazione

Nelle fasi di radicazione è stato usato il substrato MS a diverse concentrazioni di IBA (0,1; 0,2; 0,3; 0,5) mg/L e IAA a 0,1 mg/L, valutando poi il tasso di radicazione dei germogli, il numero medio di radici prodotte per germoglio e la lunghezza media delle stesse. Dopo 18 giorni della fase di radicazione, le piantine hanno sviluppato un buon apparato radicale e sono state trasferite in serra, in tunnel di ambientamento, in substrato contenente torba (pH 6) e perlite (2:1).

II. Coltura liquida con ElectIS

Il substrato MS con la combinazione ottimale di ormoni della fase di moltiplicazione è stato utilizzato anche in coltura liquida con bioreattore ElectIS, dove sono state applicate diverse frequenze d'immersione, valutando poi il tasso di crescita relativa (TCR), così calcolato:

$$\text{TCR} = \frac{\ln \text{PF finale} - \ln \text{PF iniziale}}{\text{gg di coltivazione}} \times 100$$

ove PF è il peso fresco. Il TCR ottenuto è stato poi confrontato con quello della coltura in substrato gelificato (controllo). Come materiale di partenza sono usati germogli micropropagati in substrato MS con NAA a 0,03 mg/L, BAP a 1,0 mg/L, agar a 7 g/L, saccarosio (3%); il pH era stabilizzato a 5,7.

Le tesi a confronto sono state: (1) controllo su substrato gelificato con 7 g/L di agar; (2) controllo su substrato semi-gelificato con 3,5 g/L agar, entrambi in vasi di vetro da 500 ml con 20 piante ciascuno; (3) coltura liquida con bioreattore ElectIS a tre cicli di immersione: (i) 8 min/8 h con 30 piante di partenza; (ii) 10 min/8 h con 35 piante; (iii) 12 min/16 h con 30 piante. Per tutte le tesi, le prove sono state condotte in substrato di moltiplicazione MS con BAP a 1,0 mg/L. Dopo 30 giorni per ogni tesi è stato valutato il TCR.

Condizioni di coltura

Tutte le prove sono state condotte in camera di crescita con fotoperiodo di 16 h di luce, temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$, intensità luminosa di 3000 lux.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con programma JMP, Version 13,0 e ha riguardato l'analisi della varianza (ANOVA, $P \leq 0.05$) e il test Tukey-Kramer per la separazione delle medie.

Risultati e discussione

I. Coltura convenzionale in substrato gelificato

Fase di allestimento delle colture

Dopo cinque settimane di inoculazione degli espianti, fra i substrati basali utilizzati per l'allestimento delle colture, la sopravvivenza più alta (86%) si è verificata nel substrato MS con BAP alla dose di 1,0 mg/L e NAA a 0,03 mg/L (Fig. 1).

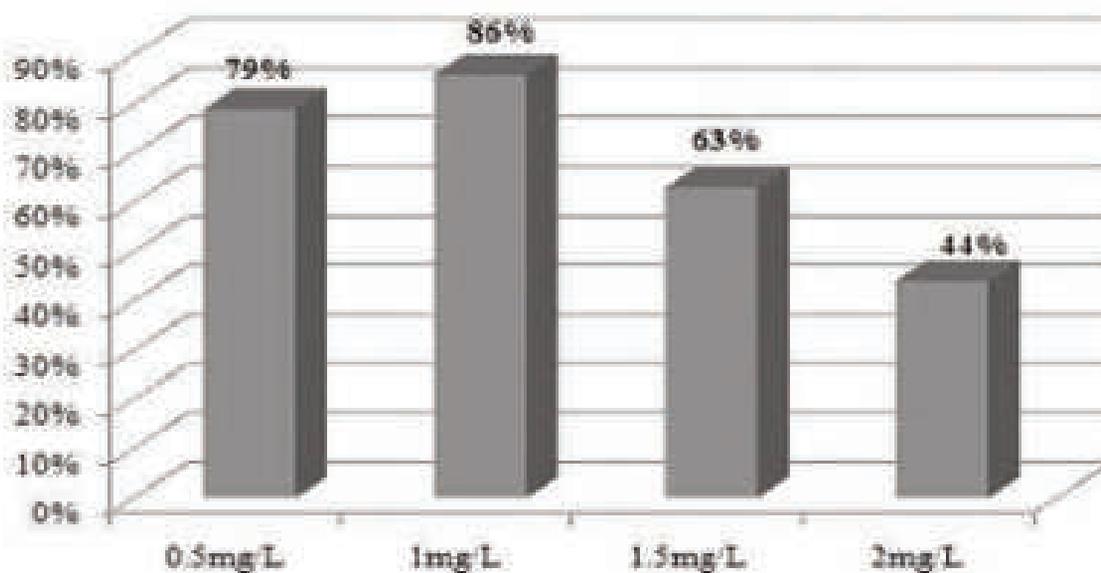


Fig. 1. Percentuale di sopravvivenza degli espianti a diverse concentrazioni di BAP.

Fig. 1. Survival percentage of explants at different BAP concentrations.

Fase di proliferazione

I risultati dopo 4 subcolture su substrato MS con diverse dosi di BAP hanno mostrato che il miglior risultato in qualità dei germogli (foglie grandi ben sviluppate, crescita attiva, assenza di necrosi) e di più alto numero medio di germogli per espianto (4,5) si è avuto con substrato contenente BAP alla dose di 1,0 mg/L (Fig. 2A; Tab. 1). Tale risultato conferma le osservazioni di Ruffoni et al. (2003) riguardo al fatto che le citochinine stimolano in modo soddisfacente la divisione cellulare e la formazione di gemme laterali in mirto, promuovendone così la proliferazione dei germogli. La proliferazione e l'allungamento delle gemme sono anche stimolati dalla combinazione della citochinina BAP con l'auxina NAA (Parra et al., 1996; Scarpa et al., 2000). A dosi di BAP superiori a 1,0 mg/L si ha diminuzione del numero di germogli e formazione di callo nelle colture.

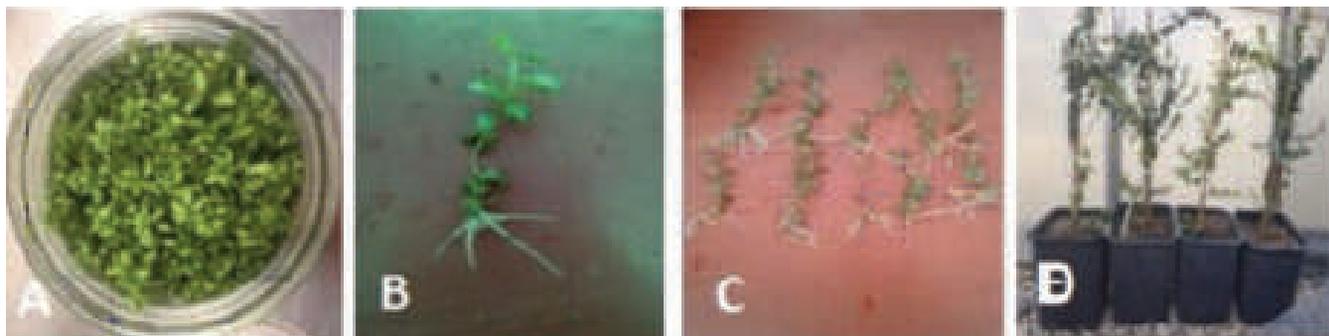


Fig. 2. Micropropagazione del mirto (BAP, 1,0 mg/L). A, fase di proliferazione; B-C, fase di radicazione; D, fase di acclimatazione.

Fig. 2. Micropropagation of myrtle (BAP, 1.0 mg/L). A, multiplication phase; B-C, rooting phase; D, acclimatization phase.

Tab. 1. Effetto della concentrazione di BAP sul numero e lunghezza media dei germogli per espianto.

Tab. 1. Effect of BAP concentration on mean number and length of shoots per explant.

BAP (mg/L)	Numero germogli per espianto	Lunghezza media germogli/espianto (cm)
0.5	4,0 ± 0,9 ^{ab}	3,3 ± 0,7 ^b
1	4,5 ± 1,0 ^a	3,9 ± 0,7 ^a
1.5	3,7 ± 0,8 ^b	2,8 ± 0,4 ^c
2	2,6 ± 0,6 ^c	1,6 ± 0,4 ^d

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative a $P \leq 0.05$

Fase di radicazione

Nella fase di radicazione a diverse combinazioni di IBA e IAA, le plantule hanno sviluppato un buon apparato radicale. I risultati mostrano che il maggior numero medio di radici (3,6) ed un tasso di radicazione soddisfacente (77%) sono stati ottenuti dal trattamento con IBA a 0,3 mg/L (Fig. 2B, C; Tab. 2). L'ANOVA sulla valutazione degli indicatori biometrici basati su prove ormonali ha dimostrato la sussistenza di differenze statisticamente significative per il livello di significatività $P \leq 0.05$ e test di Tukey-Kramer.

Tab. 2. Effetto della concentrazione di IBA sull numero e lunghezza media delle radici per espianto.

Tab. 2. Effect of IBA concentration on the mean number and length of roots/explants.

IBA (mg/L)	Numero medio radici/espianto	Lunghezza media radici/espianto (cm)
0.1	2,0 ± 0,6 ^c	2,4 ± 0,6 ^c
0.2	2,8 ± 0,8 ^b	3,5 ± 0,7 ^b
0.3	3,6 ± 0,9 ^a	4,3 ± 1,0 ^a
0.5	2,4 ± 0,8 ^{bc}	3,1 ± 0,8 ^b

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative a $P \leq 0.05$

Fase di acclimatazione

L'ambientamento in serra è spesso una fase critica delle plantule da micropropagazione (Damiano et al., 2008). Dopo 5 settimane in condizione *ex vitro*, le piantine sono state trapiantate in vasetti alveolati da dimensioni 40 x 60 cm con un totale di 54 alveoli (6 x 9) e successivamente trasferite in ombraio (Fig. 2D).

II. Coltura liquida con bioreattore ElecTIS

I risultati ottenuti con la coltura liquida in TIS, usando il bioreattore ElecTIS, sono riportati in Tab. 3. La frequenza d'immersione di 10 min ogni 8 h (pari a 30 min al giorno) è risultata la più efficace, con un TCR di 6,2, rispetto alla TCR della coltura in substrato gelificato con 7 g/L oppure 3,5 g/L di agar (rispettivamente 5,3 e 4,5) (Tab. 3; Fig 3 a,b,c). I germogli cresciuti in substrato tradizionale gelificato mostravano lunghi germogli e foglie piccole, rispetto di germogli coltivati in sistema ElecTIS che erano più corti e con foglie più grandi (Sota et al., 2020). L'utilizzo del substrato liquido in TIS elimina i costi per il gelificante e le dimensioni del contenitore permettono l'utilizzo di un numero maggiore di germogli in ogni unità, con tempi di subcoltura del mirto più lunghi e conseguente riduzione dei costi di manodopera, come evidenziato anche da De Carlo et al. (2013).

Tab. 3. Tasso di Crescita Relativo (TCR).

Tab 3. *Relative Growth Rate (RGR)*.

Sistema di coltura	Frequenza immersione	Peso medio iniziale	Peso medio finale	TCR
ElecTIS (30 piante)	8 min/8 h	5.5	31.7	5.8
ElecTIS (30 piante)	12 min/16 h	4.7	24.5	5.5
ElecTIS (35 piante)	10 min/8 h	6.2	39.6	6.2
Controllo 1: substrato gelificato, 7 g/L (20 piante)		4	19.6	5.3
Controllo 2: substrato gelificato, 3,5 g/L (20 piante)		3.4	13	4.7

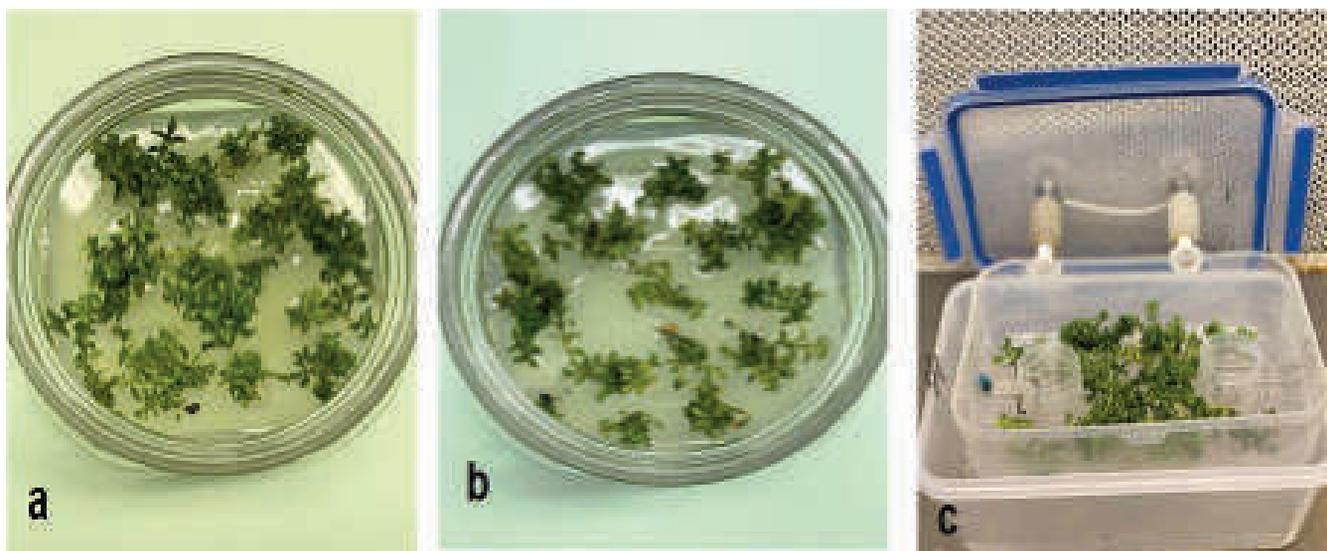


Fig. 3. Piante di mirto propagate *in vitro*. a, germogli su substrato gelificato con 7,0 g/L di agar; b, germogli su substrato semi-solido con 3,5 g/L di agar; c, germogli in bioreattore ElecTIS.

Fig. 3. *In vitro* propagated myrtle plants. A, shoots in solid medium (agar, 7.0 g/L); b, shoots in semi-solid medium (agar, 3.5 g/L); c, shoots in ElecTIS bioreactor.

Conclusioni

La micropropagazione del mirto ha dato risultati soddisfacenti con protocollo basato su substrato MS, addizionato di BAP (1,0 mg/L) e IBA (0,3 mg/L). L'uso del bioreattore ElecTIS si è dimostrato molto efficace nella micropropagazione del mirto, rispetto ai substrati agarizzati provati, come evidenziato dal maggiore valore del TCR. La coltura liquida in TIS con ElecTIS rappresenta, pertanto, l'evoluzione del tradizionale sistema di coltura in substrato gelificato per i suoi vantaggi in termini di qualità delle colture e costi di produzione più contenuti, in confronto alla micropropagazione tradizionale.

Ringraziamento

Si ringrazia il Sig. Claudio Depaoli per la fornitura del bioreattore ElecTIS.

Bibliografia

- Capuana M., Depaoli C., Ozudogru A., Lambardi M., 2018. Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore 'ElecTIS'. *Acta Italus Hortus* 21: 98-99.
- Damiano C., Padro M.D.A., Fratarelli A., 2008. Propagation and Establishment *in vitro* of myrtle (*Myrtus communis* L.), pomegranate (*Punica granatum* L.) and mulberry (*Morus alba* L.). *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (1): 3-8.
- De Carlo A., Benelli C., Cencetti G., Michelozzi M., 2013. Oli essenziali prodotto da piante di *Myrtus communis* allevate *in vitro* mediante l'impiego dell'innovativo bioreattore Plantform. *Natural* 1, 127: 48-49.
- Lambardi M., 2012. Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 12: 32-38.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantar.*, 15: 478-487.
- Parra R., Amo-Marco J.B., 1996. Effect of plant growth regulators and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. *Biol. Plantar.*, 38: 161-168.
- Ruffoni B., Gazzano A., Costanino C., 1994. *Myrtus communis* micropropagation: indolacetic acid effect on rooting. *Italus Hortus*, 1: 8-12.
- Ruffoni B., Airò M., Fascella G., Mascarello C., Zizzo G., Cervelli C., 2003. Rooting and acclimatization of ornamental myrtle genotypes. *Acta Horticulturae*, 616: 255-258.
- Scarpa M. G., Milia M., Satta M., 2000. The influence of Growth Regulators on Proliferation and Rooting of *In vitro* Propagated Myrtle. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 62: 175-179
- Scortichini M., 1986. Il Mirto. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 12: 47-53
- Sota V., Benelli C., Çuko B., Papakosta E., Depaoli C., Lambardi M., Kongjika E. 2021. Evaluation of ElecTIS bioreactor for the micropropagation of *Malus sylvestris* (L.) Mill., an important autochthonous species of Albania. - *Hort. Sci. (Prague)*, 48: 12-21.
- Welander M., Kuznetsova T., Persson J., Sayegh A., 2013. Evaluation of a new vessel system for micropropagation based on temporary immersion system (TIS) and applied physiology. In: "8th IVCHB" ISHS Symposium – Abstract Book. Coimbra, Portugal: 36.

Colture *in vitro* di callo di olivo per la produzione di metaboliti secondari bioattivi

Federica Blando^{1*}, Giovanni Colella¹, Giovanni Mita¹, Isabella Nicoletti², Enrica Donati²

* federica.blando@ispa.cnr.it

¹ Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Lecce

² Istituto per i Sistemi Biologici, CNR, Montelibretti (Roma)

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è stato l'allestimento di colture di calli di olivo a partire da espianti di foglia di microtalee *in vitro*, ottenute da piante in campo delle cultivar Leccino, Cellina di Nardò e Olivastro. I calli sono stati indotti su mezzo MS addizionato di 2,4-D (9,05 μM) e zeatina (0,91 μM). Le linee di callo stabilizzate sono state utilizzate per l'estrazione di composti polifenolici. Gli estratti sono stati analizzati mediante cromatografia liquida spettrometria di massa (UPLC/MS) rivelando che le colture callose erano in grado di produrre composti fenolici. Il composto polifenolico presente in modo quasi esclusivo è risultato essere il verbascoside, in quantità diversa a seconda della cultivar. La quantità più elevata (27 mg/g peso secco) è stata osservata in calli di 'Olivastro', ma il verbascoside è risultato maggiore in tutti i calli rispetto alle piante *in vivo*.

Parole chiave: colture *in vitro*, verbascoside, UPLC/MS,

Olive callus cultures for the *in vitro* production of bioactive secondary metabolites

Abstract: *In vitro* plant cell cultures are considered valuable bio-factories to produce several compounds of great importance for food, pharmaceutical and cosmetic sectors. Studies on olive *in vitro* cultures are limited because this species is considered recalcitrant to the biotechnological techniques. Olive is a natural source of bioactive compounds, molecules known for their valuable effects on human health, among which is verbascoside (a phenylethanoid, hydroxytyrosol derivative) known for its antioxidant, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory as well as antitumor activities. In this work we report the establishment of *in vitro* callus cultures from olive explants belonging to cultivars Leccino, Cellina di Nardò and Olivastro. Calli were induced incubating leaf explants in the dark on agarized Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4-D (9.05 μM) and zeatin (0.91 μM) as plant hormones. Established callus cultures were sub-cultivated monthly and assayed for their ability to produce secondary metabolites. Extracts were analyzed by liquid chromatography mass spectrometry (UPLC/MS) revealing that callus cultures were able to produce phenolic compounds. In particular, verbascoside was found almost exclusively at high level, with two isomers found at low level. The production of verbascoside was produced at different levels depending on the cultivar and resulted maximum (27 mg/g dry weight) in extracts from 'Olivastro' callus cultures. This is the first report on olive callus cultures producing verbascoside at high level.

Keywords: Acteoside, Verbascoside, Olive, Plant Cell culture

Introduzione

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle specie arboree da frutto più antiche ed importanti coltivate nel Mediterraneo, presente in Italia con una grande biodiversità in varietà ed ecotipi.

Con lo scopo di allestire colture *in vitro* di diverse cultivar di olivo, sono stati sterilizzati espianti prelevati direttamente da materiale in campo e saggiati diversi substrati di coltura per la micropropaga-

zione e la rigenerazione. Contestualmente, sono state allestite colture di callo a partire dalle foglie ed internodi degli espianti axenici.

I primi risultati sulla coltura *in vitro* dell'olivo sono riportati da Rugini, che ha messo a punto un substrato di coltura specifico per la micropropagazione di olivo, dato che la specie risultava recalcitrante alla coltura *in vitro* (Rugini, 1984). L'olivo risulta una specie recalcitrante anche per le manipolazioni biotecnologiche come organogenesi ed embriogenesi somatica (Rugini, 2016).

Colture *in vitro* di cellule di olivo sono state riportate in pochi casi in letteratura, per esempio Mohammad et al. (2019) hanno caratterizzato colture di calli per la presenza di enzimi e composti antiossidanti in risposta a differenti intensità luminose, mentre Hernandez et al. (2008) le hanno utilizzate per studi sul metabolismo degli acidi grassi; colture di cellule in sospensione sono state caratterizzate per la produzione di acidi triterpenici (Saimaru et al., 2007). Fra i metaboliti secondari presenti nella pianta *in vivo* di olivo (foglie e frutti), i composti fenolici sono molto rappresentati, e di particolare interesse sono i composti secoiridoidi: idrossitirosolo, tirosolo, e verbascoside, quest'ultimo presente in minore quantità. Il verbascoside (chiamato anche acteoside) è un feniletanoide glicosilato isolato per la prima volta in *Verbascum*, ma molto diffuso nel mondo vegetale (Alipieva et al., 2014). È un composto con numerose proprietà farmacologiche, incluse proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie e antineoplastiche (Alipieva et al., 2014). La produzione di verbascoside da cellule vegetali *in vitro* è stata riportata per alcune specie (Inagaki et al., 1991; Kubica et al., 2017; Temporiti et al., 2020; Arano-Valera et al., 2020). In olivo, Gentile e Uccella (2014) riportano la produzione di biofenoli (incluso verbascoside) da calli della cv Coratina, e Saimaru e Orihara (2010) hanno usato cellule in sospensione, per studi sulla via biosintetica del verbascoside.

In questo lavoro, si riporta la produzione e la caratterizzazione di verbascoside da colture di calli di olivo (cv Cellina di Nardò, Leccino, Olivastro).

Materiali e Metodi

Materiale vegetale e condizioni di crescita

Germogli di olivo (*Olea europea* L.) delle cultivars Cellina di Nardò, Leccino ed Olivastro sono stati prelevati e sterilizzati come segue: abbondante risciacquo sotto acqua corrente, immersione in etanolo al 70% per due minuti, successivamente in 7% NaOCl per 20 minuti, seguiti da abbondanti risciacqui in acqua sterile. Dai germogli axenici sono state prelevate foglie, dalle quali sono stati ottenuti espianti (0,5 cm x 0,5 cm) coltivati in piastre Petri (da 60 mm di diametro) con 10 mL di substrato di coltura Callus Induction Medium (CIM), contenente sali e vitamine MS (Murashige and Skoog, 1962), addizionato di saccarosio (3% w/v) e agar (0,7% w/v, Plant Agar, Duchefa, NL). Dopo sterilizzazione in autoclave a 121 °C per 20 minuti sono stati aggiunti i fitormoni 2,4-D (9,05 µM) e zeatina (0,91 µM), filtrati preventivamente con filtri da 0,2 µm.

Gli espianti di foglia sono stati posizionati con la lamina inferiore (abassiale) a contatto con il substrato di coltura. Per favorire l'induzione del callo, le colture sono state incubate al buio a 25 ± 2 °C, per 30 giorni. Il trasferimento dei calli su substrato fresco è avvenuto ad intervalli di quattro settimane, mantenendo sempre le colture al buio.

Estrazione dei composti polifenolici dalle cellule di callo in vitro

Porzioni di callo a fine ciclo di crescita (circa quattro settimane) sono state prelevate in triplo e liofilizzate. L'estrazione dei composti polifenolici è stata fatta macerando 100 mg di callo liofilizzato in 20 mL di solvente (metanolo 80%), overnight, a 4 °C. Dopo centrifugazione a 3500 g per 10 min a 4 °C, il supernatante è stato messo in pallone da evaporazione ed il pellet è stato estratto nuovamente, per 1 h su agitatore rotante a temperatura ambiente.

Dopo centrifugazione (come sopra) i supernatanti sono stati uniti ed il solvente evaporato *in vacuo* a 32 °C mediante rotavapor (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland); infine gli estratti sono stati liofilizzati.

Analisi UPLC-PDA-MS degli estratti

Gli estratti liofilizzati sono stati ridisciolti in una miscela metanolo/acqua (80/20 v/v) e filtrati su membrane in PTFE (4 mm x 0,2 µm; Sartorius) prima dell'analisi cromatografica. I campioni sono stati analizzati mediante Acquity™ UPLC H-Class Bio (Waters, Milford) costituito da un sistema di gestione dei solventi con miscelazione quaternaria, autocampionatore, modulo di termostatazione colonne e rivelatore PDA. L'UPLC era inoltre interfacciato con uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare (LXQ-MS System, Thermo Scientific). La sorgente di ioni per elettrovaporizzazione (ESI) operava in modalità negativa; gli spettri di massa full scan MS sono stati registrati nel range di massa m/z 100-700, utilizzando una temperatura del capillare di 275 °C, un voltaggio del capillare di -10 V, un voltaggio spray di 3,60 kV e rispettivamente un flusso di sheath gas e auxiliary gas di 10 e 5 unità arbitrarie. La separazione cromatografica è stata ottenuta su colonna ACQUITY UPLC HSS T3 (150 x 2,1 mm; 1,8 mm) utilizzando una fase mobile costituita da acqua (fase A) ed acetonitrile (fase B) entrambi acidificati con lo 0,1% (v/v) di acido formico. L'analisi dei campioni è stata eseguita mediante la seguente eluizione a gradiente: 0 - 3 min da 85% di A e 15% di B a 82% di A e 18% di B; 3 - 6,5 min da 82% di A e 18% di B a 77% di A e 23% di B; 6,5 - 10 min da 77% di A e 23% di B a 40% di A e 60% di B; 10 - 11 min da 40% di A e 60% di B al 100% di B. Il volume di iniezione era di 2 µL e la velocità di flusso 0,4 mL/min. I cromatogrammi sono stati registrati alle lunghezze d'onda di 280, 320 e 350 nm.

Il metodo analitico ottimizzato è stato validato in termini di linearità, sensibilità e precisione. Il limite di rilevabilità (LOD) ed il limite di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati come la concentrazione di campione in grado di fornire un picco cromatografico rispettivamente 3 volte o 10 volte più intenso del rumore di fondo della linea di base del cromatogramma. LOD e LOQ calcolati per il verbascoside sono stati rispettivamente 0,10 µg/mL e 0,36 µg/mL.

L'analisi quantitativa del verbascoside è stata eseguita con il metodo della calibrazione esterna. La curva di calibrazione è stata costruita analizzando in triplicato soluzioni standard di verbascoside a diverse concentrazioni (n = 6) comprese tra 0,36 - 840 µg/mL.

Una soluzione standard contenente verbascoside è stata analizzata per le prove di ripetibilità. Sei repliche sono state analizzate in un giorno per calcolare la precisione intra-day; la stessa procedura è stata ripetuta in tre giorni consecutivi per calcolare la precisione inter-day. La precisione è stata espressa come deviazione standard relativa (RSD) ed in entrambi i casi la percentuale di errore non superava mai il 2%.

Analisi statistica

Le analisi (estrazione e quantificazione UPLC-MS) sono state fatte in triplicato. La comparazione statistica dei dati è stata condotta con analisi ANOVA ad una via, seguita da post-test Bonferroni (GraphPAD Prism Software). Valori di $P \leq 0,001$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Dopo diversi tentativi di sterilizzazione dei germogli prelevati in campo, è stato possibile allestire colture axeniche di olivo, cv Cellina di Nardò, Leccino ed Olivastro (Fig. 1A). Gli espianti di foglia (Fig. 1B), dopo circa un mese dalla messa in coltura, in condizioni di buio, hanno prodotto callo (Fig. 1C) che ha continuato a proliferare ed è stato subcoltivato ogni 30 giorni (Fig. 1D). L'aspetto del callo, una volta che le colture si sono stabilizzate, è risultato diverso per le differenti cultivar, soprattutto per quanto riguarda il colore, mentre la consistenza era simile e molto friabile (Fig. 1E).

I dati ottenuti dall'analisi cromatografica degli estratti ottenuti dalle porzioni di calli delle diverse cultivar hanno evidenziato la presenza di un composto presente in quantità elevata e di pochi altri composti presenti in quantità non significative. Dalla combinazione delle informazioni ottenute mediante spettrofotometria UV-visibile con i dati della spettrometria di massa e dal confronto con soluzioni standard di riferimento, è stato possibile identificare il composto presente in maggiore quantità nei campioni analizzati come il verbascoside ed i composti presenti in piccole quantità come isomeri del verbascoside (Fig. 2, 3, 4).

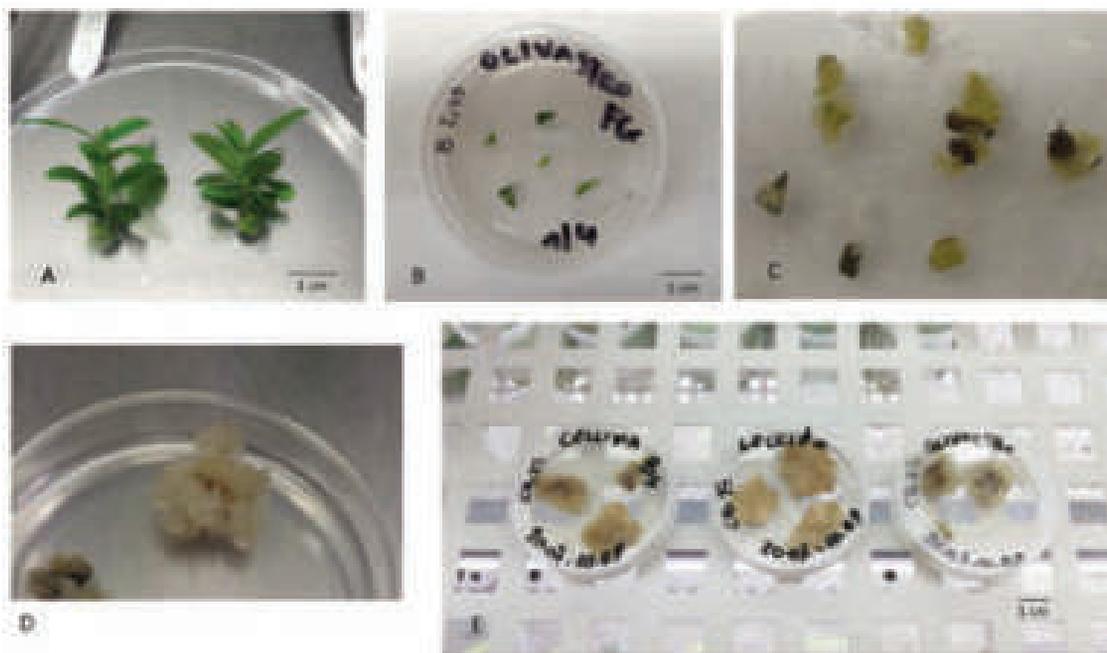


Fig. 1. Colture *in vitro* di olivo (*Olea europea* L.). A: Germogli micropropagati di cv Cellina di Nardò, dopo due mesi dalla messa in coltura; B: Espianti di foglia di cv Olivastro su substrato di coltura per induzione di callo; C: Proliferazione di callo allo stadio iniziale; D: Callo in attiva proliferazione; E: Linee di callo stabilizzate (cv Cellina di Nardò, cv Leccino, cv Olivastro).

Fig. 1. In vitro culture of olive (Olea europea L.). A: cv Cellina di Nardò microshoots, after two months from the in vitro settlement; B: Starting leaf explants (cv Olivastro) on CIM (callus induction medium); C: Starting callus proliferation; D: Actively growing callus; E: Established callus lines (cv Cellina di Nardò, cv Leccino, cv Olivastro).

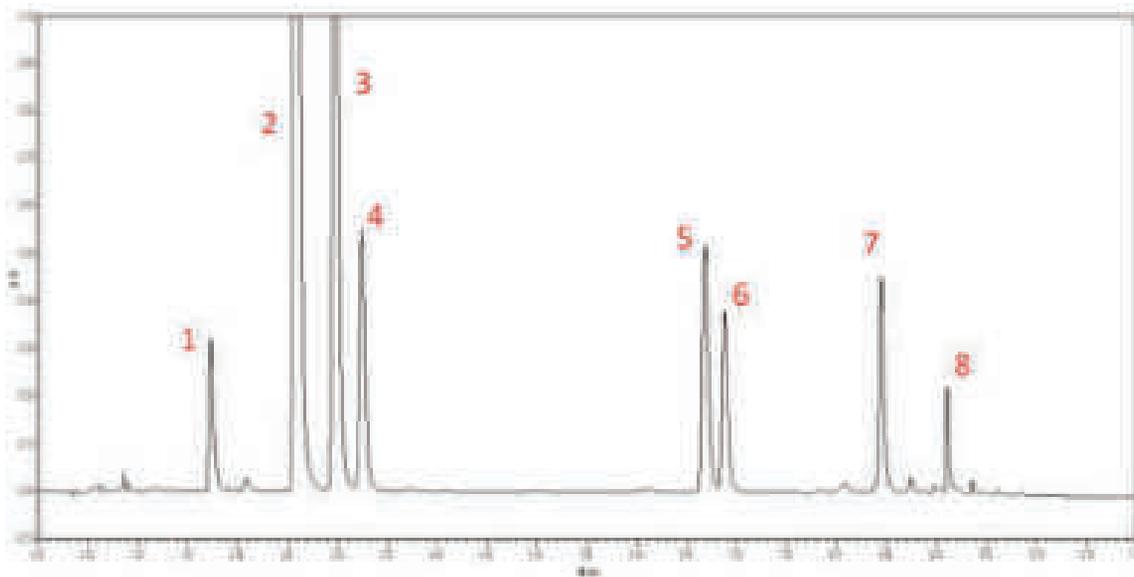


Fig. 2. Cromatogramma UPLC – PDA della miscela standard. Identificazione dei picchi: 1) Idrossitirosole; 2) Tirosole; 3) Acido- 4-idrossifenilacetico; 4) Acido vanillico; 5) Luteolina 7-glucoside; 6) Verbascoside; 7) Apigenina 7-glucoside; 8) Oleuropeina.

Fig. 2. UPLC-PDA chromatogram of standards mix. Peaks identification: 1) Hydroxytyrosol; 2) Tyrosol; 3) 4-hydroxyphenylacetic acid; 4) Vanillic acid; 5) Luteolin 7-glucoside; 6) Verbascoside; 7) Apigenin 7-glucoside; 8) Oleuropein.

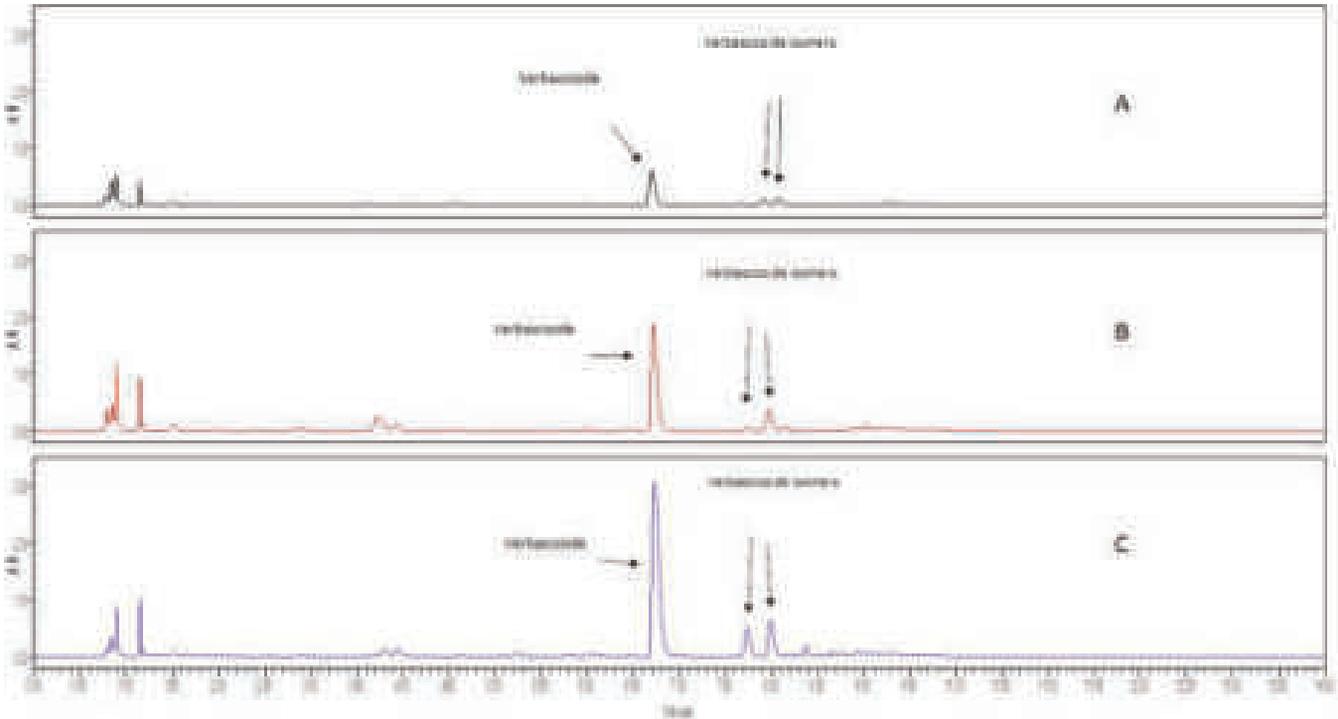


Fig. 3. Confronto tra i profili cromatografici ottenuti mediante UPLC-PDA degli estratti di callo di: A) cv Leccino; B) cv Cellina di Nardò; C) Olivastro ($\lambda = 320 \text{ nm}$).

Fig. 3. UPLC-PDA chromatograms from callus extracts of: A) cv Leccino; B) cv Cellina di Nardò; C) cv Olivastro ($\lambda = 320 \text{ nm}$).

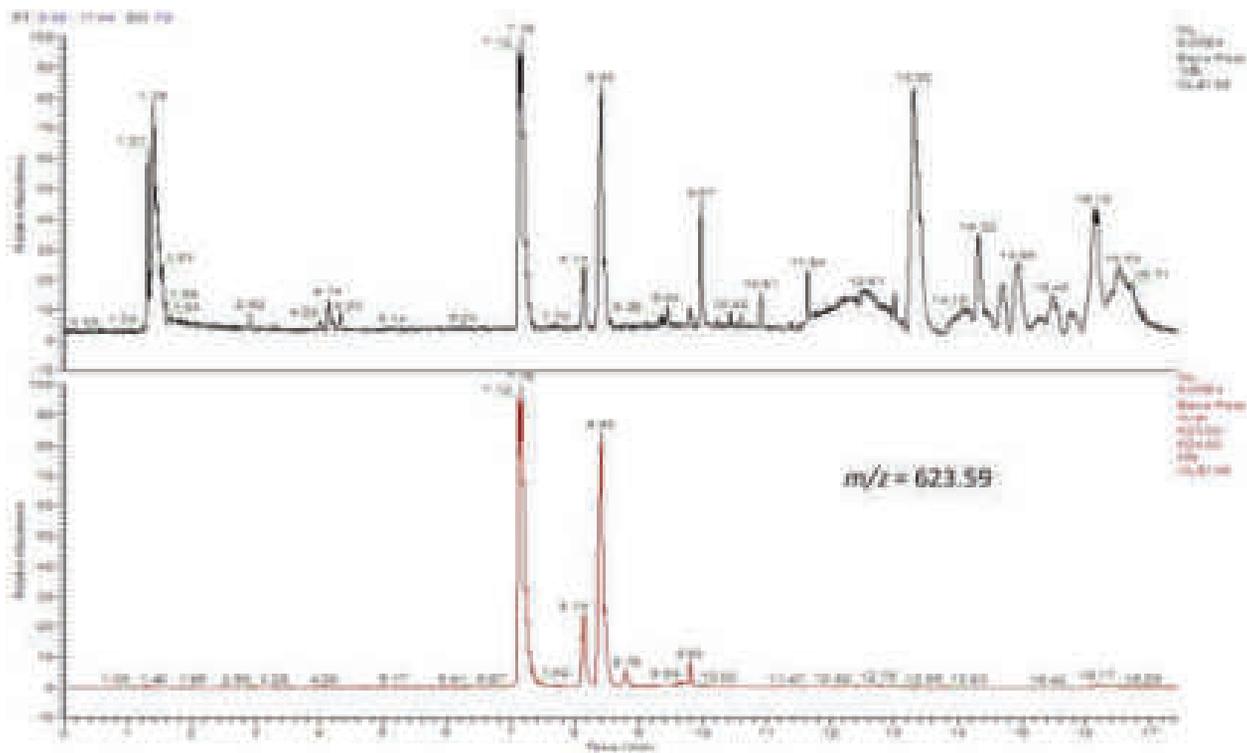


Fig. 4. Profilo cromatografico ottenuto mediante UPLC-ESI-MS dell'estratto di callo (cv Cellina di Nardò). Ione molecolare $[M-H]^-$ $m/z = 623.59$.

Fig. 4. UPLC-ESI-MS chromatogram of callus extract (cv Cellina di Nardò). Molecular ion $[M-H]^-$ $m/z = 623.59$.

L'analisi quantitativa eseguita sugli estratti dei calli di olivo ha evidenziato differenze notevoli nella quantità di verbascoside prodotta dai calli nelle diverse cultivar. In particolare i risultati ottenuti hanno evidenziato che la cv Olivastro presentava il più alto livello di verbascoside, con 27,0 mg/g dry weight (DW), seguita dalla cv Cellina di Nardò (10,4 mg/g DW) e cv Leccino (3,9 mg/g DW) (Tab. 1).

Tab. 1. Contenuto di verbascoside (mg/g DW) in colture di callo di diverse cultivar di olivo alla fine del ciclo di crescita.

Tab. 1. *Verbascoside content (mg/g DW) in callus culture of different olive cultivars at the end of the growth cycle.*

cv	Verbascoside mg/g DW
Leccino	3,9 ± 0,30 <i>c</i>
Cellina	10,4 ± 0,01 <i>b</i>
Olivastro	27,1 ± 0,03 <i>a</i>

I dati sono la media ± Standard Deviation (n=3).

Per ogni colonna, lettere diverse indicano valori statisticamente differenti a $P \leq 0.001$.

Discussione e Conclusioni

La possibilità di produrre composti bioattivi da colture vegetali *in vitro* riveste un interesse applicativo in considerazione dei vantaggi propri di questa tecnologia. Tra questi, sono da considerare che la produzione *in vitro* di molecole di interesse è indipendente da fattori climatici e ambientali e vi è quindi la possibilità di ottenere produzioni non legate alla stagionalità e allo stadio di sviluppo della pianta che spesso accumula i metaboliti di interesse solo in particolari organi o tessuti. Inoltre, la coltura *in vitro* risulta esente da patogeni che possono limitare fortemente lo sviluppo delle colture in pieno campo, ciò elimina anche la necessità di trattamenti chimici per la difesa della pianta stessa.

Il verbascoside è un composto che possiede numerose attività biologiche con effetti positivi nei confronti di diverse patologie (Alipieva et al., 2014). Strutturalmente è un feniletanoide glicosilato, generalmente contenuto in basse dosi *in planta* anche se molto diffuso nel mondo vegetale. Sebbene la produzione di verbascoside da cellule vegetali *in vitro* sia stata già riportata per alcune specie, e.g., *Syringa* sp., *Buddleja* sp., *Verbascum* sp e altre (Inagaki et al., 1991; Kubika et al., 2017; Temporiti et al., 2020; Arano-Valera et al., 2020), i lavori pubblicati su olivo sono limitati per la scarsa predisposizione di questa specie alla coltura *in vitro*. Tuttavia, data l'importanza economica della coltura, disporre di colture *in vitro* di olivo è di notevole interesse non solo per la produzione di composti bioattivi ma anche per la possibilità di interventi di miglioramento genetico della specie attraverso le recenti tecnologie di evoluzione assistita che necessitano di colture *in vitro* e di validi protocolli di rigenerazione.

In questo lavoro sono state ottenute colture di callo di olivo delle cultivar Leccino, Cellina di Nardò e Olivastro. I calli ottenuti sono stati in grado di produrre verbascoside in quantità diverse e in particolare gli estratti ottenuti dalla cv Olivastro hanno mostrato la più elevata quantità di verbascoside risultata pari al 2,7% del peso secco.

È importante evidenziare che i valori osservati sono molto interessanti in considerazione di quanto riportato in letteratura su colture *in vitro* o foglie di olivo. In uno studio sui composti bioattivi ottenuti da calli di olivo della cv Coratina, Gentile e Uccella (2014) hanno osservato una produzione di verbascoside pari a 0,56 mg/g DW (equivalente allo 0,056%). Gli stessi autori hanno evidenziato che le foglie *in vivo* contenevano 0,15 mg/g DW di verbascoside mentre le olive all'invasatura ne contenevano 1,19 mg/g DW. Martínez-Navarro et al. (2023) hanno osservato in estratti acquosi di foglie ottenute da olivi selvatici e da cultivar spagnole e greche, la presenza di verbascoside nel range compreso tra 1,98-3,97 mg/g DW. Infine, in estratti ottenuti da sospensioni cellulari di olivo, Saimaru e Orihara (2010) hanno osservato un valore di verbascoside pari a 1,7% del peso secco.

Le colture di callo da noi ottenute rappresentano quindi un interessante sistema per la produzione

biotecnologica di verbascoside. È interessante notare inoltre che gli estratti ottenuti dai calli contenevano quasi esclusivamente verbascoside e isoverbascoside e pertanto il sistema è molto promettente per la produzione e purificazione di verbascoside. Sono attualmente in corso attività per l'allestimento di sospensioni cellulari a partire dai calli sopra descritti da utilizzare per lo scale-up del processo di produzione in continuo di verbascoside.

Bibliografia

- Alipieva K., Korkina L., Orhan I.E., Georgev M.I., 2014. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32: 1065-1076.
- Arano-Varela H., Fernández F.J., Estrada-Zúñiga M.E., Cruz-Sosa F., 2020. Verbascoside production in long-term *Buddleja cordata* Kunth cell suspension cultures. *3 Biotech*, 10: 245. DOI:10.1007/s13205-020-02222-4
- Inagaki N., Nishimura H., Okada M., Mitsuhashi H., 1991. Verbascoside production by plant cell cultures. *Plant Cell Reports*, 9: 484-487.
- Gentile L., Uccella N.A., 2014. Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. var. Coratina) by LC-MS. *Food Research International*, 55: 128-136. DOI:10.1016/j.foodres.2013.10.046
- Hernandez M.L., Guschina I.A., Martínez-Rivas, J.M. Mancha M., Harwood J.L., 2008. The utilization and desaturation of oleate and linoleate during glycerolipid biosynthesis in olive (*Olea europaea* L.) callus cultures. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2425-2435.
- Martínez-Navarro M.E., Kaparakou E.H., Kanakis C.D., Cebrián-Tarancón C., Alonso G.L., Salinas M.R., Tarantilis P.A., 2023. Quantitative Determination of the Main Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Toxicity of Aqueous Extracts of Olive Leaves of Greek and Spanish Genotypes. *Horticulturae*, 9: 55. <https://doi.org/10.3390/>
- Mohammad S., Khan M.A., Ali A., Khan L., Khan M.S., Mashwania Z.R., 2019. Feasible production of biomass and natural antioxidants through callus cultures in response to varying light intensities in olive (*Olea europaea* L.) cult. *Arbosana. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 193: 140-147.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Rugini, E., 1984. *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.
- Rugini E., Cristofori V., Silvestri C., 2016. Genetic improvement of olive (*Olea europaea* L.) by conventional and *in vitro* biotechnology methods. *Biotechnology Advances*, 34: 687-696. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.03.004
- Saimaru H., Orihara Y. 2010, Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *Journal of Natural Medicines*, 64: 139-145. DOI: 10.1007/s11418-009-0383-z.
- Saimaru H., Orihara Y., Tansakul P., Kang Y.-H., Shibuya M., Ebizuka Y., 2007. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55: 784-788.
- Temporiti M.E.E., Frezza C., Beccaccioli M., Gelardi L., Bianco A., Bonina F.P., Nielsen E., 2020. Production of verbascoside and its analogues in *in vitro* cultures of *Verbascum thapsus* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 140: 83-93.
- Kubica, P., Szopa, A., Ekiert, H., 2017. Production of verbascoside and phenolic acids in biomass of *Verbena officinalis* L. (vervain) cultured under different *in vitro* conditions. *Natural Product Research*, 31: 1663-1668.

Identificazione di metaboliti secondari coinvolti nella risposta a radiazione UV-B in cellule in coltura di *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*

Giulia Santunione^{1*}, Giuseppe Montevercchi^{1,2}, Andrea Carli², Elisabetta Sgarbi^{1,2}

* elisabetta.sgarbi@unimore.it

¹ Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia

² Centro Interdipartimentale BIOGEST - SITEIA, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia

Riassunto

Il callo ottenuto da espunti fogliari di vite *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* (cv Lambrusco Marani e Sangiovese) è stato esposto in condizioni controllate a radiazione UV-B per valutare la capacità di produzione di composti fenolici in risposta allo stress. L'esposizione *short-term* ai raggi UV-B ha indotto cambiamenti nel metabolismo fenolico: solo nel callo della cv L. Marani è stata osservata una maggiore produzione di polifenoli totali. Nel callo di entrambe le cultivar è stata identificata una decina di molecole, la maggior parte delle quali è presente solo dopo esposizione alla radiazione UV-B. Il sistema utilizzato offre interessanti prospettive per ottenere *in vitro* metaboliti secondari ad azione antiossidante.

Parole chiave: callo, vite, stress abiotico, polifenoli

Identification of secondary metabolites involved in the response to UV-B radiation in cultured cells of *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*

Abstract: Abiotic stresses are physical-chemical factors capable of limiting growth, reproductive capability, and productivity of plants. One of the plant's adaptation strategies for their defence against altered environmental conditions is the activation of biosynthetic pathways and the synthesis of secondary metabolites. Among the molecules most involved in the response to stress, phenolic compounds play an important role as signalling, antioxidant, shielding molecules, also effective in the response to biotic stress. One of the possible abiotic stresses, which induces expression of many genes usually involved in defence, wounding, or general stress responses, is UV-B irradiation. Callus tissue is composed of cells that have undergone a process of de-differentiation, which means that they have lost their specialized morphology and functions and become more similar to undifferentiated cells. Callus formation could be promoted by both the endogenous phytohormones and the exogenous plant growth regulators as auxins and cytokinins; its induction is furthermore facilitated by mechanical stress and wounding. This work aimed at investigating the phenolic production from callus cultures obtained from grapevine (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) leaf explants of two cultivars, Lambrusco Marani (L. Marani) and Sangiovese, when exposed to UV-B radiation as stress source. Phenols production through callus tissue cultivation could represent a smart way to increase the availability of these compounds for several pharmaceutical, cosmetic and food applications. In this study, callus *massulae* of each cultivar were exposed under controlled environmental conditions to UV-B radiation for one hour a day for three consecutive days; after two days (recovery time) the extraction and determination of total phenolic content was carried out by means of spectrophotometric measurements at 720 nm; furthermore, the identification of individual phenolic compounds was performed with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry–Electro Spray Ionization–Ion Trap (HPLC-MS-ESI). Short-term exposure to UV-B rays induced changes in phenolic metabolism; in L. Marani callus there was a greater production of total polyphenols than in the control, while in Sangiovese callus no significant differences emerged between control and treated callus. The qualitative analysis was done on three classes of polyphenols, *i.e.* flavonoids, anthocyanins and stilbenes. About a dozen molecules were identified in callus of the two

cultivars, most of which appeared only after treatment; these are mainly flavonoids, known to be primarily involved in the response to UV radiation. The production of stilbenes was particularly interesting for the types of molecules, including *trans*-resveratrol, *trans*-resveratrol-*O*-glucoside and *cis*-piceid, found in Sangiovese, and viniferin, identified in L. Marani. This *in vitro* system may offer many interesting prospects for obtaining secondary metabolites with antioxidant activity.

Keywords: callus, grapevine, abiotic stress, polyphenols

Introduzione

Le piante sono frequentemente esposte ad un ampio range di stress biotici e abiotici: raggi UV, inquinanti, ferite, patogeni e parassiti, basse temperature, ecc., che inducono danni e cambiamenti fisiologici, con ripercussioni sulla crescita, sulla fitness riproduttiva e sulla produttività (Dixon e Paiva, 1995). È nota, tuttavia, la capacità degli organismi vegetali di rispondere alle condizioni stressanti attivando strategie per adattarsi all'ambiente o per limitare gli effetti negativi degli stress, come l'attivazione o il potenziamento di vie metaboliche che portano alla sintesi o all'accumulo di composti fenolici (Sharma et al., 2019; Sgarbi et al., 2003). Tra le varie tipologie di stress abiotici, la radiazione UV-B induce l'espressione di molti geni coinvolti nelle risposte di difesa, attivando le vie biosintetiche dei fenilpropanoidi (Jansen et al., 1998). Questo studio ha lo scopo di valutare la risposta alla radiazione UV-B in cellule in coltura *in vitro*, in termini di produzione di composti fenolici, con particolare riguardo a flavonoidi, proantocianidine e stilbeni. Le cellule utilizzate nella sperimentazione sono state ottenute attraverso un processo di callogenesi *in vitro* da espianti di foglie di vite di due diverse cultivar, Lambrusco Marani e Sangiovese.

Materiali e Metodi

Campionamento e preparazione degli espianti

Talee legnose delle cultivar Lambrusco Marani e Sangiovese sono state prelevate durante il riposo vegetativo dalla collezione di campo dell'IIS "A. Zanelli" di Reggio Emilia. Le talee sono state mantenute a temperatura ambiente e a luce naturale per la forzatura delle gemme. Da ciascun tralcio sono state prelevate foglie con area di circa 9 cm². Le foglie sono state lavate in acqua corrente, pre-sterilizzate in etanolo a 70° per 3 sec. e sterilizzate con una soluzione di NaOCl all'1,5% Cl attivo e Tween 20 allo 0,1%, per 20 min; le foglie sono state lavate abbondantemente con acqua sterile e tagliate in due porzioni più piccole eliminando il picciolo e la nervatura principale per ricavare gli espianti.

Callogenesi

Per indurre la produzione di callo, è stato utilizzato terreno MS (Murashige & Skoog; Duchefa) con saccarosio 30 g/L e agar 6 g/L; il pH è stato portato a 5,7. Dopo sterilizzazione, al terreno sono stati aggiunti: vitamine (Nitsch & Nitsch, Duchefa) 1 ml/L (da soluzione concentrata), 2,4 D (acido 2,4 dicloro-fenossiacetico, Duchefa) 4,5 mM e BA (benziladenina, Duchefa) 0,4 mM. Gli espianti sono stati collocati sul terreno di coltura con la pagina adassiale rivolta verso l'alto e le piastre Petri sono state incubate in camera di crescita a 23 °C ± 1 °C con un fotoperiodo di 12 h. Ogni tre settimane il callo era trasferito su terreno MS con la stessa composizione.

Esposizione a radiazione UV-B

Per il trattamento è stata utilizzata una lampada UV-B (TL-20 W/01, Philips) con range di emissione da 290 nm a 315 nm e picco a 311 nm. La lampada è stata posta a 40 cm dal ripiano su cui erano poste le piastre Petri. Poiché le piastre Petri utilizzate sono di polistirene e questo materiale ha buoni valori di trasmittanza (0,84% a 311 nm), esse sono state mantenute chiuse durante i trattamenti. L'esposizione è avvenuta per 3 giorni consecutivi, per 1 ora al giorno, iniziando l'esperimento sempre alla stessa ora. Al termine dei trattamenti le piastre sono state riposte in camera di crescita per due giorni (*recovery time*) prima di procedere con le analisi. Le masse di callo non esposte a UV-B ma sottoposte a

trasferimento e *recovery time* come quelle esposte, sono state considerate come controllo. Tutte le prove sono state allestite in duplicato. Il test è stato ripetuto due volte.

Estrazione dei composti fenolici

Per l'estrazione dei fenoli 1 g di callo è stato omogeneizzato con Ultra-Turrax (IKA) a 3000 giri/min per 1 min sotto flusso di azoto con 5 mL di solvente, metanolo-acqua (90:10), mantenendo il campione in ghiaccio e al buio. I campioni sono stati poi posti ad una temperatura di 4 °C per 1 h su agitatore magnetico in agitazione continua; dopo centrifugazione a 9500 rpm per 10 min a +5 °C, è stato recuperato il soprannatante; il pellet residuo è stato sottoposto ad altri due cicli di estrazione, al termine delle quali il volume è stato portato a 25 mL e conservato a -18 °C fino al momento delle analisi.

Contenuto di Polifenoli Totali

Un'aliquota di 0,5 mL di estratto è stata posta in un matraccio da 50 mL con l'aggiunta di 30 mL di acqua deionizzata e 2,5 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu. Sono stati aggiunti 10 mL di soluzione di carbonato di sodio al 15% e infine il campione è stato portato a volume con acqua. Dopo 2 h al buio, è stato determinato l'assorbimento a 750 nm con spettrofotometro (Jasco). Il contenuto di polifenoli è stato determinato basandosi su curva di calibrazione ottenuta con acido gallico a titolo noto.

Metodo di identificazione delle sostanze fenoliche mediante LC-MS-ESI(-)IT

L'analisi è stata condotta iniettando 10 µL di estratto in una colonna *reversed-phase* fenil-esil (Poroshell, Agilent). L'eluizione è avvenuta in modalità a gradiente. L'eluente era costituito da una fase A (H₂O + acido acetico 0,2 %) e da una fase B (acetonitrile) ed era pompato in colonna con un flusso di 0,5 mL/min. L'interfaccia (ESI) lavorava in modalità negativa. L'identificazione è stata eseguita mediante analisi dei dati tramite il software 6300 Series Ion Trap LC/MS versione 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Brema, Germania). I composti sono stati identificati in base alla valutazione dei pattern di frammentazione – dato dall'insieme di ioni precursori [M]⁻ *m/z* e ioni prodotti MS² *m/z* – ricavato dagli spettri di massa e confrontati con i dati spettrometrici descritti in letteratura (Flamini et al., 2015; Püssa et al., 2006), tenendo conto anche del tempo e dell'ordine di eluizione.

Analisi Statistica

Le differenze tra i trattamenti sono state valutate mediante test ANOVA a una via seguito, in caso di differenze significative ($p \leq 0,05$), da test di confronto multiplo post hoc di Tukey.

Risultati

I risultati ottenuti dall'analisi spettrofotometrica sono riportati in tabella 1; essi hanno evidenziato un incremento dopo l'esposizione a UV-B solo nella cultivar L. Marani.

L'analisi dei composti fenolici effettuata mediante LC-MS-ESI-trappola ionica ha dato i risultati mostrati in Tab. 2 per il callo della cv L. Marani e in Tab. 3 per il callo della cv Sangiovese. Nel callo derivato da foglie di vite cv. L. Marani sono stati identificati 11 diversi composti fenolici; di questi, 9 sono stati rilevati solo dopo il trattamento UV-B. Solo diidroquercetina-3-*O*-esoside era presente sia nel callo di controllo che nel callo trattato. Le analisi condotte sul callo derivato dalla cv Sangiovese hanno consentito di identificare 12 composti fenolici, di cui 9 rilevabili solo nei campioni esposti a UV-B e 3 identificati anche nel callo non esposto. Dal confronto tra le due cultivar emerge che 6 composti sono presenti in entrambe: diidroquercetina-3-*O*-esoside, quercetina-3-*O*-galattoside, quercetina-3-*O*-glucoside, kaempferolo-3-*O*-galattoside, kaempferolo-3-*O*-glucoside, isoramnetina-3-*O*-esoside. Tra i composti identificati esclusivamente nel callo da cv. Marani sono da segnalare viniferina, diidroquercetina-3-*O*-ramnoside, miricetina-3-*O*-galattoside, miricetina-3-*O*-glucoside, diidrokaempferolo-3-*O*-ramnoside. I composti rilevati solo nel callo della cv. Sangiovese sono: diidroquercetina-3-*O*-glucoside, quercetina-3-*O*-glucorinide, *trans*-resveratrolo-*O*-glucoside, *trans*-resveratrolo, *cis*-piceide e procianidina B2.

Tab. 1. Contenuto in polifenoli totali in calli di vite esposti a UV-B e relativi controlli. L'analisi della varianza a una via (ANOVA) è espressa come F-value. * = $p \leq 0.05$; *** = $p \leq 0.001$; n.s.: non significativo. Test di Tukey: lettere diverse indicano valori medi statisticamente diversi. MC = callo cv controllo Marani; MT = callo trattato cv Marani (colture esposte a UV-B); SC = callo controllo cv Sangiovese; ST = callo trattato cv Sangiovese (colture esposte a UV-B).

Tab. 1. Content in total polyphenols in grapevine calli exposed to UV-B and related controls. The analysis of variance at one way (ANOVA) is expressed as F-value. * = $p \leq 0.05$; *** = $p \leq 0.001$; n.s.: not significant. Test di Tukey: different letters indicate means values statistically different. MC = control callus cv Marani; MT = treated callus cv Marani (culture exposed to UV-B); SC = control callus cv Sangiovese; ST = treated callus cv Sangiovese (culture exposed to UV-B).

	Media (mg/kg)	D. S. (\pm)	CV (%)	Tukey test	Tukey test (L. Marani)	Tukey test (Sangiovese)
ANOVA (F_{value})				37***	19*	n.s.
MC	9.06	0.25	2.18	b	a	--
MT	11.19	0.64	5.75	b	b	--
SC	6.12	1.09	17.75	a	--	n.s.
ST	4.47	0.26	5.76	a	--	n.s.

Tab. 2. Identificazione dei composti fenolici nei campioni di callo cv L. Marani, esposti a UV-B e controlli; tempi di ritenzione, ioni precursori e prodotti (m/z). T = campioni trattati (colture di callo esposte a UV-B); C = campioni di controllo. A = Flamini et al., (2015); B = Püssa et al., (2006).

Tab. 2. The identification of phenolic compounds of callus cv L. Marani, exposed to UV-B and controls; retention times, precursor and product ions (m/z). T = treated samples (callus cultures exposed to UV-B); C = control samples. A = Flamini et al., (2015); B = Püssa et al., (2006).

Composti	R_f min	[M] ⁺ m/z	MS^2 m/z	Riferimenti	Campioni
Diidroquercetina-3-O-esoside	14.4	465	447; 343; 303; 285	A	T; C
Resveratrolo dimero (viniferina)	14.9	455	373	B	T
Diidroquercetina-3-O-ramnoside	14.9	449	405; 289	A	T
Kaempferolo-3-O-galattoside	15.1	447	401	A	T
Miricetina-3-O-galattoside	15.2	479	153; 415	A	T
Quercetina-3-O-galattoside	15.2	463	417; 393	A	T
Miricetina-3-O-glucoside	15.3	479	433; 407; 393; 325	A	T
Quercetina-3-O-glucoside	15.4	463	405	A	T
Kaempferolo-3-O-glucoside	15.8	447	401	A	T
Isoramnetina-3-O-esoside	16.1	477	431	A	T
Diidrokaempferolo-3-O-ramnoside	16.8	433	421; 413; 405	A	C

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio mostrano che anche un'esposizione "a breve termine" ai raggi UV-B, induce cambiamenti nel metabolismo fenolico. Lo stress da UV-B stimola il metabolismo dei fenoli in entrambe le cultivar, con particolare riguardo alle 3 classi di composti considerati: flavonoidi, proantocianidine e stilbeni. La maggior parte delle sostanze fenoliche identificata appartiene alla classe dei flavonoli, ai quali è ascrivito un ruolo chiave nella protezione delle cellule vegetali dai raggi UV-B, anche per l'adattamento all'esposizione a lungo termine (Langeake e Pryce, 1977). Molto interessante è anche la produzione di stilbeni, *trans*-resveratrolo, *trans*-resveratrolo-*O*-glucoside e *cis*-piceide, trovati nel Sangiovese, e viniferina – un dimero del resveratrolo – identificata in L. Marani. Gli stilbeni resveratrolo e viniferina appartengono alla classe delle fitoalessine, composti antimicrobici sintetizzati e accumulati nelle cellule vegetali in seguito a infezioni microbiche e fungine (Ebel, 1986) e già caratte-

Tab. 3. Identificazione dei composti fenolici nei campioni di callo cv Sangiovese esposti a UV-B e controlli; tempi di ritenzione, ioni precursori e prodotti, (m/z). T = campioni trattati (colture di callo esposte a UV-B); C = campioni di controllo. A = Flamini et al. (2015); B = Püssa et al. (2006).

Tab. 3. The identification of phenolic compounds of callus cv Sangiovese, exposed to UV-B and controls; retention times, precursor and product ions, (m/z). T = treated samples (callus cultures exposed to UV-B); C = control samples. A = Flamini et al. (2015); B = Püssa et al. (2006).

Composti	R _t min	[M] ⁻ m/z	MS ² m/z	Riferimenti	Campioni
Diidroquercetina-3- <i>O</i> -glucoside	10.9	465	419; 417; 447	B	T
<i>trans</i> -Resveratrolo- <i>O</i> -glucoside	11.5	389	289; 277	B	T
<i>cis</i> -Piceide	11.8	389	291; 273	B	T
Procianidina B2[(-)-Epicatechina-(4 β →8)-(-)-epicatechina]	13.7	577	558; 484; 457; 425; 407	B	T
Diidroquercetina-3- <i>O</i> -esoside	14.4	465	445; 419; 417; 387; 341; 313; 273; 173	A	T; C
<i>trans</i> -Resveratrolo	14.7	227	159	B	T
Quercetina-3- <i>O</i> -galactoside	15.1	463	417; 411; 393	A	T
Kaempferolo-3- <i>O</i> -galattoside	15.2	477	401; 409; 269; 161	A	T; C
Quercetina-3- <i>O</i> -glucoside	15.4	463	417; 293	A	T
Kaempferolo-3- <i>O</i> -glucoside	15.6	477	411; 401; 331; 161	A	T; C
Quercetina-3- <i>O</i> -glucuronide	15.8	477	431; 417	A	T
Isoramnetina-3- <i>O</i> -esoside	16	477	475; 431	A	T

rizzati nella vite anche in seguito a stress abiotici (Mahmood e Pour, 2010; Sgarbi et al., 2003). Un solo composto appartenente alla classe delle proantocianidine, procianidina B2, è stato identificato nella cv. Sangiovese.

I risultati qui ottenuti evidenziano che nelle cellule di callo di vite esposte ai raggi UV-B in modalità “a breve termine”, vengono stimulate vie biosintetiche del metabolismo fenolico. Il passaggio dalla sperimentazione in laboratorio alla produzione su vasta scala può essere utile per ottenere metaboliti secondari con effetti antiossidanti, potenzialmente utili in vari campi di interesse, farmaceutico, nutraceutico, alimentare (Matkowski, 2008).

Bibliografia

- Dixon R.A., Paiva N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1085-1097.
- Ebel J., 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology*, 24 (1): 235-264.
- Flamini R., De Rosso M., Bavaresco L., 2015. Study of grape polyphenols by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF) and suspect screening analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015: 350259.
- Jansen M.A.K., Gaba V., Greenberg B. M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3 (4): 131-135.
- Langcake P., Pryce R.J., 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16 (8): 1193-1196.
- Mahmood E., M. Pour A.M., 2010. Ultraviolet Irradiation Enhances Resveratrol Production in Organs and Cell Suspension Cultures of Two Iranian Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars. *Food Global Science Books*, 4 (1): 23-26.
- Matkowski A., 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26 (6): 548-560.

- Püssa T., Floren J., Kuldkepp P., Raal A., 2006. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography -diode array detection- tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20): 7488–7494.
- Sgarbi E., Baroni Fornasiero R., Paulino Lins A., Medeghini Bonatti P., 2003. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science*, 165: 051-957.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24 (13): 1-22.

Sviluppo di nuove tecnologie *in vitro* per il miglioramento genetico del castagno e il rilancio della castanicoltura

Vera Pavese^{1*}, Andrea Moglia¹, Silvia Abbà¹, Anna Maria Milani¹, Elena Corredoira², Maria Teresa Martínez², Daniela Torello Marinoni¹, Roberto Botta¹

* vera.pavese@unito.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari-DISAFa, Università degli Studi di Torino

² Misión Biológica de Galicia, Sede de Santiago, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Santiago de Compostela, Spain

Riassunto

La tecnologia CRISPR/Cas9 rappresenta un ottimo strumento per effettuare modifiche target all'interno del genoma, consentendo la disattivazione del gene di interesse. In questo lavoro è stata testata tale tecnologia su embrioni somatici di castagno, silenziando il gene della *fitoene desaturasi* la cui mutazione dà origine ad un fenotipo albino. I risultati hanno mostrato una buona efficienza di *editing*, di circa il 60%. Il costrutto CRISPR/Cas9 è stato anche testato sotto forma di ribonucleoproteina in protoplasti isolati da calli embriogenici. Sono stati isolati 4.500.000 protoplasti/mL (91% vitali) e trasfettati con il complesso ribonucleoproteico contenente l'RNA guida (gRNA) disegnato sul gene della fitoene. I risultati hanno mostrato un'efficienza di editing del 15-20%, paragonabile ai dati bibliografici.

Parole chiave: *Castanea sativa*, CRISPR/Cas9, ribonucleoproteine, protoplasti, *gene editing*

Development of new *in vitro* technologies for chestnut breeding and revitalization of the chestnut cultivation

Abstract: *Castanea sativa* Mill. is a species of high economic interest, widespread in Europe and Turkey for the nutritional value of nuts and timber. This species is susceptible to two main diseases that seriously hinder the spread and efficiency of cultivation: chestnut blight, caused by the fungus *Cryphonectria parasitica*, and ink disease caused by the oomycete *Phytophthora* spp. Therefore, it is necessary to implement breeding programs aimed at increasing the tolerance of chestnut plants to pathogens. New breeding technologies represent the new frontier of genetic improvement of cultivated plants; among them, the CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) technology allows to get target mutations at specific sites in the genome, enabling rapid gene deactivation. The CRISPR/Cas9 construct can be introduced in the form of DNA or assembled into a ribonucleoprotein complex, ensuring, in this case, the obtainment of transgene-free plants. The objective of this work was to test, for the first time in chestnut, the CRISPR/Cas9 technology by targeting the *phytoene desaturase* (*pds*) gene, involved in chlorophyll biosynthesis, whose mutation causes the appearance of an albino phenotype. This gene is a reporter gene, used to validate the transformation efficiency in a new species. The results showed good editing efficiency (~60%). The CRISPR/Cas9 construct was subsequently delivered into protoplasts in the form of ribonucleoprotein. Protoplasts were isolated from embryogenic calli of *C. sativa* with a yield of 4,500,000 protoplasts/mL (91% viable); their transfection ability was tested and confirmed introducing the plasmid pAVA393 with the Green Fluorescence Protein gene. The protoplasts were then transfected with the ribonucleoprotein complex containing the gRNA targeting the *phytoene* gene. The results showed an editing efficiency from 15 to 20%, comparable to data observed in literature.

Keywords: *Castanea sativa* Mill., CRISPR/Cas9, ribonucleoproteins, protoplasts, *gene editing*

Introduzione

Il castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) è una specie arborea apprezzata per la qualità del legname e dei frutti (Conedera et al., 2004). La coltivazione del castagno europeo è seriamente limitata da due gravi patologie che ne condizionano la diffusione: il mal dell'inchiostro, causato dall'oomicete *Phytophthora* spp., e il cancro corticale provocato dal fungo *Cryphonectria parasitica* (Pavese et al., 2021a).

In queste specie, il *breeding* tradizionale, per ottenere cultivar con una maggiore resa e miglior qualità dei frutti, maggiore adattabilità ai cambiamenti climatici e tolleranza ai patogeni, risulta complesso a causa dell'alto tasso di eterozigosi, alla lunga fase giovanile e dell'autoincompatibilità fiorale delle specie arboree. Per questo motivo, le Nuove Tecnologie di Breeding (NPBTs) rappresentano un'interessante alternativa, consentendo modifiche mirate ai geni di interesse. Tra le NPBTs, la tecnologia CRISPR/Cas9 rappresenta la nuova frontiera dell'editing genomico, consentendo di introdurre modifiche precise, migliorando le caratteristiche della pianta (Santillán Martínez et al., 2020).

Il sistema CRISPR/Cas9 può essere introdotto nelle cellule vegetali utilizzando la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* oppure tramite ribonucleoproteine (RNPs). Nel primo caso, l'enzima Cas9 e il guide RNA (gRNA) possono rimanere attivi e causare mutazioni casuali non desiderate nel genoma (off-target); nel secondo caso i componenti vengono assemblati *in silico* e trasferiti in protoplasti (ottenuti dalla digestione della parete cellulare) con il vantaggio di evitare l'integrazione stabile del DNA ricombinante (Woo et al., 2015). Nonostante questi vantaggi, la tecnologia è stata finora scarsamente applicata alle specie arboree in quanto recalcitranti alla rigenerazione *in vitro*.

Lo scopo di questo lavoro è stato l'applicazione della tecnologia CRISPR/Cas9 per la prima volta in castagno utilizzando la trasformazione classica mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (Pavese et al., 2021b) e la trasfezione di protoplasti con il complesso ribonucleoproteico (Pavese et al., 2022). Il gene selezionato è stato il gene della *fitoene desaturasi* (*pds*) coinvolto nella biosintesi delle clorofille, la cui mutazione porta alla comparsa di un fenotipo albino (Qin et al., 2007; Pan et al., 2016).

Materiali e Metodi

Materiale vegetale e realizzazione del vettore CRISPR/Cas9

La linea embriogenica CI-3, ottenuta a partire da embrioni zigotici di *C. sativa* Mill. (Corredoira et al., 2006), è stata utilizzata per gli esperimenti di *gene editing*. I due gRNAs sono stati disegnati sulla sequenza del gene della *fitoene desaturasi* di *C. sativa* (*Cspds*), utilizzando il software CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2>). I gRNAs sono stati assemblati, utilizzando la tecnologia Golden Braid 4.0 (Vázquez-Vilar et al., 2021), in un vettore CRISPR/Cas9 contenente il gene *hCas9* e il gene *nptII* per la resistenza alla kanamicina (kan). Il vettore finale è stato denominato *nptII_Cas9_pds_gRNA1_gRNA2* e trasferito nel ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Trasformazione degli embrioni con il vettore CRISPR/Cas9

Gli embrioni somatici sono stati immersi per 30 minuti nella sospensione di *A. tumefaciens* trasformato con il vettore *nptII_Cas9_pds_gRNA1_gRNA2*. Dopo 5 giorni di co-cultura, gli espianti sono stati lavati per 30 minuti con acqua sterile e 500 mg/L di cefotaxime e trasferiti su terreno di selezione addizionato con carbenicillina (300 mg/L), cefotaxime (200 mg/L) e kanamicina (150 mg/L). Espianti embriogenici non trasformati sono stati utilizzati come controllo negativo. Dopo 8 settimane sono stati individuate le linee embriogeniche resistenti alla kanamicina. Le linee embriogeniche resistenti sono state moltiplicate e il DNA è stato estratto da ciascuna linea embriogenica per valutare l'efficienza di editing. La rigenerazione delle piante è stata ottenuta seguendo il protocollo di Corredoira et al. (2008).

Isolamento di protoplasti e trasfezione con Green Fluorescent Protein (GFP)

I calli embriogenici (0,1 g) sono stati utilizzati come materiale di partenza per l'isolamento dei pro-

toplasti. I calli sono stati sezionati e immersi in una soluzione enzimatica contenente 0,5% (p/v) di Macerozyme R10 e l'1% (p/v) di Cellulase R-10 (Pavese et al., 2022). Gli embrioni sono stati sottoposti al vuoto per 20 minuti e ad una successiva digestione di 4 ore (40 rpm a 37 °C). Dopo la digestione, i protoplasti sono stati filtrati con un filtro di nylon (100 µM) per rimuovere i detriti della parete cellulare e lavati con la soluzione di lavaggio (Osakabe et al., 2018). I protoplasti vitali sono stati separati mediante gradiente di saccarosio al 21%.

I protoplasti sono stati lavati nuovamente e risospesi in 300 µL di soluzione MMG (soluzione descritta in Osakabe et al., 2018). I protoplasti sono stati quantificati e la vitalità è stata saggiata utilizzando il 4% (w/v) di trypan blu. I protoplasti sono stati diluiti per ottenere una concentrazione finale di 2×10^5 in 100 µL MMG. Per valutare la loro capacità di trasfezione è stato utilizzato il plasmide pAVA393 con il gene della GFP. I protoplasti sono stati mescolati con 10 µg di plasmide pAVA393:GFP, seguiti dall'aggiunta di 100 µL di PEG al 40% (w/v). La soluzione è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente seguita da due lavaggi con soluzione di lavaggio (Osakabe et al., 2018). Il pellet è stato infine risospeso in 1 mL di soluzione di lavaggio. I protoplasti trasfettati sono stati incubati a 24 °C/buio per 72 ore prima di essere osservati al microscopio. Il segnale della GFP è stato valutato utilizzando un microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse Ti2, Giappone).

Trasfezione con RNPs e rigenerazione

Il gene selezionato è quello della *pds* utilizzato da Pavese et al. (2021). La sequenza del crRNA corrisponde al gRNA1 (GAGTCAAGAGATGTGCTAGG) utilizzato da Pavese et al. (2021b). Le concentrazioni appropriate di crRNA e tracrRNA sono state mescolate con il Duplex Buffer (IDT, Coralville, IA, USA) e sottoposte ad annealing a 95 °C per 5 minuti. Successivamente sono state aggiunte la nucleasi Alt-R SpCas9 3NLS e il tampone PBS 10X, pH 7,4 (Pavese et al., 2022). Il rapporto molare ottimizzato tra Cas9 e gRNA era 1:1,25. La soluzione è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente e poi utilizzata per il processo di trasfezione come precedentemente indicato nella trasfezione con GFP. I protoplasti trasfettati sono stati sottoposti all'estrazione di DNA per valutare l'efficienza di editing mediante sequenziamento Sanger. Inoltre, sono stati testati tre terreni di induzione per ottenere l'organogenesi *de novo* (Pavese et al., 2022). I protoplasti sono stati inglobati in dischi di terreno semi-solido circondato da terreno liquido. Le colture sono state incubate in condizioni di buio a 24 °C. La divisione dei protoplasti è stata monitorata settimanalmente.

Risultati

Trasformazione degli embrioni con CRISPR/Cas9 e valutazione dell'efficienza di editing

Dopo 5 giorni di co-cultura con *Agrobacterium* e 8 settimane su mezzo di selezione, è stato ottenuto il 6,6% di embrioni resistenti alla kanamicina, caratterizzati da un fenotipo albino (Pavese et al., 2021b).

Ogni embrione resistente è stato trattato come una linea embriogenica differente denominata W1-W4. L'efficienza media di editing è risultata essere del 61% per il gRNA1 e del 56% per il gRNA2. Successivamente solo il 50% degli embrioni della linea W1, il 30% della linea W2, il 13% della linea W3 e il 6% della linea W4 sono sopravvissuti alla vernalizzazione; di questi il 13% della linea W1, il 3% della linea W2, il 7% della linea W3 ed il 6% della linea W4 hanno mostrato sviluppo di germogli. Gli embrioni editati hanno mostrato germogli con internodi più corti e foglie più piccole rispetto alla pianta controllo (Pavese et al., 2021b).

Isolamento di protoplasti e trasfezione con GFP

La resa finale in protoplasti è stata di 4.500.000 protoplasti/mL con una percentuale di vitalità pari al $91 \pm 1\%$ (Pavese et al., 2022).

I protoplasti ottenuti hanno mostrato una perfetta forma sferica e una dimensione di 20-70 µm di diametro e non sono stati rilevati aggregati di cellule non digerite. A seguito della trasfezione con GFP,

i protoplasti hanno mantenuto una buona integrità, con cellule di forma intatta e sferica anche dopo 72 ore dall'evento di trasfezione. Il 51% dei protoplasti ha mostrato l'espressione della GFP; l'assenza di segnale nel controllo negativo ha confermato il successo della trasfezione (Pavese et al., 2022).

Trasfezione con RNPs e rigenerazione

Il DNA genomico estratto da protoplasti trasfettati e sequenziato ha mostrato un'efficienza di editing pari al 15-21% nelle tre repliche biologiche analizzate.

I risultati migliori di rigenerazione sono stati osservati sul terreno contenente il terreno di Nitsch (Nitsch e Nitsch, 1969) integrato con 1 mg/L di acido naftalenacetico (NAA) e 0,5 mg/L di benzilaminopurina (BAP), utilizzato da Bertini et al. (2019) per la rigenerazione di protoplasti di vite (Pavese et al., 2022).

Discussione e Conclusioni

Le principali difficoltà riscontrate nell'applicazione delle tecnologie di genome editing nelle specie arboree sono la bassa efficienza di trasformazione e la recalcitranza alla trasformazione e rigenerazione. In Pavese et al. (2021b, 2022) abbiamo riportato, per la prima volta nel genere *Castanea*, l'applicazione della tecnologia CRISPR/Cas9. Sono stati ottenuti il 6,6% di espianti resistenti alla kanamicina, percentuale simile a quella riportata in studi precedenti da Corredoira et al. (2012).

Il basso tasso di rigenerazione è un problema riscontrato nel castagno europeo, specialmente negli embrioni somatici transgenici in cui si osserva occasionalmente lo sviluppo simultaneo di germogli e radici (Corredoira et al., 2004, 2012, 2015). Inoltre, è noto che la mutazione del gene *pds* influisce negativamente sulla rigenerazione delle piante. Breitler et al. (2018) hanno sottolineato che la perdita di funzione del gene *pds* causa una riduzione dei pigmenti fotosintetici che provoca un basso tasso di germinazione. Allo stesso modo, Walawage et al. (2019) ha dimostrato che il gene *pds* è essenziale per la corretta crescita della pianta. Il nostro sistema di editing, basato sull'utilizzo di due gRNAs, è risultato efficiente per garantire il knock out genico e gli embrioni editati hanno mostrato il fenotipo albino caratteristico, con internodi corti e foglie piccole, come già osservato in molte specie, tra cui riso, melo, arancio dolce e pioppo (Odipio et al., 2017).

Lo sviluppo di un metodo alternativo all'editing classico, mediante RNPs, rappresenta un'ottima strategia per ottenere piante transgene-free. Utilizzando la soluzione enzimatica contenente Cellulase e Macerozyme, è stato ottenuto un buon numero di protoplasti, paragonabile a Malnoy et al. (2016) e Bertini et al. (2019) e superiore a quello riportato in *Quercus ilex* e *Populus alba* da Kuzminsky et al. (2016). Il test di vitalità con il trypan blue ha mostrato un'alta percentuale di vitalità ($91 \pm 1\%$) in accordo con studi precedenti (Malnoy et al., 2016). La trasfezione con GFP ha permesso di confermare l'efficacia della tecnica di trasferimento di materiale genetico nei protoplasti. L'efficienza di editing mediante RNPs, sottolineata nel nostro studio (~18%) è paragonabile ai dati osservati in *Arabidopsis* (16%) e riso (8,4-19%), e superiore a quella osservata in vite (0,1%) e melo (0,5-6,9%) (Woo et al., 2015; Malnoy et al., 2016). I risultati migliori di rigenerazione sono stati osservati su terreno contenente i sali Nitsch e Nitsch, integrato con NAA e BAP, utilizzato da Bertini et al. (2019) per la coltura di protoplasti di vite.

In conclusione, la presenza di un efficace metodo di *gene editing* in castagno rappresenta un ottimo strumento per le attività di miglioramento genetico volte ad interventi sui geni responsabili della resistenza/suscettibilità ai patogeni, come i due geni S candidati (*pmr4* e *dmr6*) potenzialmente coinvolti nella suscettibilità di *C. sativa* a *C. parasitica* e *P. cinnamomi* (Pavese et al., 2021a).

Bibliografia

Bertini E., Tornielli G.B., Pezzotti, M., Zenoni, S., 2019. Regeneration of plants from embryogenic callus-derived protoplasts of Garganega and Sangiovese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 138: 239–246.

- Breitler J. C., Déchamp E., Campa C., Rodrigues L. A. Z., Guyot R., Marraccini P., Etienne H., 2018. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 134: 383–394.
- Conedera M., Krebs P., Tinner W., Pradella M., Torriani D., 2004. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe: from its origin to its diffusion on a continental scale. *Veget. Hist. Archaeobot.*, 13(3): 161-179.
- Corredoira E., Ballester A., Vieitez A.M., 2006. Somatic embryogenesis in chestnut. In: S. Mujib and J. Samaj (eds.), *Somatic Embryogenesis*. Plant Cell Monography. Springer, Berlin, pagg. 177-199.
- Corredoira E., Valladares S., Vieitez A. M., Ballester A., 2008. Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 44: 307.
- Corredoira E., Valladares S., Allona I., Aragoncillo C., Vieitez A. M., Ballester A., 2012. Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-like protein (CsTL1) gene isolated from *Castanea sativa* seeds. *Tree Physiol.*, 32: 1389–1402.
- Corredoira E., Valladares S., Vieitez A.M., Ballester A., 2015. Chestnut, European (*Castanea sativa*). In Wang (ed), *Methods in Molecular Biology Agrobacterium Protocols*. Springer, Berlin, pagg. 163-176.
- Malnoy M., Viola R., Jung M.H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S., Velasco R., Nagamangala Kanchiswamy C., 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front. Plant Sci.*, 7:1904.
- Odipto J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D.A., Bart R., Taylor N.J., 2017. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of *phytoene desaturase* in Cassava. *Front. Plant Sci.*, 8: 1780.
- Osakabe Y., Liang Z., Ren C., Nishitani C., Osakabe K., Wada M., Komori S., Malnoy M., Velasco R., Poli M., Jung M.H., Koo O.J., Viola R., Nagamangala Kanchiswamy C., 2018. CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nat. Protoc.*, 13: 2844–2863.
- Pan C., Ye L., Qin L., Liu X., He Y., Wang J., Chen L., Lu G., 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci. Rep.*, 6: 24765.
- Pavese V., Moglia A., Gonthier P., Torello Marinoni D., Cavalet-Giorsa E., Botta R., 2021a Identification of susceptibility genes in *Castanea sativa* and their transcription dynamics following pathogen infection. *Plants*, 10: 913.
- Pavese V., Moglia A., Corredoira E., Martínez M.T., Torello Marinoni D., Botta R., 2021b. First report of CRISPR/Cas9 *Gene Editing* in *Castanea sativa* Mill. *Front. Plant Sci.*, 12: 728516.
- Pavese V., Moglia A., Abbà S., Milani A.M., Torello Marinoni D., Corredoira E., Martínez M.T., Botta R., 2022. First Report on Genome Editing via Ribonucleoprotein (RNP) in *Castanea sativa* Mill. *International Journal of Molecular Science*, 23: 5762.
- Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X. W., Chen Z., Qu L.J., 2007. Disruption of *phytoene desaturase* gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res.*, 17: 471–482.
- Santillán Martínez M. I., Bracuto V., Koseoglou E., Appiano M., Jacobsen E., Visser R. G. F., Wolters A.A., Bai Y., 2020. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biol.*, 20: 284.
- Vazquez-Vilar M., Bernabe-Orts J. M., Fernandez-Del-Carmen A., Ziarsolo P., Blanca J., Granell A., 2016. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the golden braid standard. *Plant Methods*, 12: 10–21.
- Walawage S. L., Zaini P. A., Mubarik M. S., Martinelli F., Balan B., Caruso T., Leslie C.A., Dandekar A.M., 2019. Deploying genome editing tools for dissecting the biology of nut trees. *Front. Sustain. Food Syst.*, 3: 100.
- Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.G., Kim S.T., Choe S., Kim J.S., 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.*, 33: 1162-1164.

“Born to be white”: differenti strumenti biotecnologici per l’impiego della tecnologia CRISPR-Cas9 nell’editing genomico del mirtillo gigante

Giuseppe Vaia^{1*}, Vera Pavese², Andrea Moglia², Valerio Cristofori¹, Cristian Silvestri¹

* giuseppe.vaia@unitus.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

² Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università di Torino

Riassunto

Per lo studio di un protocollo efficiente di genome editing è stato effettuato il knockout del gene *Vcpds*. Gli espianti fogliari di mirtillo cv Berkeley sono stati trasformati con *A. tumefaciens* ingegnerizzato contenente il costrutto CRISPR/Cas9 e 2 sgRNA. Dopo la selezione in kanamicina è stato accertato il successo dell’editing. Inoltre, allo scopo di ottenere piante DNA-free, è stato messo a punto un sistema per l’isolamento e la trasfezione dei protoplasti che, posti in coltura in substrato liquido, hanno originato dei microcalli. Sono in corso esperimenti per lo sviluppo di callo e per l’organogenesi avventizia di germogli da protoplasti.

Parole chiave: *Vaccinium corymbosum* L., fitoene desaturasi (*pds*), tecnologia dei protoplasti, piante transgene-free, ingegneria genetica, trasfezione PEG-mediata, marcatore *GFP*

“Born to be white”: Different biotechnological tools for CRISPR/Cas9- mediated genome editing in highbush blueberry

Abstract: Among the New Plant Breeding Techniques (NPBTs), the CRISPR/Cas9 system represents a useful tool for target editing, improving the traits of the plants rapidly. CRISPR/Cas9 genome editing includes both plasmid-dependent and plasmid-independent systems employing direct delivery protocols. Direct delivery tools can create transgene-free new varieties through edit plant genomes without introducing foreign DNA into cells, alleviating regulatory concerns related to genetically modified plants. Furthermore, the elimination of transgene integration and DNA insertion is expected to increase public acceptance of genetic engineering for crop improvements. The protoplast technology, used as a versatile cell-based model system to elucidate the biological functions of genes and proteins, could represent an opportunity to develop DNA-free genome editing through transfection with RNPs, a pre-assembled complex of purified Cas9 protein and guide RNAs. However, the most convenient and routinely applied method for gene delivery is *Agrobacterium*-mediated gene transfer with antibiotic selection and stable integration. In our work we describe improved protocols adapting the CRISPR/Cas9 system to highbush blueberry, using both *Agrobacterium*-mediated genome editing and studying a protocol for protoplast transfection by using Green Fluorescent Protein (GFP), to be used in future experiments of direct delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) to achieve efficient DNA-free targeted mutations. As a proof of concept, we targeted the gene encoding *phytoene desaturase* (*Vcpds*), whose mutation disrupts chlorophyll biosynthesis allowing for the visual assessment of knockout efficiency. Leaf explants of *in vitro*-cultured blueberry cv Berkeley have been transformed with a CRISPR/Cas9 construct targeting two conserved gene regions of *Vcpds* and subsequently maintained on a selection medium enriched with kanamycin. After 4 weeks in culture on selection medium, the kanamycin-resistant lines were isolated, and the genotyping have been performed through target Sanger sequencing, demonstrating successful gene editing. Furthermore, an optimized protocol for protoplast isolation from callus and leaves of highbush blueberry cv Berkeley has been developed. After overnight incubation at room temperature, a yield of $2 \cdot 10^6$ protoplast/mL has been obtained, with 97% of viability. Isolated protoplasts were then trans-

fected using PEG/Ca²⁺ solution and with the plasmid pAVA393: GFP. The transient expression of the green fluorescent protein was evaluated. The transfection efficiency of the protoplasts resulted higher than 50% after 24 h from the transfection event. After 48 hours from transfection, a minimal loss of viability of the protoplasts has been observed. The protoplasts, cultured in liquid medium for callus induction (containing thidiazuron 10 μ M and 1-naphthaleneacetic acid 10 μ M), showed microcolonies just after 10 days in culture. Experiments for callus development and *de novo* shoot organogenesis are ongoing. These preliminary results showed that the highbush blueberry protoplasts can be a valuable tool to be explored for DNA-free genome editing, using gRNA: Cas9 ribonucleoproteins (RNPs).

Keywords: *Vaccinium corymbosum* L., *phytoene desaturase*, protoplast technology, transgene-free, genome editing, PEG-mediated transfection, GFP marker gene

Introduzione

Tra le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), la tecnologia CRISPR/Cas9 è quella comunemente utilizzata per l'ottenimento di nuovi mutanti (Kim et al., 2021). Per molte specie arboree tale tecnologia trova poca applicabilità a causa della carenza di protocolli efficienti spesso cv-dipendenti, come nel caso del mirtillo gigante (*Vaccinium corymbosum* L.) (Omori et al., 2021; Han et al., 2022). Questa specie è poliploide e la progettazione dei guide-RNA (gRNA) risulta complessa, in quanto devono agire contemporaneamente su tutti i diversi alleli del gene oggetto di editing (Schaart et al., 2021). Per gli studi preliminari viene spesso impiegato il gene della *fitoene desaturasi* (*pds*) (Savadi et al., 2021), coinvolto nella biosintesi dei carotenoidi, il cui knockout porta alla manifestazione di un fenotipo albino. Tuttavia, l'editing mediato da *Agrobacterium* spp. non consente di ottenere mutanti transgene-free, che invece è possibile mediante la trasfezione dei protoplasti con il costrutto CRISPR/Cas9 inserito sotto forma di ribonucleoproteine (RNP), evitando l'integrazione stabile del DNA ricombinante (Pavese et al., 2022). Il nostro lavoro descrive un protocollo efficiente di organogenesi e genome editing mediato da *A. tumefaciens* per il mirtillo gigante. Inoltre, abbiamo messo a punto un protocollo efficiente di isolamento e trasfezione di protoplasti di mirtillo gigante, utilizzando un plasmide contenente il gene che codifica per la proteina fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). Sono in corso esperimenti per l'ottenimento di organogenesi avventizia a partire da protocalli.

Materiali e Metodi

Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato nel nostro studio era costituito da germogli della cv Berkeley, moltiplicati in vitro come descritto in Marangelli et al. (2022). Sono stati inoltre disegnati 2 RNA guida (gRNA) sulla sequenza del gene *pds*, attraverso lo strumento online CRISPR-P2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2>), e assemblati in un vettore CRISPR/Cas9 utilizzando il sistema di assemblaggio GoldenBraid 4.0 (Vázquez-Vilar et al., 2021). La sequenza codificante di Cas9 è stata posta sotto il controllo del promotore 35S, il gene *nptII* per la resistenza alla kanamicina era sotto il promotore pNos, mentre i gRNA erano sotto il promotore pU6-26. Il vettore finale *alpha_nptII_Cas9_gRNA1_gRNA2*, è stato trasferito nel ceppo *A. tumefaciens* EHA105.

Editing mediato da Agrobacterium tumefaciens

Gli espianti fogliari della cv Berkeley sono stati posti in rigenerazione secondo il protocollo descritto da Marangelli et al. (2022). La soluzione batterica (OD₆₀₀=0,6) è stata posta a contatto con gli espianti fogliari per 10-15 minuti, i quali, dopo esser stati asciugati, sono stati posti in co-coltura sullo stesso terreno (al buio a 24°C). Dopo 96 ore, sono stati trasferiti sullo stesso substrato arricchito con cefotaxime alla concentrazione di 200 mg/L e 50 mg/L di kanamicina. Nel corso dell'esperimento sono stati isolati i germogli rigenerati resistenti alla kanamicina e l'efficienza di editing è stata validata estraendo il DNA genomico con il kit EZNA® Plant DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). Il

DNA è stato amplificato utilizzando KAPA HIFI Taq (KapaBiosystems, Roche, Basilea, Svizzera) (PCR: 95°C/3 min, 30 cicli di 98°C/20 sec, 60°C/20 sec, 72°C/45 sec e 72°C/3 min). I prodotti della PCR sono stati purificati con il kit DNA/RNA Clean Up E.Z.N.A.® (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA), sequenziati con il metodo Sanger e i cromatogrammi analizzati con il software online TIDE (<https://tide.deskgen.com>).

Isolamento, purificazione e trasfezione dei protoplasti

Circa 0,5 g di callo ottenuto su substrato WPM contenente saccarosio 3%, TDZ (10 µM) e NAA (10 µM), sono stati trasferiti in 5 mL di una soluzione enzimatica proposta da Osakabe et al. (2018), con Cellulase Onozuka RS 1% e Macerozyme R10 0,5%, e mantenuti in agitazione (100 rpm). Dopo 12 ore, sono stati filtrati con filtro da 100 µm, purificati con soluzione WS e trasferiti su un gradiente di saccarosio al 21%. L'anello di protoplasti è stato aspirato con una pipetta Pasteur e risospeso in 2 mL di soluzione WS, centrifugato (300 rpm, 15°C x 5 min) e risospeso in soluzione MMG (Osakabe et al., 2018). I protoplasti vitali sono stati contati e diluiti per ottenere una concentrazione di 2×10^5 in 200 µL.

La trasfezione dei protoplasti è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Woo et al. (2015). Un'aliquota di 150 µL di soluzione MMG contenente 2×10^5 protoplasti della cv Berkeley è stata delicatamente mescolata con 50 µL di plasmide pAVA- GFP [(pAVA393-35S::GFP::Tnos; Ochatt et al., (2005)], e miscelata a 150 µL di soluzione di PEG/Ca²⁺ e incubata per 30 min al buio a temperatura ambiente. Dopo la trasfezione i protoplasti sono stati lavati in WS, centrifugati e risospesi in 1 mL di MMG (al buio, 24 °C). L'espressione della GFP nei protoplasti trasfettati è stata osservata dopo 24 ore dall'evento di trasfezione al microscopio a fluorescenza ed è stata calcolata la percentuale di protoplasti trasfettati (%).

Risultati e Discussione

Gli espunti fogliari della cv Berkeley hanno rigenerato numerose gemme avventizie già dopo due settimane in coltura (Fig. 1a), confermando l'alto potenziale organogenetico di molte varietà di mirtillo gigante (Marangelli et al., 2022). È stata osservata un'ampia variabilità fenotipica tra i germogli rigenerati: in pochi casi, i germogli rigenerati hanno mostrato il fenotipo albino atteso (Fig. 1b), altri erano caratterizzati da pigmentazione rossa uniforme e in molti casi sono stati osservati germogli con fenotipo chimerico. È emerso inoltre che gli espunti che mostravano un fenotipo albino, avevano una crescita stentata anche su substrato di crescita artificiale: tale comportamento è stato evidenziato anche in altri studi ed è probabilmente dovuto al fatto che il gene *pds* non ha un ruolo chiave solo nella via biosintetica dei carotenoidi, ma anche un ruolo importante nella biosintesi delle giberelline (Qin et al., 2017). Per confermare i possibili eventi di editing a livello di sequenza del DNA, i campioni selezionati sono stati sequenziati con il metodo del sequenziamento Sanger e i cromatogrammi risultanti sono stati analizzati con il software online TIDE. Le efficienze di editing, accertate con sequenziamento Sanger e analizzati con il software TIDE (Fig. 1c), sono risultate diverse tra i 2 gRNA, e variavano tra il 2,1 e il 9,6% per il gRNA1 e il 3,0 e il 23,8% per il gRNA2 (Fig. 1d). Le mutazioni più comuni osservate nelle linee modificate sono state singole inserzioni o delezioni (+/-1 bp), in accordo con quanto riportato in altre specie, dove le mutazioni predominanti sono rappresentate da inserzione o delezione di 1bp (Bortesi et al., 2016).

Il protocollo di isolamento dei protoplasti, seppur da migliorare per aumentarne la resa, ha permesso di ottenere $2,20 \pm 0,18 \times 10^6$ protoplasti/mL, che sono stati impiegati per la trasfezione del plasmide pAVA393, grazie all'azione del PEG/Ca²⁺, che rende le membrane cellulari permeabili al DNA. Il plasmide, contenente il gene per la sintesi della GFP, è un ottimo marcatore per testare un nuovo metodo, per la prima volta, in una nuova specie. L'efficienza di trasformazione della GFP, valutata 24 ore dopo il processo di trasfezione, è risultata pari a circa il 50%.

La resa in protoplasti molto alta, associata ad una altissima vitalità degli stessi, rende questo protocollo adatto per il mirtillo gigante. Tuttavia, è importante approfondire alcuni aspetti quali il genotipo e il tessuto impiegato (Osakabe et al., 2018, Pavese et al., 2022).

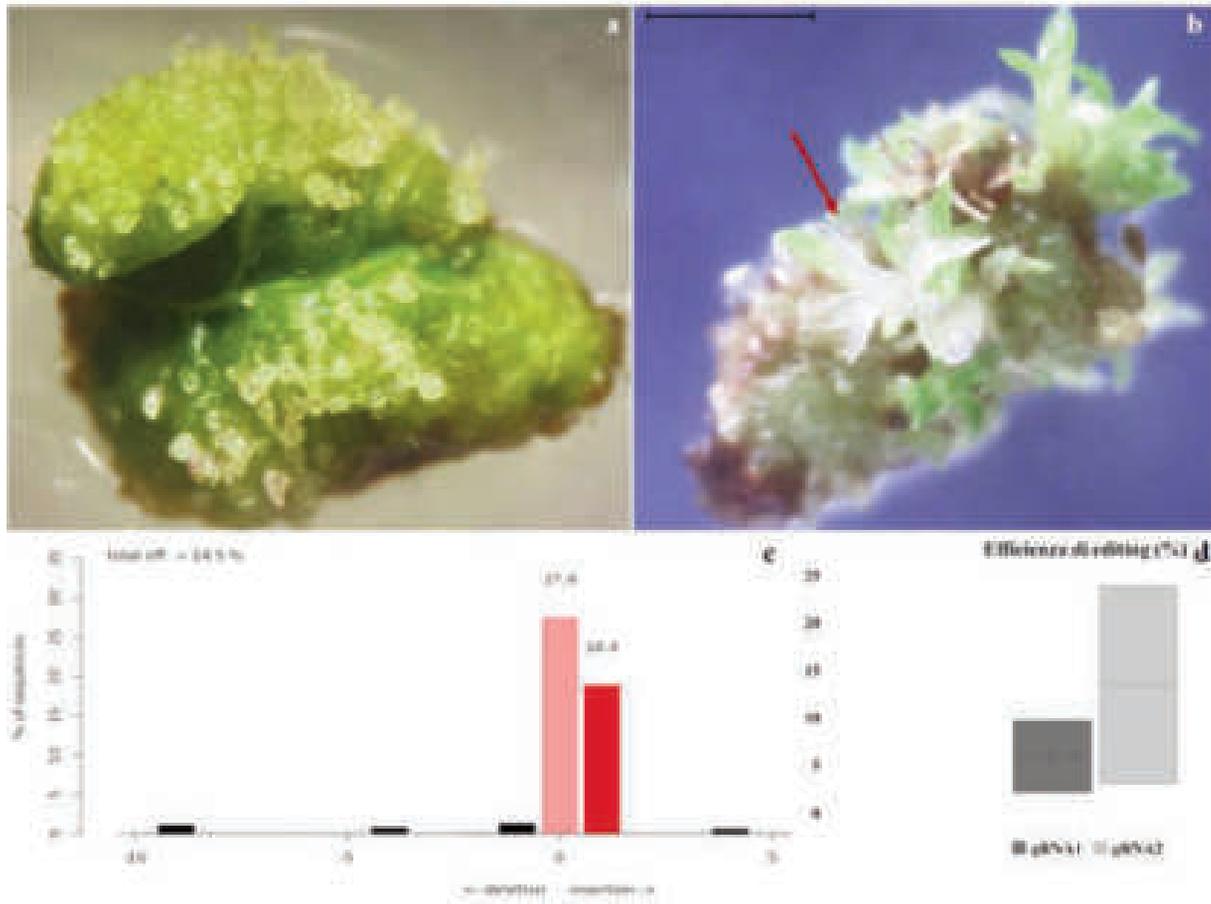


Fig. 1. Editing di mirtillo gigante (cv Berkeley) attraverso il silenziamento del gene *pds*, utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9. I tessuti producono numerose gemme avventizie (A), i germogli avventizi neoformati mostrano il fenotipo albino atteso (B), analisi delle mutazioni indotte dal complesso CRISPR/Cas9_gRNA1 (C), efficienza di editing delle due guide di RNA (D).

*Fig. 1. Editing of highbush blueberry cv Berkeley by knockout of *pds* gene with CRISPR/Cas9. Regenerating tissues produces numerous adventitious buds (A), regenerated shoots showed the expected albino phenotype (B), genotyping of targeted gene mutations induced by CRISPR/Cas9 on gRNA1 (C), editing efficiency of the two RNA guides (D).*

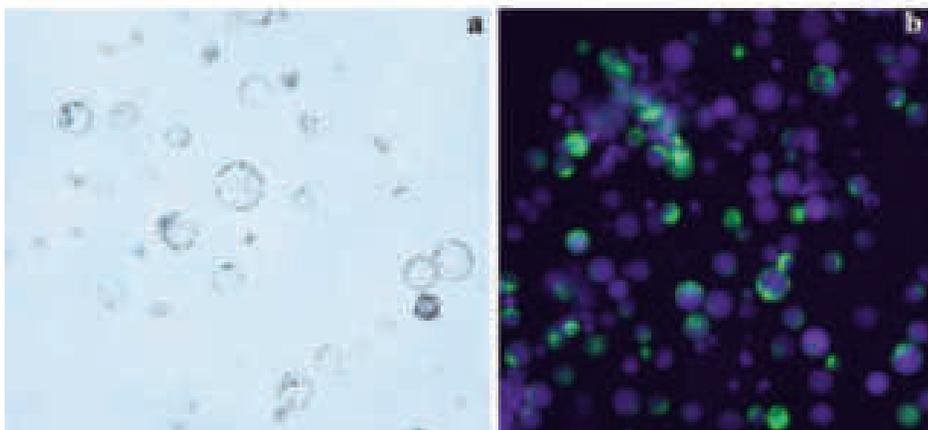


Fig. 2. Protoplasti di mirtillo gigante (*Vaccinium corymbosum* L.) osservati al microscopio ottico (A). Protoplasti trasfettati con il plasmide pAVA393, osservati tramite microscopio a fluorescenza (B).

*Fig. 2. Protoplasts isolated from *Vaccinium corymbosum* L. observed under an optical microscope (A), and protoplast transfected with the pAVA393 plasmid observed under fluorescent microscope (B).*

Conclusioni

La tecnologia CRISPR/Cas rappresenta lo strumento più potente nell'era delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), in grado di accelerare il breeding delle specie agrarie. I nostri risultati rappresentano un aggiornamento della tecnologia di editing per il mirtillo gigante. Il protocollo è efficiente e affidabile, ma sono necessari ulteriori miglioramenti per rendere questa tecnica uno strumento pronto all'uso nel miglioramento genetico di questa specie di alto valore.

Inoltre, la tecnologia dei protoplasti rappresenta uno strumento versatile ed indispensabile poiché consente di superare il problema legato alla presenza di DNA esogeno, ed evitare le attuali normative sugli OGM. I nostri risultati, seppure preliminari, rappresentano i primi risultati di isolamento e trasfezione dei protoplasti di mirtillo, divenendo un valido strumento da esplorare per l'editing del genoma senza DNA, utilizzando gRNA: ribonucleoproteine (RNP) Cas9.

Bibliografia

- Kim Y.C., Kang, Y., Yang, E.Y., Cho, M.C., Schafleitner, R., Lee, J.H. et al., 2021. Applications and major achievements of genome editing in vegetable crops: A review. *Front. Plant Sci.* 12: 688980.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., et al. 2016. Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol. J.* 14: 2203–2216.
- Han, X., Yang, Y., Han, X., Ryner, J.T., Ahmed, E.A.H., Qi, Y. et al., 2022. CRISPR Cas9- and Cas12a- mediated gusA editing in transgenic blueberry. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 148: 217-229.
- Marangelli, F., Pavese, V., Vaia, G., Lupo, M., Bashir, M.A., Cristofori, V. et al., 2022. In Vitro Polyploid Induction of Highbush Blueberry through De Novo Shoot Organogenesis. *Plants*, 11: 2349.
- Ochatt, S., Lionnenton, E., Delaitre, C., Kahane, R., 2005. One team, PCMV, and one approach, in vitro biotechnology, for one aim, the breeding of quality plants with a wide array of species. *Crops: Growth, Quality and Biotechnology*: 1038-1067.
- Omori, M., Yamane, H., Osakabe, K., Osakabe, Y., Tao, R., 2021. Targeted mutagenesis of CENTRO-RADIALIS using CRISPR/Cas9 system through the improvement of genetic transformation efficiency of tetraploid highbush blueberry. *J. Hortic. Sci Biotechnol.*, 96: 153-161.
- Osakabe, Y., Liang, Z., Ren, C., Nishitani, C., Osakabe, K., Wada, M. et al., 2018. CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nature Protocols*, 13(12): 2844-2863.
- Pavese, V., Moglia, A., Abbà, S., Milani, A. M., Marinoni, D. T., Corredoira, E. et al., 2022. First report on genome editing via ribonucleoprotein (RNP) in *Castanea sativa* mill. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10)
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z. et al., 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 17(5): 471-482.
- Savadi, S., Mangalassery, S., Sandesh, M.S., 2021. Advances in genomics and genome editing for breeding next generation of fruit and nut crops. *Genomics*, 113(6): 3718-3734.
- Schaart, J. G., Van De Wiel, C. C. M., Smulders, M.J.M., 2021. Genome editing of polyploid crops: Prospects, achievements and bottlenecks. *Transgenic Research*, 30(4): 337-351.
- Vazquez-Vilar, M., Bernabe-Orts, J. M., Fernandez-Del-Carmen, A., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., 2016. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the golden braid standard. *Plant Methods* 12: 10–21.
- Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalán, C., Cho, S. W., Kim, H., et al., 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33: 1162-1164.

Coltura *in vitro*, sviluppo e ambientamento di piante androgeniche di anemone a supporto del *breeding*

Alex Alberto¹, Paolo Mussano¹, Mario Rabaglio², Fabio Brusco², Barbara Ruffoni¹, Marina Laura¹, Andrea Copetta^{1*}

* andrea.copetta@crea.gov.it

¹ CREA – Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (Imperia)

² Biancheri Creazioni, Camporosso (Imperia)

Riassunto

La coltura di antere per la creazione di linee omozigoti viene ampiamente utilizzata per programmi di breeding. Lo scopo del lavoro è stabilire le condizioni ottimali per lo sviluppo *in vitro* degli embrioni di anemone di origine androgenica, analizzarne la crescita e determinare il momento migliore per l'ambientamento in serra. La migliore temperatura per la coltura delle piante androgeniche di anemone *in vitro* è 18 °C, mentre il periodo più adatto per l'ambientamento in serra è l'autunno del primo anno di coltura. Non sono state riscontrate correlazioni tra dimensioni del corno sviluppatosi *in vitro* e sopravvivenza in fase di ambientamento.

Parole chiave: *Anemone coronaria*, embrioni, cormi

In vitro culture, development and acclimatization of androgenic anemone plants to support breeding programs

Abstract: The protocol to obtain *Anemone coronaria* plants with androgenic origin has been widely described. In this species, only the anthers with uninucleate pollen (mature or microspore tetrads), subjected to thermal stress, are able to differentiate embryos with androgenic origin. However, even when many embryos have been obtained, their conversion into seedlings is not obliged and there are many cases in which low regeneration rates are observed, despite a high induction rate. Therefore, this work is aimed to determine the temperature conditions useful for the *in vitro* development of anemone embryos with androgenic origin, to increase the protocol efficiency in particular on the last phase of conversion to plant and test the best period for greenhouse acclimatization. Eight (two diploid and six tetraploid) cultivars of *A. coronaria* were utilized for the experimental tests. From February to April, flower buds were disinfected for 20 min in 1% sodium hypochlorite and rinsed with distilled sterile water. According to the protocol established in previous work, anthers were distributed in Petri dishes containing a double layer medium constituted of Nitsch and Nitsch agarized substrate, enriched with 1% activated charcoal, 3% sucrose and the same substrate in liquid phase without activated charcoal. Anthers were shocked with a preculture at 33 °C for 5 days and then incubated in the dark at 23 °C. After 3 months, the embryos were transferred into the flask with modified MS substrate composed of vitamins, half-strength salts, 3% sucrose, 1% activated charcoal and 0.8% agar and placed at 15 °C or 18 °C or 23 °C. After one month, the survival rate and the degree of development to seedlings of the embryos were evaluated. At 8, 12 and 20 months after anther sowing, the *in vitro* development of androgenic plants of eight different anemone cultivars was compared. Moreover, at the same time, greenhouse acclimatization tests have been carried out. The androgenic corms were placed in alveolus containers with peat:agripelite substrate 1:1 and transferred in greenhouse. One month after acclimatization, the survival rate of the plants was estimated, in addition to the correlation between the weight and dimension of the corm, and the corm survival rate during acclimatization. The optimal temperature for the development of androgenic anemone plants *in vitro* was determined at 18 °C. During *in vitro* culture, many

regenerants from anther culture tend to differentiate by secondary embryos, mainly from root pole of the primary structures. This secondary embryogenesis moves nutrients from the older corm to the newly formed ones, reducing the enlargement of older corm. High differences of differentiation among androgenic plants of the tested cultivars have been observed. Our results confirm that the genotype is one of the main endogenous factors with an important role in embryogenesis from anther culture. The best period for acclimatization in the greenhouse is the autumn, after 8 months of *in vitro* culture. No correlations have been found between the size or weight of the corm *in vitro* developed, and the acclimatization performances.

Keywords: *Anemone coronaria*, embryos, corms

Introduzione

La produzione di linee omozigoti viene ampiamente utilizzata per programmi di breeding e mappatura genetica (Germanà, 2011). In molte specie, i tempi di ottenimento delle linee omozigoti viene abbreviato dalla coltura *in vitro* di microspore (polline immaturo) contenute nelle antere, ad uno specifico stadio di maturazione. Affinché si generino le piante androgeniche, le antere contenenti microspore devono essere esposte a stress; tra questi, gli stress termici sono considerati quelli più efficaci per indurre lo sviluppo di rigeneranti (Germanà, 2011).

Anemone coronaria L. è una specie geofita perenne; i cormi iniziano a produrre le foglie in autunno (generalmente nel mese di ottobre), producono i fiori in inverno (tra la fine di gennaio e l'inizio della primavera) e vanno in dormienza in estate quando le temperature superano i 32 °C (Ben-Hod et al., 1988). Gli anemoni sono allogami, gli stimmi sono ricettivi 10 giorni prima della dispersione del polline (entomofila o anemofila). L'autoimpollinazione è possibile tra i fiori della stessa pianta, ma la progenie mostra spesso sintomi di depressione da inbreeding. Per questo motivo, le cultivar esistenti sono altamente eterozigoti, geneticamente non uniformi e spesso diverse per livello di ploidia (Laura et al. 2006; Laura e Allavena 2007). Negli ultimi anni, sono state introdotte in commercio nuove varietà, migliorate per la produzione di fiori recisi con petali e sepali più grandi, steli lunghi robusti e fioritura precoce o di piante da giardino con numerosi fiori, foglie erette e picciolo corto (Laura e Allavena 2007).

In *A. coronaria*, il metodo per ottenere piante di origine androgenica è stato ampiamente descritto (Johansson e Eriksson, 1977; Copetta e Laura, 2021). In questa specie, solo le antere con polline uninucleato (tetradi mature o di microspore) sottoposte a stress termico sono in grado di produrre molti rigeneranti di origine androgenica (Copetta et al., 2018). Tuttavia, anche quando sono stati ottenuti molti embrioni, la loro conversione in piantine non è scontata e sono molti i casi in cui si osservano bassi tassi di rigenerazione, nonostante un alto tasso di induzione (Germanà 2011). Pertanto, lo scopo del lavoro è aumentare l'efficienza complessiva del protocollo e determinare quali sono le migliori condizioni di temperatura per lo sviluppo *in vitro* degli embrioni di anemone di origine androgenica, valutarne lo sviluppo e testare quale sia il periodo migliore per l'ambientamento in serra.

Materiali e Metodi

Materiale vegetale

Le cultivar di *A. coronaria* L. sono state fornite da Biancheri Creazioni (Camporosso, IM, Italia): due cultivar diploidi, cv Magenta e cv Rosa appartengono alla linea Mistral, mentre le altre sei cultivar tetraploidi, cv Bianco A, cv Bianco B, cv Blu, cv Fuego, cv Pinkie e cv Rosso, appartengono alla linea Mistral Plus. Tutte le otto cultivar vengono coltivate per la produzione di fiori recisi e sono il risultato delle attività di *breeding* e selezione effettuata presso la Biancheri Creazioni in base al colore della corolla, alla dimensione dei fiori, alla lunghezza e alla robustezza degli steli, ed al periodo di fioritura.

Produzione degli embrioni androgenici

Il metodo utilizzato per la produzione di embrioni androgenici di anemone è dettagliatamente descritto da Copetta e Laura (2021). Brevemente, tra febbraio ad aprile i boccioli immaturi (gambo a uncino) derivanti dai cormi delle otto cultivar sono stati raccolti, sterilizzati superficialmente per 20 min in soluzione di NaClO all'1%, con una goccia di Tween 20, e risciacquati due volte con acqua distillata sterile per 10 min. Rimossi i petali, le antere sono state distribuite in piastre Petri (15-20 antere per piastra) da 6 cm di diametro, contenenti un doppio strato di substrato sterile, autoclavato a 120 °C per 20 min. Lo strato inferiore solido era composto da 8 ml di sali e vitamine Nitsch e Nitsch (1969), 1% di carbone attivo (AC), 3% di saccarosio e 0,8 % di agar (pH 5.7). Lo strato superiore liquido era costituito da 6 ml dello stesso terreno, senza AC e agar. L'induzione all'embriogenesi è stata effettuata incubando le piastre con le antere in coltura a 33 °C per 5 giorni, e successivamente, a 23±1 °C al buio. Dopo 2/3 mesi, in un'unica piastra con doppio strato si potevano osservare strutture androgeniche a vari stadi di sviluppo: globulare, cuoriforme, torpedo, embrioni completamente formati, calli e anche piantine con cotiledoni, foglioline, microtuberi e radici. Le piantine sono state trapiantate in vasi di vetro contenenti il substrato di coltivazione costituito da sali MS (Murashige e Skoog, 1962) a metà dose, vitamine MS, 3% saccarosio e 0,8% agar (Copetta e Laura, 2021).

Prove di coltivazione e sviluppo in vitro

Le piante androgeniche sono state coltivate a 18±1 °C con un ciclo luce/buio di 16/8 ore e 200 µmol m⁻² s⁻¹ di irradianza luminosa a livello del vaso (lampada fluorescente bianca Philips Master TL-D 36W/840). Come prima variabile, si è testato l'effetto della temperatura sullo sviluppo degli embrioni androgenici. A questo scopo, 8-15 embrioni per cultivar, completamente formati (ovvero con cotiledoni, microtubero e radichetta) sono stati posti su substrato di coltivazione e a tre differenti temperature 15 °C, 18 °C e 23 °C. Dopo un mese di coltivazione sono stati valutati il tasso di sopravvivenza e il grado di sviluppo degli embrioni.

Le piante androgeniche derivanti dalle otto cultivar prodotte sono state coltivate *in vitro* su substrato di coltivazione (sali MS a metà dose, vitamine MS, 3% saccarosio e 0,8% agar) e lo sviluppo dei cormi (peso delle plantule, lunghezza e larghezza del corno) è stato valutato in momenti differenti: 1) nell'autunno del primo anno di coltivazione a circa 8 mesi della semina delle antere; 2) alla fine dell'inverno nell'anno successivo a circa 12 mesi dalla semina delle antere; 3) nell'autunno dell'anno successivo a circa 20 mesi dalla semina delle antere. Inoltre, nell'autunno del primo anno di coltivazione è stata valutata la sopravvivenza delle piante androgeniche (numero di piante androgeniche sopravvissute/numero di piante androgeniche ambientate x 100).

Prove di ambientamento

Parte delle piante androgeniche coltivate *in vitro* e ottenute in quattro anni sono state utilizzate per effettuare prove di ambientamento in serra. Le prove di ambientamento sono state effettuate negli stessi momenti in cui sono stati analizzati i parametri di sviluppo dei cormi (a circa 8, 12 e 20 mesi della semina delle antere). I cormi sono stati posti in contenitori alveolati contenenti torba:agriperlite (1:1) e innaffiati a necessità. Dopo un mese dall'ambientamento è stato valutato il tasso di sopravvivenza delle piante e la correlazione tra peso e dimensioni del corno al momento dell'ambientamento e tasso di sopravvivenza del corno stesso.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati statisticamente mediante ANOVA, seguita dal test della differenza dei minimi quadrati di Fisher, considerando statisticamente significativi valori di p≤0,05.

Risultati

Prove di coltura e sviluppo in vitro

Lo sviluppo degli embrioni completamente formati (ovvero con cotiledoni, microtubero e radichetta) risultava migliore sul substrato di coltivazione a 18 °C; infatti la sopravvivenza degli embrioni a 15 °C, 18 °C e 23 °C era rispettivamente pari a $4,0 \pm 1,0$ %, $65,0 \pm 5,0$ % e $2,0 \pm 2,0$ %. La percentuale di sopravvivenza era indipendente dalla cultivar (dati non mostrati). Gli embrioni sopravvissuti avevano prodotto piante con foglie e radici completamente sviluppate. Per questo motivo, le successive colture *in vitro* sono state effettuate mantenendo la temperatura rigorosamente a 18 °C. I risultati riguardanti lo sviluppo delle piante androgeniche di anemone dopo 8, 12 e 20 mesi di coltivazione *in vitro* a 18 °C su substrato di coltivazione sono riassunte in Tab. 1. Dopo 8 e 12 mesi di coltivazione, la cv Rosa produceva piante più piccole e leggere rispetto alle altre cultivar; mentre non sono state riscontrate differenze

Tab. 1. Sviluppo dei cormi di origine androgenica su substrato di coltivazione dopo 8, 12 e 20 mesi dalla semina delle antere (per ogni carattere, lettere diverse indicano valori statisticamente diversi mediante ANOVA e test di Fisher a $p \leq 0,05$).

Tab. 1. Development of androgen corms on propagation substrate 8, 12 and 20 months after anther sowing (for each character, different letters indicate statistical different values by ANOVA and Fisher test at $p \leq 0.05$).

periodo	cultivar	peso delle piante (g)	lunghezza del corno (mm)	larghezza del corno (mm)
8 mesi				
	Bcn13	$0,11 \pm 0,01$ ab	$5,7 \pm 0,4$ a	$4,4 \pm 0,3$ a
	Bcn14	$0,11 \pm 0,01$ ab	$5,8 \pm 0,4$ a	$4,4 \pm 0,3$ a
	Blu	$0,11 \pm 0,01$ a	$6,4 \pm 0,7$ a	$4,4 \pm 0,4$ a
	Fuego	$0,11 \pm 0,01$ a	$5,9 \pm 0,4$ a	$4,6 \pm 0,3$ a
	Magenta	$0,11 \pm 0,01$ a	$5,8 \pm 0,4$ a	$4,6 \pm 0,3$ a
	Pinkie	$0,09 \pm 0,01$ b	$5,8 \pm 0,5$ a	$4,7 \pm 0,4$ a
	Rosa	$0,06 \pm 0,01$ c	$6,2 \pm 0,6$ a	$4,3 \pm 0,4$ a
	Rosso	$0,11 \pm 0,01$ ab	$5,9 \pm 0,4$ a	$4,5 \pm 0,3$ a
12 mesi				
	Bcn13	$0,15 \pm 0,01$ a	$7,8 \pm 0,3$ a	$5,2 \pm 0,2$ a
	Bcn14	$0,17 \pm 0,02$ a	$5,6 \pm 0,3$ b	$4,0 \pm 0,2$ b
	Blu	$0,51 \pm 0,10$ b	$11,0 \pm 1,2$ c	$6,5 \pm 0,9$ cd
	Fuego	$0,25 \pm 0,02$ c	$7,6 \pm 0,2$ ad	$5,4 \pm 0,2$ ac
	Magenta	$0,35 \pm 0,05$ d	$10,4 \pm 0,8$ c	$7,4 \pm 0,6$ d
	Pinkie	$0,19 \pm 0,03$ ac	$6,6 \pm 0,5$ bd	$4,9 \pm 0,3$ a
	Rosa	$0,07 \pm 0,01$ e	$4,5 \pm 0,2$ e	$3,5 \pm 0,1$ b
	Rosso	$0,18 \pm 0,03$ ac	$7,0 \pm 0,6$ ad	$4,8 \pm 0,3$ a
20 mesi				
	Bcn13	$0,45 \pm 0,07$ a	$10,5 \pm 0,9$ ab	$8,0 \pm 0,4$ a
	Bcn14	$0,34 \pm 0,05$ a	$10,1 \pm 0,8$ abc	$7,1 \pm 0,5$ ac
	Blu	$0,47 \pm 0,09$ a	$8,8 \pm 0,8$ ac	$7,3 \pm 0,5$ ac
	Fuego	$0,41 \pm 0,06$ a	$11,6 \pm 0,7$ b	$7,4 \pm 0,5$ ac
	Magenta	$0,62 \pm 0,11$ a	$11,6 \pm 1,0$ b	$9,5 \pm 0,8$ b
	Pinkie	$0,44 \pm 0,11$ a	$10,2 \pm 0,9$ ab	$8,2 \pm 0,9$ abc
	Rosa	$0,40 \pm 0,07$ a	$10,4 \pm 0,7$ ab	$8,3 \pm 0,6$ ab
	Rosso	$0,33 \pm 0,04$ a	$8,2 \pm 0,4$ c	$6,8 \pm 0,3$ c

nel peso delle piante dopo 20 mesi di coltura. Fra le cultivar, differenze statisticamente significative per la dimensione del corno (lunghezza e larghezza) sono state riscontrate dopo 12 e 20 mesi di coltivazione. Se dopo 12 mesi di coltura la cv Rosa era quella con corni di più piccole dimensioni, dopo 20 mesi di coltura la cv Rosso era quella con corni di più piccole dimensioni (Tab. 1). Il tasso di sopravvivenza dei corni, dopo 8 mesi di coltivazione *in vitro* variava da 64,7 % della cv Bianco B al 97% della cv Blu (Tab. 2).

Tab. 2. Sopravvivenza dei corni di origine androgenica dopo 8 mesi di coltivazione *in vitro* (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi mediante ANOVA e test di Fisher a $p \leq 0,05$).

Tab. 2. *Survival of androgen corms after 8 months in vitro culture (different letters indicate statistical different values by ANOVA and Fisher test at $p \leq 0.05$).*

cultivar	tasso di sopravvivenza (%)
Bcn A	92,4 ± 4,8 ac
Bcn B	64,7 ± 5,8 b
Blu	97,6 ± 2,4 a
Fuego	94,5 ± 3,3 ac
Magenta	90,4 ± 6,0 ac
Pinkie	75,0 ± 25,0 abcd
Rosa	86,4 ± 5,1 cd
Rosso	79,5 ± 5,1 d

Prove di ambientamento

L'autunno del primo anno, a 8 mesi dalla semina delle antere *in vitro* risultava essere il periodo statisticamente migliore per l'ambientamento in serra dei corni rigenerati. Dai corni ambientati in questo periodo è stato ottenuto un tasso di sopravvivenza del 27,0±11,0%, mentre quelli ambientati dopo 12 e 20 mesi di coltura *in vitro* avevano un tasso di sopravvivenza decisamente minore, rispettivamente del 4,2±1,6% e 3,7±1,5%. Non sono state riscontrate differenze nella sopravvivenza tra le cultivar e non sono state riscontrate correlazioni tra peso della pianta *vs* sopravvivenza o tra dimensioni del corno *vs* sopravvivenza (dati non mostrati).

Discussione e Conclusioni

La formazione delle piante androgeniche necessita di una temperatura costante di 18° C. Questa particolarità è in accordo con le caratteristiche di sviluppo in natura quando, dopo la dormienza estiva, con l'abbassamento delle temperature i corni iniziano a germogliare e immagazzinare fotosintati. A temperatura più bassa (15 °C), che risulta ottimale per *Hepatica nobilis* (Ranunculaceae) (Nominozu *et al.*, 2004), *A. coronaria* non reagisce con la stessa efficienza. In *A. virginiana*, la temperatura ottimale per lo sviluppo degli embrioni è di 25 °C (Johansson e Eriksson 1977). Le differenze di sviluppo osservate tra le piante androgeniche di differenti cultivar non è sorprendente: cultivar di una specie mostrano risposte differenti alla formazione degli embrioni androgenici e sviluppo delle plantule perché il genotipo è uno dei principali fattori endogeni importanti nell'embriogenesi da polline immaturo (Germanà 2011 e citazioni contenute). Il periodo migliore per l'ambientamento in serra dei corni risultava essere statisticamente migliore nell'autunno del primo anno, a 8 mesi dalla semina delle antere. Tale risultato potrebbe essere dovuto al fatto che il periodo autunnale è quello ottimale anche per l'impianto dei corni, mentre l'inverno coincide col periodo di fioritura. La coltura *in vitro* prolungata dei corni probabilmente causa una perdita della forza germinativa causando lo scarso ambientamento ottenuto nell'autunno del secondo anno di coltura (20 mesi). Col tempo, molti corni, ottenuti da coltura d'antere, producono molte radici da cui differenziano per embriogenesi secondaria embrioni secondari che formano nuovi corni. Si può ipotizzare che tale fenomeno sposti nutrienti dal corno principale, che non si

ingrossa più, a quelli neoformati. Questa neo-organogenesi è stata descritta anche in cormi *in vitro*, derivanti da rigenerazione ottenuta dal gambo florale di anemone (Ruffoni et al., 2005). In questo caso, con materiale rigenerato e non derivante da polline immaturo, gli stessi autori hanno osservato che la percentuale di ambientamento dei cormi ottenuti *in vitro* era correlato alla loro dimensione che doveva essere non inferiore a 0,5 g. Contrariamente, in questo studio, utilizzando materiale di natura embriogonica, non sono state riscontrate correlazioni tra peso o dimensione del corno e sopravvivenza all'ambientamento, indipendentemente dalla cultivar di origine.

In conclusione, è stato definito che la temperatura ottimale per lo sviluppo delle piante androgeniche di anemone *in vitro* è 18 °C, il periodo migliore per l'ambientamento in serra è l'autunno del primo anno di coltura e non sono state riscontrate correlazioni tra dimensioni del corno formatosi *in vitro* e sopravvivenza all'ambientamento. I risultati di questo studio, confermano che il protocollo di sviluppo e ambientamento delle plantule derivanti da androgenesi è affidabile e ripetibile e che lo sviluppo di linee omozigoti di *Anemone coronaria* è una strada perseguibile per aumentarne le strategie di breeding; anche se sono state osservate differenze genotipo-dipendenti nella sopravvivenza durante la fase di coltura *in vitro* da considerare nell'impostazione dei futuri programmi di incroci.

Bibliografia

- Ben-Hod G., Kigel J., Steinitz B., 1988. Photothermal effects on corm and flower development in *Anemone coronaria* L. *Scientia Horticulturae*, 40 (3): 247-258
- Copetta A., Laura M., 2021. The double layer method to the genesis of androgenic plants in *Anemone coronaria*. In P. Tripodi (ed), *Crop Breeding, Genetic Improvement Methods*. Springer, Clifton, N.J. pagg. 187-196.
- Copetta A., Dei F., Marchioni I., Cassetti A., Ruffoni B., 2018. Effect of thermal shock in the development of androgenic plants of *Anemone coronaria* L.: influence of genotype and flower parameters. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 134: 55-64.
- Germanà M.A., 2011. Anther culture for haploid and double haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104 283-300.
- Johansson L., Eriksson T., 1977. Induced embryo information in anther cultures of several *Anemone* species. *Physiologia Plantarum*, 40: 172-174.
- Laura M., Allavena A., 2007. *Anemone coronaria* breeding: current status and perspectives. *European Journal of Horticultural Science* 72 (6): 241-247.
- Laura M., Safaverdi G., Allavena A., 2006. Androgenetic plants of *Anemone coronaria* derived through anther culture. *Plant Breeding* 125: 629-634.
- Nomizu T., Niimi Y., Han D.S., 2004. Haploid plant regeneration via embryogenesis from anther cultures of *Hepatica nobilis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 79: 307-313.
- Ruffoni B., Semeria L., Laura M., Savona M., Bisio A., 2005. *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Anemone coronaria* L. hybrids. *Propagation of Ornamental Plants* 5 (2): 74-77.

Produzione di ibridi di *Hydrangea macrophylla* attraverso la tecnica di ovule culture

Beatrice Nesi^{1*}, Lisetta Ghiselli^{1,2}, Andrea Mansuino³

* beatrice.nesi@crea.gov.it

¹ CREA-OF Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pescia (PT)

² DAGRI-Università degli Studi di Firenze

³ Azienda Mansuino, Sanremo (IM)

Riassunto

L'ortensia macrophylla [*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.] è la specie più popolare nel genere *Hydrangea* e rappresenta un'importante coltura ornamentale da oltre 300 anni, anche grazie alle sue grandi e colorate infiorescenze. Dall'inizio del 1900, sono state selezionate numerose cultivar con fiori vistosi, ma gli studi genetici sono stati rallentati dalla scarsità di informazioni sulle risorse genetiche esistenti. Tradizionalmente utilizzata come pianta da giardino e da vaso, sta riscontrando molto successo anche come pianta da fiore reciso. Tuttavia l'espansione verso nuovi settori di mercato necessita lo sviluppo di nuovi ibridi da ottenere mediante incroci intra- e interspecifici. L'*ovule rescue* è una tecnica di coltura *in vitro* utilizzata per superare i limiti legati all'ibridazione tra i quali l'aborto prematuro degli embrioni e la disomogeneità e/o bassa percentuale di germinazione dei semi. La tecnica, seppur laboriosa, consente di superare alcune di queste difficoltà nella produzione di ibridi di *Hydrangea* con caratteri desiderabili. Scopo del lavoro è stato quello di investigare la tecnica dell'*ovule culture* per produrre ibridi di *Hydrangea* utilizzando due mezzi di coltura (MS e GA) caratterizzati da una diversa composizione.

Parole chiave: Ortensia, coltura *in vitro*, ovuli, breeding, Murashige and Skoog medium, Gamborg medium.

Production of hybrids *Hydrangea* spp. by ovule culture technique

Abstract: In flowering plants, the main breeding objective is to increase genetic variability in ornamental traits such as flower colour, flower shape and plant form, but also to get reblooming varieties. Although production of wide hybrids is often hindered by two types of hybridization barriers, i.e., pre- and post- fertilization barriers, the latter can partly be overcome by embryo rescue, such as embryo or ovule culture. *Hydrangea macrophylla* is one of the most important ornamentals worldwide. However, breeding of new *Hydrangea* cultivars has been hampered by a long breeding cycle and lack of information about its genetic resources. This study investigates *in vitro* culture techniques through ovule cultures to overcome these limitations and increase the efficiency of hybridization. Two different culture media were compared to verify the germination rate of immature ovules in different intraspecific crosses. The germination rate and viability of the seedlings were influenced by the genotypes used in the different combinations of crossing, highlighting, in some cases, the poor compatibility between some of them. The media used seems to mainly influence the development and growth of young seedlings.

Keywords: Hortense, *in vitro* culture, ovule, breeding, Murashige and Skoog medium, Gamborg medium

Introduzione

Il genere *Hydrangea*, appartenente alla Famiglia delle *Hydrangeaceae*, comprende 53 specie arbustive, sarmentose ed anche arboree, originarie dell'Asia, soprattutto Giappone e Cina, e della costa atlantica del Nord America, fino al Centro America (The Plant List). Nel 1957, McClintock ha suddivi-

so il genere in 2 sezioni: *Hydrangea* e *Cornidia*. La prima sezione è la più numerosa e comprende specie caducifoglie originarie dell'America (*H. arborescens*, *H. quercifolia* e *H. Radiata*), e quelle di origine asiatica (*H. paniculata*, *H. petiolaris*, *H. serrata* e *H. macrophylla*). La sezione *Cornidia* invece include specie prevalentemente rampicanti, di grandi dimensioni (*H. seemannii*, *H. integrifolia* e *H. serratifolia*), sempreverdi, con foglie coriacee e commercialmente poco diffuse. A livello paesaggistico le ortensie hanno la capacità di caratterizzare fortemente un luogo e un ambiente pedoclimatico. Ne sono un esempio le colline delle isole Azzorre (terreni acidi e ricchi di alluminio) che diventano di un colore blu intenso quando le ortensie sono in fiore; così come i bordi delle risaie a sud di Tokyo, colorati di bianco e di tutte le sfumature del rosa a giugno.

La specie che ha dato origine al maggior numero di ibridi coltivati è *H. macrophylla*, la più popolare, un arbusto deciduo che cresce spontaneo nella Cina occidentale, in Corea e in Giappone caratterizzata da fiori bianchi, rosa, rossi o viola a seconda della cultivar e del pH del terreno. Tradizionalmente utilizzata come pianta da giardino e da vaso, sta riscuotendo molto successo anche come pianta da fiore reciso. L'espansione verso nuovi settori di mercato è però legata allo sviluppo di nuovi ibridi dotati di caratteri interessanti, da ottenere mediante incroci intra- e interspecifici. Nei programmi di breeding si cerca di combinare buoni caratteri estetici con quello della rifioritura, cioè la capacità di fiorire non solo sulle gemme apicali ma anche su quelle ascellari (*H.m.* cv Endless Summer, cv Elegance e cv Coco, o cv Forever&Ever), e della buona resistenza al freddo. Il successo dell'ibridazione è condizionato però dal superamento di alcuni fattori limitanti quali l'aborto prematuro degli embrioni e la disomogeneità e/o bassa percentuale di germinazione dei semi (Eeckhaut et al., 2006). Alcune tecniche di coltura *in vitro*, come l'*ovary* e l'*ovule rescue*, possono essere utilizzate per superare questi limiti e aumentare l'efficienza dell'ibridazione (Reed, 2004, 2005; Mohapatra et al., 2005; Lazzereschi et al., 2018).

Il CREA-Centro di Orticoltura e Florovivaismo, Sede di Pescia, da alcuni anni, in collaborazione con l'Azienda Mansuino di Sanremo, porta avanti un'attività di ricerca su *Hydrangea* spp. con l'obiettivo di costituire nuovo materiale genetico da destinare al mercato del fiore reciso. Nel corso di questi anni è stato possibile ottenere nuovi ibridi, con caratteri interessanti e attualmente in fase di valutazione presso aziende italiane ed estere. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare la tecnica dell'*ovule culture* utilizzando due substrati di coltura, caratterizzati da una diversa composizione, su alcuni ibridi di ortensia.

Materiali e Metodi

La tecnica dell'*ovule culture* è stata utilizzata per ottenere piantine da 5 ibridi intraspecifici di *H. macrophylla* effettuati presso il CREA-OF di Pescia e l'Azienda Mansuino nell'estate 2021 (Tab. 1). A tal proposito sono stati utilizzati due tipi di substrato di coltura: GA, a base di sali di Gamborg, e MS (Murashige e Skoog, 1962). Ad entrambi i substrati sono stati aggiunti saccarosio e phyto agar della ditta Duchefa, nella quantità di 20 e 9 g/L rispettivamente, senza l'aggiunta di ormoni. Da ogni incrocio è stato prelevato un certo numero (5 per ciascun substrato = repliche) di capsule dalle quali, previa sterilizzazione e successivo sezionamento, sono stati estratti tutti gli ovuli presenti. Le capsule contenenti gli ovuli (con ovuli fecondati) sono state raccolte da 121-138 giorni dopo l'impollinazione (D.A.P.). La sterilizzazione delle capsule è avvenuta attraverso un pre-lavaggio con acqua corrente e detergente concentrato per il lavaggio della vetreria da laboratorio per 30 minuti, che ha la funzione di detergere la superficie del materiale vegetale senza produrre schiuma, seguito da un risciacquo con acqua sterile per 10 minuti, un passaggio in etanolo al 70% per 1 minuto, al quale ha fatto seguito un lavaggio di 30 minuti in una soluzione di cloro attivo al 2,5% + 2 gocce di Tween 20 e 1 ppm di PPM™ (*Plant Preservative Mixture*). Infine si è proceduto con 2 lavaggi in acqua sterile di 10 minuti ciascuno. In ambiente sterile e con l'utilizzo di un binoculare, sono stati estratti gli ovuli da ogni capsula che è stata aperta con un taglio longitudinale mediante pinza e bisturi, quindi con la punta di un ago da siringa sono stati prelevati i singoli ovuli, contati e trasferiti su piastre Petri con i due substrati di coltura. Le capsule Petri sono state messe in cella climatica alla temperatura di 23±1°C, fotoperiodo di 16 h di luce fornita da tubi neon a luce bianca fredda, 40 W Osram che sviluppano un'intensità luminosa di 35 μmol m⁻² s⁻¹. I rilievi

Tab. 1. Genotipi utilizzati nel programma di *breeding* in *H. macrophylla*.Tab. 1. *Genotypes used in the breeding program in H. macrophylla.*

Parentale♀	Parentale♂	D.A.P.
Amor blue® (Amor)	Endless Summer Bloom Star (ESBlo)	124
Verena (Vere)	Koria (Kori)	123
Rodeo (Rod)	Wedding Ring (Wedd)	121
Light Purple (Ligh)	Koria (Kori)	138
Parentale A (ParA)	Parentale B (ParB)	121

sono stati effettuati ogni due settimane osservando il numero di ovuli germinati, questi sono poi stati trasferiti in appositi vasetti di vetro, sempre con i medesimi substrati e mantenuti alle stesse condizioni di crescita. Dopo 130 giorni circa, si è proceduto all'ambientamento delle giovani piante sviluppate su substrato a base di torba e perlite (1:1) ed è stato rilevato il numero totale di piante vive. Su un campione rappresentativo di 15 piante, sono stati rilevati alcuni parametri morfologici: numero totale di piante vive, lunghezza delle radici e biomassa della pianta. I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), e la separazione delle medie è stata eseguita mediante il test di Duncan. Per riassumere la variabilità osservata fra le varie combinazioni di incrocio nei due mezzi di coltura, è stata calcolata la matrice delle distanze Euclidee con cui è stata effettuata l'analisi cluster.

Risultati e Discussione

Dall'analisi dei dati è stato possibile evidenziare sia un effetto del genotipo, che del substrato sui parametri misurati (Tab. 2). La combinazione di incrocio (genotipo) ha influenzato in modo significativo il numero totale di piante vive, mentre sugli altri due parametri misurati il suo effetto è risultato non significativo. In particolare l'incrocio *H.m.* cv Light Purple x cv Koria è quello che ha manifestato il più alto numero totale di piante vive (24), significativamente diverso dagli altri 4 incroci: *H.m.* cv Verena x cv Koria con 11,2, *H.m.* cv Rodeo x cv Wedding Ring con 6,7, *H.m.* cv Amour x cv E. S. Bloom Star con 5,6 e infine *H.m.* cv Rodeo x cv Shoking blu con 2,2 piante vive. Nel substrato GA il numero medio di piante vive è risultato maggiore rispetto al substrato MS rispettivamente con 14 e 11 piante vive in totale (Tab. 2). Altro parametro morfologico interessante è il peso delle piante campionate che, in questo caso, è risultato significativamente più elevato per le piante allevate su GA (0,20 g) rispetto a quelle su MS (0,14 g). L'incrocio *H.m.* cv Light Purple x cv Koria è quello con piante più sviluppate che pertanto si differenzia in modo significativo solo dall'incrocio *H.m.* cv Rodeo x cv Shoking blu caratterizzato da piante più piccole.

Tab. 2. Dati medi dei parametri misurati per le diverse fonti di variazione valutate.

Tab. 2. *Mean effects of parental genotype, medium, and genotype x medium interactions on the different parameters measured.*

Fonte di variazione	Piante vive totali (n.)	Lunghezza radici (mm)	Peso piante (g)
Genotipo (G)	*	n.s.	n.s.
Amor x ESBlo	5.63b	21.89	0.14
Ligh x Kori	23.75a	19.37	0.23
Rod x ParB	2.25b	9.83	0.12
Rod x Wedd	6.67b	23.31	0.16
Vere x Kori	11.18b	16.20	0.14
Mezzo (M)	n.s.	**	**
GA	13.94	21.62	0.20
MS	10.91	16.34	0.14
GxM	n.s.	n.s.	n.s.

È stata inoltre rilevata la dimensione degli apparati radicali, parametro importante per lo sviluppo delle piante una volta trasferite alle condizioni *ex vitro*. Tale parametro è risultato significativamente diverso tra i due substrati con una lunghezza media di 22 e 16 mm in GA e MS rispettivamente. Tra gli incroci, H.m. cv Rodeo x cv Wedding Ring e H.m. cv Amour x cv E. S. Bloom Star sono quelli caratterizzati da un apparato radicale più sviluppato, con una lunghezza media di 23,3 e 20,5 mm rispettivamente e significativamente diversi solo dall'incrocio H.m. cv Rodeo x cv Shoking blu caratterizzato da una radice di 16,2 mm di lunghezza.

Questi risultati evidenziano la bassa compatibilità di alcuni genotipi all'ibridazione interspecifica per lo sviluppo di nuovi ibridi, in particolare la combinazione H.m. cv Rodeo x cv Shoking Blu è risultata caratterizzata sia da un basso numero di piante vive sia da un basso peso delle piantine, oltre che da uno scarso sviluppo dell'apparato radicale.

Dalle matrici delle distanze euclidee calcolate tra gli incroci coltivati in due differenti substrati di coltura *in vitro*, utilizzando le 6 componenti principali ottenute dall'analisi fattoriale, è stata eseguita l'analisi cluster per evidenziare le relazioni tra i diversi tipi di incrocio (Fig. 1). Nel cluster è possibile evidenziare 3 gruppi principali: gruppo A) comprendente a sua volta due sottogruppi (a1) composto dagli incroci H.m. cv Amour x cv E. S. Bloom Star coltivati su GA e MS insieme a H.m. cv Verena x cv Koria su GA, sottogruppo (a2) comprendente l'incrocio H.m. cv Rodeo x cv Wedding Ring su MS e GA; il gruppo B) con l'incrocio H.m. cv Light Purple x cv Koria e il gruppo C) con l'incrocio H.m. cv Rodeo x cv Shoking blu. Si evidenzia una separazione dei genotipi fondata principalmente sul tipo di incrocio che pertanto risulta avere una maggiore influenza rispetto al tipo di substrato di coltura. Infatti tutte le combinazioni di incrocio, coltivate sia su GA che su MS, si raggruppano fatta eccezione per l'incrocio H.m. cv Verena x cv Koria che sembra subire maggiormente l'interazione con il tipo di substrato. Questo conferma ulteriormente che è il genotipo ad avere una maggiore influenza rispetto al substrato.

Conclusioni

I dati raccolti mettono in evidenza come la tecnica dell'*ovule culture* applicata su *H. macrophylla*, seppur laboriosa, ha consentito di ottenere, per alcune combinazioni di incrocio, un elevato numero di nuovi genotipi in tempi relativamente brevi.

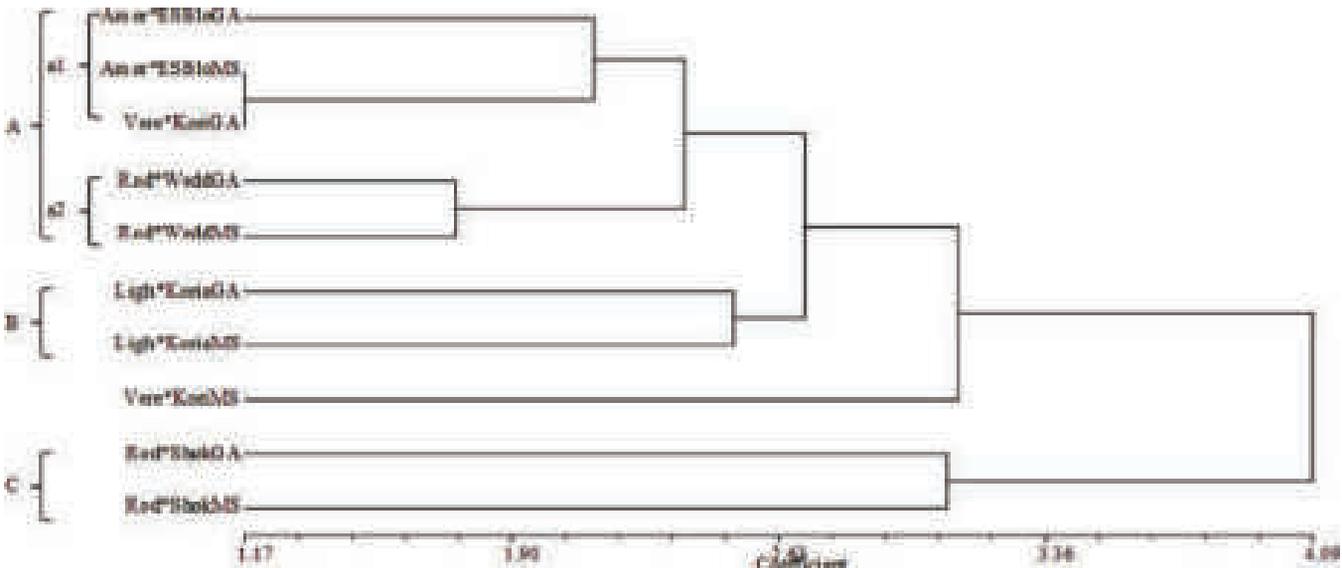


Fig. 1. Analisi cluster basata sulle distanze euclidee calcolate tra le accessioni con 6 PC variabili morfologiche significative.

Fig. 1. Cluster analysis based on Euclidean distances calculated between accessions with the 6 PC extracted.

La vitalità delle piantine è inoltre risultata maggiormente influenzata dall'effetto genotipo piuttosto che dal tipo di substrato di coltura considerato, evidenziando in alcuni casi, la scarsa compatibilità tra alcuni di essi.

Con questa attività sono stati selezionati nuovi ibridi con caratteri commerciali interessanti, attualmente in fase di selezione e valutazione, sia presso una rete di aziende italiane sia estere.

Bibliografia

- Eeckhaut T., Van Laere K., De Riek J., Van Huylbroeck J., 2006. Overcoming interspecific barriers in ornamental plant breeding. In: Da Silva J.A.T. (ed.) Floriculture, ornamental and plant biotechnology. Vol. I. Global Science Books, UK, pp. 540-551.
- Lazzereschi S., Nesi B., Burchi G., Mansuino A., 2018. Embryo rescue e germinazione assistita: sviluppo di tecniche in vitro a supporto del miglioramento genetico in *Hydrangea* spp. *Italus hortus*, 1 (1): 22-26.
- Mohapatra A., Rout G.R., 2005. Study of embryo rescue in floribunda rose. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81: 113-117.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Reed S.M., 2004. Floral characteristics of a *Hydrangea macrophylla* × *H. paniculata* hybrid. *Proc. Southern Nursery Assn. Res. Conf.*, 49: 580-582.
- Reed S.M., 2005. Pollination Biology of *Hydrangea macrophylla*. *Hort Science*, 40(2): 335-338.

Ottimizzazione dei protocolli di embriogenesi somatica e rigenerazione da protoplasti per l'applicazione delle *New Plant Breeding Techniques* (NPBTs) nel miglioramento genetico della Vite

Lucia Rosaria Forleo^{1*}, Margherita D'Amico¹, Maria Francesca Cardone¹, Flavia Angela Maria Maggiolini^{1,2}, Teodora Basile¹, Antonella Salerno¹, Antonio Domenico Marsico¹, Rocco Perniola¹, Riccardo Velasco¹, Carlo Bergamini¹

* luciarosaria.forleo@crea.gov.it

¹Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia (CREA-VE), Turi (BA)

²Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Bari Aldo Moro

Riassunto

Le *New Plant Breeding Techniques* (NPBTs), a differenza del miglioramento genetico tradizionale, consentono di modificare un carattere prescelto, mantenendo intatte le altre caratteristiche tipiche della varietà. La via più promettente, per l'applicazione delle NPBTs su vite, è quella che parte dalla formazione di calli embriogenici, l'isolamento di protoplasti vitali, la transfezione con ribonucleoproteine gRNA/CAS e la rigenerazione delle piante attraverso la formazione di embrioni. In questo lavoro, presentiamo i recenti progressi del nostro gruppo di ricerca nello sviluppo di strumenti genomici per l'applicazione del breeding molecolare di prossima generazione in *Vitis vinifera* L.

Parole chiave: *Vitis vinifera*, callo embriogenico, genome editing, embrioni somatici

Optimization of somatic embryogenesis and protoplast regeneration protocols for the application of *New Plant Breeding Techniques* (NPBTs) in the genetic improvement of grapevine

Abstract: *New Plant Breeding Techniques* (NPBTs) protocols have been developed to produce new grape varieties with improved quantitative and qualitative characteristics. Reliable transformation protocols for grapes are based on the generation/induction of embryogenic callus cells that are then transformed. Varieties such as Italia have proven to be very recalcitrant to regeneration via somatic embryogenesis. In this work, the development of a protocol for improved production of embryogenic calluses is described. Two sterilization protocols of immature inflorescences were tested: (a) a lower active chlorine concentration for a longer time (LS); and (b) a higher active chlorine concentration for a shorter time (HS), in combination with the absence or presence of citric acid in the inducing embryogenic callus substrate. The embryogenic calluses formation in Chardonnay, a cv. with a high embryogenic response, was significantly higher in the presence of citric acid in the initial growing substrate regardless of the sterilization protocol. In Aglianico, a cultivar with a lower embryogenic response, no significant differences were observed. Instead, in a recalcitrant cultivar as Italia, we obtained a 13-fold increase in embryogenic calluses formation performing sterilization of flowers with the HS protocol compared to LS. Several protocols for protoplast isolation, transfection, and regeneration have been tested and improved. A successful regeneration was achieved for some of the tested genotypes. Verification of gene editing is yet to be completed.

Keywords: *Vitis vinifera*, embryogenic callus, genome editing, somatic embryos

Introduzione

Data la crescente richiesta da parte dei mercati internazionali di uve apirene il CREA-VE (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria-Centro di Viticoltura ed Enologia) sede di Turi ha scelto di indirizzare la ricerca verso l'ottenimento di nuove varietà apirene legate al territorio. Grazie all'introduzione delle nuove tecniche di breeding (NPBTs), il miglioramento genetico potrà essere eseguito con metodiche quali cis-genesi e l'editing genomico (Dalla Costa et al., 2007), le quali consentono di modificare solo il carattere prescelto, mantenendo inalterate le altre caratteristiche tipiche della varietà. L'applicazione di queste nuove tecnologie richiede l'utilizzo di callo embriogenico, cellule derivanti da tessuti somatici che in opportune condizioni o stimoli ormonali, acquisiscono la capacità di formare embrioni somatici senza passare attraverso la fusione dei gameti. Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto protocolli per l'ottenimento di calli embriogenici da varietà recalcitranti da cui ottenere protoplasti vitali da sottoporre a transfezione con ribonucleoproteine e capaci di rigenerare plantule. Inoltre, combinando genomica e trascrittomica siamo stati in grado di studiare alcuni importanti geni candidati nel miglioramento genetico della vite e utilizzare queste informazioni per la progettazione precisa di moduli gRNA/CAS in grado di mirare a specifici siti di mutazione. Per mettere a punto l'intera procedura, abbiamo scelto VviAGL11, il gene che induce l'assenza di semi nell'uva. Sono stati effettuati tentativi di editing del gene VviAGL11 delle cv. Italia, Red Globe e Victoria utilizzando il sistema CRISPR/CAS con proteine ricombinanti prodotte nei nostri laboratori (dati non mostrati). Finora sono stati ottenuti embrioni rigenerati da protoplasto appartenenti alle cvs Chardonnay, Sultanina e Victoria.

Materiali e Metodi

Materiale vegetale

Infiorescenze immature di 13 varietà di *Vitis vinifera* L. (Tab. 1) sono state raccolte da piante di 15 anni di età, dal 23 aprile al 26 maggio 2020. Le infiorescenze raccolte erano negli stadi di sviluppo florale II-III (Gribaudo et al., 2004). Lo sviluppo degli espianti è stato determinato dall'esame dello stadio di microsporogenesi dopo colorazione con acetocarmine delle antere. Gli espianti appena raccolti sono stati immersi in etanolo (70% v/v in acqua) per 30 secondi; successivamente sono stati applicati due differenti protocolli di sterilizzazione con ipoclorito di sodio: a) ipoclorito di sodio (0,8% di cloro attivo) per 10 minuti (LS); b) ipoclorito di sodio (2% di cloro attivo) per 2 minuti (HS). Metà degli espianti è stata pia-

Tab. 1. Percentuale di calli embriogenici 2020 ottenuti mediante sterilizzazione LS ed HS.

Tab. 1. Percentage of embryogenic calluses 2020 obtained by LS and HS sterilisation.

Cultivar	Calli embriogenici (%)
Aglianico	2.1
Autumn Royal	2.4
Chardonnay	16.9
Crimson	6.2
Glera	0.7
Italia	0.4
Negroamaro	0.5
Palieri	0.5
Primitivo	0
Red Globe	2.1
Sultanina	10.5
Summer Royal	3.8
Victoria	2.1

strata subito e l'altra metà è stata frigoconservata tal quale a 4°C e piastrata al più tardi entro sette giorni per evitare possibili problemi di contaminazione. Come espianti sono stati utilizzati, al posto di stami e ovari, fiori interi come già proposto da altri autori (Gambino et al., 2007). L'utilizzo di fiori interi fa risparmiare tempo, consente di piastrare un maggior numero di espianti e comporta un minor danno di stami e ovari. Nel 2021 sono stati messi in coltura fiori di 7 varietà (Tab. 2) utilizzando il solo protocollo di sterilizzazione HS, in quanto si è rivelato essere il migliore (Forleo et al., 2021).

Tab. 2. Percentuale di calli embriogenici 2021 ottenuti mediante sterilizzazione HS.

Tab. 2. Percentage of embryogenic calluses 2021 obtained by HS sterilisation.

Cultivar	Calli embriogenici (%)
Chardonnay	28.8
Italia	0.9
Nero di Troia	0.2
Primitivo	0.4
Red Globe	3.1
Sultanina	38.2
Victoria	2.9

Condizioni dei media e della coltura

Gli espianti per l'induzione del callo sono stati posti inizialmente in un terreno contenente come regolatori di crescita 4,5 μM 2,4-D e 8,9 μM BA. A metà dei campioni è stato aggiunto al terreno acido citrico come antiossidante nella dose di 0,15 g/L. Il pH è stato regolato a 5,8. I fiori sono stati coltivati in piastre Petri e mantenuti a 26 °C al buio. Dopo la formazione dei calli (circa 3-4 mesi) per il loro mantenimento a lungo termine, sono stati utilizzati due diversi substrati. Il primo GS1CA, arricchito di 10 μM NOA, 1 μM BA, 20 μM IAA e carbone attivo 2,5 g/L e il secondo C1, addizionato di 1 μM BA, 5 μM 2,4-D e 0,15 g/L di acido citrico. Il pH è stato regolato a 5,8. Il trasferimento dei calli su substrato fresco è avvenuto mensilmente alternando 1 mese su GS1CA e 2 mesi su C1. La produzione totale di calli è stata registrata dopo 8 mesi.

Produzione di protoplasti

I protoplasti sono stati prodotti a partire da calli embriogenici di 'Victoria', 'Red Globe', 'Italia', 'Chardonnay' e 'Sultanina'. Il protocollo adottato è stato quello di Zhu e collaboratori (1997), al quale sono state apportate modifiche nel corso delle prove. Dopo la digestione della parete cellulare, i protoplasti sono stati filtrati e centrifugati su cuscino di saccarosio. La conta dei protoplasti vitali è stata eseguita dopo colorazione con fenosafranina. I protoplasti sono stati portati alla concentrazione consigliata in letteratura e si è proceduto alla transfezione con PEG e altri carriers, seguita dall'inclusione in gocce di substrato contenenti agenti gelificanti (Gellan gum, Phytoagar, Agar, Agarosio, Alginato) adagiate in piastre Petri, dove è stato aggiunto un mezzo di crescita liquido.

Risultati

Sono stati ottenuti calli embriogenici da tutte le varietà testate. Per le varietà recalcitranti di particolare interesse, come la cv. Italia, si è osservata una percentuale di calli embriogenici pari allo 0,4% nel 2020 e 0,9% nel 2021 (Tab. 1 e 2). Sono state osservate correlazioni tra morfologia del callo e competenza embriogenica. I calli friabili (FC) e i calli duri (HC) sono risultati non embriogenici. Quelli embriogenici (EC) si presentavano granulari di colore giallo chiaro o bianco. I calli friabili hanno mostrato un tasso di crescita più rapido rispetto a quelli embriogenici. I diversi tipi di calli sono stati registrati ed espressi in percentuale rispetto al totale degli espianti in coltura. Dall'analisi effettuata impiegando il software statistico R (R versione 3.6.3, 2020-02-29) su tre cv. con differente capacità embriogenica (Italia bassa, Aglianico media, Chardonnay alta) è stato possibile osservare che solo nella

cv. Chardonnay la formazione di calli embriogenici è stata significativamente più alta in presenza di acido citrico nella fase iniziale della coltura. Sia per 'Italia' che per 'Chardonnay' una sterilizzazione più breve con una concentrazione di cloro attivo più elevata (HS) ha favorito la formazione di calli embriogenici. Per 'Aglianico' non è chiara l'influenza dei diversi fattori nella formazione dei calli embriogenici (Tab. 3).

Per quanto riguarda la rigenerazione da protoplasti, per le cv. Sultanina, Chardonnay e Victoria, dopo circa 15 giorni è stato possibile osservare la formazione delle prime microcolonie (Fig. 1), seguite dopo circa 50-60 giorni dagli embrioni con le prime foglie cotiledonari (Fig. 2).

Tab. 3. Effetto del substrato (con acido citrico C e senza NC) e della procedura di sterilizzazione sulla percentuale dei diversi tipi di callo.

Tab. 3. Effect of the substrate (with citric acid, C, and without, NC) and sterilization procedure on the percentage of different callus types.

Cultivar	Tipo di callo (%)	Substrato			Sterilizzazione		
		C1	NC		LS	HS	
Italia	Totale (TC)	14.73	9.18	n.s.	13.36	10.71	n.s.
	Friabile (FC)	12.3	8.25	n.s.	11.74	8.66	n.s.
	Duro (HC)	2.04	0.54	n.s.	1.54	1.16	n.s.
	Embriogenico (EC)	0.39	0.38	n.s.	0.07	0.89	**
Aglianico	Totale (TC)	20.9	15.8	n.s.	12.93	27.38	n.s.
	Friabile (FC)	11.25	9.82	n.s.	7.43	15.71	n.s.
	Duro (HC)	8.04	4.02	n.s.	3.21	10.71	n.s.
	Embriogenico (EC)	1.61	1.96	n.s.	2.29	0.95	n.s.
Chardonnay	Totale (TC)	50.71	26.43	*	22.86	49.8	*
	Friabile (FC)	20.71	13.1	n.s.	9.14	22.45	n.s.
	Duro (HC)	4.05	5.48	n.s.	4	5.31	n.s.
	Embriogenico (EC)	25.95	7.86	**	9.71	22.04	n.s.

Acido citrico: C sempre presente, NC aggiunto dopo 3-4 mesi; Sterilizzazione fiori HS: con 2% di cloro attivo per 2', LS: con 0.8% di cloro attivo per 10'.

n.s. non significativamente differenti, * significativamente diversi secondo il Duncan's test con $p \leq 0.05$, ** significativamente diversi con $p \leq 0.01$

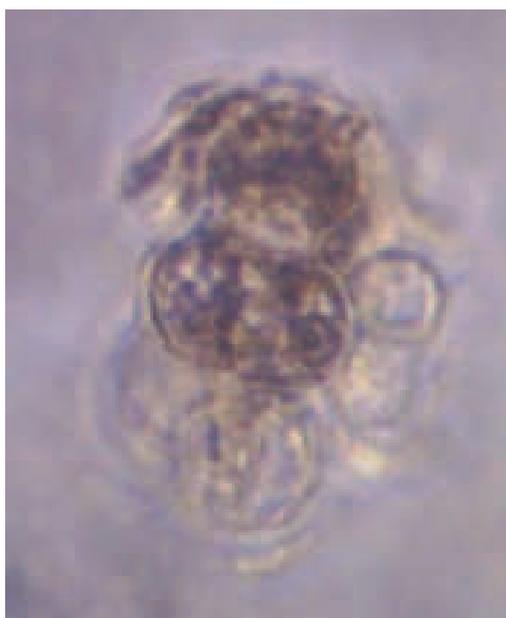


Fig. 1. Microcolonia dopo 15 giorni di coltura (ingrandimento 200X).

Fig. 1. Microcolony after 15 days culture (200X magnification).

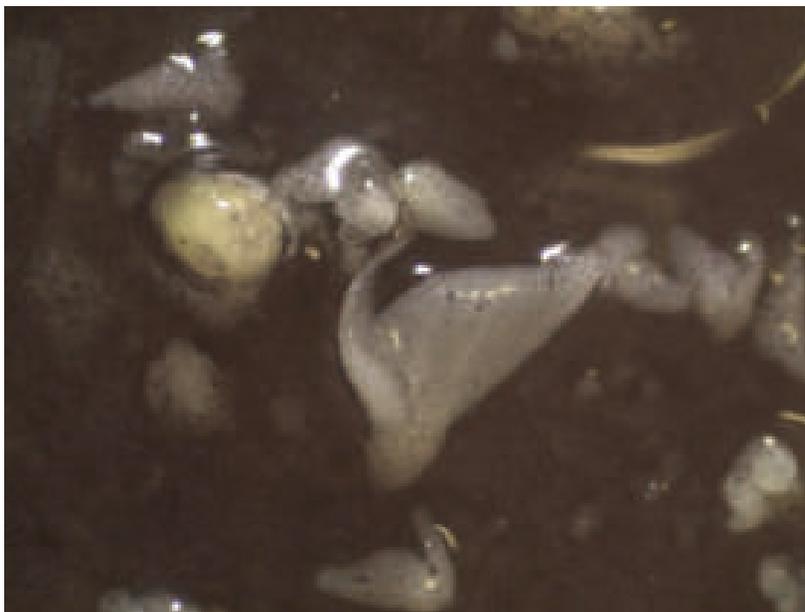


Fig. 2. Embrione di 65 giorni della cv. Sultanina (ingrandimento 10X).

Fig. 2. 65-day embryo cv Sultanina (10X magnification).

Discussione e Conclusioni

In questo lavoro abbiamo ottenuto, rispetto a quanto riportato in letteratura (Lopez-Perez et al., 2005) una discreta percentuale di calli embriogenici dalla cultivar da tavola Italia molto apprezzata e recalcitrante. Per valutare l'efficacia delle condizioni testate, oltre a 'Italia' abbiamo preso in considerazione anche altre varietà con diversa capacità embriogenica.

I risultati preliminari hanno mostrato che utilizzare fiori interi consente di ottenere calli embriogenici da tutti i genotipi testati. Oltre alla forte influenza genotipica, la formazione dei calli totali ed embriogenici è stata influenzata dal tipo di sterilizzazione e dal substrato di coltivazione. Di particolare importanza, nella formazione del callo embriogenico per le cv. Italia e Chardonnay, è stata la sterilizzazione con una più alta concentrazione di ipoclorito di sodio (HS). Questo comportamento può essere interpretato come conseguenza della necrosi dei tessuti della caliptra a causa della maggiore concentrazione di ipoclorito di sodio. Infatti, i tessuti della caliptra producono calli friabili con un tasso di crescita elevato, provocando la dispersione dei pochi embriogenici a crescita lenta, oltre che a competere per i nutrienti e lo spazio disponibile. Un altro miglioramento delle condizioni di coltura riguarda l'aggiunta di acido citrico, che può mantenere i calli vitali per un periodo più lungo. L'acido citrico ha dimostrato, almeno in 'Chardonnay', di aumentare la percentuale di calli embriogenici e di migliorarne la vitalità a lungo termine. D'altra parte, non è stato possibile trarre conclusioni coerenti riguardo l'effetto dell'acido citrico sulle varietà più recalcitranti come 'Italia' e 'Aglianico'. I risultati di questo lavoro sembrano dimostrare che i nostri protocolli consentono di aumentare significativamente la produzione di calli embriogenici, specialmente da varietà recalcitranti, e producono protoplasti vitali in grado di rigenerare embrioni. La rigenerazione da protoplasti è essenziale per l'applicabilità di NPBTs quali cisgenesi ed editing genomico. Resta ancora da verificare se gli embrioni rigenerati risulteranno editati.

Ringraziamento

La presente ricerca è stata finanziata dal Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità Alimentare e delle Foreste (Masaf) nell'ambito del progetto BIOTECH-VITECH.

Bibliografia

- Dalla Costa L., Malnoy M., Gribaudo I., 2017. Breeding next generation tree fruits: Technical and legal challenges. *Horticulture Research*, 4: 1–11.
- Forleo L.R., D’amico M., Basile T., Marsico A.D., Cardone M.F., Maggiolini F., Velasco R., Bergamini C., 2021. Somatic Embryogenesis in *Vitis* for Genome Editing: Optimization of Protocols for Recalcitrant Genotypes. *Horticulturae*, 7 (11): 1-11.
- Gambino G., Ruffa P., Vallania R., Gribaudo I., 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90: 79–83.
- Gribaudo I., Gambino G., Vallania R., 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anthers: The optimal developmental stage for collecting explant. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55: 427–430.
- Lopez-Perez A.J., Carreño J., Martinez-Cutillas A., Dabauza M., 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*, 44: 79–85.
- Zhu Y.M., Hoshino Y., Nakano M., Takahashi E., Mii M., 1997. Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis by using embryogenic callus culture and activated charcoal. *Plant Science*, 123: 151-157.

Micropropagazione via embriogenesi somatica di piante di *Iris pallida* L. e prova di frigoconservazione

Annalisa Meucci^{1*}, Rita Maggini², Fernando Malorgio², Beatrice Pezzarossa³, Giorgiana Chietera⁴, Anna Mensuali¹

* annalisa.meucci@santannapisa.it

¹ Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

² Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Agro-ambientali, Università di Pisa

³ Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Pisa

⁴ LMR Naturals by IFF (International Flavors & Fragrances SAS), Grasse, France

Riassunto

L'*Iris pallida* L. rappresenta la fonte di reddito di numerose aziende Toscane, che la coltivano per venderne il rizoma ad industrie profumiere. Una delle criticità della sua coltivazione è la tradizionale propagazione, che fornisce solo dieci piante per rizoma all'anno; al contrario, la propagazione *in vitro* tramite embriogenesi somatica da fiore immaturo, applicata in questo studio, consente di ottenere tassi di moltiplicazione molto più elevati. Per agevolare le attività di micropropagazione, le plantule ottenute sono state conservate a 4°C per 30 e 60 giorni e ad un mese dal trattamento sono riuscite a recuperare le loro normali funzionalità.

Parole chiave: *in vitro*, callo, boccio immaturo, conservazione, freddo

Micropropagation via somatic embryogenesis of *Iris pallida* L. plantlets and cold storage trial

Abstract: *Iris pallida* L. is a plant that has been cultivated in the Tuscan hills of Pratomagno (Arezzo) and Chianti Fiorentino (Firenze) for centuries and it is considered an important income for a lot of small and medium-sized rural realities. Orris is cultivated mostly in association with olive trees and vineyards, in order to sell its rhizomes to industries specialized in perfumes production based in France and Germany. The *I. pallida* L. species is particularly in demand both on national and European market because of its high content of irones, ketone compounds responsible for the characteristic smell of violet of the Orris essence, that appear in the rhizome during the long storage in ventilated rooms which is subjected to after being harvested in field. Irones are the result of the oxidation of triterpenoids called iridals that accumulate in rhizomes during the years of cultivation. One of the main critical aspects of its cultivation is the propagation method, that is usually performed with rhizomes but allows to obtain only 10 plants per rhizome per year. This aspect discourages its cultivation, as the typical transplant density of this species (180,000 plants/ha) leads to the sacrifice of raw material that could be sold to perfume companies. A solution is provided by the *in vitro* propagation via somatic embryogenesis, a very effective technique that allows to obtain a higher number of plantlets in a shorter period of time and save marketable raw material. In this study, explants from *I. pallida* L. immature flower buds were disinfected and transferred onto specific culture media to obtain new plantlets using the somatic embryogenesis technique. This method appeared to be successful, as from a single plant it is possible to obtain 110 plants in a year. Furthermore, in order to facilitate the scale up of the activities of companies specialized in the micropropagation sector, a cold storage trial was conducted in order to see for how long Orris plantlets are able to survive at low temperatures. Plantlets were reduced, cutting old leaves and removing roots, and then placed at 4°C in the dark for 30 and 60 days. After their removal from cold, number of shoots and roots produced and total chlorophylls and carotenoids content were

monitored 7 and 30 days after the treatment. The results showed that it is possible to cold preserve plantlets up to 60 days, as in 30 days they are able to recover their normal functions.

Keywords: *in vitro*, callus, immature flower bud, conservation, cold

Introduzione

L'*Iris pallida* L., comunemente detta "Giaggiolo", è una delle specie più rappresentative del paesaggio Toscano che da secoli viene coltivata nelle zone collinari di Pratomagno (AR) e del Chianti (FI) per la produzione di profumi, sebbene trovi largo impiego anche nel settore farmaceutico (Khatib et al., 2022) e nella produzione di distillati. L'iris rappresenta un reddito aggiuntivo per numerose aziende agricole di piccole e medie dimensioni, in cui viene coltivato principalmente in associazione con olivo e vite. L'essenza di iris si ottiene dalla distillazione del rizoma, la parte della pianta con maggior valore commerciale. Infatti, nei 3-4 anni di coltivazione in campo, all'interno del rizoma si accumulano gli iridali (Bicchi e Rubiolo, 1993), triterpenoidi che ossidandosi durante la conservazione postraccolta del rizoma danno origine agli ironi, chetoni responsabili della tipica fragranza di violetta dell'essenza. L'iris è inoltre una pianta rustica in grado di sopravvivere anche in aree marginali o su suoli non adatti a colture destinate al consumo alimentare (Austin, 2005), aspetto che la rende utile per il recupero di suoli abbandonati o inutilizzati. Uno degli aspetti critici della sua filiera produttiva riguarda il tradizionale metodo di propagazione utilizzato che, implicando l'impiego di parte del rizoma, porta al sacrificio di materiale potenzialmente vendibile alle industrie. Riuscire ad ottenere nuove piante tramite la micropropagazione rappresenterebbe un'efficace soluzione al problema. Nello specifico, la tecnica dell'embriogenesi somatica eseguita partendo da espunti di boccio di fiore immaturo ha già dato risultati promettenti (Ascough et al., 2009; Lucchesini et al., 2015). Essendo una coltura ad alta densità di trapianto, la necessità di produrre *in vitro* un elevato numero di plantule nei tempi richiesti per l'impianto rende necessario adottare strategie per agevolarne la futura produzione da parte delle aziende specializzate in micropropagazione; tra queste troviamo la frigoconservazione, tecnica già testata su numerose specie micropropagate di interesse (Alzubi et al., 2019; Hatzilazarou et al., 2020; Manokari et al., 2021; Martínez et al., 2021) ma mai utilizzata su plantule micropropagate di *I. pallida* L. Questo studio è finalizzato a mettere a punto un efficace protocollo di micropropagazione di *I. pallida* L., che consenta di produrre un maggior numero di piante in tempistiche ridotte, oltre a valutare la resistenza delle plantule ottenute alle basse temperature utilizzate per la frigoconservazione.

Materiali e Metodi

Embriogenesi somatica con espunti di boccio di fiore immaturo

Piante di *I. pallida* L. cv RQ fornite dall'industria LMR-International Flavors and Fragrances (IFF) sita a Grasse (Francia) sono state trapiantate a settembre presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali dell'Università di Pisa (DiSAAA-a). Durante la fioritura, i bocci di fiore immaturo sono stati prelevati dal campo, risciacquati con acqua di rubinetto per 20 minuti e disinfettati utilizzando EtOH al 70% e NaClO al 15%. In seguito, sotto cappa a flusso laminare, sono stati prelevati i petali centrali da ogni boccio e trasferiti in capsule Petri contenenti un mezzo di induzione del callo, denominato i1A (Tab.1). Gli espunti sono stati successivamente posti in camera di crescita, al buio, ad una temperatura di 22°C e subcolturati ogni mese. Una volta formati i calli gialli, questi sono stati trasferiti su un mezzo di induzione degli embrioni i1B (Tab. 1) e ne è stata monitorata la crescita in peso ogni settimana per circa un mese, ovvero fino al trasferimento dei calli su nuovo mezzo. Gli embrioni ottenuti sono stati in seguito trasferiti su mezzo i2 ed infine su mezzo i4 (Tab. 1) dove hanno dato origine a nuove plantule.

Moltiplicazione plantule

Le plantule ottenute sono state trasferite in contenitori Magenta® contenenti 50 mL di substrato i5

(Tab. 1) e sono state coltivate in camera di crescita con fotoperiodo giorno-notte di 8:16 ore ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Ogni tre settimane i nuovi germogli sono stati separati dalle plantule e trasferiti in nuovi contenitori (3-5 germogli per ogni Magenta®). Sei diverse linee di cv RQ sono state ottenute mantenendo distinte le plantule derivanti dagli espianti originali. Il numero di germogli prodotti dalle plantule appartenenti alle linee maggiormente performanti dal punto di vista della proliferazione (Linee 1, 5, 6) è stato monitorato ad ogni subcoltura, per sei mesi, ed è stato inoltre calcolato il tasso di moltiplicazione complessivo della cv RQ.

Tab. 1. Composizione dei mezzi di coltura utilizzati per l'embriogenesi somatica di *I. pallida* cv RQ.
Tab. 1. Composition of culture media used for somatic embryogenesis in *I. pallida* cv RQ.

Composizione mezzi	i1A	i1B	i2	i4	i5
Macroelementi	MS	MS	Knudson C	MS	MS
Microelementi	MS	MS	FeEdta MS	MS	MS
Vitamine	MS	MS	Gamborg B5	Gamborg B5	Gamborg B5
Saccarosio	50 g/L	50 g/L	20 g/L	20 g/L	30 g/L
MES	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L
GSH	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L
Caseina idrolizz.	250 mg/L	250 mg/L			
Prolina	250 mg/L	250 mg/L			
Tirosina	250 mg/L	250 mg/L			
2,4-D	1 mg/L	1 mg/L			
IBA			0,1 mg/L		
kinetina	1 mg/L	0,1 mg/L	1 mg/L		
BA				0,1 mg/L	0,1 mg/L
NAA				0,1 mg/L	0,1 mg/L
Gelrite	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L
pH	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9

Frigoconservazione plantule

Plantule appartenenti alle linee 1, 5 e 6 della cv RQ sono state trasferite in contenitori Magenta® su mezzo di coltura i5 e posti a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ al buio per 30 e 60 giorni. Al termine del trattamento, le plantule sono state rimosse dalla cella frigorifera e tenute in camera di crescita per una settimana, prima di essere subcolturate su nuovo mezzo i5. A 7 e 30 giorni dal trattamento sono stati monitorati numero di radici e germogli prodotti e sono stati determinati spettrofotometricamente sia il contenuto totale di clorofille (665,2 e 652,4 nm) sia di carotenoidi (470 nm) in estratti metanolici (Lichtenthaler, 1987).

Risultati

Embriogenesi somatica con espianti di boccio di fiore immaturo

Una volta formatosi, il callo ha risposto positivamente al mezzo di coltura, accrescendo in peso fino alla terza settimana (Fig. 1); questo monitoraggio ci ha permesso di valutare le corrette tempistiche di trasferimento degli espianti. Una volta trasferiti su mezzo di induzione degli embrioni, i calli hanno prodotto in media 47 ± 11 embrioni per grammo di callo e da essi è stato possibile ottenere $9 \pm 1,5$ nuove plantule per grammo di callo.

Moltiplicazione plantule

In 6 mesi di micropropagazione, dalle linee maggiormente performanti (Linee 1, 5, 6) sono state ottenute in totale 159 piante, con un tasso di moltiplicazione media mensile pari a 9,14 (Fig. 2). La linea 1 ha inizialmente prodotto un maggior numero di germogli ad ogni subcoltura rispetto alle linee 5 e 6 ed a distanza di 6 mesi la capacità rigenerativa degli espianti viene mantenuta. La radicazione delle plantule è avvenuta spontaneamente, pertanto non è stato necessario utilizzare mezzi di radicazione specifici.

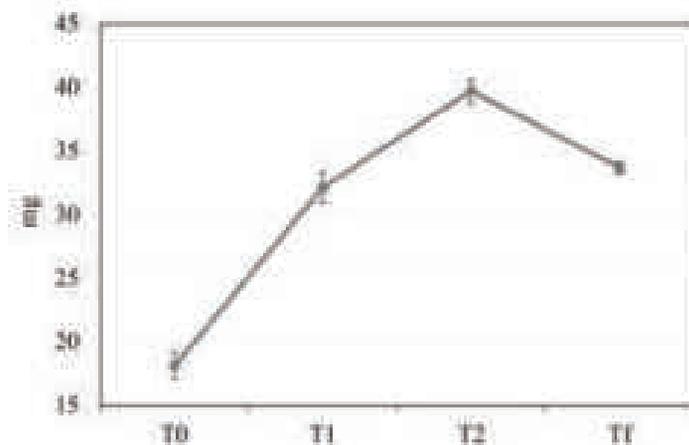


Fig. 1. Crescita di callo (mg Peso Fresco) proveniente da espianti di boccio di fiore immaturo di piante di *I. pallida* cv RQ; il peso è stato monitorato ogni 7 giorni fino al trasferimento su nuovo mezzo di coltivazione. I dati sono riportati come media \pm E.S.

Fig. 1. Callus growth (mg Fresh Weight) of I. pallida cv RQ immature flower bud explants; callus weight was monitored every 7 days until its transferring to a new cultivation medium. Data are reported as mean values \pm S.E.

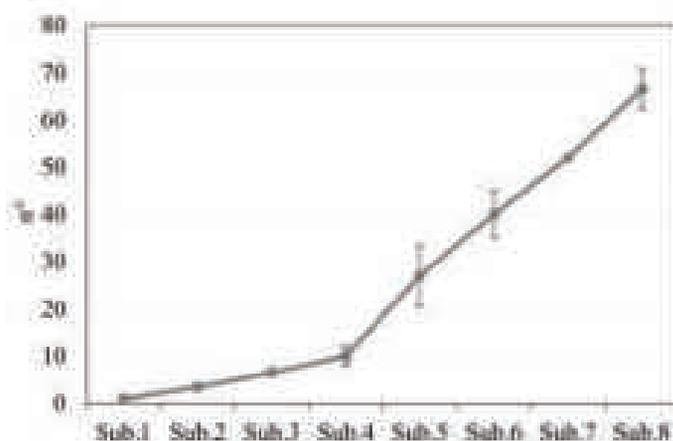


Fig. 2. N° medio di nuovi germogli prodotti in 6 mesi (8 subcolture) da plantule di *I. pallida* cv RQ appartenenti alle Linee maggiormente performanti (1, 5, 6).

Fig. 2. Average number of sprouts per plant produced during six months (8 subcultures) by I. pallida cv RQ micropropagated plantlets obtained from the best performing lines (1, 5, 6).

Frigoconservazione plantule

Una volta rimosse dal frigo, le piante sottoposte a 30 e 60 giorni di frigoconservazione sono apparse in buona salute; tutte le linee interessate (1, 5, 6) hanno infatti ripreso la produzione di radici e germogli già a 7 giorni di distanza dal termine della frigoconservazione. A 30 giorni di distanza dal trattamento le plantule della linea 1 conservate per 30 giorni (T30), hanno prodotto un maggior numero di radici, sia rispetto al controllo che alle plantule sottoposte a 60 giorni di trattamento (T60) (Fig. 3).

La frigoconservazione sembra non aver compromesso neanche la produzione di nuovi germogli, che risulta uguale a quella delle piante di controllo per tutte e tre le linee (dati non riportati). L'analisi del contenuto di clorofille totali e di carotenoidi mostra che, a prescindere dal trattamento, a 7 giorni dall'interruzione della frigoconservazione le plantule appartenenti alle diverse linee hanno mostrato una riduzione del contenuto di entrambi i parametri. Nel complesso, la linea che ha dato risposte peggiori a 7 giorni dal trattamento è stata la 5, mostrando un minor contenuto sia di clorofille totali sia di carote-

noidi. A 30 giorni di distanza da entrambi i trattamenti, al contrario, le plantule di ogni linea hanno mostrato un incremento sia nel contenuto di clorofille che di carotenoidi, raggiungendo i valori delle piante di controllo (Fig. 4).

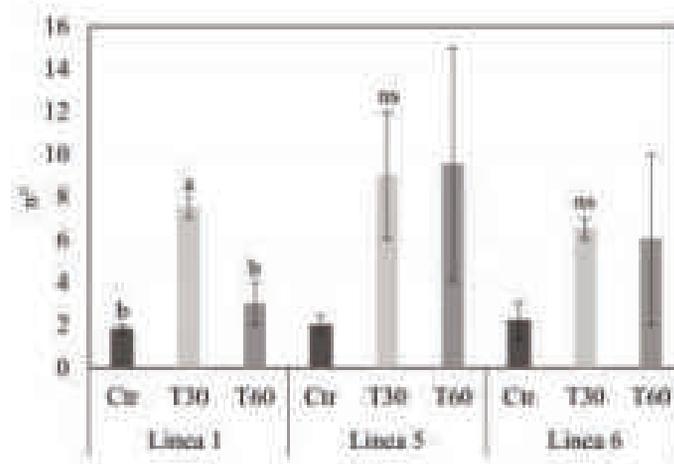


Fig. 3. N° medio di radici di plantule di *I. pallida* cv RQ (Linee 1, 5, 6) prodotte a 30 giorni di distanza dal trattamento a freddo di 30 e 60 giorni (T30, T60), a confronto con plantule non frigoconservate.

Fig. 3. Average n° of roots in *I. pallida* cv RQ plantlets (Lines 1, 5, 6) 30 days after their removal from 30 and 60 days of cold storage (T30, T60), compared to not cold stored plantlets.

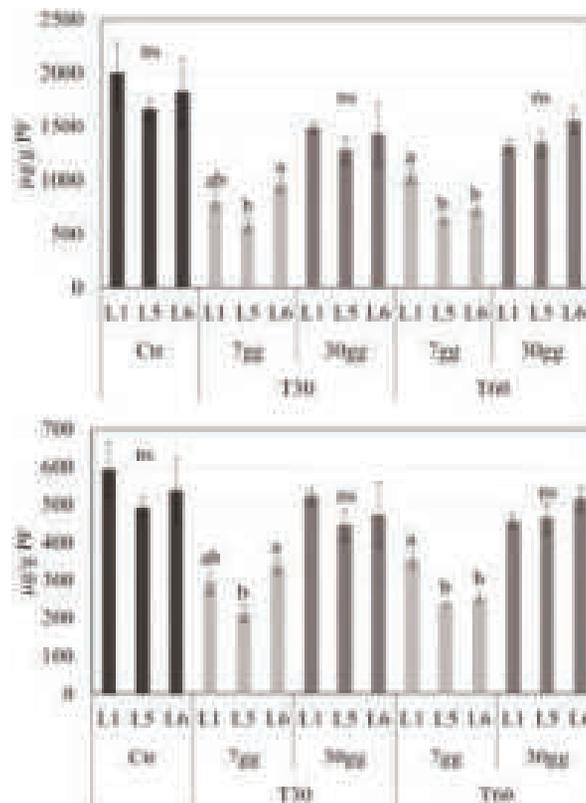


Fig. 4. Contenuto di clorofille totali (in alto) e carotenoidi (in basso) (µg/g Peso Fresco) in plantule di *I. pallida* cv RQ (Linee 1, 5, 6) a 7 e 30 giorni di distanza dai trattamenti di 30 e 60 giorni di frigoconservazione (T30, T60), a confronto con plantule non frigoconservate.

Fig. 4. Total chlorophylls (top) and carotenoids content (bottom) (µg/g Fresh Weight) in *I. pallida* cv RQ plantlets (Lines 1, 5, 6), 7 and 30 days after their removal from 30 and 60 days of cold storage (T30, T60), compared to not cold stored plantlets.

Discussione e Conclusioni

La micropropagazione di *I. pallida* L. cv RQ tramite embriogenesi somatica partendo da bocci di fiore immaturo ha dato risultati promettenti; i mezzi di coltura utilizzati hanno infatti permesso di completare tutte le fasi di sviluppo da espianto a plantula, in linea con precedenti studi effettuati su un'altra cultivar (Lucchesini et al., 2015). In fase di moltiplicazione la linea 1 ha mostrato maggiori capacità di proliferazione rispetto alle linee 5 e 6, mostrando come sia possibile selezionare *in vitro* linee clonali con miglior attitudine riproduttiva. Il tasso mensile di moltiplicazione della cv RQ ($t = 9,14$) ci consente di prevedere una produzione media annuale di 110 plantule per plantula micropropagata, superando ampiamente il numero di piante ottenibili in un anno con il metodo di propagazione tradizionale. La frigoconservazione a 30 e 60 giorni a cui le plantule sono state sottoposte si è rivelata, inoltre, un metodo efficace di conservazione dell'iris micropropagato: le plantule, infatti, sono riuscite a riadattarsi alle condizioni ambientali in soli 30 giorni ed a riprendere la regolare produzione di germogli; la ripresa delle plantule è stata ulteriormente confermata dal contenuto di clorofille totali e di carotenoidi, che a 30 giorni dal trattamento risultano simili a quelli delle piante di controllo. Inoltre, le plantule trattate hanno mostrato una maggior produzione di radici rispetto alle piante controllo, seppur significativo solo per la linea 1. La conservazione delle specie tramite frigoconservazione è già stata riportata in numerosi studi, sebbene non sia stata applicata su plantule ma su espianti di germoglio o embrioni somatici incapsulati in alginato di sodio (Alzubi et al., 2019; Manokari et al., 2021). Espianti di *Viburnum dentatum* hanno mostrato, ad esempio, una maggior percentuale di sopravvivenza al freddo se incapsulati, mentre gli espianti non incapsulati non sono riusciti a sopravvivere per più di 30 giorni (Hatzilazarou et al., 2020). Inoltre, uno studio condotto su *Anthurium* sp. e *Ranunculus* sp. riporta come la frigoconservazione si riveli utile per conservarne i germogli, rispettivamente fino ad 8 e 9 mesi (Benelli et al., 2011). L'embriogenesi somatica e la frigoconservazione si sono dimostrate due tecniche potenzialmente utili per risolvere le criticità legate alla tradizionale propagazione dell'*I. pallida* L., consentendo sia l'ottenimento di un maggiore quantitativo di piante in un minor lasso di tempo, sia la semplificazione delle attività di scale up della sua produzione *in vitro*; risolvere questo aspetto critico della catena di produzione sarà un utile incentivo per la diffusione della coltivazione di *I. pallida* L. in Italia.

Ringraziamenti

Studio condotto nell'ambito del Centro Nazionale Agritech, finanziato dall'Unione Europea – NextGenerationEU (PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR) – MISSIONE 4 COMPONENTE 2, INVESTIMENTO 1.4 - D.D. 1032 17/06/2022, CN00000022).

I punti di vista e le opinioni espresse sono tuttavia solo quelli degli autori e non riflettono necessariamente quelli dell'Unione Europea o della Commissione Europea. Né l'Unione Europea né la Commissione Europea possono essere ritenute responsabili per essi.

Si ringrazia LMR-International Flavors and Fragrances (IFF), Grasse (Francia) per aver cofinanziato le attività di ricerca.

Bibliografia

- Alzubi H., Yepes L.M., Fuchs M., 2019. In vitro storage of micropropagated grapevine rootstocks at low temperature. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55 (3): 334-341.
- Ascough G.D., Erwin J.E., Van Staden J., 2009. Micropropagation of Iridaceae - a review. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 97 (1): 1-19.
- Austin C., 2005. *Iris: a gardener's encyclopedia*. Timber Press (OR), pp. 340.
- Benelli C., Ozudogru E.A., Lambardi M., Dradi G., 2011. In vitro conservation of ornamental plants by slow growth storage. *Acta Hort.* 961: 89-93.
- Bicchi C., Rubiolo P., 1993. Analysis of constituents of iris rhizomes. Part I: high performance liquid chromatographic-particle beam-mass spectral analysis of iridals from *Iris pallida* rhizomes. *Phytochem Anal.* 4: 171-177.

- Hatzilazarou S., Kostas S., Joachim M., Economou A., 2020. Regeneration of *Viburnum dentatum* L. from alginate-encapsulated shoot explants after short-term cold storage and assessment of genetic stability using ISSR analysis. *Agronomy*, 10 (11): 1660.
- Khatib S., Faraloni C., Bouissane L., 2022. Exploring the Use of Iris Species: Antioxidant Properties, Phytochemistry, Medicinal and Industrial Applications. *Antioxidants*, 11: 526.
- Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol*, 148: 350–382.
- Lucchesini M., Bedini L., Florio E.F., Maggini R., Malorgio F., Pezzarossa B., Mensuali-Sodi A., 2015. The improvement of *Iris pallida* propagation by somatic embryogenesis. *Acta Hortic.* 1155: 127-134.
- Manokari M., Latha R., Privadharshini S., Jogam P., Shekhawat M.S., 2021. Short-term cold storage of encapsulated somatic embryos and retrieval of plantlets in grey orchid (*Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex G. Don). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144 (1): 171-183.
- Martinez M.T., Arrillaga I., Sales E., Perez-Oliver M.A., Gonzalez-Mas M.D.C., Corredoira E., 2021. Micropropagation, characterization, and conservation of *Phytophthora cinnamomi*-tolerant holm oak mature trees. *Forests*, 12 (12): 1634.

Embriogenesi somatica: uno strumento per il risanamento da virus e per l'analisi del chimerismo in vite

Irene Perrone¹, Chiara Pagliarani¹, Floriana Nuzzo¹, Amedeo Moine¹, Paolo Boccacci¹, Luca Nerva^{1,2}, Walter Chitarra^{1,2}, Ivana Gribaudo¹, Giorgio Gambino^{1*}

* giorgio.gambino@ipspp.cnr.it

¹ Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Torino

² Centro di ricerca per la Viticoltura ed Enologia, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria (CREA-VE), Conegliano (TV)

Riassunto

L'embriogenesi somatica è un processo in cui il potenziale rigenerativo di una pianta viene sfruttato per replicare un intero organismo a partire da tessuti somatici. Abbiamo dimostrato che l'embriogenesi somatica è una strategia efficace per la segregazione delle chimere periclinali nei somacloni di Nebbiolo e che la diffusione del chimerismo in vite deve essere attentamente considerata nel quadro dei programmi di miglioramento genetico. Inoltre, l'embriogenesi somatica si è dimostrata efficace nell'eliminazione del completo viroma nella vite, compresi i micovirus, rigenerando piante pseudo-gnotobiotiche che rappresentano un'importante risorsa per comprendere l'influenza del microbioma nell'interazione tra la vite e l'ambiente.

Parole chiave: microbioma, miglioramento genetico, somacloni, *Vitis vinifera*

Somatic embryogenesis: a biotechnological tool for producing healthy plants and dissecting chimerism phenomena in grapevine

Abstract: Somatic embryogenesis is a morphogenetic process in which the plant regenerative potential is exploited to replicate a whole organism starting from somatic explants. During this process, differentiated somatic cells re-enter the cell cycle and transform into a dedifferentiated state, then acquire embryogenic potential characterized by the reprogramming of gene expression, metabolism and epigenetic status. Although it is a highly genotype-dependent process, with different cultivars showing wide variations in their competence to form embryogenic tissues, somatic embryogenesis is an essential prerequisite for the application of next-generation breeding techniques (cisgenesis and genome editing) in grapevine. In the present contribution, we will discuss experimental works that use somatic embryogenesis as a biotechnological tool for different purposes. Grapevine is a fruit crop linked to traditional genotypes that have been multiplied for centuries by vegetative propagation. In this way, somatic variations that can spontaneously occur within the shoot apical meristem are fixed in the whole plant and represent a source of intra-varietal variability. The previously observed inconsistencies in the allelic calls of single nucleotide variants (SNVs) indicated that the *Vitis vinifera* cv Nebbiolo clone CVT185 is a potential periclinal chimera. We demonstrated that somatic embryogenesis is an effective strategy for dissecting chimerism phenomena and that the genotype of all somaclones regenerated differed from that of the mother plant and was only ascribable to L1 layer. The tendency of somatic embryogenesis to regenerate plants only from L1 must be carefully considered in the context of biotechnological improvement programmes in grapevine. Grapevine can be infected by several pathogens, including more than 80 viral entities that heavily influence plant vigour, yield and fruit quality leading to large economic losses in the whole grapevine agribusiness. Somatic embryogenesis applied to Nebbiolo clone CVT185 was effective in the elimination of the complete virome, including mycoviruses, even though the sanitisation efficien-

cy was less than 100% for the grapevine pinot gris virus (GPGV) and grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1). The production of healthy plants devoid of any viral entity (viruses, viroids, and mycoviruses) via somatic embryogenesis could have both a practical value, being crucial for reducing the spread of these pathogens in the vineyard, and a scientific value, allowing researchers to understand the effects of a specific virus by using a healthy plant as control. Furthermore, the absence of mycoviruses suggested that the “biological vacuum” generated by this regeneration technique also involves fungi, resulting in gnotobiotic or pseudo-gnotobiotic plants, thereby representing an extraordinary asset to understand the influence of the microbiome on plant growth. For the application of next-generation breeding techniques, the loss of chimerism and the reduction of the microbiome of the regenerated plants must be taken into consideration, together with the onset of genetic mutations possibly induced during the regeneration process by somatic embryogenesis.

Keywords: genetic improvement, microbiome, somaclone, *Vitis vinifera*.

Introduzione

L’embriogenesi somatica (ES), ovvero la differenziazione di embrioni dai tessuti somatici delle piante, è impiegata come metodo di moltiplicazione in diverse specie vegetali. In vite, l’ES viene utilizzata principalmente nei programmi di miglioramento genetico, essendo i calli embriogenici particolarmente competenti per la rigenerazione di piante geneticamente modificate (Nuzzo et al., 2022a). L’ES è stata inoltre proposta come strategia per indurre variazioni somaclonali ed eliminare agenti virali (Martinelli e Gribaudo, 2009), e come strumento per la segregazione di chimere periclinali (Franks et al., 2002), molto comuni in vite. L’utilizzo dell’ES negli studi di genomica funzionale per la caratterizzazione dei geni è fondamentale per individuare nuovi geni bersaglio per il miglioramento genetico. Recentemente, l’interesse per le nuove Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), quali cis-genesi e *genome editing*, è notevolmente aumentato in campo viticolo, poiché queste tecnologie consentono il miglioramento genetico di varietà tradizionali preservando in teoria tutte le caratteristiche dei genotipi originali. L’utilizzo di ES in questo contesto non è esente da problemi, in quanto l’insorgenza di mutazioni genetiche eventualmente indotte durante il processo di rigenerazione e la presenza di molti cloni di vite chimerici (Gambino et al., 2021) possono indurre la rigenerazione di individui mutati rispetto alla pianta madre di partenza. Inoltre, l’eliminazione di virus/viroidi e microrganismi endofiti durante il processo di ES può alterare il microbioma della pianta rigenerata e modificare le sue risposte agli stress ambientali.

Nel presente lavoro un clone chimerico di *Vitis vinifera* cv Nebbiolo CVT185 (Gambino et al., 2017) è stato utilizzato come caso studio di un genotipo con possibili problematiche nell’applicazione delle TEA in vite, in cui è stata verificata la segregazione nei rigeneranti dei genotipi associati agli strati cellulari L1 e L2 ed il risanamento da tutti gli agenti virali e virus-simili presenti nella pianta madre.

Materiali e Metodi

Materiale vegetale e rigenerazione dei somacloni

L’induzione dell’ES e la rigenerazione dei somacloni sono stati ottenuti secondo un protocollo precedentemente descritto (Gambino et al. 2007). In breve, nel maggio 2018, sono state raccolte infiorescenze immature da *V. vinifera* cv Nebbiolo clone CVT185. Antere (compresi i filamenti) e ovari sono stati coltivati a 26°C al buio su terreno di induzione del callo e trasferiti dopo 3 mesi in un substrato di proliferazione (Gambino et al. 2007), rinnovato ogni 4 settimane. Singoli embrioni differenziati sono stati trasferiti in un substrato contenente 10 µM di 6-Benziladenina fino allo sviluppo della piantina. Ogni somaclone è stato in seguito micropropagato indipendentemente mediante subcoltura di talee apicali su substrato senza regolatori di crescita. I somacloni sono stati infine acclimatati in serra e mantenuti in un substrato di torba (TS4, Turco Silvestro, Italia).

Genotipizzazione mediante Single Nucleotide Variants (SNVs)

Il DNA è stato estratto utilizzando un kit commerciale (Norgen Biotech Corp., ON, Canada) da foglie dei somacloni e della pianta madre di Nebbiolo CVT185, e da campioni di polpa di acini prelevati dalla pianta madre e utilizzati come un controllo per il genotipo L2. Tre marcatori SNVs (Ne_SNV31, Ne_SNV33 e Ne_SNV62), identificati come putativamente chimerici nel clone CVT185 sono stati analizzati mediante PCR quantitativa (qPCR) e sonde TaqMan marcate con fluorofori VIC e FAM, secondo il protocollo descritto in precedenza (Gambino et al. 2017).

Sequenziamento dell'RNA e analisi del viroma

L'RNA totale della pianta madre CVT185 e di 11 somacloni è stato estratto (Gambino et al., 2017), miscelato utilizzando la stessa quantità di RNA per ciascuna pianta, sottoposto a deplezione dell'RNA ribosomiale (Ribo-Zero™ Gold Kit, Epicentre, Madison, USA) e sequenziamento Illumina mediante servizio esterno (Macrogen, Seoul, Corea del Sud). L'assemblaggio *de novo* dei dati di sequenziamento è stato eseguito mediante Trinity (versione 2.3.2), e per la ricerca di proteine virali tra i *contig* assemblati è stata adottata la *suite* BLAST (versione 2.6.0+) e un database di riferimento di sequenze virali (dettagli in Nuzzo et al., 2022b).

Per confermare i dati di sequenziamento e per determinare l'associazione tra virus e virus-simili identificati *in silico* e le singole piante è stata eseguita una RT-qPCR, utilizzando primer specifici per i virus individuati nella pianta madre Nebbiolo CVT185 ed il protocollo riportati in Nuzzo et al. (2022b).

Risultati e Discussione

Segregazione della chimera periclinale nei somacloni di Nebbiolo

L'efficienza embriogenica degli espianti fiorali immaturi di Nebbiolo CVT185 è stata dello 0,06% per le antere e dell'1,02% per gli ovari. I valori sono risultati molto bassi, ma sostanzialmente in linea con quelli precedentemente riportati in altri cloni di Nebbiolo (Gribaudo et al., 2017), confermando una certa recalcitranza del genotipo nei confronti dell'ES. Nonostante la bassa competenza embriogenica, i calli ottenuti sono stati moltiplicati rapidamente e 58 somacloni sono stati rigenerati in un periodo di 5 mesi, da novembre 2018 a marzo 2019. Tutti i somacloni sono stati analizzati mediante test di genotipizzazione TaqMan® per verificare il profilo allelico di tre loci SNV identificati come chimerici nel clone CVT185 (Gambino et al. 2017). I loci Ne_SNV31, Ne_SNV33 e Ne_SNV62 avevano mostrato alcune incongruenze nei profili allelici nel clone CVT185, e le differenze delle chiamate alleliche tra la polpa della bacca (originata solo dallo strato meristemato L2) e la foglia (originata da entrambi gli strati cellulari L1 e L2) avevano suggerito la presenza di una chimera periclinale in questo clone. Sono stati individuati due distinti profili genetici assegnati agli strati cellulari L1 e L2 (Tab. 1). Tutti i 58 somacloni rigenerati presentano un unico profilo genetico a livello fogliare e distinto dal segnale ottenuto dal DNA fogliare della pianta madre CVT185. In tutti i somacloni i profili allelici coincidono con il profilo genetico dello strato L1 della pianta madre (Tab. 1). Questo risultato ha dimostrato che l'ES è

Tab. 1. Profilo genetico di 3 marcatori SNVs chimerici nella pianta madre di *V. vinifera* cv Nebbiolo CVT185 e in 58 somacloni rigenerati mediante embriogenesi somatica.

Tab. 1. Genetic profile of the three SNVs chimeric markers in *V. vinifera* Nebbiolo CVT185 mother plant and in 58 somaclones regenerated by somatic embryogenesis.

SNV marker	Pianta madre Nebbiolo CVT185			Somacloni
	L1+L2	L1	L2	L1+L2
Ne_SNV31	CC/t	CT	CC	CT
Ne_SNV33	TT/a	TA	TT	TA
Ne_SNV62	AA/g	GG	AA	GG

uno strumento efficace per segregare chimere periclinali in vite e che tutti i somacloni derivano dallo strato cellulare L1, suggerendo che questo sia lo stato cellulare più reattivo per la rigenerazione degli embrioni somatici in vite.

Viroma dei somacloni di Nebbiolo

Il viroma della pianta madre di Nebbiolo CVT185 e di una selezione di 11 somacloni è stato analizzato mediante sequenziamento dell'RNA. La pianta madre è risultata essere infetta da 3 virus: grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV-1), grapevine pinot gris virus (GPGV), e grapevine fleck virus (GFkV), 2 viroidi: grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) e hop stunt viroid (HSVd), e 9 micovirus non identificati in precedenza (Tab. 2). Oltre ai virus/viroidi che normalmente infettano la vite, negli ultimi anni sono stati ampiamente studiati anche i micovirus, ovvero virus fungini diffusi in tutti i gruppi tassonomici che possono influenzare le risposte all'ambiente delle piante ospiti dei funghi infetti da micovirus (Nerva e Chitarra, 2021).

Negli 11 somacloni di Nebbiolo analizzati mediante RNA-seq e RT-qPCR sono stati identificati solo il GPGV ed il GYSVd-1, in particolare una piana infetta da GPGV e 3 da GYSVd-1 (Tab. 2). Tutti gli altri virus e viroidi sono risultati assenti, compresi i 9 micovirus, suggerendo che il processo di embriogenesi somatica è altamente efficiente nell'eliminare gli endofiti che ospitano questi micovirus. La produzione di piante sane da ES prive di qualsiasi entità virale (virus, viroidi o micovirus) ha sia una valenza pratica, essendo determinante per ridurre la diffusione di questi patogeni nel vigneto, sia una valenza scientifica, permettendo ai ricercatori di comprendere gli effetti di un virus specifico utilizzando come controllo una pianta realmente sana (Gambino e Perrone, 2022). Infine, l'assenza di micovirus nei somacloni suggerisce che il "vuoto biologico" generato da questa tecnica di rigenerazione coinvolge anche i funghi, dando luogo a piante gnotobiotiche o pseudo-gnotobiotiche, rappresentando quindi un sistema importante per comprendere l'influenza del microbioma sullo sviluppo delle piante.

Tab. 2. Virus, viroidi e micovirus presenti nella pianta madre di *V. vinifera* cv Nebbiolo CVT185 e loro incidenza nei somacloni rigenerati mediante embriogenesi somatica.

Tab. 2. Viruses, viroids and mycoviruses infecting V. vinifera Nebbiolo CVT185 mother plant and their incidence in the somaclones regenerated by somatic embryogenesis.

Virus/viroidi/micovirus	Somacloni infetti /Somacloni totali
Virus	
Grapevine rupestris stem pitting associated virus	0/11
Grapevine pinot gris virus	1-nov
Grapevine fleck virus	0/11
Viroidi	
Grapevine yellow speckle viroid 1	3-nov
Hop stunt viroid	0/11
Micovirus	
Grapevine associated jivivirus 1	0/11
Plasmopara viticola lesion associated vivivirus 1	0/11
Grapevine-associated mitovirus 1	0/11
Grapevine-associated ourmia-like virus 2	0/11
Grapevine-associated ourmia-like virus 4	0/11
Grapevine-associated RNA virus 14	0/11
Grapevine-associated RNA virus 15	0/11
Grapevine-associated RNA virus 17	0/11
Grapevine-associated RNA virus 18	0/11

Conclusioni

Le TEA consentono il miglioramento genetico di cultivar di vite preservando in teoria tutte le caratteristiche apprezzate dei genotipi originali. Nell'ambito di questi programmi di miglioramento biotecnologico della vite, la segregazione del chimerismo e la riduzione del microbioma delle piante migliorate devono essere attentamente presi in considerazione, insieme all'insorgenza di mutazioni causali durante il processo di rigenerazione mediante ES.

Bibliografia

- Franks T., Botta R., Thomas M.R., 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 192-199
- Gambino G., Ruffa P., Vallania R., Gribaudo I., 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90: 79-83.
- Gambino G., Dal Molin A., Boccacci P., Minio A., Chitarra W., Avanzato C.G., Tononi P., Perrone I., Raimondi S., Schneider A., Pezzotti M., Mannini F., Gribaudo I., Delledonne M., 2017. Whole-genome sequencing and SNV genotyping of 'Nebbiolo' (*Vitis vinifera* L.) clones. *Scientific Reports* 7: 17294.
- Gambino G., Moine A., Boccacci P., Perrone I., Pagliarani C., 2021. Somatic embryogenesis is an effective strategy for dissecting chimerism phenomena in *Vitis vinifera* cv Nebbiolo. *Plant Cell Reports*, 40: 205–211.
- Gambino G., Perrone I., 2022. Somatic embryogenesis as a tool for studying grapevine–virus interaction. In: N. Luchi (ed.), *Plant Pathology. Methods in Molecular Biology*, vol 2536. Humana, New York (NY), pp. 381-394.
- Gribaudo I., Gambino G., Boccacci P., Perrone I., Cuzzo D., 2017. A multi-year study on the regenerative potential of several *Vitis* genotypes. *Acta Hort.*, 1155: 45-50.
- Martinelli L., Gribaudo I. 2009. Strategies for effective somatic embryogenesis in grapevine (*Vitis* spp.). An appraisal. In: K.A. Roubelakis-Angelakis (ed.), *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, Springer Science+Business Media (NL), pp 461-493.
- Nerva L., Chitarra W., 2021. Mycoviruses: a hidden world within fungi. In O. Zaragoza, A. Casadevall (eds.), *Encyclopedia of Mycology*, Elsevier, pp. 134-141.
- Nuzzo F., Gambino G., Perrone I., 2022a. Unlocking grapevine in vitro regeneration: Issues and perspectives for genetic improvement and functional genomic studies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 193: 99-109.
- Nuzzo F., Moine A., Nerva L., Pagliarani, C., Perrone I., Boccacci P., Gribaudo I., Chitarra W., Gambino G., 2022b. Grapevine virome and production of healthy plants by somatic embryogenesis. *Microbial Biotechnology*, 15 (5): 1357–1373.

Effetti di diverse concentrazioni di NaCl applicate su *Morus nigra* L. attraverso la tecnologia dell'incapsulamento

Irene Granata^{1*}, Cristian Silvestri², Maurizio Micheli³, Simona Lucia Facchin³, Maria Antonietta Germanà¹

* irene.granata@unipa.it

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF), Università degli Studi di Palermo,

²Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

³Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (DSA3), Università degli Studi di Perugia

Riassunto

In questo studio è stata valutata l'influenza di differenti concentrazioni di NaCl aggiunte all'endosperma del seme sintetico sul genotipo di *Morus nigra* L. 'Fontanarossa nera' applicando la tecnologia dell'incapsulamento. Dai risultati è emerso che alla concentrazione salina maggiore (200 mM of NaCl), la percentuale di vitalità è del 76%; mentre il tasso di conversione raggiunto è stato pari al 52%.

Parole chiave: salinità, stress, seme sintetico, micropropagazione

Effects of different concentrations of NaCl applied on *Morus nigra* L. via encapsulation technology

Abstract: Soil salinity represent a critical factor that restrict plants growth and crop production. In this study, the influence of different salt concentrations (0, 50, 100,150, 200 mM of NaCl) on morphologic and biochemical changes of black mulberry accession 'Fontanarossa nera' (*Morus nigra* L.) was evaluated, applying for the first time, in our knowledge, the synthetic seed technology for the assessment of salt tolerance. *In vitro* culture allows a rapid selection of suitable genotypes, as it can be carried out under controlled conditions providing useful information about the response of induced stress. Salinity increases the rate of reactive oxygen species (ROS) that causes oxidative stress and cellular damages, resulting in the activation of specific protective enzymatic and non-enzymatic mechanisms to scavenge ROS. Results showed how the salt stress applied through the encapsulating coating, significantly reduced the percentages of viability, rooting, and conversion. The number of shoots produced and their length were significantly influenced by the stress induced starting from the lowest concentration, as well as the length of the roots emitted by the propagules.

Keywords: salinity, stress, synthetic seed, micropropagation

Introduzione

Il fenomeno della salinità rappresenta un importante fattore limitante per lo sviluppo e la produttività di numerose specie in agricoltura. Stime FAO (FAO, 2021) indicano come ad essere interessato da salinità e sodicità sia oltre 1 miliardo di ettari di suolo in tutto il mondo; in particolare nelle aree a clima arido e semi-arido, ove la pratica dell'irrigazione risulta imprescindibile per mantenere livelli produttivi soddisfacenti, ma che spesso viene effettuata con acque di scarsa qualità contribuendo ad esacerbare la problematica. L'eccessiva presenza di sali solubili e, in particolare NaCl, esercita sulle piante effetti complessi dovuti ad interazioni di tipo ionico, osmotico e nutritivo, ostacolando l'assimilazione di altri elementi nutritivi (Shannon, 1997). I tratti morfologici (foglie e radici) possono subire riduzioni nella crescita, mentre tra i cambiamenti biochimici che si instaurano risulta essere determinante la riduzione del contenuto di clorofilla (Sudhakar, 2001).

In risposta alla riduzione della fotosintesi, alti livelli di stress osmotico causano un eccesso delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Mittler, 2002), che agiscono sia con effetto citotossico, attraverso la degradazione di biomolecole come proteine, carboidrati, lipidi, ecc., sia promuovendo meccanismi specifici di difesa, che coinvolgono enzimi e molecole antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT), carotenoidi, flavonoidi e l'osmolita prolina, al fine di ridurre lo stress ossidativo e prevenire ulteriori danni (Das e Roychoudhury, 2014).

La maggior parte delle specie arboree è relativamente sensibile alla salinità ad eccezione di poche specie ritenute moderatamente tolleranti (Shannon, 1997). L'identificazione e la propagazione di genotipi in grado di tollerare stress salino impiegando metodi tradizionali richiederebbe ingenti risorse e spazio e risulta difficoltosa a causa delle complesse interazioni che si instaurano tra pianta ed ambiente. L'impegno della coltura *in vitro*, invece, consente di selezionare o validare rapidamente ed in condizioni controllate materiale genetico idoneo, che può essere costituito da colture cellulari, callo, apici meristematici e gemme (Shannon, 1997). Tra le tecniche di coltura *in vitro* e contemporanea selezione, quella dell'incapsulamento di propaguli vegetativi unipolari di origine non embriogenica, permette di coniugare alcuni vantaggi della moltiplicazione in asepsi (rapidità ed efficienza della propagazione e uniformità genetica e sanitaria del materiale vegetale) con la facilità di manipolazione, la possibilità di stoccaggio e la semplificazione nel trasporto (Standardi, 2012; Standardi e Piccioni, 1998), nonché la conservazione del germoplasma e anche l'attività vivaistica. Il gelso è una pianta tipica dell'area del Mediterraneo e tra le numerose specie appartenenti al genere *Morus*, il *Morus nigra* L. in particolare era molto diffuso in passato nell'Italia centrale ed in Sicilia, per la bachicoltura da seta (*Bombyx mori* L.), per uso farmaceutico e cosmetico (Micheli et al., 2015), mentre oggi la sua coltivazione risulta fortemente limitata. In questo studio è stata valutata l'influenza di differenti concentrazioni saline addizionate alla componente nutritiva sul genotipo Fontanarossa nera (*Morus nigra* L.), applicando la tecnologia del seme sintetico.

Materiali e Metodi

Per il presente lavoro sono state utilizzate microtalee uninodali di 4 mm di lunghezza, provviste di gemma laterale, prelevate da una collezione di *Morus nigra* L. accessione 'Fontanarossa nera', già stabilizzata *in vitro*, al termine di una subcoltura di proliferazione. I propaguli, privati delle foglie, sono stati dapprima immersi in una soluzione di alginato di sodio al 2,5% (viscosità media, Sigma Aldrich); successivamente sono stati posti in una soluzione complessante costituita da CaCl_2 al 1,1% per 35 min ed infine, le microtalee incapsulate sono state risciacquate con una soluzione di lavaggio per 15 min. Le tre soluzioni sono state arricchite con le componenti dell'endosperma artificiale, costituite dai sali MS (Murashige and Skoog, 1962) a metà concentrazione, 50 g/L di saccarosio e cinque diverse concentrazioni di NaCl (Sigma Aldrich) pari a 0, 50, 100, 150 e 200 mM. Il pH è stato corretto a 5,8 prima della sterilizzazione in autoclave. Per la semina sono state utilizzate piastre Petri da 100x15 mm contenenti 10 ml di substrato sterile costituito da sali MS a piena concentrazione, addizionato di 30 g/L di saccarosio e 7 g/L di agar (Plant Agar, Duchefa), con pH pari a 5,8. Sono state predisposte 5 tesi costituite da 5 repliche contenenti 5 propaguli ciascuna, ciascuna corrispondente alle concentrazioni saline applicate, oltre ad un controllo, costituito da propaguli non incapsulati. Le colture sono state poste in camera climatica a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo pari a 16 h di luce, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La durata della prova è stata di 45 giorni, al termine dei quali sono state registrate le percentuali di vitalità (propaguli verdi), ripresa (crescita del propagulo ed emissione di almeno un germoglio o radice) e conversione (emissione di radici e germogli) e registrati alcuni parametri morfologici, come numero lunghezza dei germogli sviluppati e delle radici rigenerate e la presenza di callo.

Sono state effettuate inoltre, analisi per la stima di indicatori fisiologici associati allo stress salino quali contenuto di prolina (Pro) e di malondialdeide (MDA), le attività enzimatiche della catalasi (CAT) e della guaiacolo perossidasi (POD), le letture di clorofilla, flavonoidi, antociani e Nitrogen Balance Index (NBI), quest'ultimo espresso come rapporto tra clorofille e flavonoli, utilizzando lo strumento Dualex®; nonché la determinazione della EL (Electrolytic Likage), secondo i protocolli riportati da

Silvestri et al. (2016) e Bashir et al. (2021).

L'analisi dei dati è stata condotta con il software IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 attraverso la procedura GLM (General Linear Model) ed analisi della varianza ad una via, le medie separate con il test di Tuckey ($p \leq 0,05$); i valori misurati di vitalità, ripresa, radicazione e conversione sono stati precedentemente sottoposti a trasformazione angolare (Compton, 1994).

Risultati

Dall'analisi dei dati ottenuti è emerso che la presenza di stress salino, applicato attraverso la matrice incapsulante, ha significativamente ridotto le percentuali di vitalità e radicazione, soprattutto nel trattamento T5 (200mM), mentre la conversione è stata ridotta significativamente a partire dal trattamento T3 (100 mM), pur mantenendosi entro valori soddisfacenti (Tab. 1). Il numero di germogli prodotti e la loro lunghezza sono stati significativamente influenzati dallo stress indotto, a partire dalla concentrazione più bassa (50 mM in T1), così come la lunghezza delle radici rigenerate dai propaguli (Tab. 1). Inoltre, l'effetto 'capsula' (trattamento T1 a 0 mM) ha favorito l'emissione di nuovi germogli e di lunghezza significativamente maggiore rispetto ai propaguli sprovvisti di matrice incapsulante (T0). Il numero di radici prodotte e la percentuale di ripresa non hanno mostrato differenze significative per nessuna delle concentrazioni saline applicate. La totalità dei propaguli (incapsulati e non), non ha fatto rilevare produzione di callo.

Per quanto riguarda gli indicatori fisiologici, il contenuto in clorofilla non ha fatto registrare differenze significative particolari, a parte per la concentrazione salina pari a 150 mM dove il contenuto risultava essere superiore rispetto agli altri trattamenti (Tab. 2). Anche il contenuto in flavonoli mostrava un aumento significativo alle concentrazioni saline più elevate (T3, T4 e T5), mentre non sono state osservate differenze significative in termini di contenuto di antocianine (Tab. 2). L'indice NBI, invece, risultava più basso rispetto a tutti gli altri trattamenti nel trattamento T5, a conferma che tale concentrazione era molto elevata e la pianta appariva stressata.

La determinazione del contenuto di prolina nei diversi trattamenti non ha evidenziato nessuna differenza significativa (Tab. 3), così come anche l'attività dell'enzima catalasi, che non ha mostrato differenze tra i diversi trattamenti (Tab. 3). L'attività enzimatica della guaiacolo-perossidasi invece, mostrava tuttavia dei valori piuttosto simili in tutti i trattamenti, ad eccezione della concentrazione più elevata di NaCl (T5), dove tale attività enzimatica risultava maggiore (Tab. 3).

Tab. 1. Valori di vitalità, ripresa, radicazione e conversione; numero di germogli prodotti, lunghezza germogli, numero di radici prodotte e lunghezza delle radici raggiunte nei diversi trattamenti registrati al termine dell'esperimento (per ogni carattere, lettere diverse indicato differenze significative mediante analisi della varianza e test di Tuckey a $p \leq 0,05$).

Tab. 1. Value of viability, regrowth and conversion, number of new shoots and roots, shoots and roots length, achieved on different treatments recorded at the end of the experiment (for each character, different letters indicate significant differences by ANOVA and Tuckey test at $p \leq 0.05$).

Trattamento con NaCl	Vitalità (%)	Ripresa	Germogli prodotti (n)	Lunghezza germogli (cm)	Radicazione (%)	Radici prodotte (n.)	Lunghezza radici (cm)	Conversione (%)
Controllo (T0)	100 a	100 a	0,60 b	0,63 b	72 a	2,00 a	7,12 a	72 a
0 mM (T1)	100 a	96 a	1,24 a	1,75 a	88 a	2,44 a	9,42 a	84 a
50 mM (T2)	100 a	96 a	0,52 b	0,42 b	88 a	2,40 a	6,38 b	88 a
100 mM (T3)	96 a	84 a	0,20 b	0,19 b	60 ab	1,36 a	3,52 c	60 b
150 mM (T4)	96 a	88 a	0,16 b	0,16 b	60 ab	1,64 a	3,03 c	60 b
200 mM (T5)	76 b	72 a	0,12 b	0,18 b	52 b	1,68 a	3,22 c	52 b

Tab. 2. Valori di clorofille, flavonoli e antociani, espressi in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, e Nitrogen Balance Index (NBI) nei diversi trattamenti registrati al termine dell'esperimento (per ogni carattere, lettere diverse indicano differenze significative mediante analisi della varianza e test di Tuckey a $p \leq 0,05$).

Tab. 2. Value of chlorophylls, flavanols and anthocyanin contents ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and Nitrogen Balance Index (NBI), achieved on different treatments recorded at the end of the experiment (for each character, different letters indicate significant differences by ANOVA and Tuckey test at $p \leq 0.05$).

Trattamento	Clorofille ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flavonoli ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Antociani ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	NBI
0 mM (T1)	18,91 b	0,38 b	0,13 ns	50,62 ab
50 mM (T2)	18,24 b	0,37 b	0,12 ns	49,29 abc
100 mM (T3)	18,81 b	0,48 a	0,12 ns	41,50 bc
150 mM (T4)	22,73 a	0,42 a	0,11 ns	56,86 a
200 mM (T5)	18,26 b	0,50 a	0,17 ns	38,51 c

Tab. 3. Valori di Electrolytic Likage (EL), prolina e di attività enzimatica di POD, CAT e MDA, nei diversi trattamenti registrati al termine dell'esperimento (per ogni carattere, lettere diverse indicano differenze significative mediante analisi della varianza e test di Tuckey a $p \leq 0,05$).

Tab. 3. Value of Electrolytic Likage (EL), prolin content and POD, CAT and MDA enzymatic activities, achieved on different treatments recorded at the end of the experiment (for each character, different letters indicate significant differences by ANOVA and Tuckey test at $p \leq 0.05$).

Trattamento	EL	POD	CAT	Prolina	MDA
0 mM (T1)	27,64 ns	5,72 b	2,41 ns	2,19 ns	4,56 b
50 mM (T2)	26,75 ns	4,47 c	2,23 ns	2,30 ns	6,17 a
100 mM (T3)	36,03 ns	6,28 b	2,37 ns	1,96 ns	4,12 c
150 mM (T4)	23,72 ns	5,86 b	2,09 ns	2,36 ns	3,05 d
200 mM (T5)	38,06 ns	7,02 a	2,22 ns	2,27 ns	2,76 e

Discussione e Conclusioni

Lo stress salino, ed in particolare quello indotto da NaCl, provoca nelle cellule uno stress ossidativo inducendo un ulteriore e conseguente deficit idrico e nutrizionale. Ciò si manifesta a partire dalla chiusura stomatica, processo che a sua volta causa sia una riduzione nella disponibilità di CO_2 e nel tasso di fotosintesi, sia un aumento della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); infine, attraverso una riduzione nella crescita dei tessuti. Per proteggere le cellule da danni irreversibili, in risposta allo stress osmotico in corso le piante attivano una risposta metabolica che coinvolge un complesso enzimatico con funzione antiossidante. In questo modo, l'analisi dell'attività degli enzimi coinvolti, nonché la stima del contenuto in clorofilla possono dare indicazioni riguardo la risposta della pianta allo stress indotto.

In questo studio è stato riscontrato che il genotipo 'Fontanarossa nera' (*Morus nigra* L.) nelle cinque diverse concentrazioni saline applicate, non ha subito riduzioni in termini di contenuto di clorofilla e non è stato altresì riscontrato aumento dell'attività dell'enzima catalasi e dell'osmolita prolina. Tuttavia, il contenuto dell'enzima perossidasi è risultato maggiore nella concentrazione più elevata (200 mM), così come l'indice NBI.

Da un punto di vista morfologico, lo stress salino applicato ha causato un effetto significativo (Tab. 1) sull'allungamento dei germogli e delle radici, e sulla conversione, mentre vitalità e percentuale di radicazione vengono ridotte solo alla dose più alta di sale (200 mM).

Le indagini fisiologiche, biochimiche e morfologiche in generale, non hanno mostrato importanti differenze, ad eccezione dei trattamenti con concentrazione di sale più elevata (T5-200 mM NaCl). La valutazione dei risultati potrebbe suggerire quindi, che il genotipo 'Fontanarossa nera' sia effettivamente in grado di tollerare concentrazioni saline fino a 200 mM per un periodo pari a 45 giorni.

Nel presente lavoro è stato studiato per la prima volta, in base alle nostre conoscenze, l'effetto di stress salino applicato contemporaneamente alla tecnologia di incapsulamento per la produzione di semi sintetici di gelso. L'applicazione di tale metodo per lo screening e la selezione di genotipi tolleranti alla salinità, pur rivelandosi promettente in quanto permette una valutazione più rapida rispetto ai metodi tradizionali, richiede ulteriori indagini in particolare riguardo lo studio del profilo fisiologico.

Bibliografia

- Bashir, M. A., Silvestri, C., Coppa, E., Brunori, E., Cristofori, V., Rugini, E., Astolfi, S. 2021. Response of olive shoots to salinity stress suggests the involvement of sulfur metabolism. *Plants*, 10(2), 1-19.
- Compton M.E., 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 217–242.
- Das K., Roychoudhury A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2: 53.
- FAO/ Intergovernmental Technical Panel On Soils, 2021. Salt-affected soils are a global issue.
- Micheli M., Bececco V., Gardi T., Martorana L., Chiancone B., Germanà M.A., 2015. Encapsulation of black mulberry microcuttings: studies on capsules and synthetic seeds. In *Acta Hort.*, 1155: 65-70.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Shannon M.C., 1997. Adaptation of plants to salinity. *Advances in agronomy*, 60: 75-120.
- Standardi A., 2012. Encapsulation: Promising technology for nurseries and plant tissue laboratories. *AgroLife Science Journal*, 1(1): 48-54.
- Standardi A., Piccioni E., 1998. Recent perspectives on synthetic seed technology using non embryogenic *in vitro*-derived explants. *International Journal of Plant Sciences*, 159(6): 968-978.
- Sudhakar C., Lakshmi A., Giridarakumar S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3): 613-619.
- Silvestri C., Celletti S., Cristofori V., Astolfi S., Ruggiero B., Rugini E., 2017. Olive (*Olea europaea* L.) plants transgenic for tobacco osmotin gene are less sensitive to in vitro-induced drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 229.

Studi preliminari per la messa a punto di un protocollo per la micropropagazione di *Humulus lupulus* L.

Adriana Viridis, Antonella Sirigu, Silvana Manca, Roberto Pilia, Anna Maria Repetto*

* amrepetto@agrisricerca.it

Servizio Ricerca sui Sistemi Colturali Erbacei, AGRIS Sardegna, Cagliari

Riassunto

Il presente lavoro ha come obiettivo la messa a punto di un protocollo per la micropropagazione di *Humulus lupulus* L. Sono state utilizzate cinque diverse varietà (*Cascade*, *Chinook*, *Nugget*, *Tradition* e *Yeoman*). Dopo la sterilizzazione e la rimozione degli apici vegetativi, le piantine sono state trasferite alla proliferazione e, sia in questa fase sia nella fase di radicazione, sono stati utilizzati due substrati con ormoni diversi a differenti concentrazioni. Tre delle varietà confrontate hanno risposto alla micropropagazione mentre per due non è stato possibile ottenere materiale *in vitro*. Nessuna delle tre varietà trasferite alla fase di radicazione ha mostrato differenze significative tra i due substrati.

Parole chiave: coltura *in vitro*, sterilizzazione, substrati, varietà.

Preliminary studies for the development of a protocol for the micropropagation of *Humulus lupulus* L.

Abstract: The present work aims to set up a protocol for the micropropagation of *Humulus lupulus* L. Five different varieties were used (*Cascade*, *Chinook*, *Nugget*, *Tradition* and *Yeoman*). After sterilization and the removal of the vegetative apexes, the seedlings were transferred to proliferation and, both in this phase and in the rooting phase, two substrates were used with different hormones at different concentrations. Three of the varieties compared responded to micropropagation while two failed to obtain *in vitro* material. None of the three varieties transferred to the rooting phase showed differences between the two substrates.

Keywords: *in vitro* culture, sterilization, substrates, varieties.

Introduzione

Il luppolo da alcuni anni è oggetto di studio vista la crescente domanda come ingrediente fondamentale per la produzione della birra alla quale apporta un'impronta caratterizzante a livello organolettico. Un'opportuna scelta varietale è fondamentale per consentire una soddisfacente produzione di luppolo e individuare le varietà più adatte all'areale di coltivazione.

Il presente lavoro ha come obiettivo la messa a punto di un protocollo per la micropropagazione di questa specie che può costituire un valido sistema per l'ottenimento in tempi brevi di un elevato numero di piante delle diverse varietà.

Materiali e metodi

Da germogli di cinque diverse varietà di luppolo (*Cascade*, *Chinook*, *Nugget*, *Tradition* e *Yeoman*) scelte tra quelle maggiormente utilizzate dai birrifici e sulla base della loro composizione aromatica e in alfa acidi, sono state prelevate piccole gemme per l'ottenimento di un congruo numero di piante da trasferire in campo. La sterilizzazione è avvenuta in ambiente asettico con immersione delle gemme in ipoclorito di sodio al 10% per 15 minuti, alcool al 70% per 2 minuti e tre risciacqui in acqua sterile. Dopo la sterilizzazione sono stati prelevati gli apici vegetativi aventi dimensioni di 1-3 mm i quali, posti in

coltura su substrato di sviluppo, hanno dato origine dopo circa 30/40 giorni a una plantula di circa 1 cm di altezza. Si è passati quindi alla fase di proliferazione per incrementare il numero di piante disponibili e, dalla terza subcoltura, sono stati utilizzati due substrati A e B con differenti citochinine e auxine a diverse concentrazioni (Tab. 1). Anche nella successiva fase di radicazione sono stati posti a confronto due substrati con due diverse auxine a diversa concentrazione (Tab. 1). Le plantule sono state allevate in camera di crescita con una temperatura di 21°C, fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio e intensità luminosa di 4000 lux.

Le piante radicate sono state trasferite in acclimatazione in vasetti di torba pressata e via via adattate all'ambiente esterno per poi essere trapiantate in campo.

Tab. 1. Fitoregolatori e relative concentrazioni impiegati nella fase di moltiplicazione e di radicazione nei due substrati saggiati (A e B) per la micropropagazione di *Humulus lupulus L.*

Tab. 1. Plant growth regulators and relative concentrations used in the multiplication and rooting phase in the two substrates tested (A and B) for the micropropagation of *Humulus lupulus L.*

	Fitoregolatori mg/L	
	Moltiplicazione	Radicazione
Substrato A	NAA 0,01	IBA 0,1
	BAP 0,7	
	GA3 0,1	
Substrato B	BAP 0,1	IAA 1

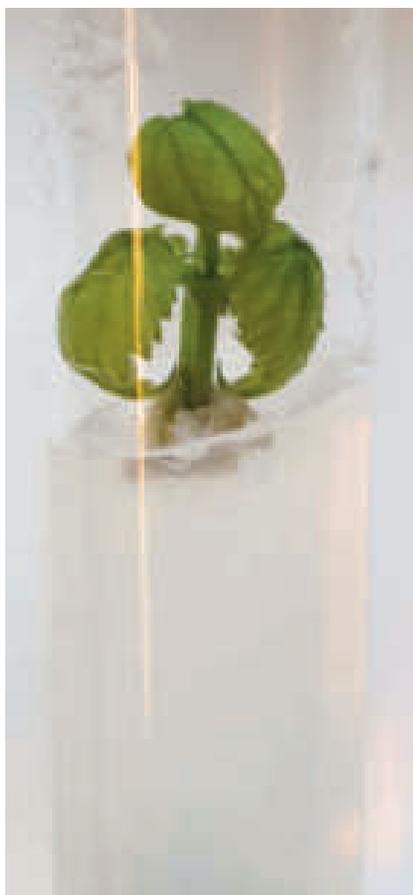


Fig. 1. Plantlet in fase di sviluppo (A) e plantula in fase di moltiplicazione (B).
 Fig. 1. Plantlet in development stage (A) and Plantlet in multiplication stage (B).



Fig. 2. Piantule in fase di radicazione.

Fig. 2. Plantlets in rooting stage.



Fig. 3. Piante in acclimatazione.

Fig. 3. Plants during acclimatation.

Risultati e Discussione

Le varietà *Cascade*, *Nugget*, *Yeomane Chinook* hanno raggiunto pienamente l'obiettivo su entrambi i substrati di moltiplicazione con rese del 1,9, 2,1, 1,12 e 1,4 rispettivamente, non differenziandosi tra i due substrati in maniera significativa e una resa media di 2,1 in entrambi i substrati A e B (Fig. 1). In alcuni casi già nella fase di moltiplicazione, si sono sviluppati gli apparati radicali consentendo di risparmiare la successiva fase di radicazione (Fig. 2). La varietà *Tradition* ha presentato tra la seconda e quarta subcoltura una resa alla moltiplicazione pari a zero e le poche piante ottenute non sono state trasferite nei substrati di radicazione a causa di un inquinamento batterico che ha compromesso la coltura. Per la varietà *Chinook* non è stato necessario il passaggio alla fase di radicazione in quanto, già in quella di proliferazione, si è avuto lo sviluppo degli apparati radicali.



Fig. 4. Pianta in campo.

Fig. 4. Plant in field.

Nessuna delle tre varietà trasferite in fase di radicazione ha evidenziato differenze di rilievo fra i due substrati. La sopravvivenza delle piante in acclimatazione è stata superiore al 90% nonostante quelle allevate nel substrato B di radicazione presentassero radici di diametro inferiore in confronto a quelle provenienti dal substrato A (Figg. 3, 4).

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno evidenziato una risposta varietale alla tecnica applicata. Per le due varietà che non hanno risposto sarebbe opportuno investigare l'impiego di substrati diversi con differenti concentrazioni ormonali. La ricerca proseguirà al fine di ottimizzare i risultati e studiare nuove varietà.

Bibliografia

- Adams A.N., 1975. Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus*) by heat and meristem culture. *J. Hort. Sci.*, 50: 151-160.
- Capla D., Harta M., 2021. Establishment of an Efficient Micropropagation System for *Humulus lupulus* L. cv. Cascade and Confirmation of Genetic Uniformity of the Regenerated Plants through DNA Markers. *Agronomy*, 11: 2268
- Farago J., Hudcovicova M., Lajchova Z., Vidova B., Vojtekova P., Faragova N., 2009. *In vitro* storage of hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm derived from meristem culture. *Proc. Int. Sci. Meet. "Use of Genetic Resources of Cultivated Plants"*, Žatec, Czech Republic, 2008, 22-25. *Nova Biotechnologica* 9-3: 291
- Guirriaran M.J., Revilla M.A., Tames R.S., 1999. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (Hop) cvs. Brewers Gold and Nugget. *Plant Cell Rep.*, 18: 1007-1011
- Popov V.I., Vysotkii V.A., Tuktagulov I.M., 1985. Conditions of cultivation of isolated hop apices for clonal micropropagation. *Fiziol. Rast.*, 32: 1191- 1195.
- Roy A.T., Legget G., Koutoulis A., 2001. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 37: 79-83
- Vine S.J., Jones O.P., 1969. The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. *J. Hort. Sci.*, 44: 281-284.

Micropropagazione di *Vaccinium myrtillus* L. originario dell'Altopiano di Asiago

Pietro Carraro^{1*}, Diego Bujazha¹, Leonardo Bisson¹, Elena Sgaravatti², Andrea Rigoni³, Marina Panozzo³, Benedetto Ruperti¹, Silvia Quaggiotti¹

* pietro.carraro@phd.unipd.it

¹ Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova

² PlantaRei Biotech S.r.l., Padova

³ Rigoni di Asiago S.r.l., Asiago (VI)

Riassunto

Al fine di sviluppare un protocollo per la micropropagazione massiva di una varietà di *Vaccinium myrtillus* L. autoctona dell'Altopiano di Asiago, sono stati valutati gli effetti di tre concentrazioni di zeatina sul tasso di moltiplicazione dei germogli, con il dosaggio intermedio (0,3 mg/L⁻¹) che è risultato il più efficace. Inoltre, è stato valutato il tasso di radicazione *ex-vitro*, dopo sei mesi di ambientamento delle piantine, che è risultato dell'82%. I risultati ottenuti dalla micropropagazione di *Vaccinium myrtillus* L. sono promettenti per la reintroduzione della specie nei suoi habitat naturali, sia a scopo di coltivazione, che di mantenimento della flora autoctona.

Parole chiave: mirtillo, Woody Plant Medium, zeatina, bioconservazione, Tempesta Vaia.

Micropropagation of *V. myrtillus* L. ecotype from the Asiago Plateau

Abstract: Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) is a shrubby species with a wide circumboreal distribution, which in Italy is mainly found in the Alps and in the northern and central Apennines. On the Asiago Plateau, the presence of bilberry has drastically decreased in recent years, also due to the Vaia storm (North Italy, October 2018) which severely damaged the forest and the brushwood. The development of an effective micropropagation protocol for bilberry could be a resource for both the protection of natural environments and the development of semi-spontaneous cultivation techniques. The aim of the present work was to study the efficacy of an *ad hoc* protocol for bilberry massive production aimed at providing about 70,000 plants for transplanting in the Asiago Plateau. To this aim, three concentrations of zeatin on shoot multiplication rate were tried and the rooting rates of the plants at the end of the rooting and acclimatization phase were evaluated. The study was part of the INNOPOS project (INNOvative methodologies for the Productions Organic Seedlings - European Union's LIFE Project LIFE20 CCA/IT/001630) that has several objectives, among the others the reintroduction of native plant species to the Asiago Plateau. It is known that *in vitro* growth responses can vary greatly among genotypes of the same species. Bilberry from different geographic areas may need different conditions for optimal *in vitro* growth. Therefore, it is important to identify variety-specific protocols to allow standardization and repeatability of the production process. As an initial source of explants, young shoots (provided by 4-5 nodes and of 3-4 cm length) were collected from natural populations in the Asiago Plateau and grown in Woody Plant Medium (WPM) integrated with sucrose and zeatin. Three levels of zeatin (0.1 - 0.3 - 0.5 mg/L) were compared to evaluate the rate of shoot multiplication. Although the number of shoots/explant was higher by increasing the concentration of zeatin, the morphological characteristics of the explants generally appeared worse, and cases of vitescence increased considerably. Dosing at 0.3 mg/L the zeatin resulted in the best multiplication/quality ratio, producing an average of 4.33 shoots/explant. After 10 weeks of *in vitro* subculturing, the shoots (provided by 4-5 nodes and of 3-4 cm length) were transplanted into cubes of pressed peat and coconut fiber. The *ex vitro* rooting rate after 6

months of acclimatization was 82%. The next step of the research will be to transfer the plants to the open field, one year after the acclimatization. In case of success, the establishment of an area for the organic production of bilberry could represent an innovation in the field of berry cultivation.

Keywords: bilberry, Woody Plant Medium, zeatin, bio preservation, Vaia storm

Introduzione

I danni causati dalla tempesta Vaia (Nord Italia, ottobre 2018) ed il progressivo innalzamento delle temperature hanno severamente compromesso la presenza del mirtillo nero (*Vaccinium myrtillus* L.) nel sottobosco dell'Altopiano di Asiago. I frutti spontanei di mirtillo vengono raccolti e commercializzati su scala locale, pur costituendo un'ottima possibilità economica di coltivazione in aree collinari/montane altrimenti improduttive (Bandini Mazzanti et al., 2007). Lo sviluppo di un efficace protocollo di micropropagazione del mirtillo nero potrebbe rappresentare una risorsa sia per la tutela degli ambienti naturali, che per lo sviluppo di tecniche di coltivazione semi-spontanea.

Lo scopo dello studio era quello di sviluppare un protocollo di micropropagazione del mirtillo nero finalizzata alla produzione massale di piantine destinate al trapianto nell'Altopiano di Asiago. A tal fine sono stati valutati gli effetti di tre concentrazioni di zeatina sul tasso di moltiplicazione dei germogli. Inoltre, sono state valutate tecniche di radicazione *ex-vitro* per accelerare ed economizzare la fase finale di micropropagazione.

Il lavoro è stato condotto nell'ambito del progetto INNOPOS (INNOvative methodologies for the Productions Organic Seedlings - LIFE20 CCA/IT/001630) che prevede, tra gli altri obiettivi, la reintroduzione di specie vegetali autoctone nell'Altopiano di Asiago.

Materiali e Metodi

Origine degli espianti

Come fonte iniziale di espianti sono stati raccolti giovani germogli in crescita attiva, provvisti di gemme laterali, da popolazioni naturali di *Vaccinium myrtillus* L. dell'Altopiano di Asiago (45°54'00"N, 11°30'00" E; 1001 m slm). Per garantire la sterilità degli espianti, i germogli sono stati lavati con acqua corrente per 15 minuti e successivamente immersi per 1 minuto in una soluzione 1,5 g/L di sodio dicloroisocianurato ($C_3Cl_2N_3NaO_3$). Gli espianti iniziali (germogli provvisti di 4-5 nodi e di 3-4 cm di lunghezza) sono stati messi in coltura axenica singolarmente.

Procedure sperimentali

Per la coltivazione *in vitro* degli espianti è stato utilizzato un terreno WPM (Woody Plant Medium; Lloyd e McCown, 1980) con tre dosaggi di zeatina (0,1- 0,3 e 0,5 mg/L), 3% di saccarosio, 0,73% di plant agar (B&V) e pH 5.8. Le colture venivano incubate in camera di crescita mantenuta a 23 ± 2 °C, con un fotoperiodo di 16/8 ore di luce/buio e una densità di flusso di fotoni di $67 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (misurazioni effettuate con spettrometro PAR200). Ogni subcultura durava 8-10 settimane. Alla fase della moltiplicazione è seguita la fase di radicazione *ex vitro* e acclimatazione. I germogli venivano tagliati in porzioni di 3-4 centimetri (comprensivi di 4-5 nodi), poi trasferiti singolarmente in cubetti di torba pressata (60%) e fibra di cocco (40%) con pH di 4,2-4,8, in vassoi da 480 fori. I vassoi venivano inseriti in piccole serre (160 x 56 x 14 cm) poste all'interno di una camera di crescita, mantenendo i parametri di temperatura e luminosità precedenti, ma con umidità relativa del 90%. Trascorse 2 settimane, con l'emissione delle prime radici, le piantine venivano progressivamente esposte all'aria. Trascorso un mese dal trapianto, le piantine venivano trasferite in ombraio. Dopo due mesi di crescita in ombraio, le piantine venivano trapiantate in vassoi da 84 fori.

Analisi statistica

Per valutare il tasso di moltiplicazione *in vitro* degli espianti sono state utilizzate 100 piantine di 10 settimane di vita per ciascuna delle tre concentrazioni di zeatina considerate. Il tasso di moltiplicazione è stato espresso in numero di germogli/espianto, considerando solo i germogli lunghi almeno 1 cm. Utilizzando il software IBM SPSS Statistics versione 25, sono stati inizialmente eseguiti due test per la verifica dell'ipotesi di normalità, il test di Kolmogorov-Smirnov e il test di Shapiro-Wilk. Entrambi hanno rifiutato l'ipotesi che i valori campionari fossero distribuiti normalmente. Si è perciò deciso di ricorrere a statistiche non-parametriche. La differenza tra il numero di germogli registrato in ciascuna delle tre condizioni di dosaggio di zeatina è stata quindi analizzata con un test H di Kruskal-Wallis, che ha rivelato una differenza significativa tra i dosaggi. A seguito di tale risultato, utilizzando il software GraphPad Prism 6.0, è stata eseguita un'analisi post-hoc per confronti multipli a coppie con test di Dunn.

Risultati

La moltiplicazione degli espianti, intesa come intensità di proliferazione dei germogli, dipende sia dalla composizione del terreno di coltura che dalla presenza di regolatori della crescita. Dai protocolli per la micropropagazione di *V. myrtillus* L. disponibili in letteratura sembra che il terreno di coltura WPM, utilizzato anche in questo studio, sia il più adatto (Cüce e Sökmen, 2015).

Moltiplicazione degli espianti con tre dosaggi di zeatina

Per valutare il tasso di moltiplicazione dei germogli, calcolato come numero di germogli lunghi almeno 1 cm/espianto, sono stati confrontati tre dosaggi di zeatina (0,1 - 0,3 - 0,5 mg/L). Un dosaggio nullo di zeatina avrebbe ridotto il tasso di moltiplicazione e la capacità rigenerativa degli espianti (Cüce e Sökmen, 2015; Jaakola et al., 2002; Reed e Abdelnour-Esquivel, 1991); per questo motivo si è deciso di non utilizzare il controllo negativo senza zeatina. In Tab. 1 sono riportate le statistiche descrittive dei campioni considerati. Il numero di germogli per espianto nelle tre condizioni è risultato significativamente differente ($H = 137,35(2)$, $p < 0,001$). Nonostante il numero di germogli/espianto sia risultato

Tab. 1. Statistiche descrittive degli espianti.

Tab. 1. Descriptive statistics of explants.

	Germogli/espianto							
	Numero espianti	Deviazione		Percentili				
		Media	standard	Minimo	Massimo	25 ^{esimo}	50 ^{esimo}	75 ^{esimo}
Zeatina 0,1 l mg L ⁻¹	100	3,20	±2,12	1	10	2	3	4
Zeatina 0,3 l mg L ⁻¹	100	4,33	±1,79	1	10	3	4	5
Zeatina 0,5 l mg L ⁻¹	100	11,44	±6,98	3	38	6	10	15
Totale	300	6,32	±5,66	1	38	3	4	8

superiore aumentando la concentrazione di zeatina, le caratteristiche morfologiche degli espianti sono apparse generalmente peggiori (forma lanceolata delle foglie, germogli sottili, colorazione alterata, presenza di callo basale). In particolare, i casi di vitescenza sono aumentati considerevolmente (10% con 0,1 e 0,3 mg/L di zeatina, 40% con 0,5 mg/L di zeatina). Inoltre, aumentando il dosaggio di zeatina si è osservata una progressiva diminuzione nello sviluppo di radici *in vitro*. In Fig. 1 si possono notare le differenti caratteristiche morfologiche delle piantine cresciute *in vitro* per 10 settimane. Considerando



Fig. 1. Caratteristiche morfologiche delle piantine di *V. myrtillus* micropropagate, dopo 10 settimane di subcultura: (a) 0,1 mg/L di zeatina, (b) 0,3 mg/L di zeatina, (c) 0,5 mg/L di zeatina.

Fig. 1. Morphological characteristics of micropropagated V. myrtillus plants, after 10 weeks of subculture: (a) 0.1 mg/L zeatin, (b) 0.3 mg/L zeatin, (c) 0.5 mg/L zeatin.

sia la resa moltiplicativa che la qualità degli espianti, il dosaggio di zeatina a 0,3 mg/L ha permesso di ottenere un buon numero di germogli/espianto mantenendo le caratteristiche morfologiche ottimali (foglie ellittiche, germogli robusti, colorazione verde scuro). È stata quindi utilizzata questa concentrazione per micropropagare un numero elevato di germogli da avviare alla radicazione (circa 70.000).

Radicazione e acclimatazione

I germogli, cresciuti *in vitro* per 10 settimane con una concentrazione di zeatina di 0,3 mg/L, provvisti di 4-5 nodi e lunghi 3-4 cm, sono stati trapiantati in cubetti di torba pressata e fibra di cocco. Il tasso di radicazione è stato valutato esaminando singolarmente 2.400 piantine, trascorsi 6 mesi dall'ambientamento. L'82% delle piantine presentava radici.

Discussione e Conclusioni

In letteratura sono disponibili diversi studi riguardo la micropropagazione di *V. myrtillus* L. (Cüce e Sökmen, 2015; Jaakola et al., 2002; Nin et al., 2019; Shibli e Smith, 1996); tuttavia i risultati sono spesso discordanti. È noto che le risposte alla crescita *in vitro* possono variare notevolmente anche tra cultivar appartenenti alla stessa specie (Serres et al., 1994; Jaakola et al., 2002). È pertanto importante identificare protocolli specifici per le singole varietà, in modo da permettere la standardizzazione e ripetibilità del processo produttivo. Confrontando i risultati ottenuti nei lavori sopra citati con quelli ottenuti nel presente lavoro, si riscontra che a parità di numero di germogli/espianto, i dosaggi di zeatina utilizzati in questa sperimentazione sono risultati significativamente inferiori. L'utilizzo di basse dosi di zeatina permette una migliore qualità del materiale da avviare al successivo trapianto per la radicazione *ex-vitro*.

Trapiantando i germogli *ex-vitro* senza nessun trattamento con auxine, i tassi di radicazione osservati nel presente studio sono risultati paragonabili con il lavoro di Shibli e Smith (1996), mentre Cüce e Sökmen (2015), Jaakola et al (2002) e Nin et al. (2019) hanno osservato tassi di radicazione considerevolmente inferiori. È interessante notare come anche in mirtillo nero, germogli ottenuti tramite micropropagazione riescono a radicare efficacemente senza la necessità di una fase intermedia di radicazione *in vitro*.

Le piante di *V. myrtillus* L. micropropagate saranno introdotte nel podere “Cattedra” a Canove di Roana (Vicenza), al fine di costituire un’area adibita alla produzione di mirtillo nero.

Bibliografia

- Bandini Mazzanti M., Sgarbi E., Bosi G., Grimaudo M., 2007. Il mirtillo (*V. myrtillus* L.): inquadramento botanico e cenni storici. Atti Società dei naturalisti e matematici di Modena, supplemento 138.
- Cüce M., Sökmen A., 2015. Micropropagation of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberry) naturally growing in the Turkish flora. Turkish Journal of Biology 39: 233-240.
- Jaakola L., Tolvanen K., Laine K., Hohtola A., 2002. Micropropagation of bilberry and lingonberry. Acta Hort., 574: 401-403.
- Lloyd G., Mccown B.H., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of International Plant Propagators Society 30: 421-427.
- Nin S., Benelli C., Petrucci W., Turchi A., Pecchioli S., Gori M., Giordani E., 2019. In vitro propagation and conservation of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) genotypes collected in the Tuscan Apennines (Italy). Journal of Berry Research 9 (3): 1-20.
- Reed B. M., Abdelnonour-Esquivel A., 1991. The use of Zeatin to Initiate in Vitro Cultures of *Vaccinium* Species and Cultivars. HortScience 26 (10): 1320-1322.
- Serres R. A., Pan S., Mccown B. H., Stang E. J., 1994. Micropropagation of several lingonberry cultivars. Fruit Varieties Journal 48: 7-14.
- Shibli R A., Smith M.A.L., 1996. Direct Shoot Regeneration from *Vaccinium pahalae* (Ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) Leaf Explants. HortScience 31 (7): 1225-1228.

Micropropagazione e conservazione *in vitro* della specie endemica *Forsythia europaea* Degen et Bald.

Efigjeni Kongjika^{1*}, Valbona Sota²

* kongjikaef@yahoo.com

¹Sezione di Scienze Naturali e Tecniche, Accademia delle Scienze d'Albania, Tirana, Albania

²Dipartimento di Biotecnologia, Facoltà di Scienze Naturali, Università di Tirana, Albania

Riassunto

Forsythia europaea è una specie endemica nel nord dell'Albania e Kosovo con valore decorativo per la precoce fioritura prima dell'emissione delle foglie. Lo scopo di questo studio è stato l'ottimizzazione di un protocollo per la propagazione e conservazione *in vitro*, usando gemme provenienti da *vivo*, porzioni di foglia provenienti da *vitro* e due diversi substrati (MS, WPM). I migliori risultati sono stati osservati in gemme mantenute in MS addizionato con 1,0 mg/L BAP e 0,1 mg/L NAA, ottenendo il 93% di rigenerazione e su MS con 1 mg/L IBA, raggiungendo l'84,3% di radicazione. I germogli radicati si sono ben adattati alle condizioni *ex vitro* con una sopravvivenza del 88,2%. Applicando il metodo di crescita rallentata per la conservazione *in vitro* a medio-termine, i germogli sono stati conservati per 8 mesi a 4°C, in completa oscurità.

Parole chiave: specie autoctone, coltura *in vitro*, crescita *in vitro* rallentata

Micropropagation and *in vitro* conservation of the endemic species *Forsythia europaea* Degen et Bald.

Abstract: *Forsythia europaea* Degen et Bald. (Oleaceae) is a widespread endemic species in Northern Albania and Kosovo, according to the "Red Book: Threatened and Rare Plant Species of Albania". *F. europaea*, also called Albanian Forsythia, is a perennial shrub with high decorative value, due to its early flowering before the leaves are emitted and used for creating hybrids, particularly widespread in Northern Hemisphere countries. To date, there is limited information on the rapid propagation and *in vitro* conservation of *F. europaea*. This study aimed to optimize a protocol for the *in vitro* propagation and preservation of this endemic and decorative species. Two types of explants, shoots (direct organogenesis) and leaf fragments (indirect organogenesis), and two different growth substrates (MS and WPM) were compared. During the *in vitro* culture stages, the best response was observed using shoot explants. In particular, the shoots maintained on MS nutrient substrate supplemented with 1.0 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA showed a higher rate of regeneration (93%) and a high percentage of rooting (84.3%) on MS medium supplemented with 1.0 mg/L of IBA. Rooted shoots were well adapted to *ex vitro* conditions (acclimatization) with a survival of 88.2%. These positive results for propagation formed the basis for experiments on short-term *in vitro* preservation of *F. europaea* by applying the slow growth storage method with low temperature (4 °C) and darkness. These conditions allowed the shoots to be kept for 8 months without carrying out any subculture. With this research, a valid protocol for *in vitro* propagation through direct organogenesis and the possibility of creating an *ex situ* collection for *F. europaea* populations has been obtained.

Keywords: autochthonous species, *in vitro* culture, *in vitro* minimal growth storage

Introduzione

La *Forsythia europaea* Deg. et Bald. (famiglia delle Oleacee) è una specie endemica dell'Albania settentrionale e centrale. E' un arbusto deciduo, ramoso, che predilige i luoghi rocciosi. Secondo il

“Libro rosso: Piante minacciate e rare dell’Albania” (Vangjeli et al., 1995), questa specie è endemica non minacciata e, per misura di protezione, sono state proposte delimitate zone come aree naturali o aree protette. In tutte le specie di *Forsythia* è comune che i fiori gialli emergano molto presto, prima del fogliame verde, come un presagio di primavera. Dalle 10 specie naturali hanno avuto origine diversi genotipi attraverso l’ibridazione, tra cui ‘Meadowlark Forsythia’, un ibrido (*F. ovata* x *F. europaea*) resistente a -35 °F nell’emisfero settentrionale, una pianta eccellente per bordure miste di arbusti (DeWolf e Hebb, 1971; Jauron, 2006). Proprio per la sua fioritura precoce, può essere utilizzata come pianta ornamentale nelle città albanesi, soprattutto in quelle del nord. Lo scopo di questo studio è stato di definire un efficace protocollo di micropropagazione testando diversi substrati di crescita e differenti espianti. Questo protocollo potrà risultare utile per la produzione massale di piantine in breve tempo di questa specie endemica e per la conservazione e la creazione di collezioni *ex situ* di varie popolazioni distribuite nel territorio albanese.

Materiali e Metodi

Sterilizzazione degli espianti

Come espianti primari sono stati utilizzate gemme apicali prelevate da piante di due popolazioni, Shkopet e Kukës. Le gemme sono state lavate, mantenute in agitazione per 1 min in etanolo 70%, successivamente per 15 min in HgCl₂ allo 0,01% e infine sottoposte a 3 lavaggi in acqua sterile.

Organogenesi diretta, subcoltura e radicazione

Per ottenere organogenesi diretta da gemme sono stati valutati due substrati di coltura, MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1980), entrambi addizionati con 6-benzilamino-purina (BAP) a 1,0 mg/L, acido naftaleneacetico (NAA) a 0,1 mg/L, 3% saccarosio, 0,7% agar. Il pH è stato aggiustato a 5,6. Per la fase di radicazione, i germogli sviluppati sono stati trattati con acido indol-3-butirrico (IBA) a 0,3 mg/L e acido gibberellico (GA₃) a 0,1 mg/L.

Organogenesi indiretta, formazione di meristemoidi e nuovi organi

Porzioni di foglie (0,5 cm x 0,5 cm) provenienti da germogli *in vitro* sono state poste su un substrato per ottenere callogenesi: MS addizionato di NAA alla dose di 10⁻⁴ M e BAP a 10⁻⁵ M, fitormoni necessari anche per lo sviluppo dei meristemoidi. Per la formazione di nuovi germogli, è stato utilizzato MS, ma con il rapporto opposto di fitormoni (BAP a 10⁻⁴ M e NAA a 10⁻⁵ M).

Condizioni di coltura

Le colture sono state mantenute nella camera di crescita a 25°C in un regime luce/buio di 16 h/8 h, con luce fluorescente bianca fredda di intensità 43,4 µmol m⁻² s⁻¹.

Condizioni di acclimatazione

Piantine con 6-7 foglie sono state trasferite in serra su un substrato costituito da terriccio, torba e perlite (2:1:1) e mantenute per 3 settimane sotto un telo di polietilene con una temperatura di 22°C.

Condizioni di crescita rallentata in vitro

I germogli prodotti *in vitro* durante le subcolture sono stati mantenuti per due settimane in condizioni di crescita standard e poi trasferiti al buio e a bassa temperatura (4°C).

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte. I dati sperimentali sono sottoposti ad ANOVA e Test di Student utilizzando il software statistico JMP 7.0.

Risultati

Le gemme di *F. europaea* hanno risposto diversamente a seconda del substrato di coltura utilizzato (MS e WPM). Il substrato influisce in modo significativo sulla risposta organogenica degli espianti; infatti, essi hanno mostrato una maggiore percentuale di rigenerazione su MS (93%). Differenze sono state osservate anche tra le due popolazioni: ‘Kukës’ presentava un tasso di proliferazione più elevato rispetto a ‘Shkopet’ (Fig. 1).

La fase di moltiplicazione del materiale vegetale è importante perché tramite le subcolture viene ottenuto un elevato numero di plantule con molti germogli laterali. In questo studio sono stati esaminati il numero dei germogli (NG)/espianto e il numero delle foglie (NF)/espianto. Gli espianti coltivati su substrato MS hanno mostrato i migliori risultati per i parametri valutati nella fase di moltiplicazione. Gli espianti della popolazione ‘Kukës’ hanno risposto meglio sia come NG/espianto che NF/espianto (Fig. 2).

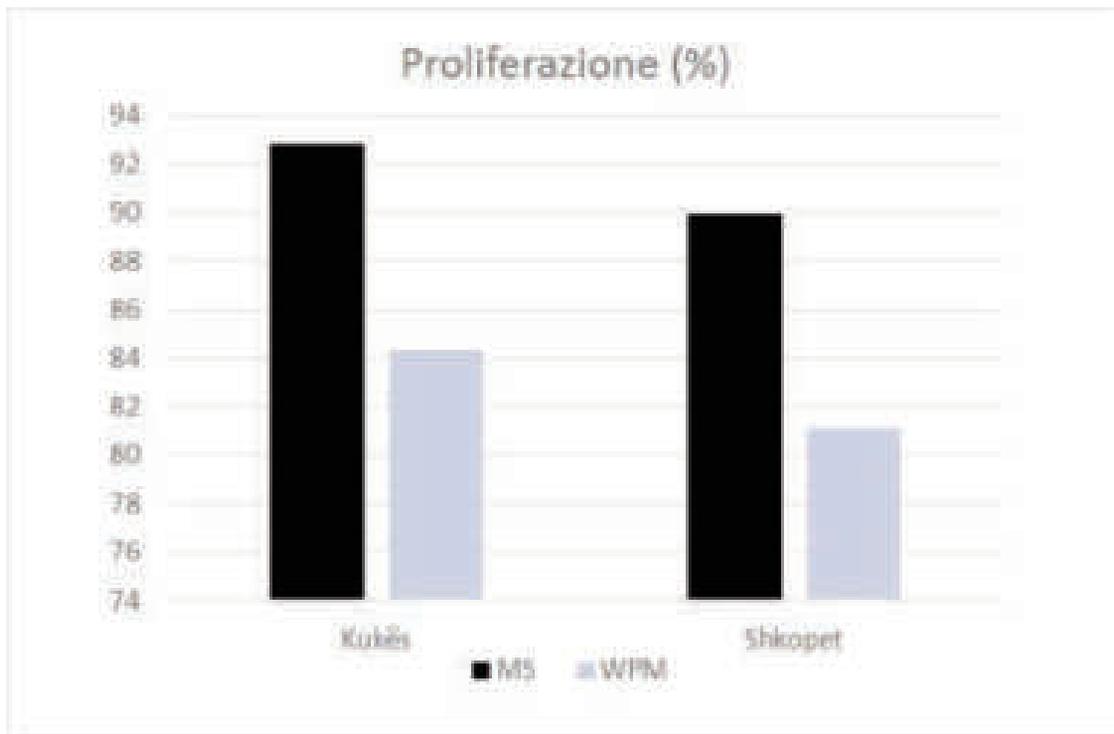


Fig. 1. Percentuale di rigenerazione degli espianti di due popolazioni di *F. europaea* in diversi substrati di coltura.

Fig. 1. Regeneration percentage of the *F. europaea* explants from both populations in different culture media.

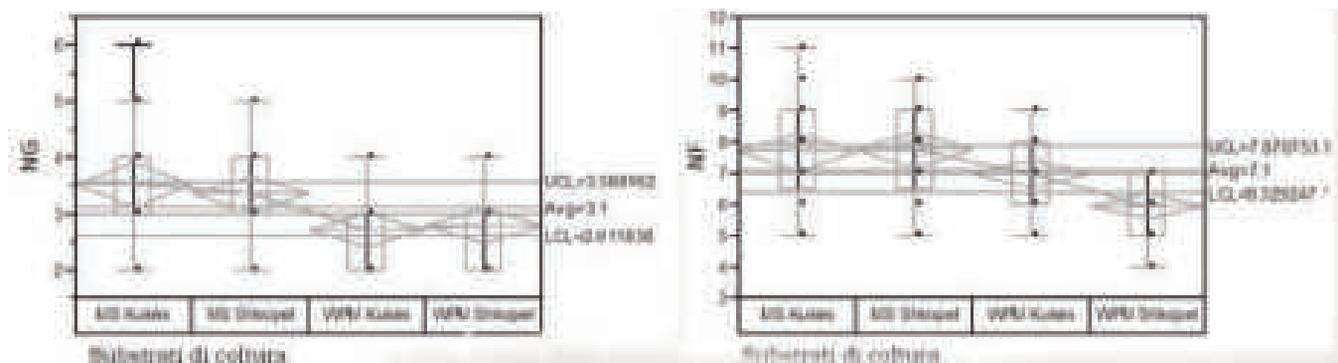


Fig. 2. Parametri biometrici monitorati durante la fase di moltiplicazione.

Fig. 2. Biometric parameters monitored during the multiplication stage.

La presenza di callo durante la subcoltura, sotto l'influenza di NAA, alla base del germoglio è da considerarsi un effetto positivo per la successiva radicazione delle plantule; nell'ecotipo 'Kukës' la presenza di callo è stata del 63,3%, mentre nell'ecotipo 'Shkopet' del 47,6% (Fig. 3a). Infatti, successivamente è stato osservato lo sviluppo di radici (circa 33%) in entrambi gli ecotipi (Fig. 3b). Tuttavia, quando è stato utilizzato un substrato idoneo alla radicazione, con una combinazione di fitormoni IBA e GA₃ in un rapporto 3:1, la percentuale di radicazione, è aumentata raggiungendo il 62,1% (Fig. 3b). Le fasi della micropropagazione sono presentate in Fig. 4.

L'acclimatazione è stata influenzata direttamente dalle condizioni di radicazione; le piantine sono state trasferite in vaso dopo l'emergenza delle radici. La sopravvivenza dopo la fase di acclimatazione ha raggiunto l'88,2% con il massimo di piante dell'ecotipo 'Kukës', mentre per l'ecotipo 'Shkopet' i valori sono stati inferiori.

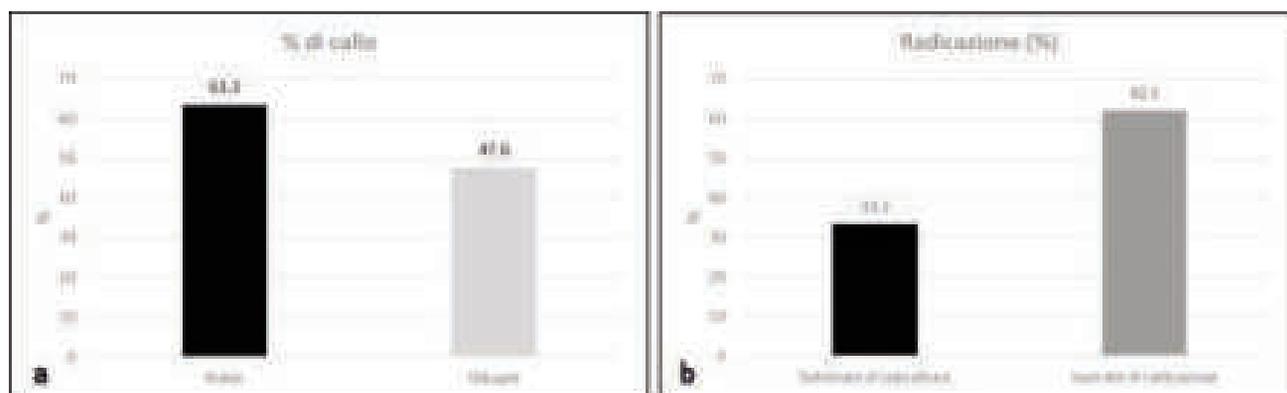


Fig. 3. a) Percentuale di callo formato alla base dei germogli degli ecotipi Kukës e Shkopet; b) Percentuale di radicazione delle piantine dell'ecotipo Kukës durante la subcoltura e la fase di radicazione.

Fig. 3. a) Callogenesis percentage at the base of explants of Kukës and Shkopet ecotypes; b) Rooting percentage of plantlets of Kukës ecotype during subculture and rooting stage.

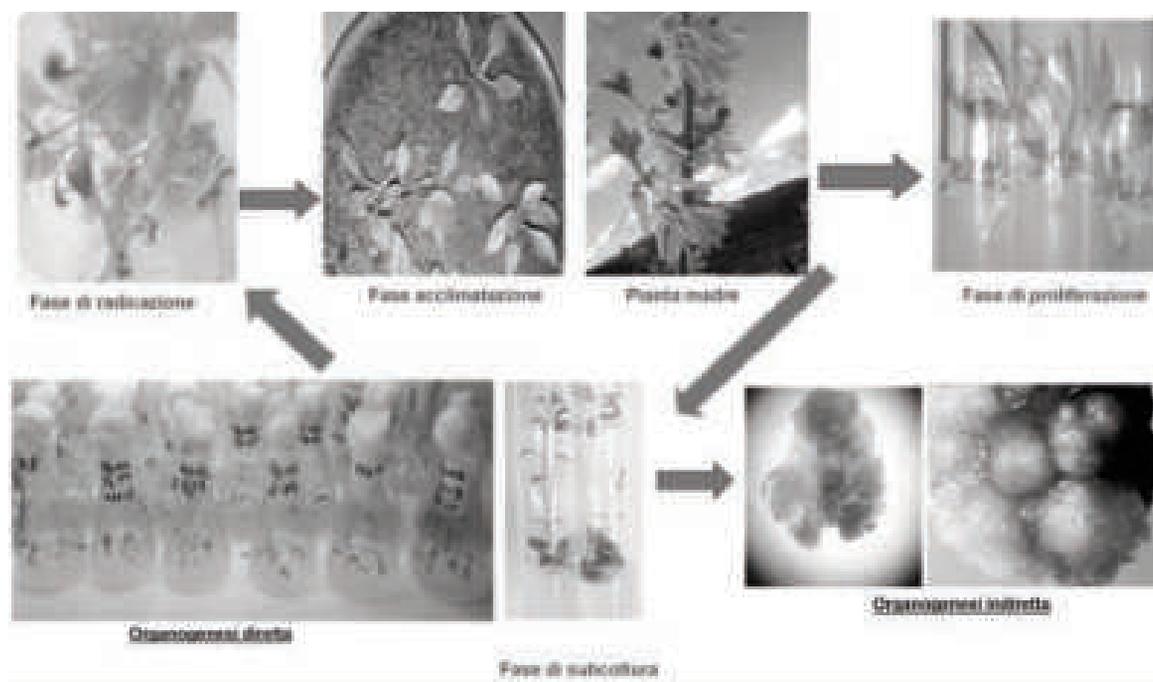


Fig. 4. Fasi di micropropagazione di *Forsythia europaea*.

Fig. 4. Micropropagation stages of *Forsythia europaea*.

Riguardo all'organogenesi indiretta indotta su porzioni di foglie, è stata osservata la formazione di callo dopo 4 settimane dall'inoculazione degli espianti nel substrato di callogenesi. Dopo la fase di induzione e il trasferimento su terreno fresco, il callo si è sviluppato ulteriormente e sulla sua superficie sono stati osservati centri meristemoidi (Fig. 4). Il trasferimento di calli con meristemoidi su MS con BAP e NAA, in rapporto opposto a quello del substrato per induzione di callogenesi (10:1), non è risultato positivo per la formazione di nuovi germogli.

La conservazione in crescita rallentata ha permesso di mantenere per 8 mesi a 4 °C al buio (Fig. 5) i germogli, con una sopravvivenza fino al 75% per entrambi gli ecotipi.



Fig. 5. Piantine *in vitro* di due popolazioni di *F. europaea* conservate a 4°C al buio.

Fig. 5. *In vitro* plantlets of two populations of *F. europaea* stored at 4 °C in the dark.

Discussione e Conclusioni

Dagli esperimenti effettuati risulta che il terreno nutritivo ottimale per la micropropagazione è l'MS con aggiunte di citochinina BAP e auxina NAA, in rapporto 10:1 per la fase di proliferazione. Mitrović et al. (2001) mostrano risultati positivi di proliferazione di gemme apicali e laterali di *Forsythia europaea* su terreno MS con BAP (2,25 mg/L) e NAA (0,186 mg/L) in un rapporto più alto che nel nostro caso (12:1). Va sottolineato che la produzione di un numero considerevole di piantine durante le subcolture è dovuta non solo alla crescita delle piante in lunghezza, ma anche alla formazione di germogli avventizi secondari e terziari in presenza di citochinina (BAP) nel substrato.

Inoltre, mantenere le piantine fino a 5 settimane nel substrato della subcoltura è considerato un fenomeno positivo, che stimola il callo e la radicazione delle piantine. La presenza di auxina (NAA) nel substrato delle successive subcolture è un fattore importante per l'inizio della formazione delle radici durante la fase di rizogenesi. La presenza della citochinina BAP in combinazione con l'auxina NAA ha stimolato l'inizio della radicazione.

Per quanto riguarda la fase dell'organogenesi indiretta, che include la formazione di nuovi organi, l'induzione di germogli non è stata raggiunta, come è risultato in altri nostri esperimenti (Kongjika et al., 2003). Quindi, la formazione di nuove piantine da gemme (organogenesi diretta) è considerata il modo migliore per creare collezioni di popolazioni *in vitro*, eliminando anche potenziali insorgenze di variazioni somaclonali.

I risultati positivi della micropropagazione sono alla base della conservazione *in vitro* a breve termine del materiale vegetale della specie endemica *Forsythia europaea*, attraverso l'applicazione della crescita rallentata a bassa temperatura (4° C).

In conclusione, il metodo di organogenesi diretta a partire da iniziali espianti organizzati (gemme) nel terreno nutritivo MS con l'aggiunta di fitormoni citochinine/auxine in rapporto 10:1 rappresenta la modalità ottimale di micropropagazione della specie endemica *Forsythia europaea* in un ciclo completo (dalla fase di proliferazione alla produzione delle piante trasferite al suolo). Questo protocollo di micropropagazione risulta utile per la successiva conservazione *in vitro* a breve termine del materiale vegetale di *Forsythia europaea*.

Bibliografia

- Dewolf G.P., Hebb R.S., 1971. The Story of Forsythia. *Arnoldia*, Arnold Arboretum of Harvard University, 31 (2): 41-63.
- Jauron R., 2006. Growing Forsythias in the Home Landscape. In: Horticulture and Home Pest News. Extension and Outreach. Iowa State University, pp. 25-26.
- Kongjika E., Çausi E., Preçi B., Zekaj Zh., Çeko A., Leventakis N., Grigoriadu K., Tabaropoulos A., 2003. Estimation of some micropropagation methods for the introduction of kiwiplant (*Actinidia* spp.) in Albania. *AJNTS Albanian Journal of Natural and Technical Sciences*, 13 (1): 17-35.
- Lloyd G., Mccown B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*). *International Plant Propagation Society, Comb. Proc.* 30: 421–427.
- Mitrović A., Živanović B., Milivojević S., Čulafić L.J., 2001. In vitro propagation of *Forsythia europaea* Deg. and Bald. *Ekologija*, 35 (1): 65-71.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473 – 497.
- Vangjeli J., Ruci B., Mullaj A., 1995. “Il libro rosso. Piante minacciate e rare dell’ Albania” (in albanese), p. 35.

Germinabilità *in vitro* e vitalità di polline conservato a diverse temperature in specie arboree da frutto

Carla Benelli^{1*}, Edgardo Giordani², Daniele Bonetti³, Stefania Nin³

¹ Consiglio Nazionale delle ricerche - IBE-CNR, Sesto Fiorentino (FI)

² Università di Firenze - DAGRI, Sesto Fiorentino (FI)

³ CREA - Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pescia (PT)

* carla.benelli@ibe.cnr.it

Riassunto

La vitalità e germinabilità di campioni di granuli pollinici prelevati da importanti impollinatori di tre specie da frutto ‘case study’ (olivo, kaki, actinidia) sono state saggiate dopo la conservazione a diverse temperature di conservazione (+4, -20, -80 e -196 °C / azoto liquido) per diversi periodi di tempo (30, 90, 180 e 360 giorni). La conservazione in azoto liquido è risultata un metodo di conservazione efficace per tutti i genotipi testati di olivo, kaki e actinidia. La temperatura di 4 °C ha consentito di preservare il polline per un periodo di tempo limitato, con tassi di vitalità e germinabilità inferiori.

Parole chiave: crioconservazione, impollinatori, olivo, kaki, actinidia

Effect of storage temperature on pollen viability and *in vitro* germinability of fruit tree species

Abstract: The viability and *in vitro* germinability of pollen grain samples of three fruit tree species (olive tree, persimmon, and kiwifruit) were tested after storage at +4 °C, -20 °C, -80 °C and in liquid nitrogen (LN, -196 °C) for 30, 90, 180 and 360 days in comparison to fresh pollen samples (control). All species showed high percentages of fresh viable pollen grains, but kiwifruit cultivars showed higher germinability compared to olive tree and persimmon. In all species, the germination capacity decreased over time, being more evident when olive and persimmon samples were stored at +4 °C, with values close to zero after 30 days of storage. The ultra-low temperatures (-80 °C and -196 °C) exerted, albeit to a variable extent, a positive effect on pollen fertility. After 360 days of conservation germination rates of kiwifruit samples averaged 21.2-21.6% lower than those recorded in fresh pollen grains, whereas in olive tree and persimmon the germinative power was reduced by 32.8-65.9% and 68.5-87.8%, respectively, compared to the control, with significant differences between the tested cultivars. Storage in liquid nitrogen proved to confer greater longevity. More precisely, germination was constant over time in the kiwifruit samples, while in olive tree and persimmon LN storage allowed to have rates of germinable pollen grains up to 4.3% and 10%, respectively.

Keywords: cryopreservation, pollinators, olive tree, persimmon, kiwifruit

Introduzione

Il polline è essenziale per l'allegagione e lo sviluppo di frutti di buona qualità in una moltitudine di specie arboree da frutto. La sua conservazione è uno strumento importante per il mantenimento delle risorse genetiche. Inoltre, la facilità di stoccaggio e di spedizione del polline, nonché la potenzialità di utilizzo immediato, facilitano lo scambio di germoplasma e rendono più efficaci le strategie dei programmi di breeding. In particolare, la conservazione del polline risulta fondamentale per specie in isolamento geografico o caratterizzate da una mancata sincronia di fioritura a causa della loro natura dioica

che rende spesso necessaria un'impollinazione artificiale per ottenere, incrementare e/o diversificare la produzione di frutti. Diversi sono i fattori che possono influenzare la longevità del polline, tra cui le condizioni ambientali come la temperatura e umidità, la maturità del polline, il tempo di raccolta e la metodologia di stoccaggio (Volk, 2011). La vitalità del polline può diminuire a seconda delle condizioni di conservazione nel tempo. L'applicazione di metodi convenzionali per la conservazione del polline a temperatura ambiente (25-30 °C) o a basse temperature (4-20 °C), è stata riportata con successo in diverse specie ottenendo un mantenimento a breve o medio termine, mentre per una conservazione a lungo termine possono essere impiegati metodi innovativi, come la crioconservazione, cioè l'immersione di campioni in azoto liquido (AL) ad ultra-basse temperature (-196 °C) (Dinato et al., 2020). Durante il periodo di stoccaggio possono verificarsi alcuni eventi che determinano il deterioramento del polline, come l'interruzione dell'integrità intracellulare, la diminuzione dell'attività enzimatica, l'accumulo di radicali liberi e la de-esterificazione e perossidazione dei lipidi di membrana (Song e Tachibana, 2007). Per questo motivo un efficace metodo di verifica sia della vitalità che della germinabilità dopo un periodo di conservazione risultano di fondamentale importanza. Il presente studio esamina lo stato del polline conservato a differenti temperature in alcune importanti specie da frutto (olivo, kaki, actinidia) in termini di vitalità e germinabilità *in vitro* e fornisce indicazioni sul periodo di conservazione delle specie suddette.

Materiali e Metodi

Raccolta del materiale

Campioni di polline sono stati prelevati da tre specie arboree da frutto che rappresentano una realtà importante per le economie di molte parti del territorio italiano ma che possono presentare problemi di impollinazione e quindi scarsa produttività. 1) *Olea europea* (olivo): 8 cultivar (Canino, Frantoio, Leccino, Maurino, Pendolino, Puntino Arbequina e Koroneiki); 2) *Diospyros* spp. (kaki): *D. kaki* (cv. Mizushima Gosho e due semenzali S1 e S2), *D. lotus* e *D. virginiana*; 3) *Actinidia deliciosa* (kiwi): 2 cultivar impollinatrici, Tomuri e Matua. Il polline è stato prelevato in una giornata di sole a fine maggio da fiori in piena antesi posti su 4 punti cardinali della chioma.

Test per la vitalità e la germinabilità in vitro del polline

La fertilità del polline è stata valutata mediante il test di vitalità e di germinabilità *in vitro* su polline fresco (temperatura ambiente e tempo zero), considerato il controllo, e dopo ogni periodo di conservazione (30, 90, 180, 360 giorni) alle diverse temperature (+4 °C, -20 °C, -80 °C e -196 °C). I campioni di polline per la conservazione a -196 °C, sono stati posti in *cryovial* e mantenuti in AL, al momento dell'uso sono stati scongelati per 2 ore sotto cappa a flusso laminare. I test sono stati eseguiti su granuli pollinici, usando 3 repliche per ogni combinazione cultivar * temperatura * tempo.

La vitalità dei granuli pollinici è stata valutata mediante il test con diacetato di fluosceina/ioduro di propidio (FDA-PI) (Heslop-Harrison, 1970). I granuli pollinici sono stati incubati al buio per 24 h a 25 °C ed osservati con microscopio ottico Leica DM 1000 con lampada al mercurio ad alta pressione da 50 W ad eccitazione blu (450-490 nm) e taglio a 510 nm. I granuli con colorazione verde brillante sono stati considerati vitali (V), mentre quelli di colore verde opaco non vitali (NV) (Radice et al., 2003; Ferri et al., 2008). La germinabilità *in vitro* è stata valutata su terreno di coltura gelificato contenente 150 g/L di saccarosio, 50 mg/L acido borico e 6 g/L di phytoagar. Dopo incubazione per 24 h a 24 °C, i granuli pollinici sono stati considerati germinati quando il tubetto pollinico ha raggiunto una lunghezza ≥ 3 volte il diametro del granulo (Pinney e Polito, 1990). Le immagini per le osservazioni al microscopio ottico e il conteggio dei granuli vitali, non vitali, germinati e non germinati sul totale dei granuli pollinici sono state acquisite tramite il software Image Tool. Per ogni trattamento sono stati conteggiati almeno 200 granuli per la vitalità, e circa 500 granuli per la germinabilità *in vitro*. I dati sono stati sottoposti al test X^2 per $p=0,05$. Il coefficiente di correlazione è stato calcolato tra le quantità di granuli di polline vitali e germinati (software SPSS versione 19).

Risultati e Discussione

La tab. 1 riassume i risultati ottenuti per le tre specie, in termini di significatività rispetto ai fattori considerati. Durante la conservazione la vitalità e la germinabilità *in vitro* dei granuli pollinici di tutte le specie e cultivar saggiate hanno mostrato un comportamento simile, con valori crescenti al diminuire della temperatura di conservazione (Tab. 2) e con valori decrescenti all'aumentare del periodo nella conservazione a lungo termine (180 e 360 giorni; Tab. 3). Queste osservazioni sono in accordo con i risultati riportati da altri autori su jojoba, olivo, mandorlo e kiwi (Lee et al., 1985; Pinney e Polito, 1990; Ferri et al., 2008; Borghezian et al., 2011; Sorkheh et al., 2011). Infatti, la bassa temperatura riduce la mobilità molecolare nel citoplasma, che può essere un fattore di controllo della longevità del polline (Dafni e Firmage, 2000). In generale, le temperature più basse (-80 °C e -196 °C) hanno consentito di conservare il polline vitale e germinabile fino a un anno, mentre quelle più elevate (-20 °C e 4 °C) hanno garantito una conservazione fino ad un massimo 30 giorni, seppure in olivo e kaki con tassi di vitalità e germinabilità molto inferiori rispetto all'actinidia. La vitalità pollinica è risultata sempre mag-

Tab. 1. Effetto dei fattori considerati (Cv, Tm, Tc) sulla longevità del polline nelle tre specie.

Tab. 1. Significance of single and combined effects of factors for pollen longevity of the three species.

Fattori	Germinabilità			Vitalità		
	Olivo	Kaki	Actinidia	Olivo	Kaki	Actinidia
Cultivar (Cv)	**	**	ns	**	ns	**
Temperatura (Tm)	**	**	**	**	*	**
Tempo conservazione (Tc)	**	**	**	**	**	**
Cv * Tm	ns	ns	ns	*	ns	ns
Cv * Tc	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tm * Tc	ns	**	**	ns	ns	**
Cv * Tm * Tc	ns	ns	**	ns	ns	ns

Tab. 2. Effetto della temperatura di conservazione sulla germinabilità *in vitro* e vitalità del polline.

Tab. 2. Effect of storage temperature on pollen *in vitro* germinability and viability.

Specie	Germinabilità %				Vitalità %			
	+4 °C	-20 °C	-80 °C	-196 °C	+4 °C	-20 °C	-80 °C	-196 °C
Olivo								
Arbequina	0	1.4	2.3	3.6	14	21.3	14.4	32
Canino	2	2.7	4	5	12.3	16.6	36	37.8
Frantoio	0.7	1.1	3.2	3.7	25.4	32.5	35.7	35.5
Koroneiki	2.3	3.2	3.8	5	23.7	25.1	29.2	37.2
Leccino	1.5	4.8	5.9	8.3	15.5	31.6	37.8	36.8
Maurino	2.4	3	3.7	6.2	16.7	23	31	34.5
Pendolino	1.3	2.6	3.9	4.3	15	25.5	30.7	34
Puntino	1.5	2.8	5.2	7.5	11.5	18.5	24.7	23.8
Kaki								
D. lotus	1.9	4.8	6.9	11.2	18.8	42.4	49.6	49.5
Mizushima Gosho	1.7	1.7	4.7	6.4	31.9	35.9	51.3	52
S1	1.4	1.2	2.7	3.7	39.8	41	46.3	42.8
S2	2.5	2.7	6.5	11.4	34.3	42.6	46	58.9
D. virginiana	1.7	3	7.5	10.9	40.9	43.8	50.3	50.6
Actinidia								
Matua	10.9	26.8	33.1	48.8	38.8	59	76.8	84.4
Tomuri	12.2	30.9	44.7	55.5	33.5	56.3	72.9	80.7

Tab. 3. Germinabilità e vitalità del polline dopo 180 e 360 giorni di conservazione a +4 °C, -20 °C, -80 °C e -196 °C.

Tab. 3. Pollen viability and in vitro germination after 180 and 360 days of storage at +4°C, -20 °C, -80 °C and -196 °C.

Giorni	Specie	Germinabilità %				Vitalità %			
		+4 °C	-20 °C	-80 °C	-196 °C	+4 °C	-20 °C	-80 °C	-196 °C
180	<i>Olivo</i>	0.6	1.4	2.2	3.4	13.3	21.4	25.9	30.7
	<i>Kaki</i>	0	0.1	4.5	7	17	22.2	30.1	39.9
	<i>Actinidia</i>	12.2	65.8	66.4	56	51.5	76.3	81.1	82.4
360	<i>Olivo</i>	0.2	0.7	1.6	2.7	10.5	17.8	23.3	28.2
	<i>Kaki</i>	0	0	2.9	7.8	6	4.9	8.2	14.4
	<i>Actinidia</i>	45.2	38.4	49.8	45.5	14.7	60.9	80.3	83.3

giore rispetto alla germinabilità e la correlazione tra questi parametri è stata significativa ($p > 0.01$), ma bassa per olivo ($R^2 = 0,45$) e kaki ($R^2 = 0,41$), più elevata per actinidia ($R = 0,64$). Ogni cultivar di olivo ha mostrato una propria vitalità e capacità germinativa del polline fresco a temperatura ambiente. Pendolino e Leccino hanno evidenziato una maggiore vitalità del polline (48 e 48,8% rispettivamente); in Leccino anche la percentuale di germinazione è stata elevata (17,2%), seguita da Puntino (14,2%), Koroneiki (13,5%), Canino (13,4%) e Maurino (12,9%). Dopo 30-90 giorni in AL Leccino ha mantenuto una maggiore capacità germinativa (13,4 e 12,8%), a cui hanno fatto seguito Puntino e Maurino con 12,2% e 11,4%, rispettivamente, dopo 30 giorni in AL. La cv. Arbequina è stata caratterizzata da minore germinabilità nei vari trattamenti saggiati (0% a +4 °C; 0-2% a -20 °C; 1,6-3,7% a -80 °C; 2,6-4,6% a -196 °C). Al termine dei 360 giorni di stoccaggio, la germinabilità del polline di olivo conservato a -80 °C e -196 °C ha registrato valori all'interno di un range compreso tra 1,1 - 2,5% e 1,6 - 3,7%. Similmente all'olivo, il polline fresco prelevato da *Diospyros spp.* ha mostrato una elevata vitalità con valori compresi tra 79,3% e 86,3%, ma la sua germinabilità è risultata molto ridotta, con valori compresi tra un minimo di 5,1% in *D. kaki* S1 e un massimo di 14,8% in *D. lotus*. Dopo 360 giorni di conservazione alle temperature -80 e -196 °C sono stati osservati valori medi di germinazione superiori al 9% in *D. kaki* S2, *D. virginiana* e *D. lotus*, e di circa il 5% in *D. kaki* cv. Mizushima Goshō e S1. La germinazione è stata nulla in tutti campioni conservati per oltre 30 giorni a -20 °C e +4 °C. La vitalità dei campioni pollinici degli impollinatori di actinidia, Matua e Tomuri, ha assunto valori molto elevati (79,8% e 87,9%, rispettivamente) più simili a quelli osservati nel kaki, ma con una germinabilità più elevata, 57,0% e 58,7%, rispettivamente. Lo stoccaggio prolungato ha ridotto sensibilmente la germinabilità del polline mantenuto a +4 °C e -20 °C, mentre il suo effetto è stato minimo sui campioni preservati alle temperature di -80 °C e -196 °C, mostrando valori di poco inferiori rispetto al controllo e compresi tra il 44,7 - 55,9%.

Conclusioni

Ogni specie considerata è caratterizzata da una propria fertilità pollinica; tuttavia, in tutte le specie si è assistito ad un calo di potere germinativo nel tempo, molto più pronunciato quando i campioni sono stati conservati +4 °C, con valori che si sono attestati vicino alla zero già dopo 30 giorni di conservazione. Al contrario, le temperature ultra-basse (-80 °C e -196 °C) hanno esercitato, seppure in misura variabile, una azione positiva ai fini della fertilità pollinica. In particolare, la conservazione in azoto liquido è risultata un metodo di conservazione efficace per tutti i genotipi testati di olivo, kaki e actinidia. La germinazione si è mantenuta abbastanza costante nel tempo nei campioni di actinidia, con una riduzione del potere germinativo del 21,2-21,6% dopo 360 giorni, mentre in olivo e kaki la germinabilità si è ridotta nello stesso periodo di tempo del 32,8-65,9% e del 68,5-87,8%, con differenze significative tra le cultivar saggiate.

Bibliografia

- Borghezán M., Clauman A.D., Steinmacher D.A., Guerra M.A., Orth A.I., 2011. *In vitro* viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev) A. Chev). *Crop Breed Appl Biotechnol*, 11: 338-344.
- Dinato, N. B., Santos, I. R. I., Vigna, B. B. Z., De Paula, A. F., Fávero, A. P. 2020. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. *CryoLetters*, 41(3): 115-127.
- Dafni A., Firmage D., 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst Evol*, 222: 113-132.
- Ferri A., Bellini E., Padula G., Giordani E., 2008. Viability and *in vitro* germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. *Adv Horti Sci*, 22(2): 116-122.
- Heslop-Harrison J., Helsop-Harrison Y., 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol*, 45: 115-120.
- Lee C.W., John C., Thomas L., Stephen L., Buchmann S.L., 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of jojoba pollen. *J Am Soc Horti Sci*, 110(5): 671-676.
- Pinney K., Polito V.S., 1990. Olivo pollen storage and *in vitro* germination. *Acta Horti*, 286: 207-210.
- Radice S., Ontivero M., Giordani E., Bellini E., 2003. Morphology and physiology of pollen grains of Italian *Prunus persica* (L.) Batsch cultivars grown in Argentina. *Adv Horti Sci*, 17 (2): 93-96.
- Song J., Tachibana S. 2007. Loss of viability of tomato pollen during long-term dry storage is associated with reduced capacity for translating polyamine biosynthetic enzyme genes after rehydration, *Journal of Experimental Botany*, 58: 4235–4244,
- Sorkheh K., Shiran B., Rouhi V., Khodambashi M., 2011. Influence of temperature on the *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of various native Iranian almonds (*Prunus L. spp.*) *Species. Trees*, 25: 809-822.
- Volk G.M., 2011. Collecting pollen for genetic resources conservation. Chapter 25. In: Guarino, L., Ramanatha Rao, V., Goldberg, E., editors. *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. 1-10 (Update version).

Produzione di fonti primarie di vitigni autoctoni pugliesi

Leonardo Susca^{1*}, Giovanna Bottalico¹, Antonia Campanale², Massimo Morano, Oriana Potere¹, Pasquale Saldarelli², Raied Abou Kubaa², Pasquale Venerito³, Antonia Saponari³, Vito Nicola Savino³, Pierfederico La Notte²

* leonardo.susca@uniba.it

¹ Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università di Bari Aldo Moro

² Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante – IPSP, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

³ Centro Ricerca, Formazione e Sperimentazione in Agricoltura – CRSFA, Locorotondo (Ba)

Riassunto

Nell'ambito del progetto regionale multidisciplinare "Recupero del Germoplasma Viticolo Pugliese" (Re.Ge.Vi.P.) è stato condotto un programma di miglioramento sanitario per la costituzione di fonti primarie di vitigni autoctoni minori. Il germoplasma recuperato, risultato infetto per oltre l'85% da uno o più virus tra quelli contemplati dalla normativa vigente, è stato sottoposto a interventi di risanamento mediante termoterapia e coltura *in vitro* di apici meristemati. Le piante ottenute, dopo la verifica del risanamento mediante test molecolari (RT-PCR) condotti tre volte nell'arco di 2 anni, sono state introdotte e allevate in vaso nelle serre a rete del Centro regionale di conservazione del germoplasma del CRSFA.

Parole chiave: apici meristemati, termoterapia, risanamento, ELISA, test molecolari

Production of primary source of Apulian autochthonous grapevine cultivars

Abstract: As part of the multidisciplinary regional project "Recovery of Apulian Grapevine Germplasm" (Re.Ge.Vi.P.) aimed at the conservation and the study of autochthonous germplasm, 105 primary sources belonging to 93 minor and neglected table and winegrape cultivars have been produced. More than a thousand accessions have been identified and recovered on the regional territory in an area extended over 400 km in length. The plant material has been subjected to health checks; over 85% were infected with one or more viruses, some up to 5, among those included in the EU and Italian regulations on production and certification of grapevine propagation material. The infected plants were sanitized in order to improve their sanitary status as compliant with the current legislation. According to the viral agents detected, the sanitation protocols were applied using *in vitro* and/or *in vivo* thermotherapy and meristem tip-culture. The young plantlets were tested by molecular assay (RT-PCR) to verify their healthy status; a further test was conducted about 5-6 months after the first one to confirm the absence of viruses. A third further assay, by RT-PCR, was carried out after 2 years from the sanitation process. The primary sources, constituted and transplanted in large pots, are still grown and stored in insect-proof screen houses to exclude and prevent future potential reinfections.

Keywords: meristematic apex, thermotherapy, sanitation, ELISA, molecular test

Introduzione

Nell'ambito del progetto regionale multidisciplinare "Recupero del Germoplasma Viticolo Pugliese" (Re.Ge.Vi.P.) volto al recupero di cultivar e biotipi minori e autoctoni del territorio pugliese è stato avviato un ampio programma di miglioramento sanitario di varietà ad uva da tavola e da vino. Si è giunti all'individuazione di oltre 750 accessioni pugliesi, partendo dalla ricerca e dalla catalogazione di tutto il materiale fruibile sul web, dalla consultazione diretta di testi storici e manoscritti conservati presso le biblioteche nazionali, regionali, comunali e private e coinvolgendo associazioni culturali e privati cittadini detentori di preziose informazioni sulla presenza di germoplasma in loco non ancora catalogato.

In considerazione del precario stato sanitario della vite nelle regioni meridionali, essendo estremamente raro il ritrovamento in vecchi vigneti di piante sane, il materiale deve essere valutato sanitarimente e, se necessario, deve essere posto a risanamento, attività necessaria e propedeutica alla registrazione dei cloni al Catalogo Nazionale delle Varietà di Vite.

Il risanamento della vite dalle principali infezioni virali non rappresenta più un problema, sia se affrontato attraverso l'utilizzo di metodi classici quali la termoterapia e la coltura *in vitro* di apici meristemati, da soli o in combinazione tra loro (Gribaudo et al., 1997; Bottalico et al., 2000), sia mediante tecniche più complesse ma altrettanto efficaci quali l'embriogenesi somatica (Goussard e Wiid, 1993). La conoscenza delle specie virali coinvolte nell'infezione è fondamentale per la scelta della tecnica da adottare. In base agli agenti virali presenti sono applicabili la termoterapia *in vitro* e/o *in vivo* e la coltura di apici meristemati. Solo le piante che, in seguito agli accertamenti sanitari di laboratorio, risulteranno esenti dalle più importanti malattie della vite (contemplate dalla vigente normativa sulla certificazione dei materiali di propagazione della vite) saranno sottoposte ad indexaggio biologico e successivamente daranno origine alle piante capostipiti, definite Fonti primarie.

Materiali e Metodi

Il recupero dell'ampio patrimonio viticolo è partito da indagini bibliografiche, condotte soprattutto sui Bollettini Ampelografici, in cui si rilevava la presenza in Puglia di oltre 200 nomi di presunti vitigni nei diversi areali di coltivazione; nell'arco dei cinque anni di attività più di mille accessioni sono state recuperate sul territorio regionale in un'area estesa per oltre 400 Km di lunghezza. Le varietà individuate sono state identificate in via preliminare, fotografate e georeferenziate, si è quindi proceduto alla raccolta di materiale di propagazione da avviare alla moltiplicazione ai fini conservativi (La Notte et al., 2018).

L'assenza di dati sullo stato sanitario delle accessioni recuperate ha richiesto saggi fitosanitari per il rilevamento dei virus contemplati dalla normativa UE ed italiana per la produzione e la certificazione di materiale di propagazione della vite. Le piante delle varietà più interessanti, per le quali non è stato rinvenuto materiale sano, sono state avviate a risanamento.

Accertamenti sanitari

Il materiale vegetale recuperato durante le esplorazioni territoriali è stato sottoposto ad accertamenti sanitari per verificare la presenza degli agenti virali contemplati nei disciplinari di produzione del materiale di propagazione della vite vigenti al momento del progetto, DM 07/07/2006 e DM 24/06/2008. Le talee legnose sono state analizzate attraverso saggi immunoenzimatici utilizzando kit commerciali, con protocollo ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Faggioli et al., 2013). In particolare, l'indagine diagnostica ha riguardato i virus A e B della vite (GVA: Grapevine virus A; GVB: Grapevine virus B), dei virus associati all'accartocciamento fogliare della vite (GLRaV-1,-2 e -3: Grapevine Leafroll associated Virus 1, 2 3), dei virus del complesso dell'ariccimento della vite (GFLV: Grapevine Fanleaf Virus; ArMV: Arabis Mosaic Virus), del virus della maculatura infettiva della vite (GFkV: Grapevine Fleck Virus).

Risanamento

Dalle piante madri infette delle varietà/accessioni scelte per il miglioramento sanitario, sono state prelevate talee dormienti che, dopo un breve periodo di frigoconservazione a 4° C, sono state moltiplicate per autoradicazione al fine di ottenere materiale vegetale da utilizzare per i trattamenti di risanamento.

A seconda del tipo di virus presente, il materiale vegetale infetto è stato sottoposto a:

1. Coltura *in vitro* di apici meristemati: tale tecnica è stata utilizzata per le piante che presentavano infezioni singole o miste di GVA, GVB, GFkV e closterovirus 1, 2 e 3 seguendo i protocolli in uso

presso il laboratorio e descritti in precedenti lavori (Bottalico et al., 1997; 2000; 2003). Partendo da giovani germogli di circa 10 cm in lunghezza prelevati dalle piante infette allevate in condizioni controllate, dopo sterilizzazione con soluzione di ipoclorito di sodio al 10% (0,5% di cloro attivo) per 20 minuti, con l'ausilio di uno stereomicroscopio, sono stati prelevati gli apici meristemati di dimensioni variabili tra 0,4 -0,8 mm. Gli apici, comprendenti 1 o 2 primordi fogliari, sono stati posti su un mezzo nutritivo contenente macroelementi Quorin e Lepoivre (1978) mod., microelementi MS (Murashige e Skoog, 1962), vitamine Llyod e McCown (1980), 6-Benzilaminopurina 0,5 mg/L, saccarosio 30g/L e Plant agar 7 g/L (Duchefa), conservati in camera climatica per 30/40 giorni a temperatura di 24 °C, illuminazione con lampade a luce bianca fredda, circa 3000 lux, fotoperiodo 16/8 h. Da ogni apice meristemato, dopo una fase di accrescimento, moltiplicazione e allungamento, utilizzando il medesimo substrato di coltura, nell'arco di 2/3 mesi si sono ottenute 4-5 piantine per apice. Ogni singola piantina è stata ambientata *in vivo* in dischi di torba precompressa (Jiffy 7-pots). Le piante sono state coperte con film plastico e allevate in condizioni controllate di temperatura 24 °C, intensità luminosa di 3000 lux e fotoperiodo 16/8 h per 15/20 giorni. Dopo questo periodo di preambientamento sono state nuovamente trapiantate in vasi (10x10) con una miscela di terriccio sterile (Brill 1- Agrochimica) e sottoposte ad un primo saggio diagnostico; successivamente trasferite in serra in attesa della ulteriore verifica dello stato sanitario.

2. Termoterapia *in vivo* associata a coltura *in vitro* di apici meristemati. Alcune piante madri con infezione da GFLV, singola o associata ad altri virus, sono state immerse in camera calda a circa 38 °C di temperatura, luminosità di 5000 lux, fotoperiodo 16/8 h e umidità 50-60%, per tempi variabili da 60 a 90 giorni. Allo scadere rispettivamente dei 60 giorni (A) e 90 giorni (B) di permanenza alle alte temperature, si è proceduto al prelievo degli apici meristemati utilizzando la stessa procedura descritta precedentemente; gli apici sono stati ambientati e le giovani piantine sottoposte ai saggi diagnostici di verifica sanitaria.
3. Termoterapia *in vitro* associata a coltura di apici meristemati. Questa tecnica è stata applicata per le accessioni con infezione da GFLV, singola o mista, delle quali non si era ancora in possesso di piante radicate ma solo di talee germogliate. Per procedere alla termoterapia *in vitro*, dopo la stabilizzazione *in vitro* di talee uninodali, i germogli sviluppati sono stati moltiplicati; raggiunto il numero di 4-5 piantine per germoglio si è proceduto al trasferimento di quest'ultimi in vasi di vetro che sono stati posti in camera calda alle stesse condizioni descritte in precedenza per 20 giorni (I), 40 giorni (II) e 60 giorni (III). Dopo ogni ciclo di termoterapia dal materiale termotrattato sono stati prelevati gli apici meristemati ed allevati sul medesimo mezzo di coltura. Gli apici sopravvissuti sono stati ambientati seguendo le stesse modalità descritte per le altre tecniche.

Saggi di verifica risanamento

Le giovani plantule ambientate di circa due mesi d'età provenienti dai trattamenti di risanamento sono state saggiate mediante la tecnica della RT-PCR (Faggioli et al., 2013) per il rilevamento mirato dei virus già citati. Tutte le piante risultate sane al primo saggio di verifica, sono state sottoposte ad un secondo saggio diagnostico a distanza di circa 5-6 mesi dal primo per confermare l'assenza degli agenti virali presenti sulla pianta madre. Le piante risultate negative anche al secondo saggio sono state sottoposte ad un trapianto in vasi di dimensioni adeguate alla crescita e trasferite in serra a rete a prova di insetto. Un'altra verifica, sempre mediante saggio RT-PCR, è stata effettuata sulle stesse piante ad oltre 2 anni dall'ambientamento (Abou Kuba et al., 2018).

Fonti primarie

Le Fonti primarie così costituite sono state conservate nelle serre a rete del Centro Regionale di Conservazione del germoplasma autoctono del Centro Ricerche, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura – CRSFA a Palagiano (TA) in condizioni tali da evitare possibili reinfezioni.



Fig. 1. Programma di miglioramento sanitario per il recupero di germoplasma viticolo autoctono pugliese eseguito nell’ambito dei progetti regionali Re.Ge.Vi.P.

Fig. 1. Health improvement program for the recovery of native Apulian grapevine germplasm carried out within the Re.Ge.Vi.P projects.

Risultati

Complessivamente, sono state censite e mappate oltre 750 accessioni (La Notte et al., 2018). Oltre l’84% del materiale recuperato è risultato infetto da uno o più virus, in alcuni casi fino a 5 (Tab. 1), tra quelli contemplati nei disciplinari di produzione e certificazione del materiale di propagazione della vite (Morelli et al., 2015). Il virus maggiormente diffuso è stato il GLRaV3 seguito dal GFKV, rispettivamente presenti nell’82% e 53% dei campioni selezionati (Tab. 2).

La percentuale media di risanamento totale attraverso la tecnica di coltura *in vitro* di apici meristematici è stata di circa il 94% mentre considerando i singoli virus del 95,1% per GVA, del 91,8 % per GFKV, del 90,5% per GFLV e del 98,5% per i closterovirus.

La termoterapia *in vivo* è stata efficace nel risanamento da GFLV partendo dal secondo ciclo (90 gg) anche se la sopravvivenza delle piante è ridotta. Attraverso l’applicazione della termoterapia *in vitro*, si è raggiunto un risanamento totale del 96,5% già dopo un solo ciclo (I) di trattamento e del 97,1% dopo due cicli (II). Non è stato possibile valutare l’efficacia della termoterapia applicata al terzo ciclo (III) in quanto la maggior parte del materiale non è sopravvissuto all’ulteriore trattamento.

Le attività di miglioramento sanitario hanno consentito di costituire 105 fonti primarie appartenenti a 93 varietà di uva da vino e da tavola (Tab. 3); le piante sono state poste in conservazione nelle serre a rete a prova d’insetto del Centro regionale di Conservazione del germoplasma del CRSFA Basile-Caramia di Locorotondo (BA) a Palagiano (TA).

Tab. 1. Incidenza delle infezioni multiple da vitivirus (GVA, GLRaV1, GLRaV3, GFLV, GFKV) rilevate sulle accessioni recuperate nell’ambito del progetto.

Tab. 1. Incidence of multiple vitivirus infections (GVA, GLRaV1, GLRaV3, GFLV, GFkV) on selected germoplasm.

Presenza di 1 virus	Presenza di 2 virus	Presenza di 3 virus	Presenza di 4 virus	Presenza di 5 virus
19%	28%	35%	16%	3%

Tab. 2. Incidenza dei virus GVA, GLRaV3, GLRaV1, GFLV, GFkV sul germoplasma recuperato.

Tab. 2. Virus incidence GVA, GLRaV3, GLRaV1, GFLV, GFkV on selected germoplasm.

GLRaV3	GFKV	GVA	GFLV	GLRaV1
82%	53%	51%	30%	29%

Tab. 3. Elenco dei vitigni di uve da tavola e da vino a cui appartengono le 105 fonti primarie costituite.
 Tab. 3. List of table and wine grape varieties/accession of the primary sources constituted.

N.	Vitigno	N.	Vitigno	N.	Vitigno
1	Acchitedda	32	MN Verd	63	Sagra
2	Apesorgia	33	Moscatiddone Nera	64	Sagrone Rosso
3	Attuario Bianco	34	Moscato	65	San Leonardo
4	Baresana Bianca	35	Moscato Bianco	66	San Lorenzo
5	Baresana Rossa	36	Moscato Giallo	67	San Martino
6	Beccarosa	37	Moscato N. allungato	68	Sant'Anna
7	Bellitalia	38	Moscato Tamburro	69	San Pietro
8	Bianco d'Alessano Ceglie	39	Moscato di Novoli	70	Sarago 1
9	Bombino B.	40	Nardo Bello	71	Sarago 2
10	Bosco Quarto	41	Nera Tosta	72	Scannapecora
11	Calma di Brindisi Nera	42	Ottaviano	73	Sciali
12	Cardinale	43	Paglione Bianco	74	Sciali+vigoroso
13	Chiapparone Rep.2	44	Pansè Precoce	75	Sciaunessa B.
14	Ciccilluzzo	45	Pedicinaro	76	Sciosciallà
15	Cigghiosa	46	Pia 1 chiesa Carmelitani	77	Sciosciallà Rosso
16	Cigliola Bianca 3	47	Piè di Cocola	78	Sgarraparete
17	Colangelo	48	Plaus B.	79	Somarello N.
18	Colangelo Nero	49	Plaus N.	80	Somarello Rosso
19	Copeta	50	Porcinaro	81	Terrizzuolo
20	Corniola Bianca	51	Precocissima B.	82	Tintiglio
21	Corniola Rossa	52	Prezzemolino	83	Tinturino
22	Dolciolo	53	Primitivo	84	Trebbiano San Severo
23	Dundurin	54	Prunesta	85	Tuccanese
24	Fior d'Arancio	55	Prunesta Bianca	86	Uannazz
25	Fragola Bianca	56	Prunesta Nera Ospedale	87	Uva di Angela
26	Fragolino Bianco	57	Regina Rosa	88	Uva Fragola
27	Gaglioff 2	58	Regina Nera	89	Uva Romana
28	Latina	59	Romana	90	Uva Perla
29	Macchia	60	Rosso di Lecce	91	Vespro
30	Malvasia antica	61	Sacra Nera	92	Vitigno di Canosa
31	Mezza Turchesca	62	Sacra Rossa	93	Zibibbo Tipo Regina

Discussione e Conclusioni

I dati riportati dimostrano ancora una volta l'efficacia della coltura *in vitro* di apici meristemati nei programmi di miglioramento sanitario della vite su vasta scala. Per massimizzare le percentuali di risanamento risulta tuttavia fondamentale conoscere la specie virale da cui risanare per poter applicare la tecnica più adeguata ed efficace.

In particolare, nel risanamento dai vitivirus (GVA e GVB) e closterovirus (GLRaV 1, 2 e 3) a localizzazione floematica la sola coltura *in vitro* di apici meristemati riesce a dare ottimi risultati. Per i virus parenchimatici come i nepovirus (GFLV) invece è fondamentale la presenza di un trattamento in termoterapia da effettuarsi indifferentemente su piante *in vivo* o *in vitro*. Naturalmente nel caso di infezioni miste è necessario abbinare le due tecniche.

L'esperienza maturata conferma che è possibile costituire Fonti primarie di vite, partendo da germoplasma selezionato, nell'arco di 3-4 anni.

Bibliografia

- Abou Kubaa R., Morelli M., Campanale A., Morano M., Susca L., La Notte P. F., Minafra A., Saldarelli P., Savino V. N., Bottalico G., 2018. Improvement of a protocol for sanitation and early diagnostic validation of autochthonous grapevine germplasm. Proceedings of the 19th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG) Santiago Chile, April 9-12, pp. 128-129.
- Bottalico G., Savino V., Campanale A., 1997. Improvements in the *in vitro* culture of meristem shoot tips for sanitation and establishment of rooted explants. Extended Abstract XII Meeting of ICGV, Lisbona: 163-164.
- Bottalico G., Savino V., Campanale A., 2000. Improvements in grapevine sanitation protocol. Proc. 13th Meeting ICGV, Adelaide (Australia), Marzo 2000, pp. 167.
- Bottalico G., Campanale A., La Notte P., Pirolo C., Savino V., 2003. Sanitation of wine grape selections from central and southern Italy. In: Proceedings of the 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Locorotondo (Bari), Italy, September 13-17th, pp. 256.
- Faggioli F., Anaclerio F., Angelini E., Bertazzon N., Antonelli M.G., Bianchi G., Bianchedi P., Bianco P., Botti S., Bragagna P., Cardoni M., Casati P., Credi R., De Luca E., Durante G., Gianinazzi C., Gambino G., Gualandri V., Luison D., Luvisi A., Malossini U., Mannini F., Saldarelli P., Terlizzi F., Triolo E., Trisciuzzi N., Barba M., 2013. Harmonization and validation of diagnostic protocols for the detection of grapevine viruses covered by phytosanitary rules. *Advances in Horticultural Science*, 27: 107-108.
- Goussard P.G., Wiid J., 1993. The use of *in vitro* somatic embryogenesis to eliminate phloem limited virus and nepovirus from grapevines. Abstr. 11th Meet. ICGV, Montreux (CH), 88GO.
- Gribaudo I., Mannini F., Lenzi R., 1997. Virus elimination in grapevine cultivars of North-Western Italy through meristem culture and *in vitro* thermotherapy. Proceedings of the 12th meeting ICGV, Lisbona, Portogallo, pp. 165-166.
- Lanotte P.F., Civita F., Raimondi S., Schneider A., 2018. Atlante dei Vitigni tradizionali di Puglia. https://www.researchgate.net/publication/334655463_Atlante_dei_vitigni_tradizionali_di_Puglia
- Lloyd G.B., Mccown B.M., 1980. Commercially feasible micropropagation of montian laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proceedings International Plant Propagation Society 30: 412-427.
- Morelli M., Zicca S., Bottalico G., Campanale A., Calderaro M., Donatelli G., Saldarelli P., Pirolo C., Savino V.N., La Notte P.F., 2015. Virus infections and sanitation of ancient native grapevine cultivars from Apulia. Proceedings of the 18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), September 7-11, Ankara, Turkey, pp. 242.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Quorin M., Lepoivre P., 1978. Improved media for the *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Hort.* 78: 437-442.

Effetto della composizione dell'endosperma artificiale sulla conversione di microtalee incapsulate di luppolo, var. Cascade e Columbus

Leandra Leto^{1*}, Simona Lucia Facchin², Chiara Ledda², Maurizio Micheli², Benedetta Chiancone¹

* leandra.letto@unipr.it

¹ Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma

² Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università di Perugia

Riassunto

Il settore vivaistico italiano non essendo ancora specializzato nella propagazione del luppolo non sempre riesce a soddisfare la crescente richiesta di piante da parte dei luppolicoltori. Le colture *in vitro* possono essere di supporto alla propagazione tradizionale per ottenere, indipendentemente dalla stagionalità, una produzione su larga scala di piante *true-to-type*. Al fine di poter valutare la tecnica dell'incapsulamento come metodo di propagazione del luppolo, in questa ricerca è stata valutata l'influenza della composizione dell'endosperma artificiale sulla risposta di microtalee incapsulate di 'Cascade' e 'Columbus'.

Parole chiave: *Humulus lupulus* L., colture *in vitro*, 6-benzilaminopurina, seme sintetico.

Effect of the artificial endosperm composition on the conversion of encapsulated microcuttings of hops, var. Cascade and Columbus

Abstract: Since 2010, in Italy, thanks to laws that regulate and protect hop growers and to the increasing number of microbreweries, there has been an increment of hop (*Humulus lupulus* L.) plant request, difficult to be fully satisfied by nurseries. *In vitro* tissue culture techniques are a valid alternative to traditional methods of multiplication by cuttings, suckers, rhizomes, etc., with the added benefit of being independent of the seasonality. In this study, two hop cultivars, Cascade and Columbus, were evaluated to be *in vitro* propagated, resorting to the encapsulation technique. Specifically, for both genotypes, microcuttings were encapsulated using artificial endosperms, different for the 6-benzylaminopurine concentration (0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L) and their vegetative parameters were monitored and registered. Results obtained showed that both genotypes well responded to the encapsulation technique, with a high genotype dependence; indeed, for all the parameter tested cv. Cascade showed better results than cv. Columbus. Moreover, for 'Columbus' the use of artificial endosperm, enriched with 1.5 mg/L, better stimulate encapsulated microcuttings to proliferate and to convert. This study provides new information about the potential and the limitations of the hop encapsulation technique and highlights, furtherly, the necessity to carry on investigating, to develop specific protocols, much more genotype-tailored, to support hop propagation at nursery level.

Keywords: *Humulus lupulus* L., *in vitro* cultures, 6-benzylaminopurine, synthetic seed

Introduzione

La pianta di luppolo, *Humulus lupulus* L. è coltivata in tutto il mondo, principalmente, per le sue infiorescenze che contengono oli essenziali e resine che conferiscono alla definizione delle caratteristiche qualitative della birra (Zanoli e Zavatti, 2008). Negli ultimi anni, in Italia, si sta assistendo a un aumento delle superfici destinate alla luppolicoltura, dovuto ad incentivi statali e alla crescente comparsa di birrifici artigianali (Carbone et al., 2017). Purtroppo, il settore vivaistico non riesce a far fronte all'elevata richiesta di piante, poiché i metodi tradizionali di propagazione del luppolo

(mediante talea e rizoma) sono poco efficienti e fortemente legati alla stagionalità. Le colture *in vitro* possono essere di supporto al vivaismo luppolicolo poiché garantiscono l'ottenimento di un elevato numero di piante, in tempi relativamente brevi e indipendenti dalle condizioni ambientali (Liberatore *et al.* 2020). In questo studio, è stata valutata l'attitudine all'incapsulamento (proposto in questa specie come ulteriore tecnica di propagazione *in vitro*) di microtalee di due cultivar di luppolo e l'influenza di diverse concentrazioni di 6-benzilaminipurina (BAP) su diversi parametri legati al loro sviluppo e proliferazione.

Materiali e Metodi

Microtalee uninodali (3-4 mm di lunghezza) sono state isolate da germogli proliferati di due cultivar di luppolo, Cascade e Columbus, sviluppate *in vitro* in vasi di vetro (500 ml), contenenti 100 ml di substrato di crescita, con la seguente composizione: sali e vitamine di Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) (1×), saccarosio (30 g/L) e agar (8 g/L) (pH a 5,8).

L'incapsulamento è stato effettuato secondo la procedura descritta da Standardi e Micheli (2013), adattata al luppolo (Liberatore *et al.*, 2020).

Al fine di stimolare la risposta delle microtalee incapsulate (MI), diverse concentrazioni di BAP sono state aggiunte all'endosperma artificiale, secondo le tesi di seguito descritte, in cui la sigla EA si riferisce alla componente relativa all'endosperma artificiale: EA-0: sali (½×) e vitamine (1×) MS (Murashige e Skoog, 1962), saccarosio (50 g/L); (EA); EA-0,5: EA con 0,5 mg/L di BAP; EA-1,0: EA con 1,0 mg/L di BAP; EA-1,5: EA con 1,5 mg/L di BAP; EA-2,0: EA con 2,0 mg/L di BAP. Per ciascuna delle cinque tesi sono state previste tre repliche e dieci MI per ogni vaso. I vasi sono stati mantenuti in camera di crescita alla temperatura di 22±2 °C nelle 24 ore giornaliere e ad una luce di 40 μE m⁻²s⁻¹ di intensità, per un fotoperiodo di 16 ore di luce. Ogni settimana, sulle colture sono state effettuate osservazioni volte a valutare l'evoluzione delle microtalee incapsulate; inoltre, al termine dell'esperimento, dopo 75 giorni, stati effettuati i rilievi dei seguenti parametri: Vitalità (%), (incidenza di propaguli verdi senza imbrunimenti o necrosi), Ripresa (%) (incidenza di propaguli che mostrano germogliamento), Conversione (%) (incidenza di propaguli che hanno germogliato e radicato contemporaneamente); Tempo Medio di Ripresa (TMR): $\sum f \cdot x / f_{tot}$ (f = numero di microtalee incapsulate germogliate in un dato giorno, x = giorni necessari per il germogliamento delle microtalee incapsulate; tot = numero di tutte le microtalee incapsulate con germogli); Tempo Medio di Conversione (TMC): $\sum f \cdot x / f_{tot}$ (f = numero di microtalee incapsulate radicate in un dato giorno, x = giorni necessari per l'inizio del processo rizogeno delle microtalee incapsulate, tot = numero di tutte le microtalee incapsulate radicate). I dati rilevati sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie, valutando l'influenza dei fattori *Genotipo* e *Composizione dell'endosperma artificiale*; la separazione delle medie è stata effettuata ricorrendo al test di Tukey (p<0.05) (SYSTAT 13.1, Systat Software, Inc; Pint Richmond, CA).

Risultati

Nei 75 giorni di esperimento, il 99,3% delle MI di 'Cascade' e il 38,7% di 'Columbus' si sono mantenute vitali, di un colore verde brillante (Fig. 1a). Dopo 7 giorni in coltura, tutte le MI vitali di entrambe le cultivar hanno iniziato a produrre germogli (Fig. 1b) e, successivamente, ad emettere radici (Fig. 1c).

L'analisi statistica dei dati ha rilevato un'interazione significativa fra i fattori considerati (*Genotipo* e *Composizione dell'EA*) per i parametri Vitalità e Ripresa. Infatti, mentre 'Cascade' ha fatto registrare risultati statisticamente superiori, per entrambi i parametri, indipendentemente dalla composizione dell'EA, 'Columbus' si è dimostrata una cultivar più sensibile alla composizione dell'EA, con valori di vitalità e ripresa significativamente superiori per le microtalee incapsulate in EA-1,5. Per quanto riguarda il parametro «Conversione», è stata registrata una forte influenza del fattore *Genotipo*, con le MI di 'Cascade' che hanno sviluppato sia germogli che radici in percentuale statisticamente superiore di quelle di 'Columbus', indipendentemente dalla composizione dell'EA (Fig. 2). Per valutare la tecnologia

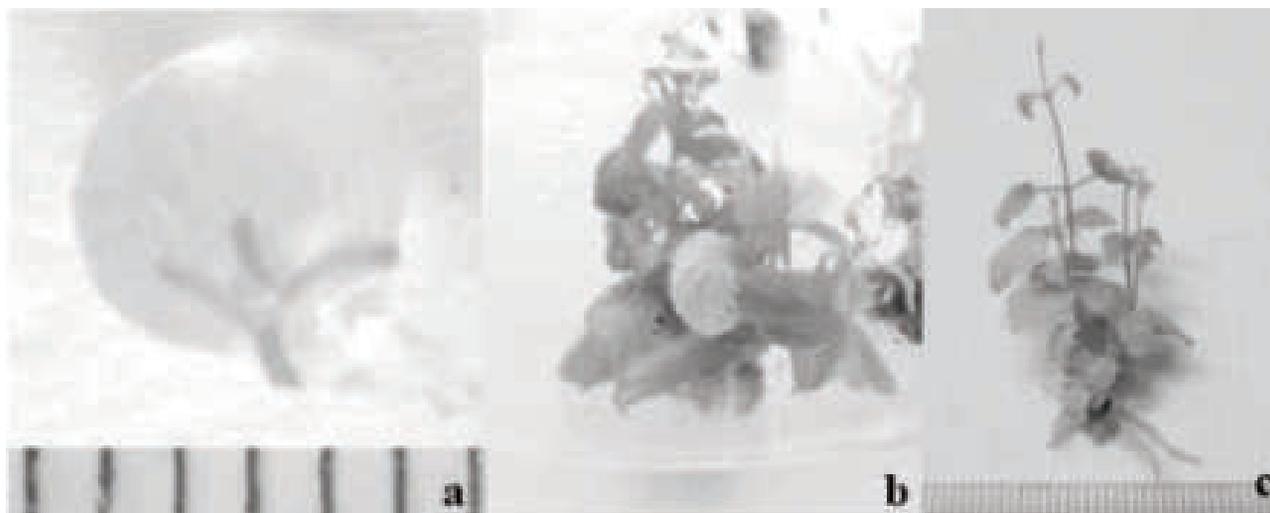


Fig. 1 a) Microtalea vitale di luppolo, cv. Cascade. b) Microtalea germogliata di luppolo, cv. Columbus; c) Microtalea radicata di luppolo, cv. Cascade.

Fig. 1 a) *Viable hop microcutting, cv. Cascade*; b) *Sprouted hop microcutting, cv. Columbus*; c) *Rooted hop microcutting, cv. Cascade*.

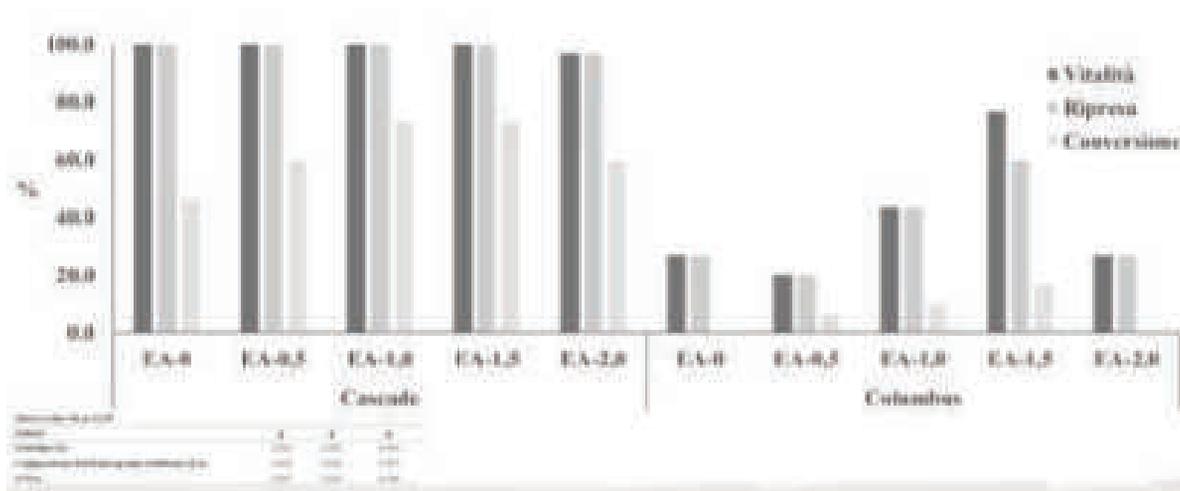


Fig. 2. Vitalità (%), Ripresa (%) e Conversione (%) di microtalee incapsulate di luppolo, cv. Cascade e Columbus, ANOVA a due vie, $p < 0,05$.

Fig. 2. *Viability (%), Regrowth (%) e Conversion (%) of hop, cv. Cascade and Columbus, encapsulated microcuttings. Two-way ANOVA, $p < 0.05$.*

dell'incapsulamento come metodo di propagazione del luppolo è necessario valutare i tempi in cui le MI manifestano la Ripresa e la Conversione. L'analisi statistica ha evidenziato che, le MI di 'Cascade' necessitano di un Tempo Medio di Ripresa statisticamente inferiore di quelle di 'Columbus' e che l'aggiunta di $1,5 \text{ mg/L}^{-1}$ di BAP riduce significativamente il tempo di ripresa (Fig. 3). Un'interazione significativa tra i fattori considerati è stata rilevata per il parametro Tempo Medio di Conversione, evidenziando come, soltanto per il genotipo 'Columbus', la composizione dell'EA eserciti un'influenza sulla risposta delle MI, con tempi di conversione più brevi osservati con EA-0,5 (Fig. 3).

Discussione e Conclusioni

La tecnologia dell'incapsulamento di espianti uninodali risulta ad oggi un metodo semplice ed efficace per la propagazione *in vitro* di diverse specie vegetali, tra cui piante da frutto, ornamentali, cereali e

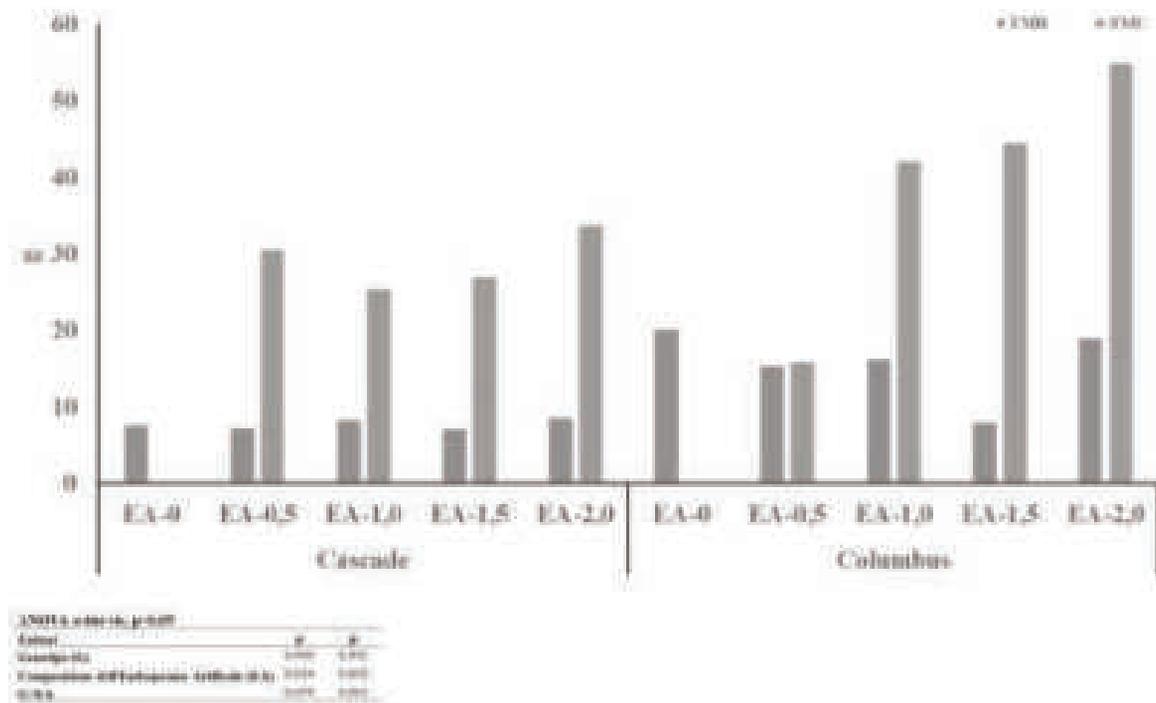


Fig. 3. Tempo Medio di Ripresa (TMR) e Tempo Medio di Conversione (TMC) di microtalee incapsulate di luppolo, cv. Cascade e Columbus. ANOVA a due vie, $p < 0,05$.

Fig. 3. Mean Regeneration Time (MRT) and Mean Conversion Time (MCT) of hop, cv. Cascade and Columbus, encapsulated microcuttings. Two-way ANOVA, $p < 0.05$.

ortaggi (Rai et al., 2009). In questo studio sono state incapsulate microtalee uninodali di luppolo, cultivar Cascade e Columbus, al fine di valutarne l'attitudine all'incapsulamento, nell'ottica di un futuro utilizzo di questa tecnica per la propagazione del luppolo su larga scala. I risultati ottenuti mettono in evidenza la forte influenza del genotipo sulla risposta all'incapsulamento del luppolo; infatti, i valori di vitalità e ripresa della cultivar Cascade sono assolutamente paragonabili a quelli riportati, per il genotipo Gianni, da Liberatore e collaboratori (2020), mentre valori notevolmente più bassi sono stati osservati per la cultivar Columbus. Valori di Vitalità e Ripresa prossimi al 100%, come quelli registrati per la cv. Cascade, sono stati osservati anche per altre specie, come *Actinidia deliciosa*, *Malus domestica*, *Olea europaea*, Carrizo citrange (Gardi et al., 1999; Micheli and Standardi, 2005; Germanà et al., 2011; Micheli et al., 2019). Mentre, per la cv. Columbus si è evidenziato un effetto inibente sulla ripresa della più alta concentrazione di BAP utilizzata (2,0 mg/L) che ha fatto registrare uno dei valori più bassi; lo stesso comportamento è riportato da Badr-Elden (2013) con semi sintetici di fragola; al contrario, in *Mimosa pudica* L., Banu et al. (2014) i migliori risultati, in termini di ripresa sono stati ottenuti proprio con la concentrazione più elevata di BAP (2 mg/L) aggiunto all'EA. La ripresa delle microtalee incapsulate è un fattore positivo, ma è riuscire ad ottenere la conversione a rendere questa tecnologia davvero preziosa (Micheli et al., 2019). La conversione del luppolo incapsulato, per entrambi i genotipi studiati, ha mostrato i migliori risultati in EA-1,0 e EA-1,5, risultati che confermano quanto riportato, per il genotipo Gianni, da Liberatore e collaboratori (2020). Prendendo in considerazione altre specie, come *Celastrus paniculatus* (Fonseka et al., 2019) e banana (Pereira et al., 2017), migliori prestazioni in termini di conversione sono state ottenute da espianti incapsulati in endosperma artificiale arricchito con 2 mg/L di BAP. Questo studio sembra confermare la notevole genotipo-dipendenza della risposta delle microtalee incapsulate all'incapsulamento e alla composizione dell'EA. Ulteriori studi risultano necessari al fine di individuare un protocollo efficace per la produzione di microtalee incapsulate di luppolo che potrebbe aprire nuove prospettive nella gestione del materiale *vitro*-derivato, a supporto delle produzioni vivaistiche e/o come ulteriore mezzo efficace per conservare la biodiversità.

Bibliografia

- Badr-Elden A.M., 2013. An effective protocol for in vitro storage and ex vitro re-growth of strawberry capsules. *Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry*, 1(2): 30-38.
- Banu L.A., Rashid M.H.O., Miah M.A.B., 2014. Development of artificial seed and preservation in *Mimosa pudica* L., an important medicinal plant in Bangladesh. *Journal of Biosciences (Rajshari)*, 22: 89-99.
- Carbone K., Amoriello T., Pagano M., Sperandio G., Assirelli A., Tarangioli S., Monteleone A., 2017. Prospettive interessanti per il luppolo italiano. *L'Informatore Agrario*, 20: 49-51.
- Fonseka D.L.C.K., Wickramaarachchi W.W.U.I., Madushani R.P.S., 2019. Synthetic seed production as a tool for the conservation and domestication of *Celastrus paniculatus*: a rare medicinal plant. *Annual Research & Review in Biology*, 32(4): 1-8.
- Gardi T., Piccioni E., Standardi A., 1999. Effect of bead nutrient composition on regrowth ability of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species. *Journal of microencapsulation*, 16(1): 13-25.
- Germanà M.A., Micheli M., Chiancone B., Macaluso L., Standardi A., 2011. Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106:2 99-30.
- Micheli M., Benelli C., 2019. Synthetic seeds of two aquatic plants, in: synthetic seeds: recent trends and future perspectives. *Methods in molecular biology*. M. Faisal, A. Alatar (Eds.), Synthetic Seeds., Springer, Cham. The Netherlands, pp. 233-239.
- Liberatore C.M., Rodolfi M., Beghe D., Fabbri A., Ganino T., Chiancone B., 2020. Adventitious shoot organogenesis and encapsulation technology in hop (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae*, 270: 109416.
- Micheli M., Standardi A., 2005. Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (cv. Moraiolo). Effect of pretreatments, their size and the coating. *Current Topics in Biotechnology*, 2: 81-88.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Pereira J.C.G., Rocha S.S., Cardoso Nogueira Londe, L., Batista Da Mota M.C., Santos Alves., P.F., Silva Viana W., 2017. Growth of 'prata-ana' banana's microshoots clone gorutuba from synthetic seeds: substrates and bap concentration. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39 (5): e-892.
- Standardi A., Micheli M., 2013. Encapsulation of in vitro-derived explants: an innovative tool for nurseries. In: Lambardi M., Ozudogru E.A., Jain S.M. (Editors.), *Protocols for micropropagation of selected economically- important horticultural plants*. Springer, New York, pp. 397-418.
- Rai M.K., Asthana P., Singh S.K., Jaiswal V.S., Jaiswal U., 2009. The encapsulation technology in fruit plants - a review. *Biotechnology Advances*, 27: 671-679.
- Zanoli P., Zavatti M., 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 383-396.

Micropropagazione dell'olivo: innovazioni metodologiche nella fase di proliferazione

Maurizio Micheli^{1*}, Martina Burnelli¹, Simona Lucia Facchin¹, Fabiano Gattabria², Massimiliano Meneghini²

* maurizio.micheli@unipg.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università di Perugia

² Vivai Piante Battistini Società Agricola s.s., Cesena (FC)

Riassunto

L'effetto di genotipo-dipendenza e dominanza apicale, nonché il costo della zeatina sembrano ancora limitare la micropropagazione commerciale dell'olivo. In questo lavoro è stato studiato l'effetto di meta-topolin e zeatina (di quest'ultima, due formulazioni, di cui una più economica) sulla proliferazione di 'Frantoio' e 'Moraiolo'. I dati di tre subcolture successive hanno evidenziato il diverso comportamento di ciascuna varietà. Inoltre, le *performances* indotte dalla zeatina più economica sono risultate simili a quelle della "standard", se non migliori per alcuni parametri. I risultati, seppure preliminari, indicano la possibilità di individuare protocolli di micropropagazione di olivo sempre più sostenibili e produttivi.

Parole chiave: *Olea europaea*, moltiplicazione *in vitro*, zeatina, indice vegetativo, costi di produzione

Micropropagation of olive: methodological innovations on proliferation phase

Abstract: Olive (*Olea europaea* L.) can be propagated through different asexual methods, such as cutting, grafting and *in vitro* propagation. Even though the last one could easily overcome some limitations connected to traditional methods, currently there are still some issues that limit the application of micropropagation of olive on commercial laboratories. First, the different behaviour of the various cultivars, which requires setting up of specific protocols depending on each single genotype; secondly, the apical dominance of olive, which can decrease the proliferation rate and, third, the cost of zeatin, which is currently the only cytokinin able to induce an efficient regeneration in the most cultivars. In this research, we studied the performances of two olive cultivars, 'Frantoio' and 'Moraiolo', at the end of the proliferation phase carried out using the well-known Olive Medium added with two types of cytokinins at concentration of 4 mg/L: meta-topolin (Duchefa, cod. T0941) and zeatin. Two formulations of zeatin were studied: the first formulation (Duchefa, cod. Z0917), which is the one widely used for the *in vitro* proliferation of olive trees and is expensive (called "standard" – Zea S); the second formulation (called Zea C), which has recently been put on the market, with the same characteristics of the standard zeatin but characterized by a very low-cost price (Panpan Industry, cod. 1637-39-4). After three consecutive proliferation subcultures (45 days-long), different parameters connected to the quantity and quality of the proliferated plantlets were analyzed: number and length of new shoots, number of nodes (multiplication rate), callogenesis and vegetative index. The multiplication rate of 'Frantoio' was statistically the highest (5.0 on average, with the maximum value (6.3) recorded at the end of the second subculture) when Zea C was applied compared to standard zeatin (4.4) and meta-topolin (4.3). The shoots developed in presence of Zea C were also the longest (average 39.2 mm) and significantly higher in all subcultures. In 'Moraiolo' the Zea S stimulated the highest average number of proliferated shoots (1.9), while as regards the multiplication coefficient no substantial differences emerged between three cytokinins. The average length of shoots developed in presence of Zea S was the lowest (31.9 mm), in comparison to those obtained with metatopolin and Zea C, respectively 42.6 and 37.2 mm. Finally, the vegetative index, calculated by relating the multiplication rate and the average length with the dry matter of the

new shoots, was higher in presence of Zea C in 'Frantoio' and metatopolin in 'Moraiolo'. The performances registered with the use of Zea C tended to be higher or at least equal to those achieved using the Zea S, usually used in laboratories that micropropagate the olive tree. The results of these experiments seem to be of great importance and, to our knowledge, for the first time they demonstrated the efficacy of a zeatin characterized by a low cost in olive micropropagation.

Keywords: *Olea europaea*, *in vitro* multiplication, zeatin, vegetative index, production costs

Introduzione

L'olivo (*Olea europaea* L.) ha dimostrato in molti studi di avere attitudine ad essere propagato mediante coltura *in vitro*. Tuttavia, ancora oggi, esistono limiti sostanziali alla possibilità di applicare diffusamente la micropropagazione di questa specie in ambito commerciale. Tali impedimenti sono rappresentati dalla differente attitudine alla coltura in asepsi delle molteplici varietà, dal manifestarsi del fenomeno della dominanza apicale, che in alcuni genotipi di olivo riduce o blocca la proliferazione di nuovi germogli, ed infine, dalla necessità di utilizzare specifiche sostanze nel substrato di crescita, come la zeatina, che, sebbene attualmente rappresenti la citochinina più efficace per indurre livelli soddisfacenti di rigenerazione *in vitro*, risulta ancora particolarmente costosa. Allo scopo, quindi, di sviluppare un protocollo di moltiplicazione più sostenibile ed efficace, è stato saggiato nelle varietà di olivo 'Frantoio' e 'Moraiolo', l'effetto di due citochinine (meta-topolin e zeatina) addizionate al terreno nutritivo alla stessa concentrazione ed in particolare per la zeatina sono state valutate due diverse formulazioni. Una formulazione che definiremo standard (Zea S), diffusamente utilizzata nei laboratori di micropropagazione, l'altra, di recente introduzione sul mercato, con un costo decisamente più contenuto (Zea C), e di cui per nostra conoscenza non è stata fino ad ora, riportata nessuna documentazione scientifica.

Materiali e Metodi

Da germogli di 'Frantoio' e 'Moraiolo', mantenuti in proliferazione su un substrato Olive Medium (OM; Rugini, 1984), arricchito di saccarosio (30 g/L), agar (7 g/L) e 4 mg/L di zeatina (Duchefa, cod. Z0917), definita come standard (Zea S) con pH 5,5, sono state prelevate porzioni uninodali con gemme ascellari, di circa 10 mm di lunghezza, escludendo la porzione apicale, che avrebbe potuto indurre fenomeni di dominanza (Fabbri et al., 2012). Dieci espianti sono stati posti in ogni vaso di vetro (4 repliche) per ciascuna delle tesi a confronto, le tesi sono caratterizzate da un substrato comune (OM), ma differenziate per componente ormonale: Zea S (usata in precedenza), Zea C (Panpan Industry, cod. 1637-39-4) e meta-topolin (Duchefa, cod. T0941), applicate alla concentrazione di 4 mg/L. Le colture di entrambe le varietà sono state poste in camera di crescita (a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e 16 ore di luce con intensità pari a $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e sono state effettuate tre subcolture successive di 45 giorni ciascuna. Al termine di ogni subcoltura sono state effettuate le valutazioni sull'attività vegetativa degli espianti, analizzando i dati relativi ai seguenti parametri: numero e lunghezza dei germogli sviluppati, coefficiente di moltiplicazione (numero medio di nodi prodotti), callogenese, sostanza secca (incidenza media di peso secco sul peso fresco totale) oltre ad un indice vegetativo determinato mettendo in relazione il coefficiente di moltiplicazione, la lunghezza dei germogli e la sostanza secca. I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante procedure G.L.M. (General Linear Models) del S.A.S. (Statistical Analysis System) e la significatività saggiata mediante il test di Duncan ($\alpha < 0,05$).

Risultati

'Frantoio'

Le differenze più evidenti sono state registrate relativamente alla lunghezza media dei germogli proliferati (Tab. 1) con valore decisamente superiore in presenza di Zea C nel substrato (39,2 mm). Nella figura 1 sono visibili alcuni germogli di 'Frantoio' particolarmente vigorosi ottenuti con OM arricchito di Zea C. Al termine della prova, anche il coefficiente di moltiplicazione, in presenza della

Tab. 1. Attività vegetativa media di 'Frantoio' dopo tre subcolture di proliferazione.

Tab. 1. Average vegetative activity of 'Frantoio' after three proliferation subcultures.

Citochinina utilizzata	Germogli (n)	Lunghezza germogli (mm)	Nodi (n)	Callo (%)
Zea S	1.5	29.7	4.4	92.2
Zea C	1.4	39.2	5	97.8
Meta-topolin	1.4	25.4	4.3	97.8



Fig. 1. Germogli di 'Frantoio' sviluppati su OM arricchito di Zea C al termine della proliferazione.

Fig. 1. Shoots of 'Frantoio' developed on OM enriched with Zea C at the end of proliferation.

zeatina meno costosa ha fornito il migliore risultato (5,0) rispetto a quella standard (4,4) e alla meta-topolin (4,3). Invece, non sono emerse differenze relativamente al numero medio di germogli prodotti, né all'entità della callogenesi. Analizzando i risultati delle singole subcolture (Fig. 2), il dato migliore relativo al coefficiente di moltiplicazione è stato registrato al termine della seconda subcoltura con l'impiego di Zea C (6,3), mentre Zea S ha prodotto performance statisticamente inferiori soprattutto a partire dalla seconda subcoltura. Per quanto riguarda la lunghezza dei germogli, in ciascuna subcoltura i valori più elevati sono sempre stati indotti da Zea C. Infine, per meglio interpretare l'effetto delle citochinine sulla qualità dei germogli proliferati, è stato calcolato un "indice vegetativo", mettendo in relazione i due principali parametri sopra descritti (numero di nodi e lunghezza dei germogli) con la sostanza secca (riportata come incidenza percentuale del peso secco rispetto al peso fresco delle masse totali ottenute al termine della fase di proliferazione). Il valore più elevato è attribuibile agli espianti moltiplicati in presenza di Zea C (34,6%), seguito da Zea S (23,7%) ed, infine, dall'uso di meta-topolin (18,3%).

'Moraiolo'

In 'Moraiolo' la tesi relativa alla Zea S ha fatto registrare il numero medio di germogli proliferati più elevato (1,9), mentre per quanto riguarda il coefficiente di moltiplicazione non sono emerse sostanziali differenze tra i trattamenti studiati (Tab. 2). Un parametro che ha fornito informazioni decisamente interessanti è stato quello della lunghezza media dei germogli: Zea S ha indotto la formazione dei germogli più corti (31,9 mm), mentre quelli ottenuti con meta-topolin (42,6 mm) e con Zea C (37,2 mm) (Fig. 3), sono risultati i più lunghi. Anche per 'Moraiolo' sono state analizzate le performances al termine di cia-

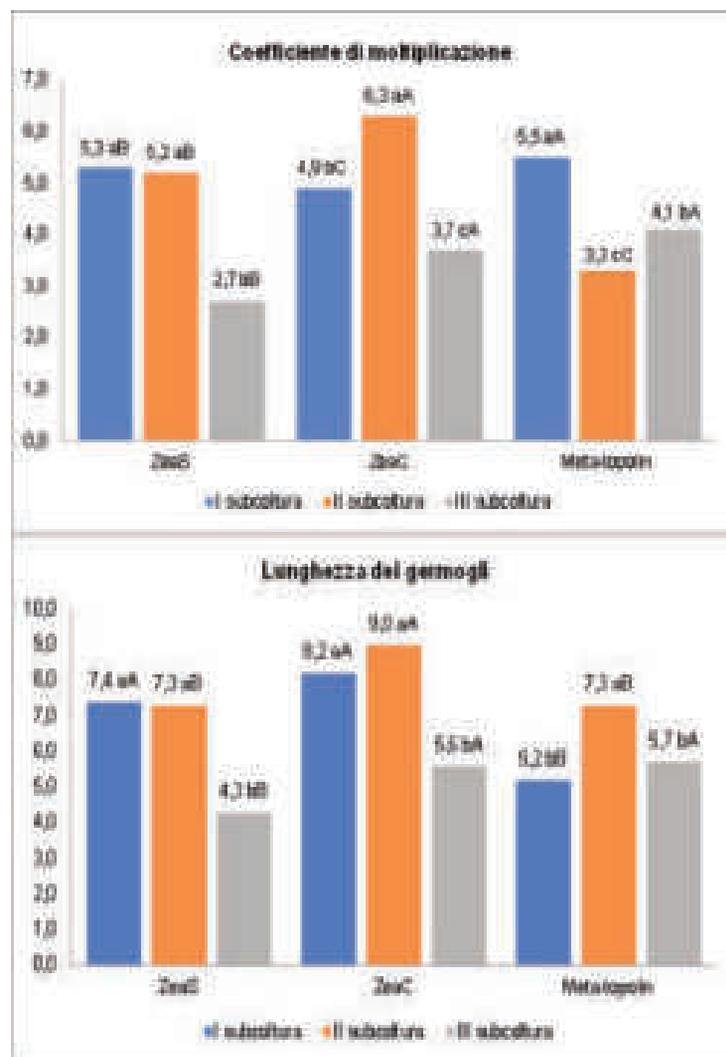


Fig. 2. Coefficiente di moltiplicazione (in alto) e lunghezza media (in basso) dei germogli di 'Frantoio' sviluppati nel corso delle tre subcolture di proliferazione.

Fig. 2. Multiplication rate (upper) and average length (down) of 'Frantoio' shoots developed throughout the three subcultures of proliferation.

Tab. 2. Attività vegetativa media di 'Moraiolo' dopo tre subcolture di proliferazione.

Tab. 2. Average vegetative activity of 'Moraiolo' after three proliferation subcultures.

Citochinina utilizzata	Germogli (n)	Lunghezza germogli (mm)	Nodi (n)	Callo (%)
Zea S	1.9	31.9	3.9	100.0
Zea C	1.7	37.2	4.0	98.9
Meta-topolin	1.6	42.6	4.1	100.0

scuna subcoltura di proliferazione. Le due zeatine hanno mostrato un andamento analogo nel corso delle tre subcolture relativamente al coefficiente di moltiplicazione (Fig. 4), mentre analizzando l'allungamento dei germogli nelle prime due subcolture, Zea C e meta-topolin hanno determinato un effetto positivo su questo parametro. indotto il maggiore. Infine, analizzando l'indice vegetativo si può evincere che tra le due zeatine, Zea C induce la determinazione di sostanza secca pari a 21,7%, con la formazione di germogli mediamente meglio strutturati rispetto a quelli ottenuti tramite Zea S (con incidenza di sostanza secca pari al 17,6%), anche se il valore più elevato è stato riscontrato con l'uso di meta-topolin (29,3%).



Fig. 3. Germogli di 'Moraiolo' sviluppati su OM arricchito di Zea C al termine della proliferazione.
 Fig. 3. Shoots of 'Moraiolo' developed on OM enriched with Zea C at the end of proliferation.

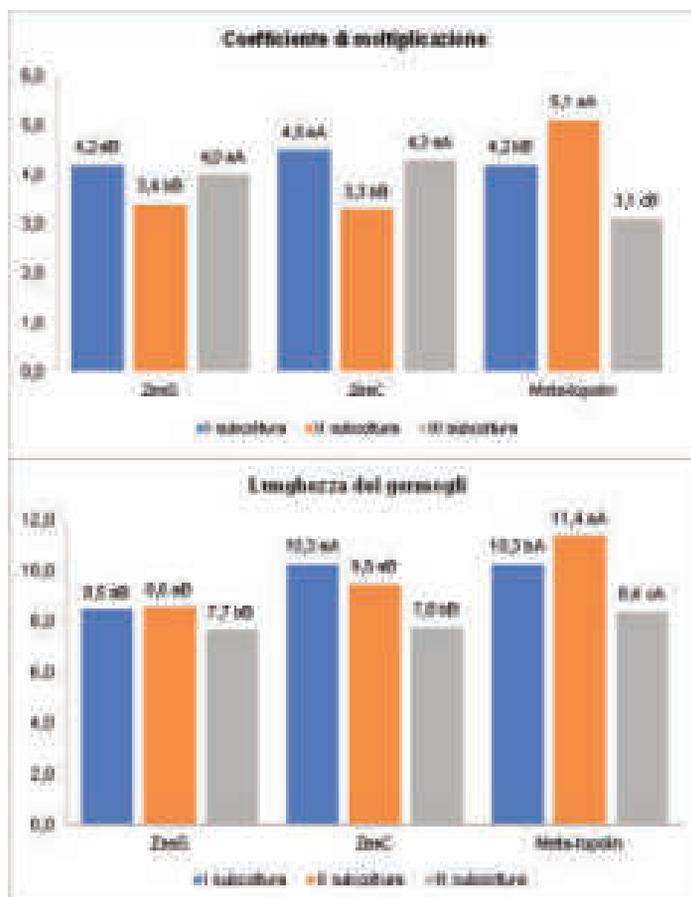


Fig. 4. Coefficiente di moltiplicazione (in alto) e lunghezza media (in basso) dei germogli di 'Moraiolo' sviluppati nel corso delle tre subculture di proliferazione.
 Fig. 3. Multiplication rate (upper) and average length (down) of 'Moraiolo' shoots developed throughout the three subcultures of proliferation.

Discussione e Conclusioni

La genotipo-dipendenza, già nota in olivo, è stata confermata anche in questo lavoro. Infatti, per quanto riguarda il 'Frantoio', in generale i risultati hanno dimostrato che Zea C ha indotto un maggiore coefficiente di moltiplicazione nella media delle tre subcolture condotte nell'esperimento, rispetto all'altra zeatina (Zea S). Al momento non è possibile formulare ipotesi che spieghino tale comportamento, dal momento che le due molecole sono uguali, come dichiarato dai produttori e, a nostra conoscenza, non esistono lavori scientifici che possano supportare qualsiasi valutazione in merito. L'unica caratteristica che sembra differenziarle è il grado di purezza (1%) che potrebbe spiegare i diversi risultati. I dati sono stati analizzati anche in relazione alle singole subcolture di 'Frantoio', evidenziando che le performance di Zea C risultano sempre le migliori, seppure al termine della terza subcoltura i valori del tasso di proliferazione decrescano per tutte e tre le citochinine. Si può ipotizzare un effetto negativo dovuto all'accumulo di principio attivo che solitamente maschera l'efficacia del trattamento, almeno in via temporanea. In 'Moraiolo' non sono emerse differenze significative tra le tre citochinine valutate, né in termini di numero di germogli prodotti, né di tasso di moltiplicazione. Rispetto alla lunghezza dei germogli, invece, il risultato migliore è stato conseguito con meta-topolin, mentre la presenza Zea S ha prodotto i germogli più corti. Anche l'analisi dell'indice vegetativo ha confermato che meta-topolin ha indotto, in assoluto, la formazione di espianti meglio strutturati e, analogamente Zea C, nel confronto tra le due zeatine. Tali risultati deporrebbero a favore dell'uso di metatopolin. Tuttavia, dopo aver analizzato l'attività vegetativa al termine di ciascuna subcoltura, è emerso che le due zeatine mantengono performances più costanti nel tempo, mentre con meta-topolin in 'Moraiolo' si è assistito all'effetto negativo dell'accumulo di principio attivo, che ha comportato al termine della terza subcoltura una forte riduzione del coefficiente di moltiplicazione, nonché della lunghezza dei germogli. Ad oggi si ha la consapevolezza che la zeatina sia l'unica citochinina in grado di stimolare soddisfacentemente la proliferazione *in vitro* della maggior parte delle varietà di olivo (Rugini e Baldoni, 2011), proprio questo presupposto ha indotto ad avviare la sperimentazione sopra descritta, con l'obiettivo di contribuire alla ricerca di una soluzione che renda definitivamente applicabile la micropropagazione massale anche per questa specie a costi ridotti. Le tesi proposte hanno mostrato risultati interessanti e l'impiego di una nuova formulazione di zeatina meno costosa (Zea C) rispetto a quella usualmente utilizzata nella maggior parte dei laboratori ha fornito buone indicazioni, sicuramente originali in quanto a nostra conoscenza gli effetti di questo prodotto non sono mai stati studiati per la proliferazione *in vitro* di alcuna specie vegetale. In tutti i casi, comunque, l'impiego di Zea C ha indotto lo sviluppo di germogli meglio strutturati e più vigorosi, conseguimento rilevante dato che la vigoria dei germogli *in vitro*-derivati può assumere grande importanza al fine di implementare la qualità delle produzioni commerciali (Rugini et al., 2001). Infatti, la tendenza attuale della micropropagazione su larga scala è quella di sostituire i sistemi di radicazione tradizionali in completa asepsi con quelli misti *in vitro-vivo*, con lo scopo di ridurre la condizione di asepsi, limitandola fino alla fase di proliferazione. Ciò può contribuire a tagliare i costi di produzione e, riducendo le operazioni di trapianto, limitare le eventuali fallanze sia durante la radicazione che, soprattutto, nel corso dell'ambientamento, come riportato da alcuni autori in merito alla migliore capacità di adattamento alle condizioni ambientali esterne di plantule vigorose (Demo et al., 2008; Micheli et al., 2018). Ovviamente i risultati ottenuti sono di carattere preliminare e necessitano di ulteriori studi e verifiche. Qualora la prosecuzione delle ricerche confermasse quanto fino ad ora riportato, sarebbe auspicabile attuare anche in olivo una micropropagazione su larga scala a costi ridotti, in modo da soddisfare le crescenti richieste di mercato.

Bibliografia

Demo P., Kuria P., Nyende A.B., Kahangi E.M., 2008. Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micropropagation of potato. African Journal of Biotechnology, 7: 2578–2584.

- Fabrizi A., Bartolini G., Lambardi M., Kailis M., Kailis S., 2012. Olive propagation manual. Land Links Press (Collingwood, Australia).
- Micheli M., Fernandes Da Silva D., Farinelli D., Agate G., Pio R., Famiani F., 2018. Neem oil used as a “complex mixture” to improve *in vitro* shoot proliferation in olive. Hortscience, 53(4): 531-534.
- Rugini E., 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different rootability, and medium development using analytic data from developing shoots and embryos. Scientia Horticulturae, 24: 123-134.
- Rugini E., Baldoni L., 2011. Biotecnologie. Volume III. Collana divulgativa dell'Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olio di Spoleto, Italia.
- Rugini E., Biasi R., Muganu M., Pannelli G., Aversa G., Maggini F., Martelli G.P., Zamboni E., Zuccherelli G., Barba M., 2001. L'organizzazione di un moderno vivaismo olivicolo alla base della produzione di piante certificate. Frutticoltura, 5: 11-24.

Ottimizzazione di un protocollo di *embryo rescue* per il miglioramento di uve da tavola apirene (*Vitis vinifera* L.)

Angelica Giancaspro*, Andrea Mazzeo, Agata Gadaleta, Giuseppe Ferrara

* angelica.giancaspro@uniba.it

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

Riassunto

Nel presente lavoro è stata impiegata la tecnica dell'*embryo rescue* per la rigenerazione di ibridi vitali di uve da tavola stenospermocarpiche, mediante l'applicazione di un protocollo di coltura *in vitro* in tre fasi. Per ciascun ibrido è stata valutata l'influenza di fattori genetici e metodologici (genotipi parentali, epoca di prelievo degli ovuli, durata della germinazione) sulla fertilizzazione degli ovuli, sviluppo e germinazione dell'embrione, radicazione, formazione della plantula. Il nostro protocollo ottimizzato prevede l'isolamento degli ovuli immaturi 40 giorni dopo l'impollinazione, la coltura su substrato nutritivo per un massimo di 8 settimane e l'induzione della germinazione degli embrioni per 6-8 settimane.

Parole chiave: apirenia, embrioni immaturi, coltura *in vitro*, stenospermocarpia, rigenerazione

Optimization of an *in vitro* embryo rescue protocol for breeding seedless table grapes (*Vitis vinifera* L.)

Abstract: Breeding for seedless grapes is traditionally based on crossing stenospermocarpic females (Sultanina variety is the most usual source of stenospermocarpic phenotype) with male parents carrying other traits of interest. Conventional intraspecific hybridization between seedless varieties is cost-expensive, time/space-consuming and involves the generation and selection of thousands of hybrids each year, as hybrids viability is severely reduced by embryos abortion in the early berry developmental stages which leads to underdeveloped seeds or seed traces. Embryo rescue technique can partially overcome these technical constraints, but the obtainment of viable plantlets relies on the optimization of several genetic and methodological issues including parental crossing genotypes, ripening season, berry ripening stage upon ovule removal, seed trace size, culture medium composition, addition of growth regulators, and plantlet acclimation conditions. The present work aimed at regenerating viable plants from immature ovules of stenospermocarpic table grape hybrids by applying a three-step *in vitro* protocol consisting of: fertilized ovule culture on a suitable growth medium to allow embryo development beyond abortion, embryo germination-rooting, and plantlet formation-acclimation. Time after pollination for ovule excision - sampling time - (30, 40, 50 days after pollination), ovule stage for setting up embryo induction, extent of embryo germination (4, 6, 8 weeks) were evaluated for six couples of crossing genotypes. The influence of such genetic and technical factors was finally assessed in terms of efficiency of ovule fertilization, embryo development and germination, rooting, and plantlet formation to establish the best rescue time for each hybrid combination. In the present work, the rescue protocol was successfully applied to all the hybridization events - as it led to some plantlet formation - but crossing genotypes, sampling time, immature ovule culture and embryo germination were crucial factors affecting the efficiency of ovule fertilization, embryo germination and recovery rate of viable plants. In detail, our optimized protocol included immature ovules isolation from berries at 40 days after pollination, ovule culture at most for 8 weeks, and embryo germination induction for 6-8 weeks. As for genotypes, the most efficient embryo recovery was obtained from hybrids of Thompson, Superior and Regal cultivars, whereas the highest percentage of viable plants was derived from "Luisa×Thompson" ovules col-

lected at 50 days after pollination. Such an optimized protocol could be useful for setting up similar preliminary experiments aiming at making embryo rescue a more efficient and predictable method compared to conventional breeding and improving breeding programs for grape seedlessness.

Keywords: seedlessness, immature embryos, *in vitro* culture, stenospermocarpy

Introduzione

Il miglioramento genetico classico per l'apirenia nell'uva da tavola (*Vitis vinifera* L.), realizzato incrociando genotipi stenospermocarpici oppure con diversi livelli di ploidia, è costoso e richiede molto tempo e spazio; inoltre, la vitalità degli ibridi è molto bassa (0-16%) poiché gravemente compromessa dall'aborto degli embrioni nei primissimi stadi di sviluppo dell'acino, che porta a semi rudimentali o erbacei (Narayanaswami e Norstog, 1964). Applicando la metodica sperimentata per la prima volta da Emershad e Ramming (1982), la vitalità degli embrioni può essere incrementata impiegando un protocollo di *embryo rescue in vitro* che prevede la coltura degli ovuli fecondati, la crescita e la germinazione degli embrioni immaturi fino alla formazione delle plantule. Poiché l'efficienza dei protocolli *in vitro* è influenzata da numerosi fattori endogeni ed esogeni, ad oggi solo poche cultivar apirene sono state ottenute (Ji et al., 2015). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare l'influenza di fattori genetici e metodologici per ottimizzare un protocollo di *embryo rescue* per la rigenerazione di ibridi di uve da tavola apirene.

Materiali e Metodi

Isolamento, coltura degli ovuli e crescita degli embrioni immaturi

Le cultivar da tavola utilizzate nello studio provengono da vigneti privati o commerciali della provincia di Bari, Puglia. Sei incroci sono stati realizzati tra la cultivar a seme erbaceo Luisa (Stella[®]) e le varietà stenospermocarpiche: Thompson Seedless[®] (Sultanina), White Seedless, Superior Seedless[®] (Sugraone), Princess Seedless[®] (Melissa), Crimson Seedless e Regal Seedless. Per ogni incrocio, gli ovuli immaturi sono stati isolati dagli acini a 30, 40 e 50 giorni dopo l'impollinazione (*days after pollination*, dap), coltivati per 8 settimane a 25 °C al buio su un substrato nutritivo solido per l'accrescimento del seme e lo sviluppo dell'embrione (Giancaspro et al., 2022). La percentuale di sopravvivenza degli ovuli, indicativa del tasso di embrioni vitali, è stata calcolata come numero di ovuli vitali sul totale di espunti.

Germinazione degli embrioni, radicazione e formazione delle plantule

I semi formati dalla coltura degli ovuli sono stati allevati su un terreno nutritivo solido per 4-8 settimane per indurre la germinazione degli embrioni. I giovani germogli sono quindi stati trasferiti su un mezzo di radicazione solido e allevati in camera di crescita fino a 10 settimane, a seconda del tipo di incrocio, per lo sviluppo delle radici. Le plantule così rigenerate sono state trapiantate in vasi di torba contenenti una miscela di terreno sterile (3:1:1, perlite: torba: terreno) e coperte con pellicola trasparente per mantenere l'umidità. Dopo 8-12 settimane le giovani piantine sono state contate, gradualmente scoperte e trasferite in serra per l'acclimatazione. La composizione dei terreni nutritivi è riportata in Giancaspro et al. (2022). L'efficienza dell'*embryo rescue* è stata valutata in base all'incrocio parentale, stadio di prelievo degli ovuli e durata dell'induzione della germinazione, calcolando i seguenti parametri espressi in percentuale: sopravvivenza degli ovuli (n. di ovuli vitali/n. di ovuli espuntati), germinazione degli embrioni (n. di embrioni con cotiledoni/n. di embrioni vitali), radicazione dei germogli (n. di germogli radicati/n. di embrioni vitali), plantule rigenerate (n. di piantine sviluppate/n. di embrioni vitali). L'analisi della varianza (ANOVA) è stata condotta con il software XLSTAT-Pro (Addinsoft, Paris, France) a livello di significatività $P < 0,05$.

Risultati

Effetto di genotipo e stadio del prelievo sulla vitalità e germinazione degli embrioni

I più elevati tassi di vitalità degli ovuli e degli embrioni in essi contenuti sono stati ottenuti da espianti effettuati a 40 dap (Luisa×Superior) e 50 dap (Luisa×Thompson). Lo stadio del prelievo ha influenzato anche l'efficienza di germinazione; infatti, dopo 8 settimane di induzione il numero totale di germogli formati da ovuli di 30 e 50 dap è stato paragonabile (36 vs. 40), mentre un numero significativamente maggiore (58) è stato ottenuto da ovuli prelevati a 40 dap (Fig. 1). Anche la durata del periodo di induzione su WPM ha influenzato l'efficienza di rigenerazione per ciascuno stadio di campionamento (Tab. 1). Dopo 4 settimane, non è stata osservata germinazione. Il tasso di germinazione degli embrioni isolati a 30 dap è stato molto basso tra la 4° e la 6° settimana, probabilmente a causa dell'eccessiva precocità dell'espianto, ma è aumentato estendendo l'induzione ad 8 settimane (Fig. 1a). La germinazione degli ovuli isolati a 50 dap è aumentata rapidamente durante le prime sei settimane, raggiungendo poi un plateau fino ad otto settimane (Fig. 1c) probabilmente perché gli ovuli prelevati in uno stadio di maturazione più avanzato hanno espresso quasi tutto il loro potenziale germinativo già nella primissima fase di induzione, senza rispondere ad ulteriori stimoli. Infine, il numero di germogli formati da ovuli isolati a 40 dap ha mostrato un primo aumento tra la 4° e la 6° settimana, che è continuato anche fino all'ottava settimana (Fig. 1b). Per la maggior parte degli ibridi il migliore stadio di maturazione per avviare la coltura degli ovuli immaturi e ottenere la massima efficienza di germinazione degli embrioni è risultato 40 dap. La più alta percentuale di embrioni è stata rigenerata dagli ibridi delle cv. Thompson, Superior e Regal.

Effetto di genotipo e stadio di maturazione sulla radicazione e formazione delle plantule

Anche l'efficienza di radicazione dei germogli e di formazione delle plantule sono state influenzate dai genotipi parentali e dallo stadio del prelievo degli ovuli immaturi (Tab. 1). Per il 60% degli incroci la più alta percentuale di radicazione è stata registrata sui germogli provenienti da ovuli isolati a 40 dap,

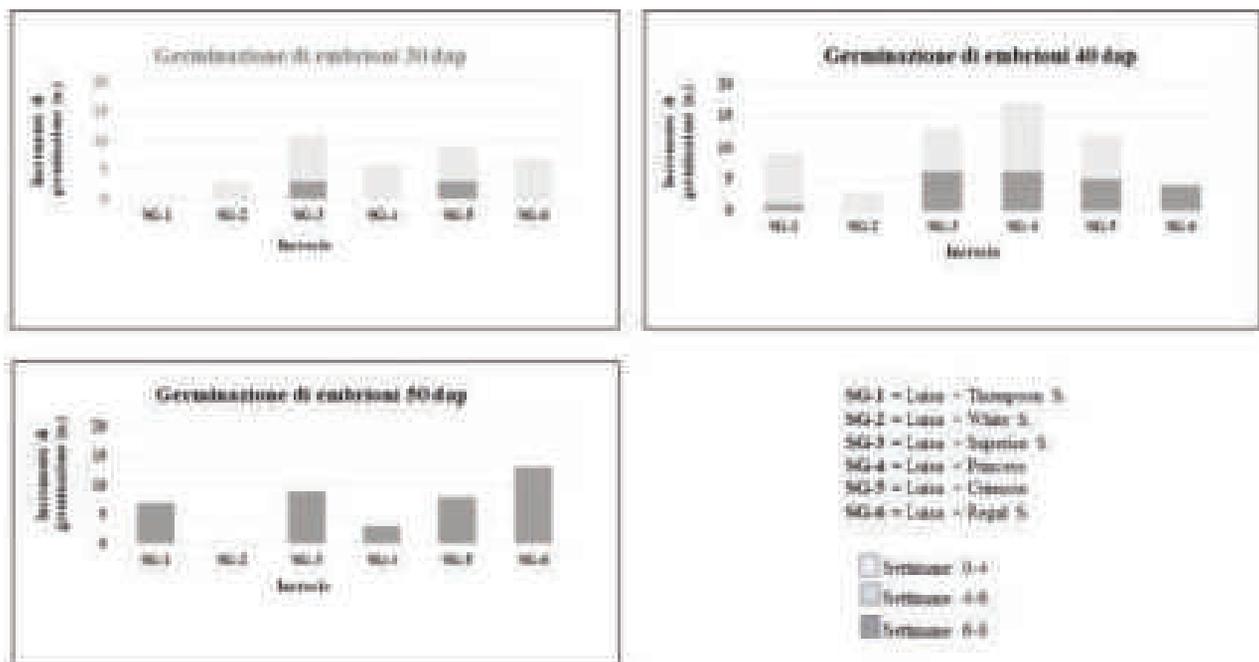


Fig. 1. Variazione del tasso di germinazione durante la fase di induzione di embrioni appartenenti a ibridi di uve da tavola apirene. I grafici si riferiscono alla germinazione di embrioni derivati da ovuli immaturi isolati a 30 dap (a), 40 dap (b) e 50 dap (c).

Fig. 1. Variation of germination rate during the embryo induction phase of six hybrids from seedless table grape crosses. Embryo rescue was assessed from immature ovules isolated at 30 dap (a), 40 dap (b) and 50 dap (c).

Tab. 1. Effetto di genotipi parentali e stadio del prelievo (dap) sulla fertilità degli acini, vitalità degli embrioni, germinazione, radicazione dei germogli e formazione di plantule da ibridi di uve da tavola apirene. Le percentuali riportate nelle colonne 3, 4 e 5 sono riferite al numero di embrioni sviluppati dopo la coltura *in vitro* degli ovuli immaturi. a, b, c = differenze statisticamente significative a valori di $P < 0,05$.

Tab. 1. Effect of crossing genotypes and sampling time (dap) on ovule fertilization, embryo survival, embryo germination, shoot rooting and plantlet formation from embryo rescue of table grape seedless hybrids. Percentages reported in column 3, 4 and 5 are referred to the number of recovered embryos (viable ovules) after immature ovules culture. A, b, c = M statistically significant differences at $P < 0.05$.

Incrocio - Stadio del prelievo	Ovuli isolati (n.)	Embrioni vitali		Formazione germogli a 8 settimane		Germogli radicati		Formazione plantule	
		(n.)	(%)	(n.)	(%)	(n.)	(%)	(n.)	(%)
Luisa × Thompson S.-30 dap	0c	0b	0	0b	0	0c	0	0c	0
Luisa × Thompson S.-40 dap	76a	30a	39.5	9a	30	2b	6.7	2b	6.7
Luisa × Thompson S.-50 dap	37b	31a	83.8	7a	22.6	7a	22.6	7a	22.6
Luisa × White S.-30 dap	30a	12a	40	3a	25	0	0	0	0
Luisa × White S.-40 dap	30a	9ab	30	3a	33.3	1	11.1	0	0
Luisa × White S.-50 dap	15b	5b	33.3	0b	0	0	0	0	0
Luisa × Superior S.-30 dap	48b	28b	58.3	11	39.3	3b	10.7	3	10.7
Luisa x Superior S.-40 dap	36c	31b	86.1	13	41.9	3b	9.7	2	6.5
Luisa x Superior S.-50 dap	99a	74a	74.8	9	12.2	6a	8.1	3	4.1
Luisa x Princess S.-30 dap	45c	12	26.7	6b	50	0c	0	0b	0
Luisa × Princess S.-40 dap	83b	55a	66.3	17a	30.9	6a	10.9	4a	7.3
Luisa × Princess S.-50 dap	124a	50	40.3	3b	6	3b	6	3a	6
Luisa × Crimson S.-30 dap	93a	42b	45.2	9	21.4	2b	4,8	2	4.8
Luisa × Crimson S.-40 dap	75b	23c	30.7	12	52.2	5a	21.7	3	13
Luisa × Crimson S.-50 dap	83ab	60a	72.3	8	13.3	2b	3.3	2	3.3
Luisa × Regal S.-30 dap	60b	18b	30	7b	38.9	0b	0	0b	0
Luisa × Regal S.-40 dap	34c	29b	85.3	4c	13.8	2a	6.9	2a	6.9
Luisa × Regal S.-50 dap	73a	60a	82.2	13a	21.7	2a	3.3	1a	1.7

con il valore più alto per l'ibrido "Luisa x Crimson". Analogamente, per il 50% degli ibridi la più alta percentuale di plantule è stata ottenuta da ovuli prelevati a 40dap. La minore rigenerazione di plantule è stata ottenuta dagli ovuli isolati a 30 dap negli incroci "Luisa×White", "Luisa×Princess" e "Luisa×Regal" (Tab. 1).

Discussione e Conclusioni

Il nostro protocollo di *embryo rescue* ha permesso di rigenerare delle plantule vitali da tutti gli ibridi di apireni (tranne "Luisa×White"), ma lo stadio di sviluppo degli espianti, i genotipi parentali e la durata della germinazione si sono rivelati fattori cruciali per ottenere la migliore efficienza di rigenerazione. La performance degli ibridi in fase di radicazione è stata quasi sempre confermata in fase di formazione della plantula, mentre il tasso di vitalità e germinazione degli embrioni non si è mantenuto sempre costante nelle fasi successive. Poiché le fasi precoci della coltura *in vitro* hanno evidenziato una maggiore instabilità degli embrioni, risultano quindi determinanti al fine di ottenere un'efficienza di radicazione quanto più elevata possibile. Il nostro studio dimostra che lo stadio ottimale per avviare un protocollo di *embryo rescue* su embrioni immaturi, ossia quello che permette di ottenere l'efficienza migliore nel maggior numero di fasi della rigenerazione *in vitro*, non può essere conosciuto *a priori* in quanto influenzato da numerosi fattori genetici e metodologici; pertanto, simili esperimenti risultano fondamentali per implementare i programmi di miglioramento genetico per l'apirenia.

Bibliografia

- Emershad R.L., Ramming D.W., 1982. In-ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. 'Thompson Seedless'. Horticultural Science, 17: 576.
- Giancaspro A., Mazzeo A., Carlomagno A., Gadaleta A., Somma S., Ferrara G., 2022. Optimization of an in vitro embryo rescue protocol for breeding seedless table grapes (*Vitis vinifera* L.) in Italy. Horticulturae, 8: 121.
- Ji W., Li G.R., Luo Y.X., Ma X.H., Wang M., Ren R., 2015. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between different ploidy grapes. Genetics and Molecular Research, 14: 18616-18622.
- Narayanaswami S., Norstog K., 1964. Plant embryo culture. The Botanical Review, 30: 587-628.

Dati preliminari di propagazione *in vitro* di *Chimonanthus praecox* nell'ambito della identificazione di specie ornamentali multifunzionali e analisi dei metaboliti secondari

Elena Balzani^{1*}, Marco Savona¹, Laura De Benedetti¹, Valentina Santoro³, Valentina Parisi³, Valeria Iobbi², Carlo Mascarello¹, Andrea Copetta¹, Angela Bisio², Barbara Ruffoni¹

* elenabalzani.to@gmail.com

¹ CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo (CREA-OF), Sanremo (IM)

² Dipartimento di Farmacia, Università di Genova, Genova (GE)

³ Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno

Riassunto

Chimonanthus praecox è una specie multifunzionale coltivata per scopi ornamentali e utilizzata dall'industria cosmetica. Scopo del lavoro è determinare un protocollo utile per la coltura *in vitro* di plantule e calli a fini estrattivi e valutare la composizione fitochimica di fiori e foglie in cromatografia liquida e spettrometria di massa. Le gemme apicali hanno sviluppato germogli che sono stati propagati su substrato contenente benzylamino purina 1,0 mg/L e acido indolacetico 0,1 mg/L; alcuni espianti hanno prodotto callo. A seguito dell'analisi degli estratti di materiale fresco, si è visto che chimonantina e scopolina sono i composti maggiormente presenti nei fiori, mentre chimonantina e acido linolenico sono principalmente presenti nelle foglie.

Parole chiave: specie multifunzionali, micropropagazione, callo, profilo fitochimico

Preliminary data on *in vitro* propagation of a multifunctional species: *Chimonanthus praecox* and phytochemical analysis

Abstract: In the horticultural sector, the need to identify new species and varietal selections with multifunctional characteristics, i.e., usable for both ornamental and extractive purposes and with a “zero residue” production cycle as well as a low environmental impact, is growing. The purpose of the “Multiflora” project (PSR Regione Liguria measure 16.01) is to develop and expand the use of ornamental, medicinal and aromatic plants grown in Liguria, applying innovative methods. Among the selected species *Chimonanthus praecox* (L.) Link. is a shrub characterized by fragrant winter flowering. The species is considered multifunctional, since the fresh cut flowers are marketed in the ornamental sector, while the essential oil is used in the cosmetic industry. For *in vitro* propagation, explants taken during the vegetative development phase (in summer) or the flowering period (in winter) were used. Apical and axillary buds, leaves and, in winter, also immature flowers were used as starting material. Sterilization of the explants was carried out following successive steps: 70% ethanol (30'' - 60''), 3.5% or 4% bleach for 20' and washings with sterile water. Explants were placed on MS propagation substrate, with 30 g/L sucrose, pH 5.7 supplemented with 0.5 mg/L BAP, or 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L IAA; leaves were placed in a Petri dish on basic MS medium supplemented with 1 mg/L NAA for callus induction. LC-MS analysis of the methanolic extracts of the leaves and of the fresh flowers was first carried out to determine a metabolic profile to be used in the next evaluation of the micropropagated material.

Keywords: multifunctional species, micropropagation, callus, phytochemical profile

Introduzione

Il progetto “Multiflora” (PSR Regione Liguria misura 16.01) ha come obiettivo l’utilizzo di piante multifunzionali per scopi sia ornamentali che estrattivi, che abbiano un ciclo produttivo a “residuo zero” ed un basso impatto ambientale. Tra le specie multifunzionali selezionate è stata presa in considerazione *Chimonanthus praecox* (L.) Link.

C. praecox è un arbusto deciduo perenne appartenente alla famiglia delle Calycantaceae, piccola famiglia composta da dieci specie suddivise in tre generi (*Calycanthus*, *Chimonanthus* e *Idiospermum*) differenti per epoca, colorazione della fioritura e distribuzione geografica. Originario della Cina, è coltivato da oltre mille anni per la profumata fioritura invernale che lo caratterizza (Shang et al., 2020). Oltre ad essere utilizzato come pianta ad elevato valore ornamentale viene impiegato nella medicina cinese per curare vari disturbi, tra cui l’artrite reumatoide, il vomito, il morbillo (Shu et al., 2019). I fiori contengono un insieme di terpenoidi volatili (monoterpeni e sesquiterpeni) e benzenoidi usati in cosmetica e nella sintesi di profumi (Ueyama et al., 1990).

Materiali e Metodi

Raccolta del materiale, sterilizzazione e coltura in vitro

Il materiale è stato prelevato presso l’Azienda Maccario Matteo - San Biagio della Cima (IM) in tre date 29/7/22, 1/9/22 e 8/10/22. Nella generale uniformità delle piante coltivate presso l’Azienda sono stati prelevati, in ogni data, 10 rami da 5 piante random in fase di sviluppo vegetativo, da questi rami sono state poi selezionate, in ogni prelievo, 25 gemme apicali e 25 ascellari. La sterilizzazione prevede: pretrattamenti con acqua e sapone, etanolo 70% per 20’’ e un lavaggio in acqua sterile per 10’, sterilizzazione superficiale in ipoclorito di sodio, NaClO 3,5% per 10’ e 2 lavaggi in acqua sterile da 10’. Sono state inoltre sterilizzate foglie singole e fiori immaturi con concentrazione inferiore di NaClO (1,5%).

Le gemme sono state poste in tubi con Murashige and Skoog (1962) MS, 30 g/L di saccarosio, pH 5,7 addizionato con 6-benzilaminopurina (BAP) 0,5 mg/L o 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/L acido indolacetico (IAA). Le gemme sviluppate sono state trasferite in vasi di coltura con substrato MS addizionato con BAP 0,5 mg/L e successivamente su MS addizionato con BAP 1 mg/L e IAA 0,1 mg/L. I materiali ottenuti sono stati trasferiti ogni 28 giorni. Le foglie sono state disposte in piastre Petri su terreno base di MS addizionato con acido naftalenacetico (NAA) 1 mg/L con la pagina abassiale della foglia a contatto con il substrato. Tutto il materiale è stato allevato in camera di coltura a 23 °C ± 1, con un fotoperiodo di 16 h di luce (45 µE m⁻² s⁻¹).

Analisi dei metaboliti secondari

L’analisi è stata effettuata su foglie e fiori freschi prelevati per lo scopo nel gennaio 2022 al fine di determinare un profilo metabolico da confrontare nelle successive analisi dei materiali micropropagati. La configurazione adottata per l’analisi dei metaboliti secondari di *C. praecox* ha previsto l’utilizzo di un sistema Ultimate 3000 HPLC accoppiato ad un analizzatore di massa ad alta risoluzione (LTQ Orbitrap, (Thermo Scientific ®) con sorgente ionica electrospray. Le condizioni analitiche sono le seguenti: colonna Luna C18 (150mm*2mm*3µm) (Phenomenex®, Castel Maggiore, Bologna, Italy) flusso 200 µL/min e volume di iniezione 10 µL. Le fasi mobili utilizzate sono state una soluzione acquosa di HCOOH 0.1% (A) e CH₃CN (B) con un gradiente lineare dal 5 al 50% di B in 30 min seguito da un secondo gradiente più veloce fino al 100% di B. Le analisi sono state acquisite in modalità ioni positivi in un range di massa tra 100-1000 m/z in modalità data-dependent.

Risultati

Per ciascuna epoca di prelievo è stata valutata la sterilità degli espianti combinata con la vitalità, i risultati relativi alle tre epoche di prelievo sono riportati in Tab. 1. Dopo 4 settimane di coltura solo gli espianti del primo prelievo sono risultati sterili e vitali nel 27% dei casi; di questo materiale il 14%, pro-

Tab. 1. Produzione di espianti sterili e proliferanti in relazione al periodo di prelievo, in ogni prelievo sono state sterilizzate 50 gemme tra apicali ed ascellari.

Tab.1. Production of sterile and viable explants related to the sampling date.

Epoca di prelievo	Percentuale di espianti sterili e vitali	Moltiplicazione dei germogli	Produzione di callo
29/07/2022	27%	14% (7 espianti apicali)	6% (3 espianti ascellari)
01/09/2022	0	0	0
08/10/2022	0	0	0

veniente da gemme apicali, ha mostrato capacità di germogliamento. Questo dato indica la necessità di individuare il periodo migliore per poter intraprendere la micropropagazione e anche la tipologia dell'espianto. Gli espianti ottenuti sono stati clonati singolarmente su substrato MS addizionato con BAP 1 mg/L e IAA 0,1 mg/L (tasso di moltiplicazione di 1,2 germogli per espianto per mese, dati non mostrati). Da alcuni espianti di gemme ascellari è stato possibile individuare lo sviluppo di callo; le porzioni di foglia di *C. praecox* non hanno indotto callo e dai fiori immaturi invece non è stato possibile ottenere né callo né alcun germoglio sterile.

Le analisi LC-MS (Fig. 1) dell'estratto delle foglie e dei fiori di *C. praecox* ci ha permesso di identificare 24 composti (Tab. 2) appartenenti a differenti classi chimiche, grazie allo studio della massa accurata, degli spettri di frammentazione e per confronto con dati di letteratura. Nel dettaglio sono stati identificati derivati mono e diglicosilati di campferolo, quercetina e isoramnetina, composti appartenenti alla classe delle cumarine, alcaloidi e acidi grassi polinsaturi.

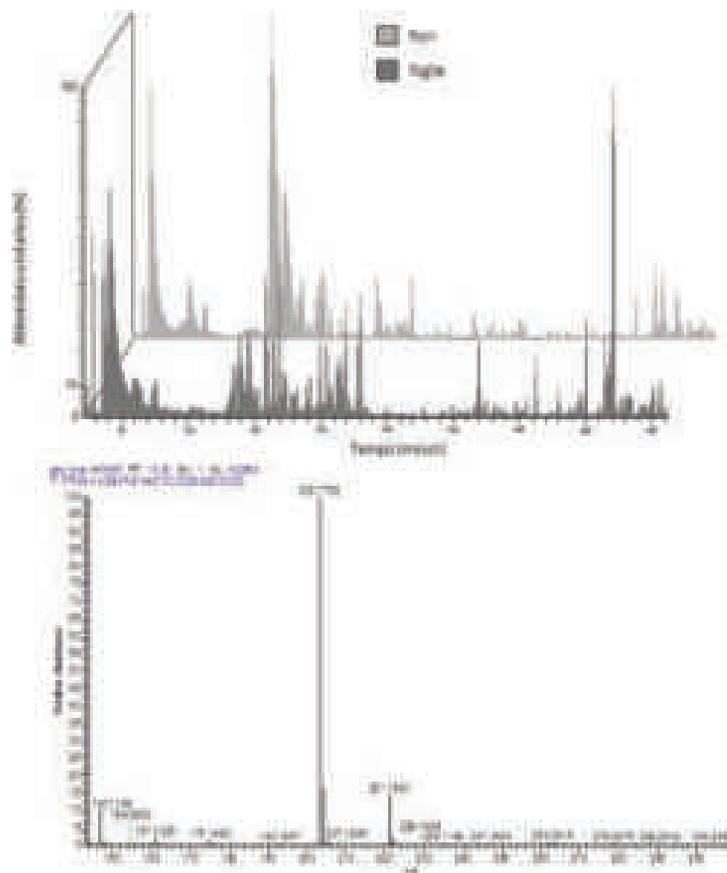


Fig. 1. Profilo LC-HRMS, acquisito in modalità ioni positivi, di estratti di fiori (grigio chiaro) e foglie (grigio scuro) di *C. praecox*.

Fig. 1. LC-HRMS profile, acquired in positive ion mode, of *C. praecox* flowers (light grey) and leaves (dark grey) extracts.

Tab. 2. Dati UHPLC-HRMS dei composti degli estratti di fiori e foglie di *C. praecox*.
 Tab. 2. UHPLC-HRMS data of compounds in flower and leave of *C. praecox* extracts.

N	R _t (min)	[M+H] ⁺	Fragmentation	Compound
1	3.2	3.612.390	173.13	Calycanthidine isomer
2	3.9	3.472.232	173,144,150	Chimonanthine isomer
3	4.5	3.472.232	173,144,150	Chimonanthine isomer
4	6.3	3.612.390	187,173,158,130	Calycanthidine isomer
5	9.4	2.910.869	123,139,207,259	Catechin
6	13.3	3.752.545	344,187,158,144	Folicanthine
7	14.1	3.472.232	173,144,150	Chimonanthine isomer
8	14.8	2.910.869	123,139,207,259	Epicatechin
9	15.0	9.032.763	757,611,449,287	Kaempferol- <i>O</i> -dihexoside-dirhamnoside
10	15.9	3.551.028	193	Scopolin
11	16.9	7.572.190	611,449,287	Kaempferol- <i>O</i> -dihexoside-rhamnoside
12	19.0	7.572.190	611.303	Quercetina- <i>O</i> -hexoside-dirhamnoside
13	20	7.412.239	595,449,287	Kaempferol- <i>O</i> -hexoside-dirhamnoside
14	20.5	6.111.608	465.303	Quercetin- <i>O</i> -hexoside-rhamnoside
15	20.8	6.111.608	465.303	Quercetin- <i>O</i> -exoside-rhamnoside isomer
16	20.9	1.930.496	133.178	Scopoletin
17	21.4	4.651.033	303	Quercetin- <i>O</i> -hexoside
18	22.0	5.951.663	449.303	Quercetin-dirhamnoside
19	22.2	6.251.769	479.317	Isorhamnetin- <i>O</i> -hexoside-rhamnoside
20	22.8	4.491.080	287	Kaempferol- <i>O</i> -hexoside
21	23.1	4.491.080	287	Kaempferol- <i>O</i> -hexoside
22	27.9	3.030.501	167.185	Quercetin
23	42.1	2.772.165	79, 93,107	Linolenic acid
24	43.3	2.792.322	81,95,109	Linoleic acid

Discussione e Conclusioni

In questo lavoro, è stato possibile micropropagare *C. praecox* su substrato MS addizionato con BAP 1 mg/L e IAA 0,1 mg/L; tale combinazione ormonale si discosta dal substrato MS con BAP 0,5 mg/L, proposto da Kozomara et al. (2008). Tale differenza potrebbe essere ascritta al differente genotipo di *C. praecox* utilizzato nei due studi o ad eventuali differenze di sistema ed areale di coltivazione. L'induzione di callo in substrato con BAP rispetto a quello con Thidiazuron (TDZ) è stata osservata da Zhao et al. (2012). Gli stessi autori osservano la più alta frequenza di rigenerazione di germogli avventizi da espianti coltivati su substrato *Woody Plant Medium* arricchito con 2,37 mg/L di TDZ e 1,48 mg/L di NAA. Tali variabili saranno oggetto di approfondimento anche nel nostro materiale. La micropropagazione dei nostri materiali è ancora poco stabile e necessita di ulteriori studi per arrivare a tassi di moltiplicazione convincenti.

I composti isolati da fiori e foglie di *C. praecox* quali la chimonantina (e correlati isomeri) e la folicantina (alcaloidi con attività medicinali e antimicrobiche), l'epicatechina (un flavonoide) (Xu e Cheng, 2015) e la scopoletina, (una cumarina) sono stati rilevati anche in differenti varietà di questa specie (Zhang et al., 2016). La scopoletina oltre ad avere capacità antiossidanti, antimicrobiche, neuroprotettiva e antinfiammatorie, ha attività anticancro (Antika et al., 2022). La presenza negli estratti di acido linolenico (un omega 3) e derivati mono e diglicosilati di campferolo, quercetina e isoramnetina noti per le loro proprietà antiossidanti indica che *C. praecox* può essere considerata una specie ornamentale multifunzionale. La possibilità di essere moltiplicata *in vitro* e di rigenerare callo può dar luogo, in questa specie, alla selezione di genotipi con profilo metabolico più adatto alle esigenze di mercato.

Bibliografia

- Antika L.D., Tasfiyati A.N., Hikmat H., Septama A.W., 2022. Scopoletin: a review of its source, biosynthesis, and pharmacology. *Zeit. fur Naturforschung*, 77 (8): 303-316
- Kozomara B., Vinterhalter B., Radojević L., Vinterhalter D., 2008. *In vitro* propagation of *Chimonanthus praecox* (L.), a winter flowering ornamental shrub. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 44: 142–147
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–97
- SHANG J., TIAN J., CHENG H., et al., 2020. The chromosome-level wintersweet (*Chimonanthus praecox*) genome provides insights into floral scent biosynthesis and flowering in winter. *Genome Biology*, 21(200): 1-28
- Shu R.G., Yi-Li Wan Y.L., Wang X.M., 2019. Non-volatile constituents and pharmacology of *Chimonanthus*: A review. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 17(3): 161-186
- Ueyama Y., Hashimoto S., Nii H., Furukawa K., 1990. The volatile constituents of the flower concrete of *C. praecox* Link. from China. *Flavour and Fragrance Journal*, 5: 85–88
- Zhao M., Fan G., Zhang X., 2012. Establishment of *in vitro* plant regeneration system for *Chimonanthus praecox* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 11(45): 10358-10361
- Zhang S., Zhang H., Chen L., Xia W., Zhang W., 2016. Phytochemical profiles and antioxidant activities of varieties of *C. praecox*. *Industrial Crops and Products*, 85: 11–21
- Xu J.B., Cheng K.J., 2015. Studies on the alkaloids of the Calycanthaceae and their syntheses. *Molecules*, 20: 6715-6738

Sitografia

<https://www.cersaa.it/multiflora/>

La tecnica dell'*embryo rescue* come strumento per l'ottenimento di nuove varietà di uve da tavola apirene

Lucia Rosaria Forleo*, Antonio Domenico Marsico, Margherita D'Amico, Maria Francesca Cardone, Teodora Basile, Riccardo Velasco, Carlo Bergamini e Rocco Perniola

* luciarosaria.forleo@crea.gov.it

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia (CREA-VE), Turi (BA)

Riassunto

L'Italia rientra tra i primi sei Paesi a livello mondiale come produttore di uva da tavola (OIV, 2019) e la Puglia rappresenta la regione con la maggior produzione. La maggior parte della produzione viene esportata verso i Paesi del Nord Europa, i quali richiedono varietà apirene. A tal fine, si è reso necessario costituire varietà apirene adatte ai nostri ambienti. Presso l'attuale CREA-VE, sede di Turi, è stato avviato un programma di miglioramento genetico che ha previsto l'utilizzo dell'*embryo rescue*. Sulla progenie ottenuta è stata applicata la Selezione Assistita da Marcatori (MAS) per verificare la paternità e prevedere quali piante avrebbero manifestato l'apirenia.

Parole chiave: *Vitis vinifera*, senza seme, novità vegetali

The embryo rescue technique is a tool for obtaining new varieties of seedless table grapes

Abstract: Italy is among the world's top six table grape-producing countries in the world with the Apulia region leading Italian production. The largest markets for grapes exported from Italy are Northern European countries, which prefer seedless grape varieties. To satisfy market demand, it was necessary to create seedless varieties capable of adaptation to the Mediterranean environment and climate. Therefore, a genetic improvement program based on embryo rescue was implemented at CREA-VE of Turi. Fifteen combinations of crossings were carried out with the traditional breeding technique. Starting from a selection of the best inflorescences, the calyptra and anthers were removed from each flower a few days before flowering with the aid of tweezers. Immediately after this removal, the inflorescences were isolated from the surrounding environment with paper bags, to avoid fecundation with unwanted pollen. When the stigmatic liquid appeared, each emasculated inflorescence was fertilized with the pollen of the variety chosen as the male parent. Finally, the inflorescences were covered again with a paper bag. Once fertilization took place, the bunches were released from the bags and left on the plant for the following 60 days. After harvesting, the bunches were stored in a cold room at a temperature of $\pm 4^{\circ}\text{C}$ until the extraction of the immature grape seeds which took place at the end of August (Eynard and Dalmaso, 1990; Nookaraju et al., 2007). The immature grape seeds were placed on a culture substrate consisting of MS, agar (7 g/L), sucrose (30 g/L), and NOA (10 μM). After about 4-6 weeks the seeds were sectioned lengthwise and placed in a new substrate containing: MS (2,2 g/L), agar (7 g/L), sucrose (30 g/L), and BAP (1 μM). The germinated seedlings were transferred into a new medium: $\frac{1}{2}$ MS, agar (7 g/L), sucrose (15 g/L), and BAP (0.5 μM). After about another 6 weeks they were placed on the last substrate composed as follows: $\frac{1}{2}$ MS, agar (7 g/L), sucrose (15 g/L), and BAP (0,1 μM). The seedlings with 7-8 leaflets were transferred to pots for the acclimatization step. Molecular marker-assisted selection (MAS) was then applied to the seedlings obtained with the "embryo rescue" technique. The molecular analysis allowed the early detection of the characters of interest in the seedlings. The progeny deriving from the Jade x Regal combination was one of the most interesting

ones. Indeed, 4 individuals producing white grapes have been already patented: Dertum, Canusium, Locreuse, and Joha.

Keywords: *Vitis vinifera*, seedless, breeding

Introduzione

La filiera dell'uva da tavola è attualmente in profonda evoluzione. Dalle varietà con semi, tradizionalmente coltivate in Italia, l'interesse si sta spostando verso le varietà apirene sempre più richieste dai mercati esteri.

Nell'ottenimento di linee di uve apirene, l'impiego di piante con semi come parentali femminili rende difficile la selezione di progenie apirena poiché la loro percentuale risulta molto bassa. L'utilizzo di genitori entrambi apireni aumenta il valore di tale percentuale, ma necessita di tecniche particolari, quali l'*embryo rescue*, necessarie per la sopravvivenza dell'embrione proveniente dall'atto fecondativo, che altrimenti andrebbe incontro a morte. Infatti, le uve apirene stenospermocarpiche sono caratterizzate da vinaccioli di piccole dimensioni ed erbacei che presentano un aborto precoce dell'embrione. Con la tecnica dell'*embryo rescue* i grappoli vengono raccolti prima della loro maturazione per evitare l'aborto dell'embrione; i vinaccioli immaturi completano l'accrescimento e la successiva germinazione *in vitro*.

Materiali e Metodi

Le accessioni delle varietà di uva utilizzate nel programma di incroci per il miglioramento genetico sono conservate nella collezione di germoplasma del CREA-VE, Azienda Sperimentale "Lamarossa" in agro di Rutigliano (BA, lat. 40°57'24.54" N, lon.17°00'28.94" E). Nello specifico la collezione è costituita da 718 accessioni di uva da tavola, 2.305 di uva da vino innestate per la maggior parte su 1103 Paulsen (*Vitis Berlandieri* x *Vitis rupestris*).

Sono state effettuate 15 combinazioni di incroci (Tab. 1) mediante tecnica tradizionale (Reisch e Pratt, 1996; Fregoni, 2005), selezionando quindi le migliori infiorescenze e rimuovendo, pochi giorni prima della fioritura (2^a decade di maggio), la caliptra e le antere da ciascun fiore con l'ausilio di pinzette (Fig. 1a). Subito dopo le infiorescenze sono state isolate dall'ambiente circostante con sacchetti di carta (Fig. 1b) per evitare l'impollinazione con polline non desiderato. Alla comparsa del liquido stigmatico, su ciascuna infiorescenza, precedentemente demasculata, si è proceduti alla fecondazione con il polline della varietà scelta come genitore maschile; infine l'infiorescenza è stata nuovamente protetta dal sacchetto di carta.

Il polline è stato prelevato da varietà apirene, presenti in parte presso l'Azienda Sperimentale "Lamarossa" e in parte presso altri vigneti della zona. Le infiorescenze usate come impollinanti, caratterizzate da fioritura anticipata rispetto a quella delle cultivar portasemi, sono state insacchettate nella prima decade di maggio e a fioritura avvenuta il polline è stato raccolto in sacchetti di carta e conservato in cella frigo, alla temperatura di ± 4 °C e valori di umidità relativa del 50% (Hartmann e Kester, 1990), fino al momento dell'impollinazione.

Tab. 1. Schema incroci realizzati.

Tab. 1. Crossbreeding scheme carried out.

Portaseme	Impollinanti
Afrodite	Autumn Royal, Regal, Sugraone,
Jade	Autumn Royal, Carati, Regal, Sugraone
Patrizia	Autumn Royal
Supernova	Autumn Royal, Regal, Sugraone, Summer Royal
Regal	Autumn Giant, Autumn Royal
Autumn Royal	Regal

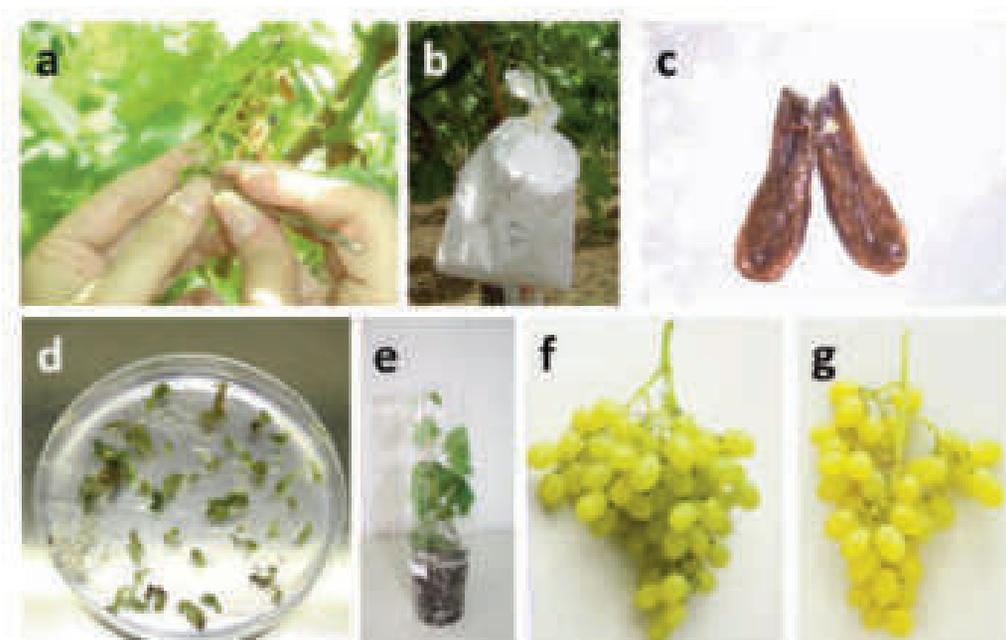


Fig. 1. Fasi del breeding: a) demasculazione; b) insacchettamento; c) embrione; d) plantule; e) ambientamento; f) cv ottenuta Joha; g) cv ottenuta Canusium.

Fig. 1. Phases of the breeding: a) emasculation; b) bagging; c) embryo; d) seedling; e) environment; f) cv obtained Joha; g) cv obtained Canusium.

A fecondazione avvenuta i grappoli sono stati liberati dai sacchetti (1^a decade di giugno) e sono stati lasciati sulla pianta fino a 60 gg circa dopo la fecondazione (1^a decade di agosto). Dopo la raccolta, i grappoli sono stati conservati in cella frigo alla temperatura di ± 4 °C fino all'estrazione dei vinaccioli immaturi, avvenuta a fine agosto (Eynard e Dalmasso, 1990; Nookaraju et al., 2007). Dopo aver estratto i semi dalle bacche si è proceduto alla loro immersione in una soluzione contenente ipoclorito di sodio al 5% per 10 minuti e, subito dopo, è stato eseguito il lavaggio in acqua sterile. Successivamente, i semi (in numero di 25 per piastra) sono stati posti su un apposito substrato di coltura costituito da: MS (Murashige e Skoog, 1962), agar (7 g/L), saccarosio (30 g/L) e acido naftoxiacetico (NOA, 10 μ M); dopo circa 4-6 settimane i semi sono stati sezionati longitudinalmente (Fig. 1c) e posti in un nuovo substrato contenente: $\frac{1}{2}$ MS, agar (7 g/L), saccarosio (30 g/L) e benzilaminopurina (BAP, 1 μ M). Gli embrioni in via di germinazione sono stati trasferiti su un nuovo mezzo per l'accrescimento (Fig. 1d): $\frac{1}{2}$ MS, agar (7 g/L), saccarosio (15 g/L) e BAP (0,5 μ M). Dopo circa altre 6 settimane le piantine sono state poste su un ultimo substrato così composto: $\frac{1}{2}$ MS, agar (7 g/L), saccarosio (15 g/L) e BAP (0,1 μ M). Le piantine con 7-8 foglioline (Fig. 1e) sono state trasferite in vasi ed acclimatate (Tian e Wang, 2008). Sulle piantine è stata poi applicata la selezione assistita da marcatori molecolari (MAS). Da ciascuna pianta della progenie ottenuta è stata prelevata una foglia ed estratto il DNA genomico con il kit REDExtract-N-AmpTM Plant PCR seguendo le istruzioni del fornitore (SIGMA-ALDRICH). Il DNA estratto è stato sottoposto a PCR usando i primers per i microsatelliti ISV2 e ISV4 (Thomas et al., 1993) e contemporaneamente nella stessa reazione i primers per il marcatore STS associato all'apirenia p3_VvAGL11 (Meija et al., 2012).

Risultati

Degli incroci effettuati, quelli tra Patrizia x Autumn Royal, Supernova x Autumn Royal e Supernova x Summer Royal non hanno dato origine ad embrioni vitali. Per le altre varietà i risultati ottenuti sono riportati in Fig. 2. Come è possibile osservare, gli incroci che hanno dato la percentuale di germinazione maggiore sono stati quelli che hanno avuto la cv Afrodite come portaseme, raggiungendo

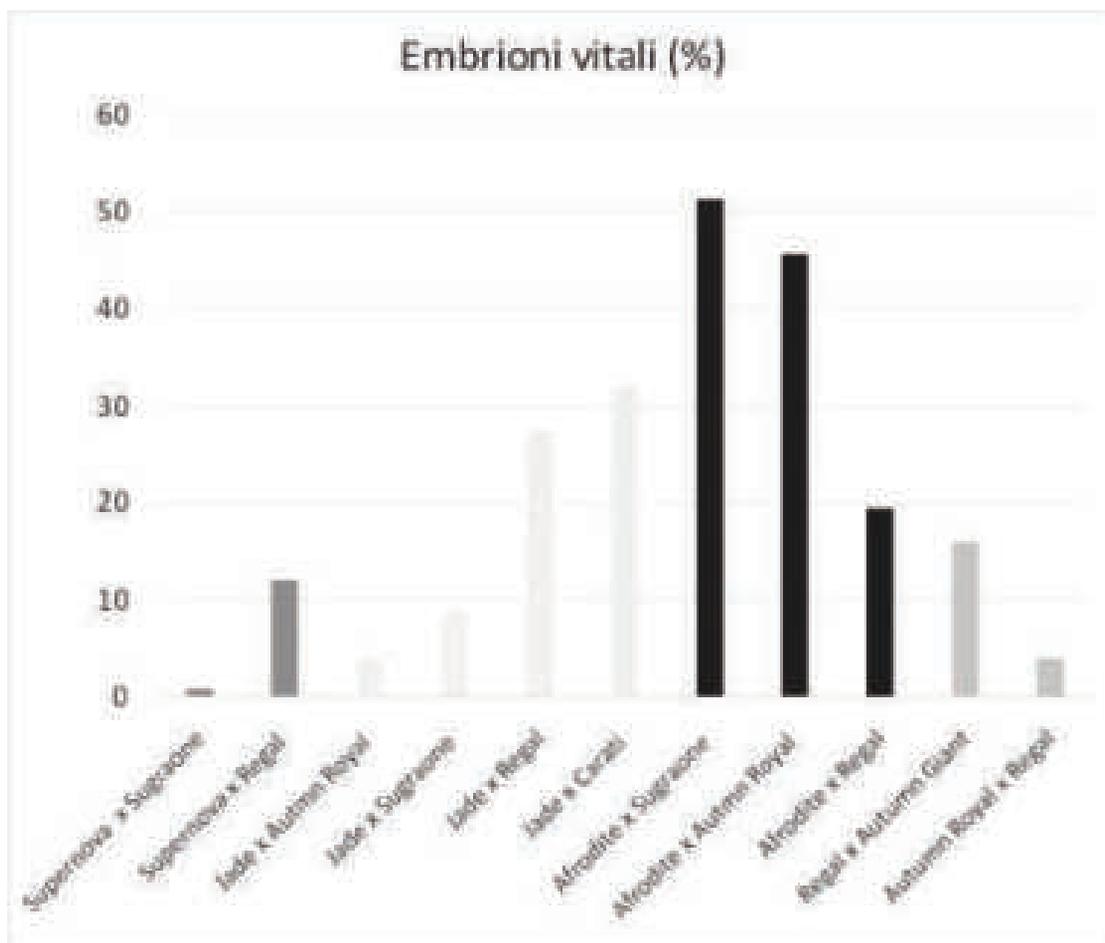


Fig. 2. Percentuale embrioni vitali.

Fig. 2. Percentage of viable embryos.

un valore medio massimo del 51,3%. I valori più bassi di germinazione sono stati invece riscontrati negli incroci con la cv portaseme Supernova, con valori medi inferiori o pari allo 0,8% (registrato nell'incrocio Supernova con Sugraone). Tuttavia, non si può affermare in termini assoluti che l'effetto positivo sulla germinabilità sia imputabile esclusivamente al parentale portaseme; ciò andrebbe verificato con un maggior numero di incroci ottenuti con impollinanti differenti. Negli incroci combinati tra le cv portasemi Supernova, Jade e Afrodite con lo stesso impollinante Sugraone è stata registrata un'ampia variabilità di germinazione tra le tre combinazioni (0,8% Supernova, 8,7% Jade e 51,3% Afrodite), a conferma di quanto sia importante individuare la giusta combinazione di incrocio.

Dall'analisi MAS è stata anche individuata una progenie risultato di autofecondazione.

Discussione e Conclusioni

La tecnica dell'*embryo rescue* ha consentito di ottenere un congruo numero di plantule e la successiva analisi molecolare ci ha permesso di rilevare in dettaglio, con anni di anticipo, i caratteri di interesse. Interessante è risultata la progenie derivante dalla combinazione Jade x Regal; infatti, sono stati brevettati ben 4 individui: Dertum, Canusium, Loceuse e Joha, tutti a bacca bianca (Figg. 1f, 1g). Nella presente ricerca è stato rilevato che la presenza di embrioni vitali e quindi la possibilità di germinazione potrebbe dipendere dal grado di sviluppo dei vinaccioli immaturi; infatti la varietà Afrodite che ha dato i migliori risultati presentava vinaccioli immaturi più grandi rispetto alle altre. Con il prosieguo delle attività di breeding tali aspetti risulteranno più chiari, così come quelli legati dall'influenza esercitata dalla varietà impollinante.

Bibliografia

- Eynard I., Dalmasso G., 1990. Miglioramento genetico. In: *Viticultura moderna*. Hoepli, pp. 167-179.
- Fregoni M., 2005. Miglioramento genetico della vite. In: *Viticultura di Qualità*, Phytoline editore: 67-160.
- Hartmann H.T., Kester D.E., 1990. Produzione di seme geneticamente puro. In *Propagazione delle piante, Edagricole (Bologna)*, pp. 87-107.
- Mejía, N., Soto B., Guerrero M., Casanueva X., Houel C., Miccono M.De.L., Ramos R., Le Cunff L., et al. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biol* 11: 57.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Nokaraju A., Barreto M.S., Karibasappa G.S., Agrawal D.C., 2007. Synergic effect of CCPU and benzyladenine on embryo rescue in six stenospermocarpic cultivars of grapevine. *Vitis*, (4): 188-191.
- OIV - International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation, 2019. *Statistical Report on World Vitiviniculture*, pp. 3-10.
- Reisch B.I., Pratt C., 1996. Grapes. In: Janick, J. and Moore J.N. (eds.), *Fruit Breeding. Volume 2, Vine and Small Fruits*. Wiley, New York, USA, pp. 297-369.
- Thomas M.R., Scott N.S., 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequenced-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics (TAG)*, 86: 985-990.
- Tian L., Wang Y., 2008. Seedless grape breeding for disease resistance by using embryo rescue. *Vitis*, (47): 15-19.

Effetto del floroglucινόlo sulla radicazione *in vitro* di Tonda Gentile Romana (*Corylus avellana* L.) e Dundee (*C. colurna* L. x *C. avellana* L.)

Michela Lupo*, Valerio Cristofori, Cristian Silvestri

* michela.lupo@unitus.it

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

Riassunto

Le esperienze sulla micropropagazione del nocciolo evidenziano delle criticità riguardanti la fase di radicazione, spesso legate alla genotipo-dipendenza. In questo lavoro viene proposto l'utilizzo del floroglucινόlo, un composto fenolico spesso impiegato in sinergia con le auxine, che mostra effetti positivi sulla radicazione *in vitro*, in quanto è probabile che il sinergismo auxina-fenolo provochi una diminuzione delle perossidasi, proteggendo così le auxine endogene dall'ossidazione. Gli esperimenti descritti nel presente lavoro hanno mostrato come l'ibrido interspecifico Dundee (*C. colurna* x *C. avellana*), impiegato come portinnesto non pollonifero del nocciolo europeo, abbia una attitudine alla radicazione superiore rispetto alla cv. Tonda Gentile Romana, e che i tempi di radicazione e la qualità delle radici ottenute sono strettamente dipendenti dal tipo di auxina impiegata. Inoltre, l'impiego del fluoroglucινόlo sembra esercitare un effetto migliorativo sulla radicazione, sulla qualità degli apparati radicali, e sulla acclimatazione delle giovani piantine.

Parole chiave: Nocciolo europeo, ibridi interspecifici, auxine, composti fenolici

Effect of phloroglucinol on *in vitro* rooting of Tonda Gentile Romana (*Corylus avellana*) and Dundee (*C. colurna* x *C. avellana*)

Abstract: One of the bottlenecks in hazelnut micropropagation is the rooting phase. These difficulties are often genotype-dependent, as there is a lack of suitable protocols for a large number of cultivars. Phloroglucinol (PG) is one of the products of degradation of phloridzin, a phenol known for its growth-promoting effect. This compound has attracted a lot of interest from researchers as it seems to have a synergistic action with auxins, particularly indole-3-acetic acid (IAA) and has a higher melting temperature than that can be reached by autoclaving, which makes it much easier to be used than other phytohormones. The positive effect of PG in the rooting phase could be due to two different mechanisms: 1- phenols can act as an alternative substrate for oxidative enzymes, protecting auxins from degradation; 2- PG and phloridzin formed many compounds when they are oxidized and these compounds induce morphogenic activity. Several studies have been conducted on the use of PG in plant tissue culture demonstrating as this compound has a positive effect on the rooting of several fruit crops. The experiments described in the present work showed that the interspecific hybrid Dundee (*C. colurna* x *C. avellana*) has a superior rooting ability compared to the cv. Tonda Gentile Romana of European hazelnut, and that the rooting time and the quality of the roots obtained are closely dependent on the type of auxin used. Furthermore, the use of phloroglucinol seems to exert an improving effect on rooting, root system quality, and acclimatization of young plantlets.

Keywords: hazelnut, interspecific hybrids, rooting, auxins, phenols

Introduzione

Il nocciolo europeo (*Corylus avellana* L.) è una pianta arborea da frutta secca di interesse sempre maggiore dal punto di vista economico. Questa pianta viene generalmente propagata mediante talea o innesto ma la grande richiesta e la presenza di diverse fitopatie hanno fatto sì che il settore vivaistico si interessasse anche alla micropropagazione del nocciolo (Silvestri et al., 2020). Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi protocolli di micropropagazione piuttosto efficienti, dove però la limitazione principale è la stretta dipendenza dal genotipo; non sono infatti presenti protocolli adattabili ad un ampio panorama varietale. La radicazione *in vitro* del nocciolo viene mediata principalmente dall'utilizzo di substrati contenenti auxine come IAA o Acido indolbutirrico (IBA) (Bacchetta et al., 2008). Una molecola che suscita molto interesse nell'ambito della radicazione *in vitro* è il floriglucunolo, un fenolo con azione sinergica alle auxine, in particolare all'IAA, che sembra proteggere le auxine dalla degradazione (Sharifian et al., 2009; da Silva et al., 2013).

In questo lavoro viene sviluppato un protocollo di radicazione *in vitro* del nocciolo, attraverso l'impiego di auxine con o senza l'impiego di fluoroglucunolo, sia per l'ibrido interspecifico Dundee (*C. colurna* x *C. avellana*) impiegato come portinnesto non pollonifero, sia per la cultivar di nocciolo europeo Tonda Gentile Romana (TGR).

Materiali e Metodi

Espianti micropropagati della cv. TGR e del portinnesto Dundee, sono stati impiegati per la prova di radicazione *in vitro* con tre diverse auxine, IBA, IAA e acido naftalenacetico (NAA). Le tre auxine sono state testate a tre diverse concentrazioni pari a 2,45 μM , 4,9 μM e 7,35 μM . Gli ormoni sono stati addizionati dopo filtrosterilizzazione con filtri di diametro pari a 0,22 μm in provette contenenti 3 ml di substrato composto da: $\frac{1}{2}$ MS (Murashige e Skoog, 1962), 20 g/L di saccarosio e 6 g/L di Plant Agar (DUCHEFA, NL), pH 5,8.

Per i primi 6 giorni i germogli sono stati mantenuti al buio e poi sottoposti a fotoperiodo di 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, alla temperatura di 24 ± 1 °C con fotoperiodo di 16 h.

Gli espanti sono stati monitorati ogni 3 giorni, valutando sia la comparsa di callo sia la comparsa di radici, per 30 giorni.

E' stata poi condotta una ulteriore prova su entrambi i genotipi per valutare il possibile effetto migliorativo dovuto all'uso di auxina insieme al fluoroglucunolo. È stata scelta la concentrazione di 2,45 μM di IBA con o senza l'aggiunta di 0,2 μM di floriglucunolo (Sigma-Aldrich®).

Anche in questo caso gli espanti sono stati monitorati ogni 3 giorni, valutando sia la comparsa di callo sia la comparsa di radici, per 4 settimane.

I dati acquisiti durante i rilievi sono stati sottoposti ad analisi della varianza (one-way ANOVA) mediante il pacchetto DSAASTAT (Onofri, 2007). La separazione delle medie è stata effettuata mediante il test di Duncan ($P < 0,05$).

Risultati

La radicazione del portinnesto Dundee è risultata, indipendentemente dal tipo di auxina e dalla concentrazione applicata, superiore rispetto a quella di TGR, tanto che la radicazione è sempre risultata prossima al 100% (Fig. 1). Nel caso di TGR, invece, il 100% di radicazione degli espanti è stato raggiunto esclusivamente con IAA 7,35 μM (Fig. 2), anche se il numero di radici neoformate risultava inferiore rispetto a Dundee (Fig. 3), e ciò può influenzare il successo della successiva fase di ambientamento.

Dalla prova con l'aggiunta di fluoroglucunolo è emerso che i germogli di TGR radicati su terreno arricchito con floriglucunolo 0,2 μM hanno una percentuale di radicazione e un numero di radici per espanto significativamente superiore, a differenza della radicazione del portinnesto Dundee, nel quale non sono state osservate differenze significative in seguito all'aggiunta di fluoroglucunolo (Tab. 1).

Tab. 1. Risultati della prova di radicazione della cv. Tonda Gentile Romana e dell'ibrido Dundee in presenza di IBA (2,45 µM) con o senza l'aggiunta di fluoroglucinol (0,2 µM).

Tab. 1. *In vitro* rooting response of *C. avellana*, cv. Tonda Gentile Romana, and of Dundee hybrid with 2.45 µM IBA and with or without 0.2 µM phloroglucinol.

	Floroglucinol (µM)	% di espianti radicati	radici/espianto (n)
Tonda Gentile Romana	-	52,6 ± 4,7 b	1,8 ± 0,6 b
Tonda Gentile Romana	0.2	86,6 ± 6,8 a	5,6 ± 1,1 a
Dundee	-	81,1 ± 3,2	4,4 ± 2,1
Dundee	0.2	85,5 ± 4,4	6,7 ± 1,4

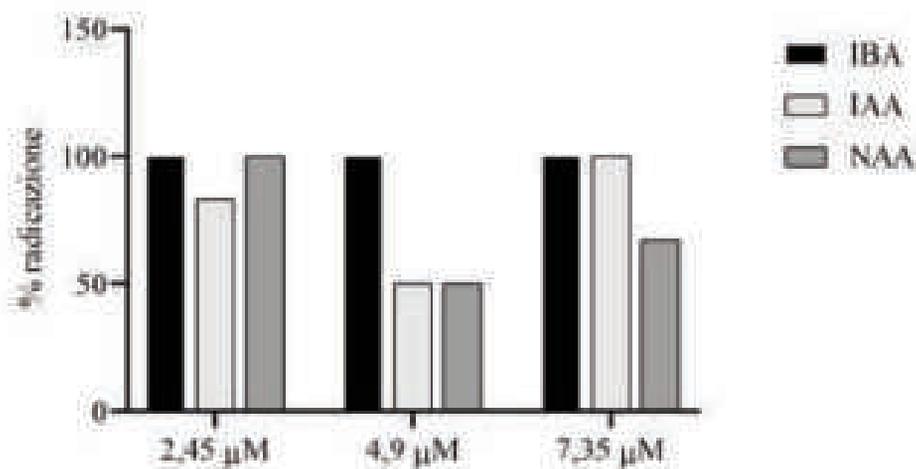


Fig. 1. Numero di espianti radicati (%) del portinnesto ibrido (*C. colurna* × *C. avellana*) Dundee in presenza di differenti auxine dopo 30 giorni dall'induzione.

Fig. 1. Number of rooted explants (%) in Dundee hybrid (*C. colurna* × *C. avellana*) in presence of different auxins after 30 days from induction.

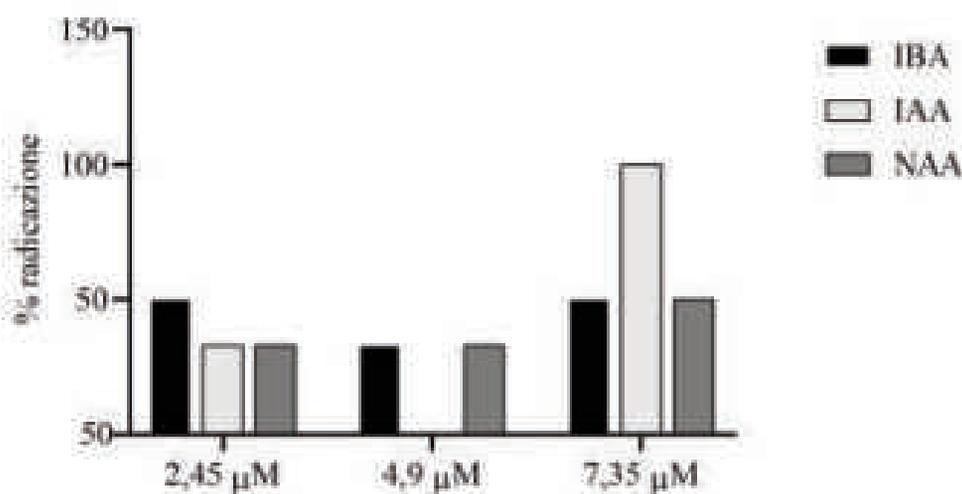


Fig. 2. Numero di espianti radicati (%) della cv. Tonda Gentile Romana (*C. avellana*) in presenza di diverse auxine dopo 30 giorni dall'induzione.

Fig. 2. Number of rooted explants (%) in cv. Tonda Gentile Romana (*C. avellana*) in presence of different auxins after 30 days from induction.

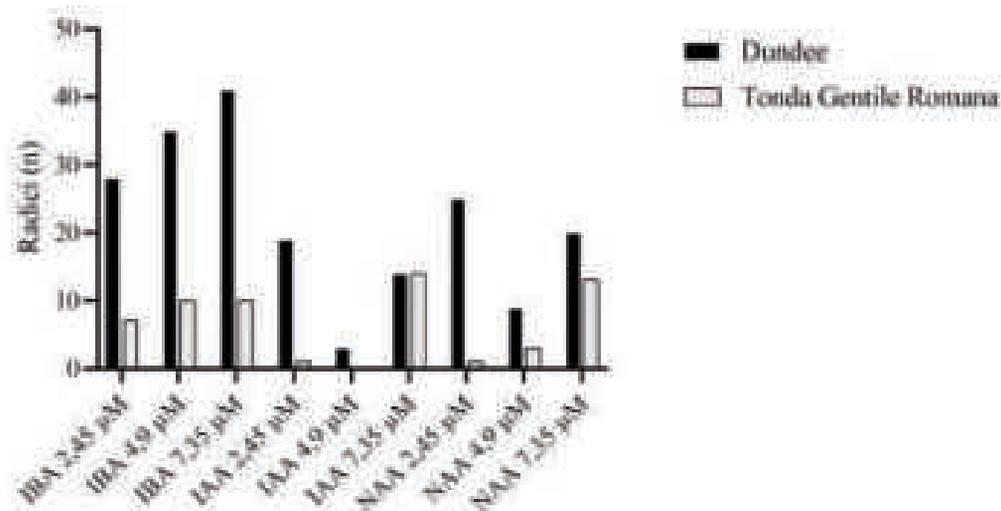


Fig. 3. Numero di radici neoformate, dopo 30 giorni dall'induzione, nel portinnesto ibrido (*C. colurna* × *C. avellana*) Dundee e nella cv. Tonda Gentile Romana (*C. avellana*).

Fig. 3. Number of neoformed roots in Dundee hybrid (*C. colurna* × *C. avellana*) and in cv. Tonda Gentile Romana (*C. avellana*) after 30 days from induction.

Discussione e Conclusioni

In questo lavoro è stato sviluppato un protocollo di radicazione efficiente per la cv. Tonda Gentile Romana e per il portinnesto Dundee. Questi risultati suggeriscono un effetto genotipo-dipendente per quanto riguarda la radicazione di nocciolo europeo e dell'ibrido. In particolare, l'utilizzo di auxine esogene nel terreno di coltura si è rivelato molto efficiente nella radicazione dell'ibrido Dundee, indipendentemente dal tipo di auxina utilizzata, presentando comunque un effetto dose-risposta. Il genotipo Tonda Gentile Romana raggiunge il 100% di espianti radicati solo mediante l'utilizzo della più alta concentrazione di IAA (7,35 µM), esclusa poi nell'esperimento per i suoi elevati costi. In questo contesto l'utilizzo del floriglucinol (0,2 µM) in combinazione con IBA (2,45 µM) ha dimostrato aumentare significativamente la radicazione di questa cultivar rispetto al solo utilizzo di auxina.

Bibliografia

- Bacchetta L., Aramini M., Bernardini C., Rugini E., 2008. In vitro propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources. HortScience 43: 562–566.
- Da Silva J.A.T., Dobranszki J., Ross S., 2013. Phloroglucinol in plant tissue culture. Vitro. Cell. Dev. Biol. - Plant 49: 1–16.
- Sharifian S., Vahdati K., Mirmasouni M., Ghaemmaghami S.A., 2009. Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured Persian walnut. Acta Hort. 812: 189–196.
- Silvestri C., Rugini E., Cristofori V., 2020. The effect of CuSO₄ for establishing in vitro culture, and the role nitrogen and iron sources in in vitro multiplication of *Corylus avellana* L. cv. Tonda Gentile Romana. Plant Biosyst., 154: 17–23.

Embriogenesi somatica diretta da foglie di caffè in differenti stadi di sviluppo

Patrick Angelo Guarini, Giuseppe Basile, Giuseppe De Mastro, Claudia Ruta*

* claudia.ruta@uniba.it

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

Riassunto

L'embriogenesi somatica è una tecnica studiata su differenti specie di caffè. L'induzione alla produzione di embrioni somatici, direttamente e/o indirettamente, e il loro successivo sviluppo, però, risultano specie e genotipo dipendenti. Generalmente i genotipi di *Coffea arabica* L. rispondono più prontamente all'embriogenesi indiretta piuttosto che alla diretta. Pertanto, obiettivo di questo studio è stato di definire un protocollo di embriogenesi somatica diretta su *Coffea arabica* L. Nakombu, partendo da espianti di foglie giovani, e inducendo l'embriogenesi somatica diretta con thidiazuron (TDZ 2,0 mg/L) che viene successivamente ridotto nella sua concentrazione per ottenere la conversione degli embrioni (TDZ 0,2 mg/L).

Parole chiave: *Coffea arabica* L., coltura *in vitro*, thidiazuron

Directed somatic embryogenesis from coffee leaves in different stages of development

Abstract: Coffee is an important crop grown in about 80 countries around the world and its demand is always high. In recent years, to try to increase its production, the improvement of alternative technologies for its propagation has been evaluated. Somatic embryogenesis is one such technology and has been in use since the 1990s. In particular, this study is focused on the induction of direct somatic embryogenesis which allows to obtain somatic embryos avoiding the callus phase, starting from already differentiated tissue cells. The methodologies to stimulate somatic embryogenesis and the subsequent development of embryos are dependent on the genotype as well as on the phenological stage, which leads to the development of specific protocols for each cultivar. In this study, both the best light and temperature conditions for optimal embryonic development and the best phenological stage of the mother plant which would allow rapid morphogenesis to be obtained starting from portions of leaf tissue were investigated. Therefore, it has been determined that the vegetative restart is the best time to take the starting material, while the substrate that has given the best results has been obtained by combining Murashige and Skoog medium enriched with sucrose (20 g/L) with thidiazuron (2 mg/L). Finally, the controlled light and temperature conditions (White/Pink LED type light (2:1) with a spectrum from 400 nm to 700 nm for $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) made it possible to obtain healthy and functional embryos. The results achieved to date highlight the potential of direct somatic embryogenesis in obtaining useful embryos for the subsequent propagation of clones, although the main limitations are still represented by the rather long times.

Keywords: *Coffea arabica* L., *in vitro* culture, thidiazuron

Introduzione

Il caffè è uno dei prodotti di maggior valore sul panorama mondiale, secondo al petrolio. La sua coltivazione interessa più di 80 Paesi, con una superficie di produzione di oltre 10,2 milioni di ettari nelle regioni tropicali e subtropicali, in particolare in Africa, Asia e America Latina (Campuzano-Duque e Wohlgemuth Blair, 2022). Appartiene alla famiglia delle Rubiaceae, genere *Coffea* L., che contiene più di 1753 specie originarie delle foreste equatoriali dell'Africa orientale e occidentale, del Madagascar

e delle isole dell'Oceano Indiano (Murthy e Naidu, 2012). Le specie di caffè attualmente più importanti dal punto di vista economico sono due, *Coffea arabica* (Arabica) L. e *C. canephora* (Robusta) (Alonso-Salces et al., 2009).

Diverse sono le modalità di propagazione studiate per queste specie, a partire dalla più comune propagazione gamica tramite seme, passando per quella agamica con il taleaggio, fino ad arrivare alla moderna moltiplicazione *in vitro* (Ashebre, 2016; Lambot et al., 2017). La propagazione vegetativa tramite talea non è ancora diffusa, probabilmente a causa della difficoltà nel raggiungere tassi di moltiplicazione soddisfacenti. Inoltre, le difficoltà di trasporto delle talee e il rischio di propagazione di malattie ne hanno vietato l'uso a livello commerciale.

Tra le tecniche di coltura *in vitro* l'embriogenesi somatica consente la produzione di embrioni somatici, direttamente e/o indirettamente, e il loro successivo sviluppo, risultando però specie-e genotipo-dipendenti (Campos et al., 2017). Generalmente i genotipi di *Coffea arabica* L. rispondono più prontamente all'embriogenesi indiretta piuttosto che alla diretta (Söndahl e Sharp, 1977).

L'obiettivo di questo lavoro di ricerca è stato lo sviluppo di un protocollo di propagazione *in vitro*, basato su embriogenesi somatica diretta partendo da porzioni fogliari di *Coffea arabica* L. Nakombu.

Materiali e Metodi

Scelta degli espianti

Per l'avvio delle prove sperimentali sono state scelte foglie posizionate nei nodi prossimali di piantine giovani ottenute da seme e accresciute in serra climatizzata. Le foglie sono state sezionate, asportando i margini, fino all'ottenimento di porzioni di dimensioni 0,5 x 0,5 cm (Fig. 1). Nell'arco di un anno solare sono stati effettuati due prelievi: uno a maggio, durante la fase di accrescimento vegetativo e l'altro in ottobre durante la fase di riposo vegetativo della pianta madre. La sterilizzazione dei tessuti è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare in soluzione di ipoclorito di sodio all'1,4% (NaClO) per 20 minuti in agitazione, seguita da 5 risciacqui con acqua distillata sterile per rimuovere i residui dell'agente sterilizzante.

Induzione all'embriogenesi somatica

Le porzioni fogliari sterilizzate sono state poste in piastre petri 90 mm impiegando il substrato nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962) completo di saccarosio (20 g/L) e agar (7 g/L) e arricchito con

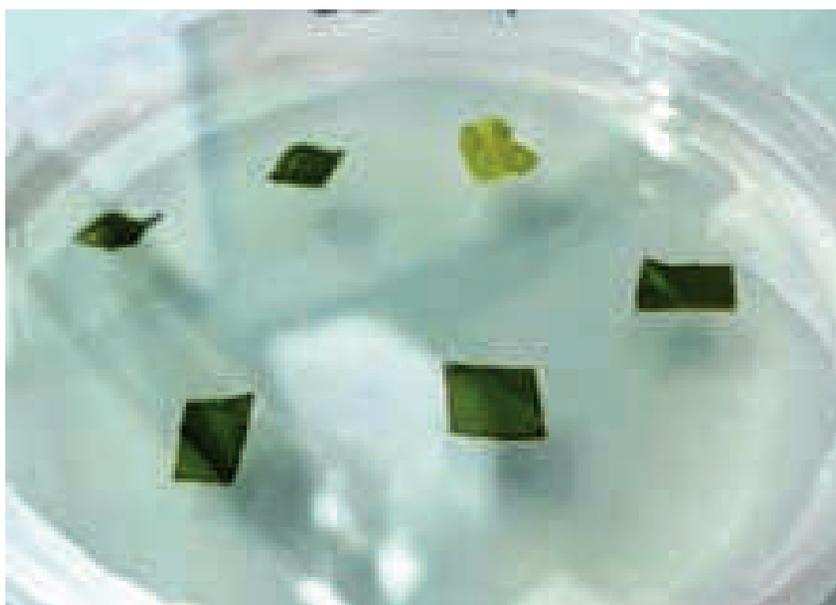


Fig. 1. Espianti fogliari di *C. arabica*.

Fig. 1. Leaf explants of *C. Arabica*.

benzilaminopurina (BAP), alla concentrazione di 0,2 mg/L e acido indol-3-acetico (IAA) nella dose di 0,5 mg/L, o solo con thidiazuron (TDZ) alla concentrazione di 2,0 mg/L (Fig. 1). Per ciascuna piastra Petri sono state disposte 6 porzioni di foglia di circa 0,25 cm², collocate sia in condizioni di buio, sia di luce, tipo Led Bianco/Rosa (2:1) con spettro da 400 nm a 700 nm per 50 µmol s⁻¹ m⁻², fotoperiodo di 16 h di luce ed una temperatura di 22±1°C. Dopo due mesi di crescita in tali condizioni, è stato rilevato il numero degli espianti che hanno prodotto embrioni nelle differenti condizioni di crescita (luce e buio) e in presenza dei differenti fitoregolatori saggiati nel mezzo di coltura.

Maturazione e sviluppo degli embrioni somatici

Per promuovere la maturazione degli embrioni somatici, bloccare la formazione di ulteriori embrioni somatici secondari e permettere il normale sviluppo della plantula, trascorsi due mesi dall'avvio dell'induzione all'embriogenesi diretta, la concentrazione di TDZ nel substrato nutritivo rinnovato è stata ridotta a 0,2 mg/L.

Analisi statistica

Nella fase di insediamento della coltura sono state considerate 10 piastre per trattamento, ciascuna contenente 6 porzioni di foglia, per un totale di 60x2x2 = 240 espianti iniziali. I dati relativi al numero di espianti embriogenetici sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), utilizzando il software CoStat versione 6.40. Il confronto tra le medie è stato effettuato mediante il test di Student-Newman-Keuls (SNK). Prima dell'analisi, i dati espressi in percentuale sono stati sottoposti a trasformazione angolare.

Risultati

La sterilizzazione ha avuto successo sul 100% delle porzioni fogliari utilizzate come espianto. Circa l'induzione all'embriogenesi, gli espianti fogliari che erano stati prelevati a maggio, quindi durante la fase di piena attività vegetativa, già dopo 2 mesi avevano mostrato la comparsa di strutture embrionali. Dal confronto tra i differenti trattamenti è emerso che le piastre esposte alla luce e con l'impiego del TDZ come fitoregolatore hanno permesso di ottenere un numero più alto di embrioni nel minor tempo possibile (Fig. 2), mentre le porzioni presenti nelle piastre poste al buio hanno prodotto callo, determinando la formazione di embrioni somatici indirettamente (Fig. 3). Al contrario, a parità di tempo, le por-



Fig. 2. Embrioni somatici ottenuti direttamente da porzioni di foglie di *C. arabica* esposte alla luce.
Fig. 2. Direct somatic embryos from C. arabica leaves exposed to the light.



Fig. 3. Formazione di callo embriogenetico da porzioni di foglie di *C. arabica* mantenute al buio.
 Fig. 3. *Embryogenic callus formation from C. arabica leaves placed in the dark.*

zioni di foglie prelevate nella fase di riposo vegetativo non hanno presentato differenziazione di alcuna struttura embrionale. Inoltre, se esposte alla luce, avevano avviato un processo di ossidazione da imputare all'effetto della luce stessa. Pertanto, il prelievo effettuato a maggio ha consentito al 70% degli espianti di dare origine ad embrioni somatici direttamente, se coltivati in presenza di luce sul substrato nutritivo arricchito con TDZ (Fig. 4). Gli espianti tenuti al buio, invece, hanno risposto con l'induzione all'embriogenesi con una percentuale pari al 43%. Nel caso dell'impianto effettuato ad ottobre, la percentuale di embrioni ottenuti si è ridotta del 55% (15% di espianti embriogenetici) con esposizione alla luce, e del 60% (10%) con esposizione al buio. Inoltre, ogni porzione fogliare ha prodotto in media 25 - 30 embrioni che hanno dato origine a plantule (Fig. 5).

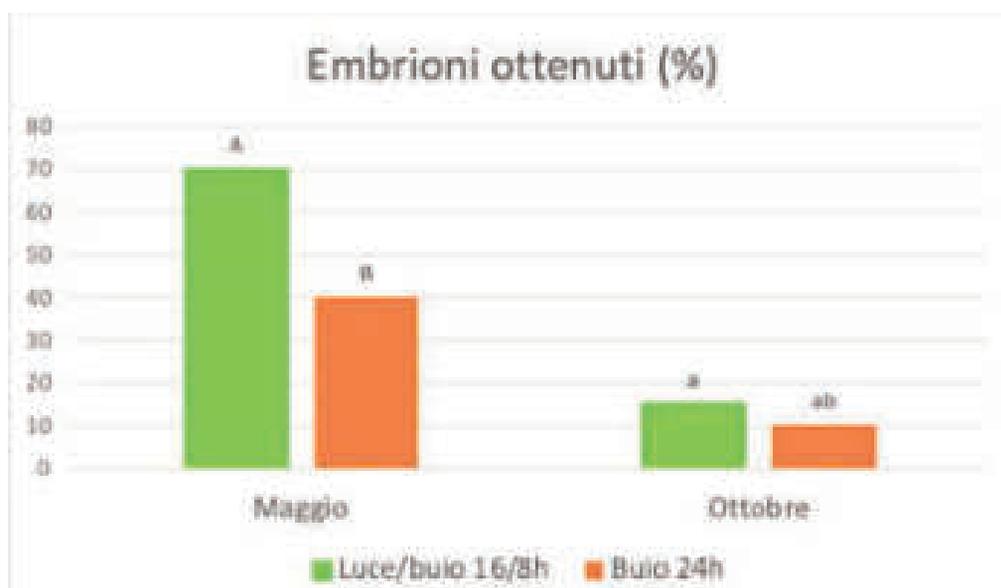


Fig. 4. Percentuale di espianti di foglie di *C. arabica* prelevate in differenti stagioni di crescita (maggio e ottobre) che hanno prodotto embrioni somatici direttamente in differenti e condizioni di crescita (luce o buio) su MS arricchito da TDZ.

Fig. 4. Percentage of C. arabica leaf explants that produced direct somatic embryos under different growth conditions (light and dark) on TDZ enriched nutrient medium (MS).



Fig. 5. Conversione di un embrione somatico di *C. arabica* a plantula.

Fig. 5. Conversion of *C. arabica* somatic embryo to plantlet.

Discussione e Conclusioni

L'embriogenesi somatica è una tecnica di propagazione ad elevata efficienza che consente la diffusione rapida e su larga scala di genotipi elite (Etienne et al., 2012). I genotipi di *C. arabica* di solito rispondono facilmente alla via indiretta con elevata produzione di embrioni somatici (Söndahl e Sharp, 1977), mentre l'embriogenesi diretta consente una bassa produzione di embrioni, spesso richiedendo tempi molto lunghi. Inoltre, le metodologie per indurre l'embriogenesi somatica e l'ulteriore sviluppo degli embrioni dipendono dal genotipo e questo richiede la definizione di protocolli specifici per ciascuna cultivar o clone (Campos et al., 2017).

I risultati ottenuti da questo studio hanno confermato come lo stadio fisiologico della pianta madre incida sulla riduzione dei tempi richiesti per un corretto sviluppo di embrioni somatici partendo da porzioni fogliari, così come evidenziato da Molina et al. (2002) e Santana et al. (2004). Inoltre, un'ulteriore conferma ai risultati riportati in bibliografia per *C. arabica* (de Almeida, 2020) ha riguardato l'efficacia di impiego delle sole citochinine nell'indurre direttamente embrioni somatici, rispetto ad una miscela con auxine che ha determinato lo sviluppo di callo. In particolare, è risultato interessante l'impiego del TDZ che Faisal et al. (2005) considerano un'alternativa in molte piante per la rigenerazione diretta ad alta frequenza degli embrioni somatici. Questo fitoregolatore, già saggiato con successo in altre ricerche su *C. arabica* (Ayub e Gebieluca, 2003; Kahia et al., 2016), ha consentito inoltre anche l'ottenimento di un soddisfacente numero di embrioni per espianto. Infine, mentre da de Almeida (2020) è stata sottolineata la difficoltà all'induzione all'embriogenesi degli espianti di *C. arabica* esposti alla luce, in questo studio i risultati migliori sono stati ottenuti in presenza della stessa.

In conclusione, il presente studio ha consentito di definire un efficace protocollo per ottenere in breve tempo un elevato numero di embrioni somatici direttamente da espianti fogliari di *C. arabica* Nakombu.

Bibliografia

- Alonso-Salces R.M., Serra F., Reniero F., Heberger K., 2009. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10): 4224-4235.
- Ashebre K.M., 2016. The Role Of Biotechnology On Coffee Plant Propagation: A Current Topics paper. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6(5).

- Ayub R.A., Gebieluca A.N., 2003. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias-Atividades Encerradas, 9(02).
- Campos N. A, Panis B., Carpentier S.C., 2017. Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. Front Plant Sci. 21(8): 1460.
- Campuzano-Duque L.F., Wohlgemuth Blair M., 2022. Strategies for Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Improvement as a New Crop in Colombia Agriculture 12, 10: 1576.
- De Almeida J.A.S., 2020. Observations on Somatic Embryogenesis in *Coffea Arabica* L. Coffee - Production and Research. IntechOpen, pp. 1-20.
- Etienne H., Bertrand B., Montagnon C., Déchamp E., Landey R.B., Jourdan I., Alpizar E., Malo E., Georget F., 2012. Un exemple de transfert technologique réussi en micropropagation: la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. Cah. Agric. 21: 115–124.
- Faisal M., Ahmad N., Anis M., 2005. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80: 187-190.
- Lambot C., Herrera J. C., Bertrand B., Sadeghian S., Benavides P., Gaitan A., 2017. Cultivating coffee quality - Terroir and agro-ecosystem. In: The craft and science of coffee. Academic Press, pp. 17-49.
- Kahia J. Kirika M. Lubabali H., Mantell S., 2016. High-frequency Direct Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Leaves Derived from In Vitro-Germinated Seedlings of a *Coffea arabica* Hybrid Cultivar. HortScience. 51: 1148-1152.
- Molina D.M., Aponte M.E., Cortina H., Moreno G., 2002. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71: 117-123.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Murthy P. S., Naidu M., 2012. Sustainable Management of Coffee Industry Byproducts and Value Addition: A Review. Resources, Conservation & Recycling, 66: 45-58.
- Söndahl M.R., Sharp W.R., 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 81: 395-408.
- Santana N., González M.E., Valcárcel M., Canto-Flick A., Hernández M.M., Fuentes-Cerda F.J., Loyola-Vargas V.M., 2004. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40: 95-101.

Moltiplicazione *in vitro* di *Salvia oxyphora* Briq., *S. karwinskii* Benth. e *S. discolor* Kunth

Poonam Devi^{1*}, Andrea Copetta², Barbara Ruffoni², Angela Bisio¹

* Poonam.Devi@edu.unige.it

¹DIFAR Dipartimento di Farmacia, Università di Genova

²CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

La composizione fitochimica e la coltura asettica di *Salvia oxyphora* Briq., *S. karwinskii* Benth. e *S. discolor* Kunth non sono state finora approfondite. Scopo del lavoro è identificare il protocollo per propagare *in vitro* le tre specie. Sono state testate diverse concentrazioni di ipoclorito di sodio abbinato a etanolo per la sterilizzazione. Microtalee sterili si ottengono con etanolo 70% e ipoclorito 1% per *S. karwinskii* oppure 1,5% per *S. oxyphora* e *S. discolor*. La micropropagazione risulta ottimale in substrato Murashige e Skoog con 6-benzil-amino-purina alla concentrazione 0,5 e 0,3 mg/L per *S. oxyphora* e *S. karwinskii*, con 0,2 % di carbone attivo per *S. discolor*.

Parole chiave: *Salvia*, micropropagazione, 6-benzil-amino-purina, sterilizzazione, Lamiaceae

In vitro multiplication of *Salvia oxyphora* Briq., *S. karwinskii* Benth. and *S. discolor* Kunth

Abstract: With about 1000 species of shrubs, perennials, and annuals, *Salvia* is the biggest genus in the Lamiaceae family. *Salvia* produces a variety of bioactive substances, including terpenoids, phenolics, and flavonoids with a range of biological functions. Currently, *Salvia oxyphora* Briq., *S. karwinskii* Benth. and *S. discolor* Kunth have not been fully explored chemically, and there is no literature describing the synthesis of *in vitro* biomass from these species. The current study intended to identify the optimal growth medium for *in vitro* micropropagation of the above mentioned three salvia species and define the best way to obtain sterile cuttings. For sterilizing testing, about 15 to 20 mature plant stem cuttings per treatment were employed. Different concentrations of sodium hypochlorite i.e., 2.5%, 2%, 1.5%, 1% v/v for each species for 20 minutes in combination with pretreatments with water and detergent or 70% v/v ethanol for 20 seconds were assayed. In all tests, after the treatments, the cuttings were rinsed twice with sterilized water for 10 minutes each time. For all three species, the pre-treatment with 70% ethanol was necessary. 1.5% sodium hypochlorite v/v was the optimum concentration for *S. oxyphora*, *S. discolor*, and *S. karwinskii* generated favourable results at 1% sodium hypochlorite v/v. Afterwards, sterilized explants with at least one node were transferred in jars with Murashige and Skoog medium, supplemented with 3% w/v sucrose, different concentrations of 6-benzyl-amino-purine 0.8% w/v plant agar maintained at pH 5.7. After the sterilization of the media, cefotaxime (50 µg/l) sterilized by filtration was incorporated to prevent contamination. Only the first stage of micropropagation required cefotaxime. Later, we used culture media free of antibiotics. The growth of initially sub-cultured regenerated apical shoots revealed that *S. oxyphora* and, *S. karwinskii*, responded well to 6-benzyl amino purine at concentrations 0.5 mg/L and, 0.3 mg/L respectively. However, we ran into issues during the multiplication stage since leaves of *S. discolor* were prone to necrosis. Citric acid and activated charcoal were employed to combat this, and it was shown that the activated charcoal-containing medium was effective in preventing necrosis for *S. discolor*. Furthermore, the ability to *in vitro* multiply was investigated for *S. oxyphora* and *S. karwinskii* in various culture medium compositions comparing shoot length, leaf quality, and the number of shoots per explant. Although the multiplication rate increased

with higher phytohormone concentrations, we discovered that the quality of the shoots decreased. For the growth of biomass, we only compare findings using solid culture media. In the future, we promise to compare *in vitro* plant development using a liquid culture medium.

Keywords: *Salvia*, micropropagation, 6-benzyl-amino-purine, sterilization, Lamiaceae

Introduzione

Il genere *Salvia* è quello più ampio della famiglia delle Lamiaceae, ed è composto da quasi mille specie di erbe, arbusti e piante perenni (Wu et al., 2012; Hu et al., 2018). Questo genere è cruciale per la biologia in quanto produce diversi metaboliti secondari, inclusi fenoli, terpenoidi, flavonoidi e sostanze chimiche volatili utilizzate nell'industria farmaceutica, alimentare e della profumeria (Lu e Yeap Foo, 2002; Wu et al., 2012; Balaei-Kahnamoei et al., 2021). Diversi disturbi quali bronchiti, emorragie, disturbi cardiovascolari e cerebrovascolari sono stati curati utilizzando le specie del genere *Salvia* (Jash et al. 2016; Ren et al. 2019). Da studi clinici è emerso che *S. officinalis* è una pianta promettente per la cura dell'alzheimer ed è ipolipidemica e antinocicettiva (Ghorbani e Esmailizadeh, 2017). Allo stesso modo, *S. miltiorrhiza* è usata per trattare l'aterosclerosi e i disturbi della coagulazione del sangue (Ren et al., 2019). Sebbene la produzione di metaboliti secondari nelle piante aromatiche e medicinali sia limitata da fattori ambientali, l'inconveniente può essere risolto utilizzando un sistema di micropropagazione per ottenere biomassa vegetale sufficiente per l'estrazione dei metaboliti secondari (Erişen et al., 2020). La micropropagazione è una tecnica in cui le cellule, gli organi o i tessuti isolati della pianta vengono coltivati in recipienti contenenti substrati nutritivi e in condizioni asettiche. Ai substrati vengono aggiunti regolatori di crescita delle piante per stimolare la moltiplicazione della pianta desiderata (Pinto et al., 2020). Tale sistema consente la moltiplicazione di piante esenti da microrganismi in tempi brevi ed è già stato utilizzato per varie specie del genere *Salvia* (Cuenca e Amo-Marco, 2000; Bisio et al., 2016). Finora non è stata condotta alcuna ricerca per la micropropagazione *in vitro* di *S. oxyphora*, *S. karwinskii* e *S. discolor*. Le tre specie sono piante erbacee perenni originarie rispettivamente della Bolivia centrale (Pei et al., 2022), del Messico (Zhao et al., 2022) e del Perù (Marchioni et al., 2020). Il presente lavoro mira a sviluppare efficienti protocolli di micropropagazione *in vitro* per le suddette specie di *Salvia*.

Materiali e Metodi

Le talee sono state prelevate da piante presenti nella collezione del CREA di Sanremo e sterilizzate utilizzando quattro differenti metodi. Gli espianti sono stati immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) al 2,5% o 2% v/v per 20' con due gocce di Tween 20 dopo essere stati puliti con acqua e sapone per 10' e senza alcun pretrattamento. Il terzo e il quarto metodo di sterilizzazione degli espianti prevedevano il pretrattamento in etanolo 70% per 20'' prima di essere poste in NaClO 1,5% o 1% v/v. Dopo due risciacqui da 10' con acqua sterile, gli espianti superficialmente sterilizzati sono stati posti a gruppi di 4-5 in vasi di vetro con 60 ml di terreno MS (Murashige e Skoog, 1962), 3% di saccarosio, 0,8% di agar, e cefotaxime 50 µg/L (pH 5.7). I vasi di coltura sono stati posti in camera di crescita a temperatura controllata (23±2 °C), 2500 lux di irraggiamento e fotoperiodo di 16/8 luce/buio. Il numero di nuovi germogli per espianto è stato contato a inizio coltura e dopo 2 e 4 settimane di coltura; la percentuale di espianti che hanno prodotto nuovi germogli è stata calcolata dopo 4 settimane di coltura.

Dopo 4 settimane di coltura, i nuovi germogli sono stati prelevati dalla coltura madre. Quelli di *S. oxyphora* sono stati subcolturali su terreno MS contenente 6-benzil-amino-purina (BAP) a concentrazioni 0,3, 0,5, 0,7 e 1,0 mg/L. I germogli di *S. karwinskii* sono stati subcolturali su MS con concentrazioni di BAP 0,0, 0,1, 0,2 e 0,3 mg/L. Ogni trattamento consisteva in trenta germogli. Dopo ulteriori 4 settimane, il numero medio di germogli prodotti e la lunghezza dei nuovi germogli sono stati utilizzati per calcolare l'efficacia di ciascun substrato. Per la subcoltura di *S. discolor* è stato utilizzato il substrato MS agar 0,8% arricchito con BAP 0,5 o 1,0 mg/L abbinati o meno a carbone attivo 0,2% e acido citrico 0,1 g/L.

Risultati

Il terzo metodo di sterilizzazione è risultato essere il migliore per *S. oxyphora* e *S. discolor* con una percentuale di espianti sterili in grado di produrre nuovi germogli del 71,43% e del 40%. La quarta tecnica ha prodotto il 20% di espianti sterili per *S. karwinskii* (Fig. 1). La cefotaxime (antibiotico) è stata necessaria solo durante la prima fase della micropropagazione. Ogni specie ha mostrato una morfologia del germoglio ben riconoscibile (Fig. 2A-C). Dopo 4 settimane di coltura, confrontando tutte le specie, il più alto tasso di moltiplicazione dei germogli è stato riscontrato in *S. karwinskii* (Fig. 3) a una concentrazione di BAP 0,3 mg/L. Per quanto riguarda *S. oxyphora*, l'indice di moltiplicazione ottimale è stato ottenuto coltivando i germogli *in vitro* su terreno MS agar contenente 0,5 mg/L di BAP. Allo stesso modo, il terreno MS contenente carbone attivo è risultato efficace per *S. discolor*. La Tabella 1 riporta il numero medio di germogli per espianto e la loro lunghezza misurate in relazione alla concentrazione di BAP nel substrato di coltura per *S. karwinskii* e *S. oxyphora*.

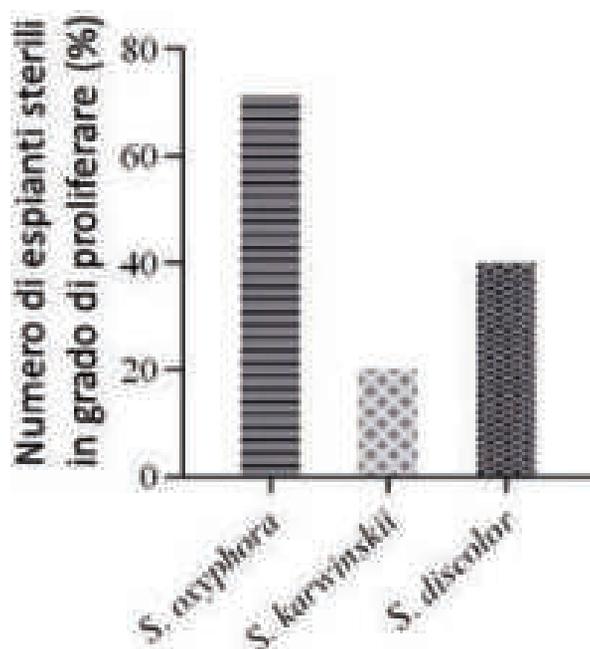


Fig. 1. Percentuale di induzione dei germogli in *S. oxyphora*, *S. karwinskii* e *S. discolor*.
Fig. 1. Percentage of shoot induction in *S. oxyphora*, *S. karwinskii* and *S. discolor*.



Fig. 2. Colture *in vitro* di *S. discolor* (A), *S. karwinskii* (B), *S. oxyphora* (C).
Fig. 2. In vitro shoots *S. discolor* (A) *S. karwinskii* (B), *S. oxyphora* (C).

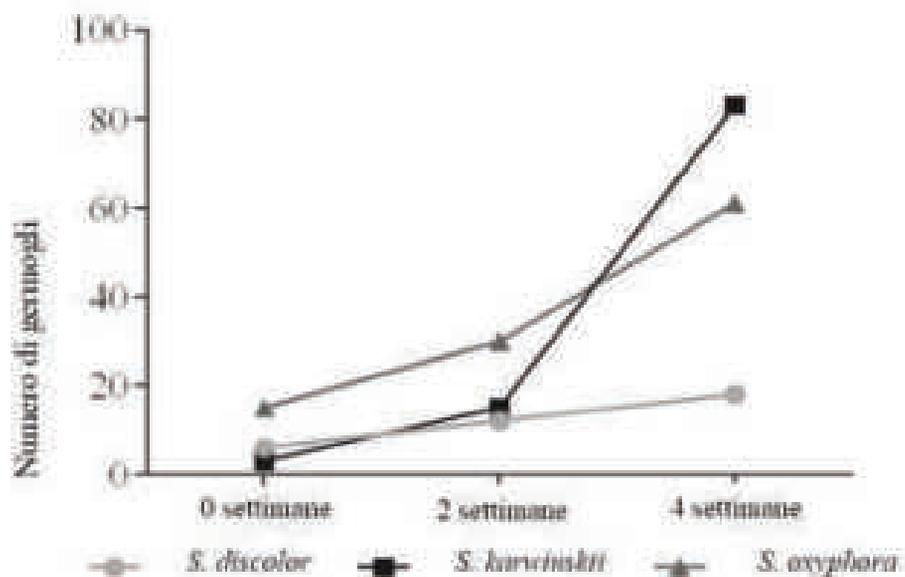


Fig. 3. Tasso di moltiplicazione di ogni specie (*S. discolor* in MS senza ormoni; *S. karwinskii* in BAP 0,3 mg/L; *S. oxyphora* in BAP 0,5 mg/L).

Fig. 3. Multiplication rate of each species (*S. discolor* in MS without hormones; *S. karwinskii* in BAP 0,3 mg/L; *S. oxyphora* in BAP 0,5 mg/L).

Tab. 1. Lunghezza e numero medio di nuovi germogli di *S. karwinskii* e *S. oxyphora* sviluppatasi a varie concentrazioni di 6-benzil-amino purina (BAP).

Tab. 1. Length and average shoots number of *S. karwinskii* and *S. oxyphora* with variation in concentration of 6-benzyl-amino-purine (BAP).

BAP (mg/l)	Lunghezza media (cm)	Numero medio di germogli
<i>S. karwinskii</i>		
0	6,3 ± 1,7	1 ± 1
0.1	5,4 ± 1,4	3 ± 1
0.2	4,6 ± 1,5	6 ± 1
0.3	3,5 ± 0,6	11 ± 2
<i>S. oxyphora</i>		
0.3	3,4 ± 0,6	2 ± 1
0.5	6,0 ± 0,7	1 ± 1
0.7	3,5 ± 1,2	1 ± 1
1	2,9 ± 0,8	1 ± 1

Discussione e Conclusioni

Il pretrattamento con etanolo è necessario per tutte e tre le specie, mentre la concentrazione di NaClO ottimale variava a seconda della specie. Tale risultato è in linea con quanto riportato in letteratura. Mascarello et al. (2006) rilevano che per ottenere colture *in vitro* dalla maggior parte delle specie di *Salvia* (17 specie delle 19 considerate) è necessario pretrattare gli espianti con etanolo. Gli stessi autori riscontrano che generalmente la moltiplicazione *in vitro* in questo genere è migliore a basse concentrazioni di BAP (comprese tra 0,3 e 0,6 mg/L). Questa osservazione si è confermata anche in questo lavoro: in *S. karwinskii*, concentrazioni di 0,3 mg/L di BAP aumentano il numero di nuovi germogli, mentre in *S. oxyphora* concentrazioni di 0,5 mg/L di BAP aumentano il numero di nuove microtalee ottenibili. Per *S. discolor*, il terreno MS contenente carbone attivo e acido citrico ha permesso lo sviluppo di germogli sani senza necrosi fogliari. *S. discolor* produce molti essudati rilasciati nel mezzo di coltura tossi-

ci per la pianta stessa che causano necrosi fogliari e morte degli espianti. È probabile che il carbone attivo adsorba gli essudati tossici, mentre l'acido citrico, essendo un antiossidante, eviti la necrosi del piede degli espianti. In conclusione, in questo lavoro sono stati messi a punto protocolli efficaci per la moltiplicazione in vitro delle tre specie di *Salvia*. I risultati ottenuti consentiranno inoltre ulteriori indagini sull'uso di substrati liquidi considerati più utili ai fini di un possibile scaleup industriale.

Bibliografia

- Balaei-Kahnamoei M., Eftekhari M., Ardekani M.R.S, Akbarzadeh T., Saeedi M., Jamalifar H., Safavi M, Sam S, Zhalehjoon N, Khanavi M. 2021. Phytochemical constituents and biological activities of *Salvia macrosiphon* Boiss, BMC Chemistry, 15(1): 1-7
- Bisio A., Fraternali D, Schito A.M., Parricchi A., Piazz F. D., Ricci D., Giacomini M., Ruffoni B., Tommasi N.D., 2016. Establishment and analysis of in vitro biomass from *Salvia corrugata* Vahl. and evaluation of antimicrobial activity. Phytochemistry, 122: 276–285.
- Cuenca S., Amo-Marco J.B., 2000. *In vitro* propagation of two Spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 36(3): 225-229.
- Erişen S., Kurt-Gür G., Servi H., 2020. In vitro propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants. Industrial Crops and Products, 157: 1-8.
- Ghorbani A., Esmaeilzadeh M., 2017. Pharmacological properties of *Salvia Officinalis* and its components. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 7(4): 433–440.
- Hu G.X., Takano A., Drew B.T., Liu E., Soltis D., Soltis P.S., Peng H., Xiang C.L. 2018. Phylogeny and staminal evolution of *Salvia* (Lamiaceae, Nepetoideae) in East Asia. Annals of Botany, 122(4): 649–668.
- Jash S.K., Gorai G., Roy R., 2016. *Salvia* genus and triterpenoids. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 7(24): 4710-4732.
- Lu Y., Foo L.Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia* - a review. Phytochemistry, 59(2): 117–140.
- Mascarello C., Mantovani E., Ruffoni B., 2006. *In vitro* culture of several ornamental and medicinal *Salvia* species. Acta Horticulturae, 723: 375-379.
- Marchioni I., Najjar B., Ruffoni B., Copetta A., Pistelli Lu., Pistelli La. 2020. Bioactive compounds and aroma profile of some lamiaceae edible flowers. Plants, 9(691): 1-30.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473–497.
- Pei Y., Zhao G., Li X., Yu D., Cui N., 2022. The complete chloroplast genome and phylogenetic analysis of *Salvia oxyphora* Briq. (Nepetoideae, Lamiaceae). Mitochondrial DNA Part B, 7(7): 1342–1344.
- Pinto K.G.D., Albertino S.M.F., Leite B.N., Soares D.O.P., Castro F.M., Gama L.D., Clivati D., 2020. Indole-3-butyric acid improves root system quality in guarana Cuttings. Horticultural Science, 55(10): 1670–1675.
- Ren J., Fu L., Nile S.H., Zhang J., Kai G., 2019. *Salvia miltiorrhiza* in treating cardiovascular diseases: a review on its pharmacological and clinical applications. Frontiers in Pharmacology, 10(753): 1-15.
- Wu Y., Ni Z., Shi Q., Dong M., Kiyota H., Gu Y., Cong B., 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. Chemical Reviews, 112(11): 5967–6026.
- Zhao G., Pei Y., Yu D., Xu F., Li X., 2022. The complete chloroplast genome and phylogenetic analysis of *Salvia Karwinskii* (Lamiaceae). Mitochondrial DNA Part B, 7(7): 1384–1386.

Tecniche di evoluzione assistita (TEA) per il miglioramento genetico di melo e pero

Cecilia Domenichini^{1*}, Paola Negri¹, Marco Defrancesco¹, Sara Alessandri¹, Lorenzo Bergonzoni¹, Ignazio Verde², Mickael Malnoy³, Giovanni A.L. Brogginì⁴, Andrea Patocchi⁵, Andreas Peil⁶, Ofere Francis Emeriewen⁶, Luca Dondini¹, Stefano Tartarini¹

* cecilia.domenichini2@unibo.it

¹ Department of Agriculture and Food Sciences, Bologna University

² CREA - Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Roma

³ Fondazione Edmund Mach, FEM, San Michele all'Adige (TN)

⁴ Molecular Plant Breeding, Institute of Agricultural Sciences, ETH Zurich, Zurich (Switzerland)

⁵ Division Plant Breeding, Agroscope, Wädenswil (Switzerland)

⁶ Julius Kühn Institute (JKI) – Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Fruit Crops, Dresden (Germany)

Riassunto

In questo lavoro sono presentati i risultati relativi a sei esperimenti indipendenti di trasformazione genetica (cisgenesi e DNA-editing) applicati a melo e pero, due specie di interesse frutticolo, per le quali le tecniche di evoluzione assistita offrono strade alternative al miglioramento genetico classico. In particolare, si vuole implementare la resistenza ad un patogeno che ogni anno causa seri danni alle coltivazioni (*Erwinia amylovora*) e migliorare la stabilità delle produzioni tramite il superamento del meccanismo che regola l'autoincompatibilità gametofitica. Vengono presentati i risultati relativi all'efficienza di rigenerazione e trasformazione per ogni costrutto usato e i risultati delle verifiche molecolari condotte sulle linee trasformate ottenute.

Parole chiave: *Erwinia amylovora*, Autocompatibilità, DNA-editing, Cisgenesi

New Breeding Techniques (NBT) to improve apple and pear productions

Abstract: Apple and pear are two of the most important fruit crops worldwide. However, recently, important yield losses were reported due to phytosanitary issues, unfavourable conditions under flowering and extreme weather conditions. Recently, to face these challenges, the traditional breeding has been supported by the New Breeding Techniques (NBT), that allow precise genome modifications without affecting their distinctive quality traits. Accordingly, NBT are particularly interesting for tree crops that presents high heterozygosity. NBT could also be helpful in breeding for pathogen resistance for those diseases that are approachable only by prevention techniques (e.g., fire blight). To date, one fire blight resistance gene (*FB_MR5*) and one candidate for the same trait (*FB_Mfu10*) have been cloned in some wild apple species and are thus available for transformation experiments. Moreover, some fire blight susceptibility genes have been identified in the genus *Malus*, allowing their knock-out by DNA-editing. Production instability is another issue affecting those species, which is partially surmountable by self-incompatibility breakdown. The genetic determinants of this trait are known, it is then possible to knock-out the *S-RNase* gene by DNA-editing to obtain self-fertile clones. In this work, six transformation experiments have been performed either by cisgenesis or DNA-editing. The cisgenic approach has been applied to transfer the two aforesaid fire blight resistance genes from *Malus* into the pear cultivar 'Conference', independently. The transfer of apple genes to pear by cisgenesis is possible due to the recent achievement of *Malus/Pyrus* fertile hybrids. Moreover, two experiments (one on 'Conference', and one on a multi-resistant apple breeding line) were performed to knock-out the *HIPM* and *DIPM* fire blight susceptibility genes and the *Mlo* powdery mildew susceptibility gene. The last two experiments

were performed on ‘Conference’ to achieve self-fertility through the *S-RNase* gene silencing. To permit the evaluation of self-fertility in a short time, in one of these experiments, a second gRNA was used to target the *TFL1* gene that enables *in vitro* early flowering. A total of 49 kanamycin-resistant, independent lines were obtained and subsequently molecular analyses were performed to verify the integration of the T-DNA and the absence of vector back-bone sequences. Of these lines, 36 presented the complete integration of the different cassettes and were back-bone free. Ten shoots of each of the *in vitro* proliferating lines were rooted and transferred to soil media to proceed with the phenotypic evaluation of resistance and self-compatibility (still in progress). Moreover, the transformed lines will be heat-treated to permit the excision of the transgenic part of the cassette by a FRT/Flp system.

Keywords: *Erwinia amylovora*, Self-fertility, DNA-editing, Cisgenesis

Introduzione

Lo sviluppo delle tecniche di evoluzione assistita (TEA) nel campo del miglioramento genetico delle specie da frutto come melo (*Malus x domestica* Borkh.) e pero (*Pyrus communis* L.) può rappresentare un’alternativa al breeding tradizionale per il raggiungimento di alcuni obiettivi come l’acquisizione di resistenza alle malattie e la stabilità delle produzioni.

Erwinia amylovora, l’agente del colpo di fuoco batterico, ogni anno causa ingenti perdite alle produzioni sia di melo che di pero. Ad oggi, due geni di resistenza sono stati individuati in specie di melo selvatiche: *FB_MR5* da *Malus x robusta* (Vogt et al., 2013; Broggin et al., 2014; Kost, 2016; Bartho et al., 2019) e *FB_Mfu10* da *Malus x fusca* (attualmente in fase di validazione; Emeriewen et al., 2014, 2018, 2019, 2020, 2021). La disponibilità di geni provenienti da specie di melo selvatiche, che conferiscono resistenza alla malattia, pone le basi per poter effettuare esperimenti di cisgenesi trasferendo questi geni non solo in cultivar commerciali di melo, ma anche di pero. Uno studio ha già indagato l’utilizzo di geni di melo per indurre la resistenza a ticchiolatura in pero, riportando l’ottenimento di piante di pero resistenti (Perchepied et al., 2021). Inoltre, è stata riportata anche la possibilità di ottenere ibridi fertili da incroci tra queste due specie (Fisher et al., 2014), aprendo così la strada al trasferimento cisgenico tra queste due specie.

Per quanto riguarda i geni di suscettibilità ad *Erwinia amylovora*, invece, sono state identificate due classi di proteine coinvolte in questo carattere nel genere *Malus*, chiamate HIPM e DIPMs. Entrambe interagiscono con alcuni effettori di *Erwinia amylovora* (HrpN e DspA/E, rispettivamente) portando allo sviluppo della malattia nelle piante ospiti (Borejsza-Wysocka et al., 2004, 2019; Meng et al., 2006; Campa et al., 2019; Tegtmeier et al., 2020).

Analogamente, per quanto riguarda l’oidio (*Podosphaera leucotricha*) sono noti alcuni fattori di suscettibilità (geni *Mlo*; Pessina et al., 2016) che possono essere silenziati mediante DNA editing.

L’autoincompatibilità è un altro fattore chiave nella produttività delle piante di pero. Nelle *Pyrinae* l’autoimpollinazione è prevenuta grazie ad un meccanismo che si basa su una RNasi (S-RNasi). I geni coinvolti in questo tipo di meccanismo sono noti (De Franceschi et al., 2012) e alcuni esperimenti condotti per il silenziamento della *S-RNasi* in melo hanno determinato il superamento dell’autoincompatibilità (Broothaerts et al., 2004).

In questo lavoro vengono riportati i risultati preliminari di alcuni esperimenti di trasformazione genetica su pero e melo effettuati sia tramite cisgenesi sia tramite *editing* genetico con il sistema CRISPR/Cas9.

Materiali e Metodi

Materiali vegetale

Per gli esperimenti di trasformazione genetica sono stati utilizzati espianti fogliari provenienti da germogli micropropagati della cv ‘Conference’ e della selezione di melo BO B47G082. I germogli, mantenuti in camera di crescita a 22-24 °C con un fotoperiodo di 16 h di luce bianca (40–60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$),

sono stati trasferiti ogni mese su un substrato fresco composto da sali QL (Leblay et al., 1991) modificati con una maggiorazione della concentrazione di NH_4NO_3 (7,5 mM), benziladenina (BA) 4,4 μM e acido indolbutirrico (IBA) 0,5 μM .

Ceppi batterici, costruzione dei vettori, trasformazione di Agrobacterium e verifiche molecolari

Il ceppo iper-virulento EHA105 di *Agrobacterium tumefaciens* contenente il plasmide *helper* pCH32 (Hood et al., 1993) è stato trasformato con diversi vettori (Tab. 1), tutti recanti il sistema di rimozione inducibile tramite calore FRT/Flp, tramite il metodo sviluppato da Hofgen e Willmitzer (1988).

Trasformazione del materiale vegetale

Sono stati eseguiti sei esperimenti indipendenti di trasformazione genetica (uno in melo e cinque in pero). Gli espianti fogliari di 'Conference' e BO B47G082 sono stati infiltrati a vuoto in una sospensione di *Agrobacterium tumefaciens* (10^8 cellule/mL) e successivamente incisi trasversalmente e posti in co-coltura al buio su un mezzo contenente sali MS alla metà della concentrazione ordinaria, saccarosio (3%) e una combinazione ormonale differente a seconda della specie: thidiazuron (TDZ) 13,5 μM e acido naftalenacetico (NAA) 1 μM per il melo; per 'Conference' oltre a TDZ (9 μM) e NAA (5,4 μM) è stato aggiunto acido gibberellico (1,4 μM). Per la decontaminazione è stato utilizzato lo stesso substrato addizionato di 2,5 g/L di Gelrite (Sigma, USA), kanamicina (100 mg/L) e cefotaxime (300 mg/L). Gli espianti sono stati trasferiti su substrato fresco dopo 15 giorni dalla prima sub-coltura e, successivamente, ogni 21-28 giorni.

I germogli ottenuti tramite rigenerazione sono stati isolati e posti sullo stesso substrato utilizzato per la micropropagazione del materiale da cui sono stati prelevati gli espianti, addizionato di cefotaxime (300 mg/L) e kanamicina (50 mg/L) e posti in camera di crescita a 22-24 °C con un fotoperiodo di 16 h di luce bianca (40-60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

I risultati, in termini di efficienza di rigenerazione (numero di regioni caulogeniche/numero totale degli espianti) ed efficienza di trasformazione (numero di cloni resistenti a kanamicina/numero totale degli espianti), degli esperimenti di trasformazione sono stati registrati durante 6-8 mesi di coltura.

Verifiche molecolari sulle linee trasformate

Da ogni linea è stato estratto il DNA genomico (Mercado et al., 1999) e sono state messe a punto le analisi molecolari per verificare l'integrazione dei geni *nptII*, *Flp*, e l'assenza di sequenze di DNA batterico (Bb) estranee al T-DNA. Le linee provenienti dagli esperimenti di cisgenesi CIS-D034 e CIS-A021 sono state analizzate anche per la presenza dei geni *FB_Mfu10* e *FB_MR5* rispettivamente. Le linee ottenute con DNA-editing sono invece state testate per la presenza del gene *Cas9* e dell'RNA guida (CRISPR-D863 e CRISPR-E444). I prodotti PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio (1%).

Tab. 1. Vettori utilizzati negli esperimenti di trasformazione con relativi codici identificativi impiegati nel testo.

Tab. 1. List of the vectors used for the transformation experiments with the identification codes used in the text.

Vettore	Tecnica	Target	Genotipo	Codice esperimento
D034p9-Dao-FLPi_STPK	Cisgenesi	<i>FB_Mfu10</i>	Conference	CIS-D034
A021p9-Dao-FLPi-FBMR5	Cisgenesi	<i>FB_Mr5</i>	Conference	CIS-A021
D764p9ioR-FFF-CWT-EA	DNA-editing	<i>HIPM</i> , <i>DIPM-1</i> , <i>DIPM-4</i> , <i>Mlo</i>	BO B47G082 Conference	CRISPR-D764-BO B47G082 CRISPR-D764-Conference
D863p9ioR-FFF-CWT_PearSI	DNA-editing	<i>S-RNAsi</i>	Conference	CRISPR-D863
E444p9ioR-FFF-CWT-SI-TFL1	DNA-editing	<i>S-RNAsi</i> e <i>TFL1.1</i>	Conference	CRISPR-E444

Risultati

I risultati preliminari di ogni esperimento di trasformazione sono riportati in Tab. 2. L'esperimento condotto sulla selezione di melo BO B47G082 (con bersagli i geni *DIPM*, *HIPM* e *Mlo*) è iniziato con l'inoculazione di 1482 giovani foglie. Dall'ottava settimana fino all'ottavo mese di coltura sono stati isolati e micropropagati 34 cluster di rigenerazione (efficienza di rigenerazione pari a 2,3%), di cui solo 7 sono stati in grado di sopravvivere in condizioni selettive da cui sono stati isolati 7 cloni (efficienza di trasformazione pari a 0,5%). Le PCR di verifica su questi cloni hanno confermato l'integrazione del marcatore di selezione *nptII* e del gene *Ffp* in ogni linea isolata. Per quanto riguarda 'Conference', per tutti gli esperimenti di trasformazione, eccetto quello con il vettore CIS-A021 contenente il gene *FB_MR5*, l'efficienza di rigenerazione si è attestata su valori da 1,9% per CRISPR-D863 fino ad un massimo di 3,0% per CRISPR-E444. L'unico esperimento per cui sono stati registrati valori più alti in termini di efficienza è stato CIS-A021, dove l'efficienza di rigenerazione ha raggiunto un valore di 22,5% e l'efficienza di trasformazione il 17,9%.

Per quanto riguarda le verifiche molecolari (Tab. 3) sono state analizzate in tutto 59 linee. Solo in due linee, trasformate con CRISPR-D764 e CRISPR-D863, è stata riscontrata la presenza di sequenze estranee al T-DNA (Bb). Il marcatore di selezione *nptII* è stato rilevato in tutte le linee eccetto tre, recanti il costrutto CRISPR-D863, che sono quindi state scartate dalle analisi successive. In totale, le linee che presentavano una completa inserzione del T-DNA sono state 46. In particolare, la percentuale di linee complete sul totale di quelle analizzate è stata del 100% per CRISPR-D764 (sia melo che pero) e CIS-D034, del 82,75% per CIS-A021 e del 50% per CRISPR-D863 e CRISPR-E444.

Tab. 2. Produzione di linee trasformate di melo e pero per ognuno dei sei esperimenti di trasformazione.
Tab. 2. Production of apple and pear transformed lines for each of the six transformation experiments.

Codice esperimento	Espianti inoculati (n°)	Germogli rigenerati (n°)	Efficienza di rigenerazione (%)	Linee resistenti a kanamicina (n°)	Efficienza di trasformazione (%)
CRISPR-D764-BO B47G082	1482	34	2.3	7	0.5
CRISPR-D764-Conference	260	6	2.3	5	1.9
CRISPR-D863	1011	19	1.9	5	0.5
CRISPR-E444	1046	31	3	9	0.9
CIS-D034	781	16	2	5	0.6
CIS-A021	2026	456	22.5	362	17.9

Tab. 3. Risultati delle verifiche molecolari sulle linee indipendenti ottenute da ogni esperimento di trasformazione genetica. I numeri riportati si riferiscono al numero di linee in cui è presente il gene analizzato (*nptII*: neomicina fosfotransferasi II; *Ffp*: Flippasi; Bb: back-bone batterico; gRNase: *S-RNaseI*, solo per CRISPR-D863 e CRISPR-E444; Mr5: *FB_Mr5*; Mfu10: *FB_Mfu10*).

Tab. 3. Results of the molecular analysis performed on each independent line obtained from each transformation experiment. Numbers refers to the number of the lines presenting the analysed gene (*nptII*: neomycin phosphotransferase II; *Ffp*: Flippase; Bb: Backbone; gRNase: *S-RNaseI*, only for CRISPR-D863 and CRISPR-E444; Mr5: *FB_Mr5*; Mfu10: *FB_Mfu10*).

Costrutto	Linee analizzate	<i>nptII</i>	<i>Ffp</i>	Bb	<i>Cas9</i>	gRNase	Mr5	Mfu10
CRISPR-D764-BO B47G082	7	7	7	0	7	-	-	-
CRISPR-D764-Conference	4	4	4	1	4	-	-	-
CRISPR-D863	6	3	3	1	3	3	-	-
CRISPR-E444	6	6	3	0	5	5	-	-
CIS-D034	7	7	7	0	-	-	-	7
CIS-A021	29	26	24	0	-	-	26	-

Discussione e Conclusioni

L'ampia variabilità osservata nell'efficienza di trasformazione (in linea, comunque, con i risultati ottenuti da lavori simili, come Charrier et al., 2019 e Malabarba et al., 2021) può essere ricondotta a problemi di riproducibilità in questo tipo di esperimenti, dove molte variabili sono coinvolte e possono avere un effetto sulla competenza dei tessuti alla rigenerazione. Una di queste variabili è la scelta del materiale destinato agli espianti: le significative differenze di efficienza osservate per CIS-A021 potrebbero, infatti, essere ricondotte alla selezione di foglie giovani non ancora del tutto espanse operata per questa inoculazione.

Le differenze riscontrate tra l'efficienza di rigenerazione e trasformazione di ogni esperimento sono probabilmente riconducibili, invece, a processi di caulogenesi di tipo multicellulare che possono portare al chimerismo dei germogli prodotti. La presenza simultanea di cellule trasformate e non, unito alla gradualità dell'effetto della kanamicina, può infatti portare ad un ritardo nella risposta alla selezione ed alla perdita tardiva di alcuni rigeneranti. Le analisi molecolari hanno confermato che solo i genotipi che possedevano il *nptII* avevano la capacità di sopravvivere su terreno selettivo; infatti, le uniche tre linee a non mostrare la presenza del gene sono sbiancate entro qualche mese dall'inizio della loro propagazione. Inoltre, l'integrazione del T-DNA è stata per lo più completa nella maggior parte delle linee e solo gli esperimenti di DNA-editing con i vettori per l'autoincompatibilità hanno presentato una percentuale di linee complete sul totale minore dell'80%. L'incompleta integrazione può essere causata alle dimensioni del T-DNA di questi costrutti, costituiti da un maggior numero di geni rispetto a quelli utilizzati per la cisgenesi.

In conclusione, le tecniche di cisgenesi e DNA-editing applicate in questo lavoro hanno portato all'ottenimento di diverse linee di melo e pero in grado di sopravvivere su substrato selettivo e che presentano un'inserzione completa del T-DNA senza sequenze di bordo batteriche. I germogli micropropagati di queste linee verranno in futuro sottoposti a shock termico per l'eliminazione della parte transgenica e delle sequenze accessorie in modo da ottenere linee prive di geni esogeni. Inoltre, verranno allestite nuove verifiche molecolari volte ad individuare il sito di inserzione del T-DNA e ad osservare le eventuali mutazioni indotte dalla *Cas9* negli esperimenti di DNA-editing. Le linee, infine, verranno avviate al processo di ambientamento per poter procedere alle analisi fenotipiche che riguarderanno la resistenza ad *Erwinia amylovora* e la verifica dell'autocompatibilità.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato sostenuto dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MiPAAF, <http://www.politicheagricole.it>) attraverso il progetto BIOSOSFRU nell'ambito del programma di bandiera italiana BIOTECH (D.M. 15921/7305/2018).

Bibliografia

- Bartho J. D., Demitri N., Bellini D., Flachowsky H., Peil A., Walsh M. A., Benini S., 2019. The structure of *Erwinia amylovora* AvrRpt2 provides insight into protein maturation and induced resistance to fire blight by *Malus* × *robusta* 5. *Journal of Structural Biology*, 206(2): 233-242.
- Borejsza-Wysocka E.E., Malnoy M., Meng X., Bonasera J.M., Nissinen R.M., Kim J.F., Beer S.V., Aldwinckle, H.S., 2004. Silencing of apple proteins that interact with DspE, a pathogenicity effector from *Erwinia amylovora*, as a strategy to increase resistance to fire blight. XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, ISHS: 469-474
- Borejsza-Wysocka E., Nagamangala K.C., Beer S.V., Aldwinckle H.S. And Malnoy M. 2019. HIPM is a susceptibility gene of *Malus* spp.: reduced expression reduces susceptibility to *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(2): 167-175.
- Broggini G. A. L., Wöhner T., Fahrentrapp J., Kost T. D., Flachowsky H., Peil A., Hanke M. V., Richter K., Patocchi A., Gessler C., 2014. Engineering fire blight resistance into the apple cultivar

- “Gala” using the *FB_MR5* CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus × robusta* 5. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6): 728–733.
- Broothaerts W., Keulemans J., Van Nerum I., 2004. Self-fertile apple resulting from *S-RNase* gene silencing. *Plant Cell Reports*, 22(7): 497–501.
- Campa M., Piazza S., Righetti L., Oh C. S., Conterno L., Borejsza-Wysocka E., Nagamangala K. C., Beer S. V., Aldwinckle H. S., Malnoy M., 2019. *HIPM* is a susceptibility gene of *Malus* spp.: Reduced expression reduces susceptibility to *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(2): 167–175.
- Charrier A., Vergne E., Dousset N., Richer A., Petiteau A., Chevreau E., 2019. Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, 10: 40.
- De Franceschi P., Dondini L., Sanzol J., 2012. Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrinae* (*Rosaceae*). *Journal of experimental botany*, 63(11): 4015-4032.
- Emeriewen O., Richter K., Kilian A., Zini E., Hanke M. V., Malnoy M., Peil A., 2014. Identification of a major quantitative trait locus for resistance to fire blight in the wild apple species *Malus fusca*. *Molecular Breeding*, 34(2): 407–419.
- Emeriewen O. F., Richter K., Piazza S., Micheletti D., Broggin G. A. L., Bernert., Keilwagen J., Hanke M. V., Malnoy M., Peil A., 2018. Towards map-based cloning of *FB_Mfu10*: identification of a receptor-like kinase candidate gene underlying the *Malus fusca* fire blight resistance locus on linkage group 10. *Molecular Breeding*, 38: 106.
- Emeriewen O.F., Wöhner T., Flachowsky H., Peil A., 2019. *Malus* Hosts–*Erwinia amylovora* Interactions: Strain Pathogenicity and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 10: 551.
- Emeriewen O. F., Richter K., Berner T., Keilwagen J., Schnable P. S., Malnoy M., Peil A., 2020. Construction of a dense genetic map of the *Malus fusca* fire blight resistant accession MAL0045 using tunable genotyping-by-sequencing SNPs and microsatellites. *Scientific Reports*, 10: 16358.
- Emeriewen O. F., Flachowsky H., Peil A., 2021. Characterization of genomic DNA sequence of the candidate gene for *FB_Mfu10* associated with fire blight resistance in *Malus* species. *BMC Research Notes*, 14: 291.
- Fischer T. C., Malnoy M., Hofmann T., Schwab W., Palmieri L., Wehrens R., Schuch L. A., Müller M., Schimmelpfeng H., Velasco R., Martens S., 2014. F1 hybrid of cultivated apple (*Malus × domestica*) and European pear (*Pyrus communis*) with fertile F2 offspring. *Molecular Breeding*, 34(3): 817–828.
- Höfgen, R., Willmitzer L., 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic acids research* 16.20: 9877.
- Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S., Hoekema, A., 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2: 208–218.
- KOST T.D., 2016. Functionality of the *FB_MR5* fire blight resistance gene of *Malus x robusta* 5. Doctoral dissertation, ETH Zurich.
- Leblay C., Chevreau E., Raboin L.M., 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25: 99–105.
- Malabarba J., Chevreau E., Dousset N., Veillet F., Moizan J., Vergne E., 2021. New strategies to overcome present CRISPR/CAS9 limitations in apple and pear: Efficient dechimerization and base editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1): 1–20.
- Meng X., Bonasera J. M., Kim J.F., Nissinen R.M., Beer S., 2006. Apple Proteins that Interact with DspA/E, a Pathogenicity Effector of *Erwinia amylovora*, the Fire Blight Pathogen. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(1): 53-61.
- Mercado J.A., El Mansouri I., Jiménez-Bermúdez S., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A., 1999. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35: 152-153.

- Perchepped L., Chevreau E., Ravon E., Gaillard S., Pelletier S., Bahut M., Berthelot P., Cournol R., Schouten H. J., Vergne E., 2021. Successful intergeneric transfer of a major apple scab resistance gene (*Rvi6*) from apple to pear and precise comparison of the downstream molecular mechanisms of this resistance in both species. *BMC Genomics*, 22: 843.
- Pessina S., Angeli D., Martens S., Visser R.G., Bai Y., Salamini F., Velasco R., Schouten H.J., Malnoy M., 2016. The knock-down of the expression of *MdMLO19* reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*). *Plant Biotechnology Journal*, 14: 2033-2044.
- Tegtmeier R., Pompili V., Singh J., Micheletti D., Silva K.J.P., Malnoy M., Khan A., 2020. Candidate gene mapping identifies genomic variations in the fire blight susceptibility genes *HIPM* and *DIPM* across the *Malus* germplasm. *Scientific Reports*, 10: 16317.
- Vogt I., Wöhner T., Richter K., Flachowsky H., Sundin G. W., Wensing A., Savory E. A., Geider K., Day B., Hanke M. V., Peil A., 2013. Gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus* × *robusta* 5-*Erwinia amylovora*. *New Phytologist*, 197(4): 1262–1275.

Propagazione *in vitro* di cultivar locali di *Castanea sativa* Mill. 1768

Marco Nigro^{1*}, Vincenzo Di Michele¹, Anna Sgarella¹, Luca Colombo^{2,3}

* marco.nigro@hortives.it

¹HortiVeS - Banca semi e laboratori sperimentali di ricerca e conservazione di piante ortive e alimentari, Milano

²Consorzio Castanicoltori di Brinzio, Orino e Castello Cabiaglio, Varese

³Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DISAA), Università di Milano

Riassunto

Nell'ambito del progetto di riscoperta, valorizzazione e tutela di cultivar locali di Castagno (*Castanea sativa* Mill. 1768) che caratterizzano la castanicoltura tradizionale delle selve ubicate nei territori forestali della provincia nord di Varese, in particolare nel Parco Regionale di Campo dei Fiori, promosso dal Consorzio Castanicoltori di Brinzio, Orino e Castello Cabiaglio, è stato creato un Gruppo di Lavoro finalizzato a sviluppare un efficace protocollo per la propagazione *in vitro* del Castagno. L'iniziativa nasce dall'esigenza di superare le numerose criticità riscontrate con i classici metodi di propagazione agamica utilizzati nella Castanicoltura tradizionale, come la tecnica dell'innesto e del taleggio, pur tenendo in considerazione la notevole recalcitranza al *in vitro* del Castagno come riportato in letteratura e in considerazione della vetustà delle piante madri e dell'ambiente di vegetazione non controllabile. L'attenzione è stata rivolta verso 5 cultivar locali: Venégon, Russirö, Paié, Verdésa e Piliscé

Parole chiave: Castagno, polifenoli, recalcitranza, adsorbenti, antiossidanti.

In vitro propagation of local cultivar of *Castanea sativa* Mill. 1768

Abstract: Within the aim of the project of rediscovery, enhancement and protection of local chestnut cultivar (*Castanea sativa* Mill. 1768), has been created a Work Team aimed to develop an efficient protocol for *in vitro* propagation of chestnut. The venture arises from the demand of overcome the numerous complications observed with the classic methods of agamic propagation used in traditional chestnut growing techniques, same as grafting or cutting techniques, considering the remarkable recalcitrance of Chestnut to *in vitro* propagation, as displayed in scientific literature. Specific attention was paid to 4 local varieties: Venégon, Russirö, Paié and Verdésa. Branches of 20-30 cm of size were collected during the period of vegetative dormancy, from mother plants situated in the sylvas located in the districts of Castello Cabiaglio (VA) and Brinzio (VA). In cooperation with the laboratory of plant tissue *in vitro* culture of the DISAA department of the University of Milan, it has been taken into consideration several amount of sterilization protocols, paying specific attention to the pre-treatment phase of the explants, aiming at minimizing the oxidative stress caused by the sterilizing agents, in order to reduce the production of phenolic substances during the first phase of *in vitro* culture. The presence of the above-mentioned phenolic substances often lead to the necrosis of the explant, notwithstanding his outliving rate to the phase of sterilization. The most excellent results have been obtained performing pre-treatments on vegetal specimens applying fungicidal products in order to reduce the amount of fungal spores, subsequently stimulating the scions to the sprouting in a controlled environment ($25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 90% U.R. and photoperiod of 16/8 h) and eventually making the buds undergo a sterilization process using a solution of sodium hypochlorite 1% or mercury chloride (HgCl_2) 0,5%. The medium used during the phase of *in vitro* culture initiation, had been based on Murashige and Skoog (1962) as well as Gresshoff e Doy (1972) medium and two type of Gresshoff e Doy modified (Vieitez et al., 2007), both added or not with activated charcoal. Having said that, after a month since the cultivation of the explants was settled, it has been noticed that only the 0% of the buds sterilized with sodium hypochlorite and the 30 (cv Venégon)

and 20% (cv Paié) of the buds sterilized with mercury chloride turned out to be decontaminated and vital. In light of this evidence, we must say that even the explants that were vital at the beginning, have then withstood phenomenon of apical necrosis, that led to the death of all the explants. In order to overcome the critical issues observed, the team will proceed setting up new experiments, starting from vegetative samples collected from plants of different ages and during different phases of the vegetative cycle, paying specific attention to the use of substances able to detoxing the essential secretion of phenolic substances observed during the first weeks of adjustment to *in vitro* culture.

Keywords: chestnut, polyphenol, recalcitrance, adsorbent, antioxidant.

Introduzione

Negli ultimi decenni si è assistito, nelle regioni subalpine delle Prealpi, alla rinascita dell'interesse per il castagno e per la castanicoltura. Sono così stati recuperati, almeno in parte, il legame perduto tra i secoli di storia e di evoluzione culturale delle popolazioni locali e le conoscenze legate alla tradizionale cultura del castagno. Fino a pochi anni or sono era del tutto negletta e sconosciuta la presenza all'interno del patrimonio castanile di esemplari di eccezionale dimensione e longevità costituenti le selve castanili, plurisecolari testimoni viventi della civiltà contadina che fu.

Secondo l'Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi Forestali di Carbonio – INFC (<https://www.inventarioforestale.org/it/>), in Italia la superficie complessiva dei boschi di castagno è di 788.408 ettari. La produzione della castagna rappresenta ancor oggi un'opportunità economica reale per le popolazioni locali che vivono nelle aree rurali e montane, come quelle del Parco Regionale del Campo dei Fiori (Raimondi, 2014).

Nell'areale del Parco Regionale del Campo dei Fiori, con un'estensione territoriale di 6.342 ettari ed una superficie boscata che interessa 19 comuni della provincia di Varese, il castagno caratterizza la fascia montana compresa tra i 500 m e i 750 m circa di altitudine (Raimondi, 2014).

Nel Parco Regionale del Campo dei Fiori, come già accennato, sono presenti 5 cultivar tradizionali rientranti anche nell'Inventario delle varietà di castagno catalogate al Sud delle Alpi (Conedera, 2001): Russirò, Verdésa, Piliscé, Paié e Venégon. L'areale di distribuzione delle singole varietà in alcuni casi è circoscritto ad un solo Comune mentre in altri casi ha una diffusione più ampia (ad esempio la varietà Russirò è diffusa in tutto il Ticino meridionale e in diverse zone della provincia di Varese). Ogni varietà di castagne possiede caratteristiche proprie rispetto a colore, forma, dimensione e utilizzo del frutto (Laurianti, 2019).

I primi test di messa in coltura *in vitro* sono stati condotti dal Laboratorio di Micropropagazione della Banca semi di HortiVeS, specializzata nella salvaguardia e studio di varietà di orticole locali, di piante alimentari della tradizione regionale del nostro Paese e di fiori commestibili anche spontanei (Nigro et al., 2018). Successivamente è stato coinvolto nel Gruppo di Lavoro anche il Laboratorio di Micropropagazione del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DISAA) dell'Università degli Studi di Milano, il quale ha continuato le prove di sterilizzazione, fino all'ottenimento di materiale decontaminato.

Materiali e metodi

Durante la fase fenologica di riposo vegetativo, sono state prelevate alcune marze di 20-30 cm da piante madri situate nelle selve site nei comuni di Castello Cabiaglio (VA) e Brinzio (VA). Il fattore limitante queste prove di messa in coltura è proprio dato dall'ambiente di vegetazione non controllabile delle piante madri e la vetustà delle stesse (Fig. 1).

I migliori risultati sono stati ottenuti eseguendo dei pre-trattamenti sul materiale vegetale con anticrittogamici per ridurre la carica fungina, successivamente stimolando le marze al germogliamento in ambiente controllato (25±1 °C, 90% U.R. e fotoperiodo 16/8 h).



Fig. 1. Selva castanile di Castello Cabiaglio (VA).

Fig. 1. Chestnut forest of Castello Cabiaglio, Varese.

Partendo da gemme dormienti schiuse, sono state allestite alcune prove di decontaminazione del materiale vegetale, sottoponendo le gemme ad una sterilizzazione in soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) all'1% o cloruro di mercurio (HgCl_2) allo 0,5‰, con tempi di esposizione all'agente decontaminante di 10, 15, 25 minuti, seguite da tre risciacqui in acqua distillata sterile da 5 minuti ciascuno.

Sono stati, pertanto, valutati numerosi protocolli di sterilizzazione con particolare attenzione alle fasi di pre-trattamento degli espianti, volte a minimizzare lo stress ossidativo degli agenti decontaminanti al fine di ridurre la produzione di sostanze fenoliche nella prima fase di messa in coltura *in vitro* che potrebbero causare la successiva necrosi dell'espianto, nonostante la sua sopravvivenza alla fase di sterilizzazione.

I substrati utilizzati per la fase di adattamento e stabilizzazione alla coltura *in vitro* erano basati su substrati MS (Murashige e Skoog, 1962), Gresshoff e Doy (1972) e due tipologie di Gresshoff e Doy modificato (Vieitez et al., 2007), con l'aggiunta di sostanze ad azione detossificante ed adsorbente quali acido ascorbico 20 mg/L, acido citrico 20 mg/L, carbone attivo 2 g/L o polivinilpirrolidone 10.000 g/mol (PVP_{10}) 2,5 g/L, benziladenina (BA) 0,5 mg/L, saccarosio 30 g/L e plant agar 8 g/L (Duchefa Biochemie) con un pH di $5,6 \pm 0,1$ (Cyberscan 510). Gli espianti, posti in coltura in contenitori di polietilene (Linf Box Micropoli), sono stati mantenuti in cella termostatica ad una temperatura costante di 25 ± 1 °C, fotoperiodo luce/buio di 16/8 h ed intensità luminosa media di $150 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$.

I germogli sterili ottenuti hanno dato luogo ad un *pool* di materiale con il quale si allestiranno delle prove di moltiplicazione *in vitro*.

I substrati sono stati sterilizzati in autoclave a 121 ± 1 °C per 20 minuti (mod. Nuve OT 90L). Come prova in bianco è stato utilizzato un substrato MS base senza l'aggiunta di fitoregolatori (MS0).

Risultati e discussione

Dopo un mese dalla messa in coltura degli espianti e dalla fase di adattamento e stabilizzazione *in vitro*, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- lo 0% di gemme sterilizzate con ipoclorito di sodio (NaClO), risultavano decontaminati e vitali,
- il 30 e 20% di gemme trattate con cloruro di mercurio per le cultivar Venégon e Paié risultavano decontaminati e vitali (Fig. 2). Una buona parte degli espianti inizialmente vitali hanno successivamente subito fenomeni di necrosi apicale, portando alla morte i germogli (Fig. 3; Tab. 1 e 2).
- ad oggi, gli espianti vitali ed in attiva proliferazione manifestano tuttavia fenomeni di vitescenza nelle subcolture (Fig. 4).

Al fine di superare le criticità riscontrate, si procederà allestendo nuovi protocolli partendo da materiale vegetale prelevato da piante di età differente e in differenti fasi del ciclo vegetativo, ponendo particolare attenzione all'uso di sostanze antiossidanti e protettive in grado di detossificare le importanti secrezioni di sostanze fenoliche riscontrate nelle prime settimane di adattamento alla coltura *in vitro*. Saranno poi sviluppati nuovi substrati di moltiplicazione (con differenti concentrazioni di fitoregolatori e promotori della crescita) al fine di attenuare o superare i fenomeni di vitescenza.



Fig. 2. Venégon (sinistra) e Paié (destra) a confronto.

Fig. 2. Venégon (left) and Paié (right) in comparison.

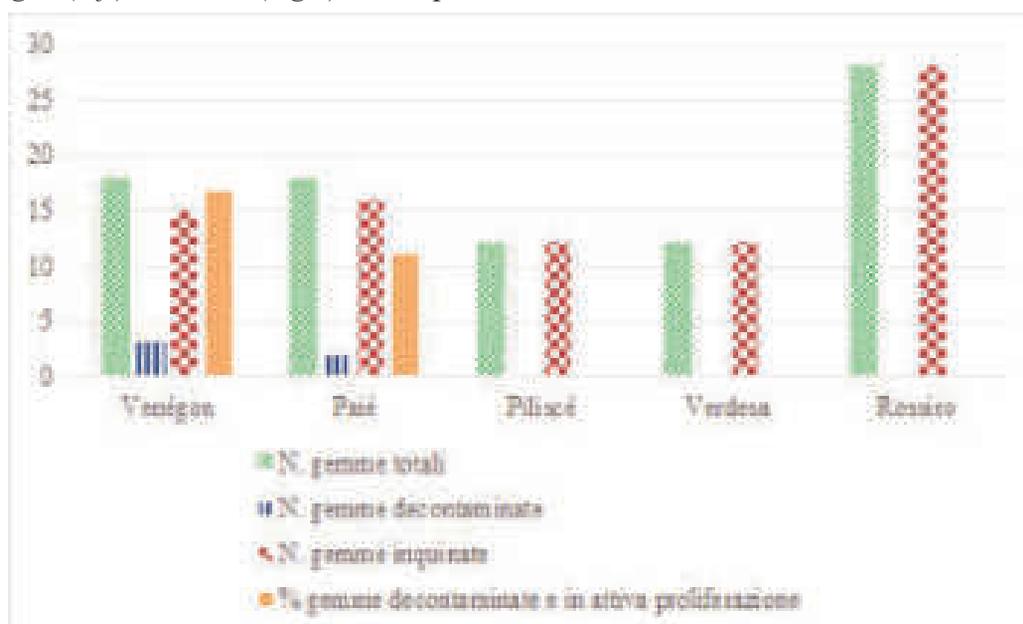


Fig. 3. Efficienza di decontaminazione e adattamento alla coltura *in vitro*.

Fig. 3. Decontamination efficiency and adaptation to *in vitro* culture.

Tab. 1. Protocolli di decontaminazione su diversi substrati di adattamento e stabilizzazione *in vitro*.
 Tab. 1. *Decontamination protocols on different in vitro adaptation and stabilization substrates.*

CV	Data ¹	Tessuto sterilizzato	Tween® 20 (gtt) ²	Tween® 20 (t) ³	H ₂ O (t) ⁴	Sostanza sterilizzante	Sterilizzante (t) ⁵	H ₂ O (n x t) ⁶	G&D modificato (n. espianti) ⁷	G&D modificato con carboni attivi (n. espianti) ⁸	N espianti totali
Venégon	ott-18		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	20'	3x10'	16	19	35
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	20'	3x10'	9	7	16
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	20'	3x10'	9	7	16
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	20'	3x10'	9	7	16
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	20'	3x10'	9	7	16
Russirò	feb-19		10	20'	10'	NaClO 1%	20'	3x10'	29	1	30
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x10'	19	18	37
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x10'	19	18	37
Russirò	feb-19		10	20'	10'	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x10'	19	18	37
Venégon	mar-21	gemma dormiente	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x5'	5	5	10
Paié	mar-21	gemma dormiente	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x5'	5	5	10
Venégon	mar-21	germoglio	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x5'	4	4	8
Paié	mar-21	germoglio	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x5'	4	4	8
Piliscé	apr-21	germoglio	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	25'	3x5'	2	5	7
Piliscé	apr-21	gemma dormiente	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	25'	3x5'	4	1	5
Verdésa	apr-21	germoglio	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	25'	3x5'	4	4	8
Verdésa	apr-21	gemma dormiente	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	25'	3x5'	3	1	4
Russirò	mag-21	gemma dormiente	5	15'	-	HgCl ₂ 0.5%	15'	3x5'	5	5	10
Russirò	giu-21	germoglio	3	10'	5'	HgCl ₂ 0.5%	10'	3x5'	1	2	3
Russirò	giu-21	gemma dormiente in apertura	9	10'	5'	HgCl ₂ 0.5%	10'	3x5'	5	4	9
Russirò	giu-21	gemma dormiente in apertura	5	10'	-	NaClO 1%	15'	3x5'	1	1	2
Russirò	giu-21	germogli aperti	5	10'	-	NaClO 1%	15'	3x5'	3	1	4

¹Data di allestimento delle prove di sterilizzazione; ²Numero di gocce di Tween® 20 (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate) in soluzione con acqua demineralizzata);

³ Tempo di esposizione alla soluzione acquosa di Tween® 20 in minuti; ⁴Tempo in minuti di risciacquo con acqua demineralizzata post pre-trattamento con tensioattivo;

⁵Tempo di esposizione alla sostanza sterilizzante in minuti; ⁶Numero di ripetizioni e tempo in minuti di risciacquo con acqua demineralizzata post pre-trattamento con

sostanza sterilizzanti; ⁷Numero di espianti su substrato Gresshoff e Doy modificato (Vieitez et al, 2007) con o senza carboni attivi; ⁸Numero di espianti su substrato

Gresshoff e Doy modificato 1/2 NO₃ (Vieitez et al, 2007).

Tab. 2. Risultati dei protocolli di decontaminazione su diversi substrati di adattamento e stabilizzazione al vitro e % di decontaminati.

Tab. 2. Results of decontamination protocols on different in vitro adaptation and stabilization substrates and % of decontaminated.

CV	Data ¹	G&D modificato (n. espianti decontaminati) ²	G&D modificato con Carboni Attivi (n. espianti decontaminati) ³	TOT espianti decontaminati	TOT espianti inquinati	% decontaminati
Venégon	ott-18	8	14	22	13	63
Russirö	feb-19	9	7	16	0	100
Russirö	feb-19	6	4	10	6	63
Russirö	feb-19	3	1	4	12	25
Russirö	feb-19	0	0	0	16	0
Russirö	feb-19	29	1	30	0	100
Russirö	feb-19	19	18	37	0	100
Russirö	feb-19	19	18	37	0	100
Russirö	feb-19	19	18	37	0	100
Russirö	feb-19	16	12	28	9	76
Russirö	feb-19	6	10	16	21	43
Venégon	mar-21	2	1	3	7	30
Paié	mar-21	1	1	2	8	20
Venégon	mar-21	0	0	0	8	0
Paié	mar-21	0	0	0	8	0
Piliscé	apr-21	0	0	0	7	0
Piliscé	apr-21	0	0	0	5	0
Verdésa	apr-21	0	0	0	8	0
Verdésa	apr-21	0	0	0	4	0
Russirö	mag-21	0	0	0	10	0
Russirö	giu-21	0	0	0	3	0
Russirö	giu-21	0	0	0	9	0
Russirö	giu-21	0	0	0	2	0
Russirö	giu-21	0	0	0	4	0

¹Data di allestimento delle prove di sterilizzazione; ²Numero di espianti decontaminati su substrato Gresshoff e Doy modificato (Vieitez et al., 2007) con o senza carboni attivi; ³Numero di espianti su substrato Gresshoff e Doy modificato $\frac{1}{2}$ NO₃ (Vieitez et al., 2007).



Fig. 4. Fenomeni di vitrescenza su Venégon.

Fig. 4. Hyperhydricity in Venégon.

Bibliografia

- Conedera M., 2001. Inventario delle varietà di castagno catalogate al sud delle alpi, WSL, sottostazione Sud delle Alpi.
- Gresshoff P.M., Doy C.H., 1972. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 259.
- Laurianti F., 2019. La castanicoltura nelle valli superiori del ticino tra il tardo medioevo e l'inizio dell'epoca contemporanea - Analisi storica comparata tra le comunità delle valli Blenio, Leventina, Riviera, Maggia e Lavizzara (Svizzera), Tesi di Dottorato in Geografia storica per la Valorizzazione del Patrimonio storico-ambientale, Università degli Studi di Genova.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Nigro M., Sgarella A., Di Michele V., Bazzan U., 2018. Conservazione ex situ di antiche varietà locali di ortaggi italiani: coltura in vitro e conservazione a bassa temperatura dei semi. *Acta Italus Hortus*, 21: 149-153.
- Raimondi M., 2014. I Castagneti dell'Insubria (Progetto "Interreg" ID 13958723): Sperimentazione raccolta castagne per valorizzazione varietale autunno 2011 – autunno 2013, Consorzio Castanicoltori di Brinzio, Orino e Castello Cabiaglio (Villaggio Cagnola - Varese), pp. 64.
- Vieitez A.M., Sánchez M.C., García-Nimo M.L., Ballester A., 2007. Protocol for micropropagation of *Castanea sativa*. In: Jain, S.M., Haggman, H. (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 299-312.

Ottimizzazione di un protocollo per la micropropagazione di varietà italiane di *Cannabis sativa* L. per uso medico

Roberta Paris^{1*}, Flavia Fulvio¹, Anna Moschella¹, Cristina Baldin², Ilaria Alberti²

* roberta.paris@crea.gov.it

¹ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali, sede di Bologna

² Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali, sede di Rovigo

Riassunto

La canapa è una pianta ricca in metaboliti attivi interessanti per uso medico, come i fitocannabinoidi, fra cui i principali sono il Δ^9 -tetraidrocannabinolo ed il cannabidiolo. Presso il CREA-CI di Rovigo sono state prodotte le due varietà di canapa medica utilizzate per la produzione nazionale di farmaci a base di *Cannabis*, il cui mantenimento avviene esclusivamente per via agamica. In questo lavoro si riporta un protocollo di micropropagazione *in vitro*, a supporto delle attività di mantenimento e moltiplicazione delle piante madri, che impiega diverse combinazioni di ormoni, tra cui è risultata migliore quella contenente thidiazuron ed acido gibberellico.

Parole chiave: coltura *in vitro*, *Cannabis* farmaceutica, germoplasma, miglioramento genetico, cannabinoidi

Optimization of a protocol for micropropagation of Italian *Cannabis sativa* L. varieties for medical and pharmaceutical uses

Abstract: *Cannabis sativa* L. is a dioecious species with multiple and controversial virtues, rich in active metabolites such as phytocannabinoids, terpenes and phenylpropanoids. The Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, known for its psycho-active properties), and cannabidiol (CBD, a not psychoactive compound) are the two major phytocannabinoids, mostly accumulating in mature inflorescences of female plants in their acidic forms, known as Δ^9 -THCA and CBDA. For their extraordinary capacity of accumulating high levels of phytocannabinoids and terpenes in the glandular trichomes covering the surface of their flowers, only the female plants are interesting for medical applications, and are therefore the sole used to produce *Cannabis*-based drugs. In Italy, two *C. sativa* female varieties (named CIN-RO and CIN-BOL) are used for the national production of *Cannabis*-based drugs. They have been bred at CREA-CI in Rovigo and are maintained by agamic propagation together with other élite clonal selections characterized by a high cannabinoid content and developed for medical uses too. The maintenance of medicinal *Cannabis* plants takes place exclusively throughout the production of rooted cuttings. To allow that, a limited number of plants are kept constantly in full vegetative development and free from contamination (mother plants) for the subsequent production of cuttings on a larger scale. However, keeping mother plants *in vivo* expose them to several biotic stresses and renewing them with *in vitro* plants can assure the availability of safe and vigorous starting material. Therefore, as part of the PRONACANAMED research project 'National production of *Cannabis*-based substances and preparations of plant origin', funded by MIPAAF, a protocol was optimized for all stages of *Cannabis* micropropagation, starting from the choice of the primary explant to be placed *in vitro*, the maintenance medium, the multiplication medium, up to the rooting and subsequent acclimatization of the seedlings to obtain new mother plants to produce cuttings. To optimize multiplication and elongation, three different treatments with different hormones combinations were tested. In addition, a medium supplemented

with indol-3-butyric acid (IBA) was compared to the control medium to evaluate its effect on promoting the explants rooting. Following each trial, the chemotype was verified via molecular markers and gas chromatography to quantify cannabinoids on leaves. Subsequently, as part of the CAMED project - National medical *Cannabis*: innovation and enhancement of the production of therapeutic *Cannabis* plant material for national needs and research for the creation of new varieties for pharmaceutical use (collaboration agreement pursuant to art. 15 of Law 241 /90), the protocols were extended also to materials of the Elite Genotype Collection, to conserve the most interesting materials also through *in vitro* culture. Together our findings represent an attempt to overcome the lack of research on *C. sativa* that limited the progress of this crop and to implement *in vitro* micropropagation protocols for germplasm maintenance and as a tool to support breeding.

Keywords: *in vitro* culture, medical *Cannabis*, germplasm, breeding, phytocannabinoids

Introduzione

La *Cannabis sativa* L., è una pianta di grande interesse sia per la produzione di fibra e seme (canapa industriale), sia come *Cannabis* medicinale, le cui infiorescenze femminili, ricche in composti bioattivi, vengono utilizzate per la produzione di farmaci. Fra questi, i fitocannabinoidi, molecole terpeno-fenoliche, che si accumulano a livello dei tricomi ghiandolari, sulla superficie delle infiorescenze femminili, sono i composti più significativi. Dei circa 150 ad oggi identificati (Cerrato et al., 2021), i principali e più abbondanti sono l'acido cannabigerolico (CBGA), l'acido cannabidiolico (CBDA), l'acido tetraidrocannabinolico (THCA) e l'acido cannabicromenico (CBCA), con le rispettive forme neutre (CBG, CBD, THC e CBC). La loro diversa composizione quali-quantitativa e la presenza di altre classi di biomolecole (fra cui terpenoidi e fenilpropanoidi) che agiscono in sinergia con i primi, risultando nel cosiddetto "effetto entourage", determinano il diverso effetto terapeutico delle preparazioni a base di *Cannabis*. La scoperta del sistema endocannabinoide e dei recettori su cui agiscono i fitocannabinoidi (Mechoulam e Parker, 2015) ha sicuramente contribuito al rilancio dell'utilizzo e della ricerca sulla canapa per uso medico, attraverso la produzione di diversi tipi di farmaci a base di *Cannabis*. Alcuni sono prodotti sinteticamente (come il Dronabinol e il Nabilon); altri sono costituiti da estratti di *C. sativa*, come il Sativex® e l'Epidiolex® (Legare et al., 2022). Infine, a differenza di altri medicinali di origine vegetale, le infiorescenze mature ed essiccate di *Cannabis* possono essere utilizzate tali e quali. In questo caso, solo protocolli standardizzati di coltivazione permettono di produrre infiorescenze con la quantità di cannabinoidi desiderata e nelle condizioni fitosanitarie più idonee.

La produzione di farmaci a base di *Cannabis* è cominciata in Italia nel 2016 presso lo Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare di Firenze (SCFM) in seguito ad un accordo fra il Ministero della difesa e il Ministero della Salute. Il ciclo di produzione delle piante ha inizio presso la sede di Rovigo del CREA-CI con la preparazione di talee erbacee radicate ottenute da piante madri, allevate *indoor*. Sono ad oggi disponibili due preparazioni magistrali, FM1 e FM2, a base di infiorescenze di due varietà di *C. sativa*, CINBOL e CINRO sviluppate dal CREA-CI di Rovigo, e tutelate con diritti di privativa. CINBOL è caratterizzata da un fenotipo chimico a THCA prevalente (chemotipo I), mentre CINRO ha un rapporto CBDA:THCA di 1.5:1 (chemotipo II).

In questo lavoro, condotto nell'ambito dei progetti nazionali Pronacanamed (DM 0089914 del 02/12/2016) e CAMED (accordo di collaborazione ex art. 15 della Legge 241/90, MIPAAF-2021-0181330), si è valutata la possibilità di affiancare il mantenimento ed il rinnovo delle piante madri, e l'attività di propagazione per talea con la micropropagazione. Sebbene siano stati pubblicati vari protocolli per questa specie notoriamente recalcitrante (Adhikary et al., 2021; Monthony et al., 2021), è necessario verificare la metodologia ed ottimizzarla per sviluppare un protocollo che sia efficiente per i genotipi d'interesse.

Materiali e Metodi

Materiale vegetale

Piante madri di CINBOL e CINRO sono state allevate *indoor* in vasi da 20 L contenenti granulato di lana di roccia, in condizioni di temperatura e umidità controllate (T 24 °C; UR 60%) ed esposte a fotoperiodo lungo (18 ore di luce) con lampade led (C-led, Cefla) per mantenerle in crescita vegetativa per 6-9 mesi (Fig. 1A). Le piante sono state fertirrigate con una soluzione nutritiva a pH 5,5-6 e EC 1,5 mS/cm. Giovani germogli apicali di 4-5 cm sono stati prelevati dalle piante madri ed utilizzati per la messa *in vitro*.

Sterilizzazione degli espianti e messa in vitro degli espianti

In seguito alla rimozione delle foglie, gli espianti sono stati sterilizzati seguendo il protocollo descritto da Lubell-Brand et al. (2021), che prevede la disinfezione per immersione in una soluzione di 0,54% (peso/volume) di ipoclorito di sodio e lo 0,1% di agente surfattante (Tween 20) per 15 min, agitando a intermittenza il campione, seguita da due lavaggi in acqua sterile, condotti sotto cappa sterile a flusso laminare. Dopo asciugatura su carta da filtro, gli espianti sono stati tagliati separando apice e porzioni di stelo di 2 cm comprendenti uno o due nodi, che sono stati messi in vasi tipo *baby food culture jars* (4-cm di diametro x 9.5 cm di altezza) chiusi con Magenta-cap, in cui è stato dispensato 25 mL di mezzo di coltura sterile contenente macro, microelementi e vitamine secondo Murashige e Skoog (1962) addizionato con 30 g/L di saccarosio e 8 g/L di agar (SIGMA) a pH 5,7. Le colture sono state mantenute per circa 4 settimane in camera di crescita Binder illuminata con Lampade fluorescenti a luce fredda L 18W/865, a 25°C e fotoperiodo lungo (18 h). Successivamente le colture sono state trasferite e mantenute per altre 3-4 settimane su mezzo MS30 addizionato di 500 mg/L di carbone attivo (MS30ca).

Ottimizzazione del mezzo di moltiplicazione

Per stimolare l'allungamento e lo sviluppo di germogli ascellari, sono state provate tre combinazioni ormonali, oltre al mezzo MS30ca:

- T05: MS30ca addizionato con Thidiazuron 0,5 μ M, come indicato in Lata et al. (2009);
- T057: MS30ca addizionato con TDZ 0,5 μ M in combinazione con acido gibberellico (GA3) 0,7 μ M (Lata et al., 2009);
- mT2: MS30ca addizionato con meta-topolina, mT, 2 μ M, come indicato in Lata et al. (2016).

La prova iniziale è stata condotta su 10 germogli per genotipo, sui 4 mezzi indicati. Successivamente, sono stati valutati 20 espianti sui due mezzi di coltura che hanno dato il risultato migliore.

Radicazione degli espianti e acclimatazione ex vitro

Per la radicazione degli espianti il mezzo di coltura MS30ca è stato confrontato con il mezzo MS con concentrazione dimezzata di sali e vitamine, addizionato di acido indol-butirrico (IBA) 2,5 μ M (MS/2). Le piantine radicate sono state prelevate delicatamente dal mezzo di coltura, e le radici lavate con acqua sterile per eliminare i residui di mezzo aderente. Quindi sono state trasferite *ex vitro* direttamente in cubetti di lana di roccia, riposti in vassoi di plastica ricoperti con pellicola al fine di mantenere elevata l'umidità e tenute nella stessa camera di crescita. L'umidità è stata gradualmente ridotta praticando dei fori nella pellicola, fino alla completa acclimatazione.

Verifica del chemotipo

Il chemotipo dei microgermogli è stato verificato tramite analisi del DNA con i marcatori molecolari B1080/B1192 secondo il protocollo dettagliato in Fulvio et al. (2021) e attraverso la quantificazione del CBD e THC totali nelle foglie utilizzando un gas cromatografo TRACE 1300 (Thermo Scientific, Milano, Italia) equipaggiato con detector FID, come riportato in Pacifico et al. (2006). Le concentrazioni dei cannabinoidi sono date in percentuale del peso sul peso secco del materiale di partenza (% p/p).

Risultati

Il protocollo di sterilizzazione impiegato ha permesso di ottenere un'efficace disinfezione del materiale di partenza, prossima al 100% degli espianti. Questo risultato è influenzato dal fatto che il materiale di partenza è stato allevato *indoor* per ridurre il rischio di insorgenza di problematiche di tipo fitosanitario.

I germogli sviluppati dagli apici vegetativi o presenti ai nodi sono stati trasferiti dopo 4 settimane sul mezzo di coltura nuovo addizionato con 500 mg/L di carbone attivo (MS30ca), in cui possono rimanere fino a 8 settimane, prima del rinnovo (Fig. 1B). Le piante di entrambe le varietà sembrano beneficiare della presenza nel mezzo di coltura di carbone attivo indicato in letteratura come utile per rimuovere sostanze tossiche per la pianta, tipo polifenoli. Tuttavia, anche dopo due mesi di coltura i germogli non si moltiplicano e si allungano poco (lunghezza media intorno ai 2 cm).

Per favorire la proliferazione dei germogli, sono state testate tre combinazioni ormonali utilizzando due diverse citochinine (TDZ e mT), in presenza o meno di gibberellina. La combinazione di TDZ e GA3 è risultata la più efficace per entrambe le varietà (Fig. 1C), soprattutto in termini di proliferazione,

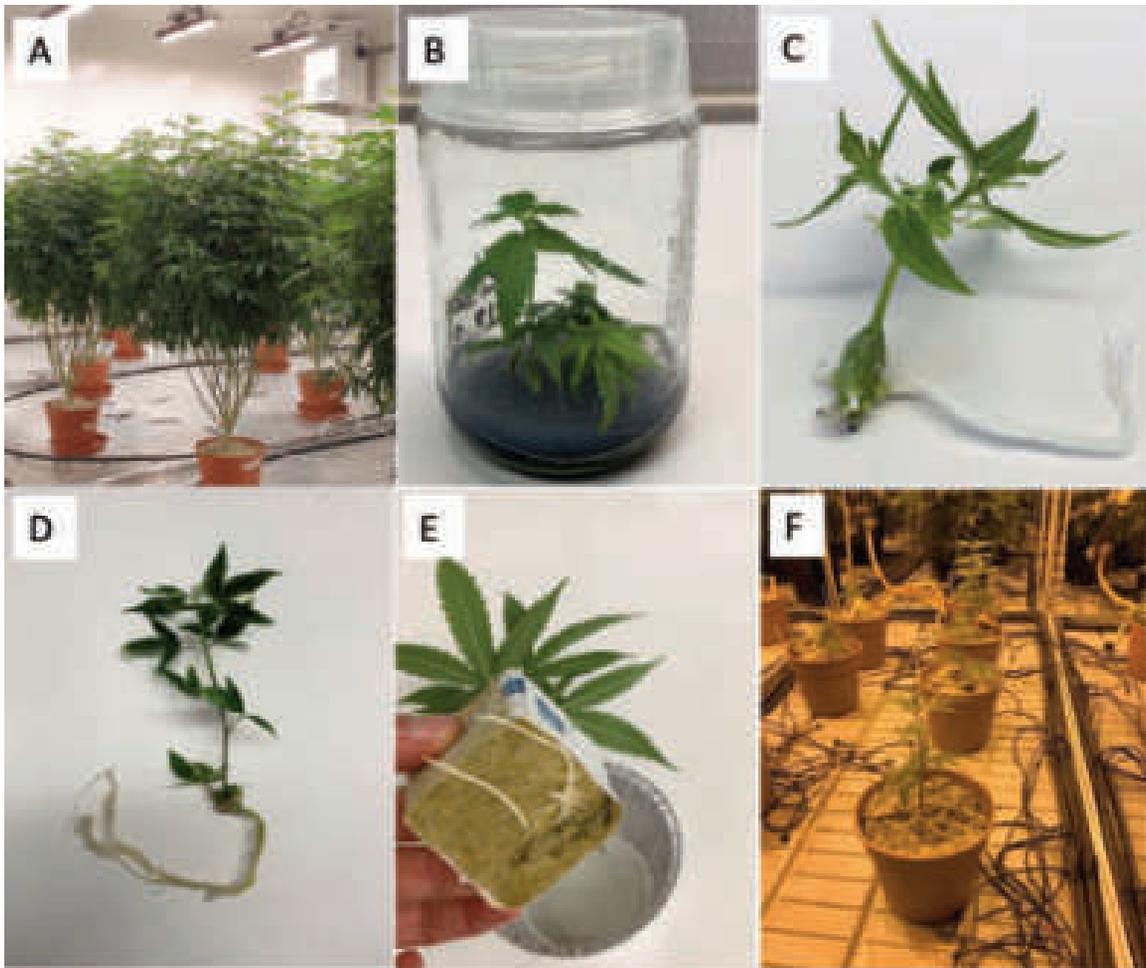


Fig. 1. Fasi diverse di lavoro: A. allevamento delle piante madri in camera di crescita; B. microgermogli di Cannabis su mezzo MS30ca; C: Proliferazione di germogli su mezzo di coltura MS addizionato con TDZ e GA3; D: Microgermoglio con apparato radicale; E: Germogli *ex vitro* in panetti di lana di roccia; F: Germogli provenienti da coltura *in vitro* acclimatati.

Fig. 1. Different stages of work: A. Mother plants in the growth chamber; B. Cannabis micropropagated shoots on MS30ca medium; C: Shoots proliferation on MS culture medium supplemented with TDZ and GA3; D: Micro-sprout with root system; E: Ex vitro sprouts in rock wool blocks; F: Sprouts from acclimatized in vitro culture.

con un numero di germogli medi sviluppati da un singolo espianto di $8,0 \pm 4,9$ e $5,7 \pm 1,0$ per CINBOL e CINRO rispettivamente. I germogli presentano un'altezza media di $1,1 \pm 0,2$ per CINBOL e $0,9 \pm 0,4$ cm per CINRO dopo due mesi di coltura, con il germoglio principale che raggiunge 1,7 cm di altezza per entrambe le varietà. L'utilizzo di mT alla dose indicata si è rivelato non idoneo alla moltiplicazione di entrambe le varietà, ed addirittura letale per la maggior parte delle piante di CINBOL (70%). Dopo 8 settimane di coltura, gli espianti coltivati sul mezzo standard MS30ca riescono a radicare (70,8% per CINBOL e 75% per CINRO), mostrando un apparato radicale ben sviluppato, come si osserva in Fig. 1D. Non è stata ottenuta alcuna radicazione sui mezzi addizionati di citochinine (T057 e mT2) né su MS/2 addizionato di IBA dopo 8 settimane.

Le piante con un apparato radicale sviluppato sono state acclimatate con una percentuale di successo prossima al 100% (Fig. 1E). Le piante sono state gradualmente trasferite in vasi più grandi contenenti substrato inerte e trasferite nelle *facilities indoor* (Fig. 1F) per costituire nuove piante madri per la produzione delle talee, previa verifica del mantenimento del chemotipo.

L'analisi cromatografica (Fig. 2A, B), la quantificazione del CBD e THC (Fig. 2C) e i marcatori molecolari (Fig. 2D) hanno confermato il chemotipo delle piantine *in vitro*.

Il protocollo sviluppato sulle due varietà di *Cannabis medica* è attualmente in uso per il mantenimento di 12 genotipi élite della collezione di germoplasma del CREA. La procedura è stata applicata anche a un esperimento di selezione varietale per l'ottenimento di una linea ad alto contenuto di CBDA a partire da seme femminizzato. Da circa 40 plantule in stadio vegetativo (40 giorni post semina) sono stati prelevati 3-4 espianti che sono stati conservati *in vitro* finché le piante hanno raggiunto la maturità, quando sono state analizzate per il contenuto dei cannabinoidi. In base ai risultati ottenuti dalle analisi delle infiorescenze sono state selezionate 4 piante col maggiore contenuto di cannabidiolo, conservate *in vitro*, che saranno sottoposte ad ulteriori cicli di coltivazione per selezionare il clone eccellente che potrà essere impiegato per la produzione di nuove varietà ad elevato contenuto di CBD.

Discussione e Conclusioni

L'utilizzo della micropropagazione di genotipi di *Cannabis medica* è estremamente utile e fortemente auspicabile per assicurare la disponibilità continua di materiale con profilo chimico ben definito e sicuro dal punto di vista fitosanitario. Il mantenimento su mezzo sintetico privo di ormoni non richiede

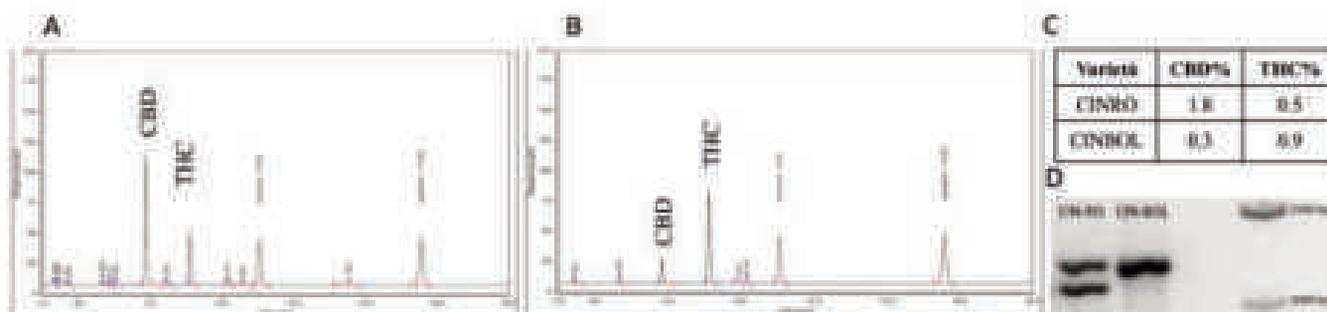


Fig. 2. Risultati dell'analisi al Gas cromatografo, con evidenziati i picchi di CBD e THC in CINRO (A) e CINBOL (B). C: quantificazione di CBD e THC in foglie prelevate da germogli micropropagati di CINRO e CINBOL, espressi in % p/p. D. Risultato dell'analisi con il marcatore molecolare B1080/B1192, che evidenzia la presenza della doppia banda in CINRO (chemotipo II) e della banda singola a 1192 bp nei campioni di CINBOL.

Fig. 2. Results of the gas chromatographic analysis, with the CBD and THC peaks in CINRO (A) and CINBOL (B) highlighted. C: quantification of CBD and THC in leaves taken from CINRO and CINBOL micropropagated shoots, expressed as % w/w. D. Result of the analysis with the molecular marker B1080/B1192, which highlights the presence of the double band in CINRO (chemotype II) and the single band at 1192 bp in the CINBOL (chemotype I) samples

costi particolari. La moltiplicazione può essere ottenuta attraverso una subcoltura di 2-3 settimane sul mezzo addizionato di citochinina TDZ e acido gibberellico. La radicazione avviene sul mezzo standard dopo circa 8 settimane di coltura con percentuali superiori al 70%. La procedura che utilizza tecniche di propagazione, i marcatori molecolari e le analisi del contenuto di cannabinoidi è un approccio impiegabile per la selezione e il mantenimento di germoplasma d'élite.

Bibliografia

- Adhikary D., Kulkarni M., El-Mezawy A., Mobini S., Elhiti M., Gjuric R., Ray A., Polowick P., Slaski J.J., Jones M.P., Bhowmik P., 2021. Medical Cannabis and Industrial Hemp Tissue Culture: Present Status and Future Potential. *Front. Plant Sci.*, 12: 627240.
- Cerrato A., Citti C., Cannazza G., Capriotti A.L., Cavaliere C., Grassi G., Marini F., Montone C.M., Paris R., Piovesana S., Laganà A., 2021. Phytocannabinomics: Untargeted metabolomics as a tool for cannabis chemovar differentiation, *Talanta*. 230: 122313.
- Fulvio, F., Paris, R., Montanari, M., Citti, C., Cilento, V., Bassolino, L., Moschella, A., Alberti, I., Pecchioni, N., Cannazza, G., Mandolino, G., 2021. Analysis of sequence variability and transcriptional profile of cannabinoid synthase genes in *Cannabis sativa* L. chemotypes with a focus on cannabichromenic acid synthase. *Plants*, 10: 1857.
- Lata H., Chandra S., Khan I., Elsolhy M.A., 2009. Thidiazuron induced high frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 45: 12–19.
- Lata H., Chandra S., Techen N., Khan I.A., Elsolhy M.A., 2016. In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3: 18–26.
- Legare C.A., Raup-Konsavage W.M., Vrana K.E., 2022. Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107: 131–149.
- Lubell-Brand J.D., Kurtz L.E., Brand M.K., 2021. An In Vitro-Ex Vitro Micropropagation System for Hemp. *HortTechnology*, 31(2): 199–207.
- Mechoulam R., Parker L., 2015. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annual Review of Psychology*, 64: 21-47.
- Monthony A.S., Page S.R., Hesami M., Jones A.M. P., 2021. The Past, Present and Future of Cannabis sativa Tissue Culture. *Plants*, 10(1): 185.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G., 2006. Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. *Molecular Breeding*, 17: 257–268.

Valutazione della presenza di batteri endofiti in tessuti di piante micropropagate di quattro portinnesti di *Prunus*

Catia Fausto¹, Alba N. Mininni^{1*}, Nikolaos I. Katis², Varvara I. Maliogka², Evangelos Ballas³, Alkiviadis Diamantopoulos³, Christoforos Xylogiannis³, Bartolomeo Dichio¹

*alba.mininni@unibas.it

¹ Dipartimento delle Culture Europee e del Mediterraneo: Architettura, Ambiente e Beni culturali (DiCEM), Università della Basilicata, Matera

² Faculty of Agriculture, Forestry and Natural Environment, School of Agriculture, Plant Pathology Lab, Aristotle University of Thessaloniki, Salonico, Grecia

³ Tissue culture laboratory, Fitotechniki, Arta, Grecia

Riassunto

In questo studio è stata valutata la presenza di batteri endofiti in 4 portinnesti di *Prunus* micropropagati, al fine di ottimizzare i protocolli di micropropagazione delle piante prodotte in vivaio. Dopo l'intero ciclo di micropropagazione, l'aggiunta di inoculi batterici durante il trapianto e la fase di acclimatazione, le piante sono state analizzate per la presenza di batteri endofiti nei tessuti vegetali. Sono state isolate 110 colonie batteriche, da cui sono stati selezionati 18 morfotipi distinti, e caratterizzate le comunità endofitiche per ogni specie di *Prunus*. I risultati hanno evidenziato che la presenza e la diversità di batteri endofiti in piante micropropagate è tessuto e specie-specifica.

Parole chiave: pianta madre, fase di radicamento, isolamento batterico, biodiversità microbica

Evaluation of endophytic bacteria in micropropagated plant tissues of four *Prunus* rootstocks

Abstract: Fruit trees and grapevine could be infected by a high number of pathogens such as viruses, viroids, bacteria through their vegetative propagation and grafting. Some of these pathogens cause severe yield losses and reduce the productive life of the fruit orchards or vineyards. The *in vitro* micropropagation technique is an efficient alternative for the rapid and high propagation rate of disease-free plantlets. The application of beneficial microorganisms to the plantlets during the acclimatation phase could improve plant quality and enhance tolerance to some biotic and abiotic stresses. In this study, the presence of endophytic bacteria in 4 micropropagated *Prunus* rootstocks was evaluated in order to understand the ecological interactions and optimize the micropropagation and sanitation protocols of the plants produced in the nursery. After the micropropagation cycle and the addition of bacterial and fungal inocula (*Agrobacterium radiobacter* K84, *Trichoderma harzianum* strain T22 and *Trichoderma asperellum*) during transplantation and the acclimatization phase, the plants were analyzed for the presence of endophytic bacteria in the plant tissues (stems, leaves and roots). Serial dilutions (1:10, 1:1000) were put on the different plates. After 3-5 days of incubation at 30 °C the CFU/g were calculated. After PCR amplification of the 16S rDNA gene, DNA was extracted from pure bacterial culture. PCR products were subjected to 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. For each plant tissue, bacterial colonies were isolated and counted. Based on colour, size, and morphology colony, a total of 110 isolates were successfully collected from the three plates media for each tissue of *Prunus* rootstocks. From bacterial colonies isolated, 18 distinct morphotypes were selected. After PCR amplification of the 110 bacterial colonies, a banded pattern was displayed on agarose gel. The cultivable endophytic isolates were assigned in groups distinguished by the size of their amplicons. For each species, fragments of DNA in bp were identified in common between stem, leaves and roots. Some bands were specific species and others specific tissue. The presence of endophytic bacteria after

in vitro micropropagation was higher in the root tissues of analyzed rootstocks than in the stems and leaves tissues. Persistent endophytic organisms were transferred in each subculture, and identified weeks or months later the initial micropropagation *in vitro*. The endophytic bacteria persisted in the absence of damage evident to plants in our observations. This preliminary study highlights how the presence and diversity of endophytic bacteria in micropropagated plants is both tissue- and species-specific. Specifically investigating endophytic communities could help to better understand their beneficial effects on plant growth and their response to biotic and abiotic stresses.

Keywords: mother plant, rooting phase, bacterial isolation, microbial biodiversity

Introduzione

Gli alberi da frutto e la vite vengono infettati da un elevato numero di agenti patogeni quali virus, viroidi, batteri attraverso la loro propagazione vegetativa e l'innesto. Alcuni di questi patogeni sono responsabili di importanti perdite di resa e riducono la vita produttiva di frutteti e vigneti (Hadidi et al., 2011; Martelli, 2014). Si stima che causino più di un terzo delle perdite di rendimento a livello mondiale (Pieterse et al., 2003). La produzione e la commercializzazione di materiale di propagazione di alta qualità testato contro i patogeni potrebbe essere un modo efficace per combattere questi agenti infettivi (Maliogka et al., 2015).

La tecnica di micropropagazione (propagazione *in vitro*) è un'alternativa efficiente per il rapido ed elevato tasso di propagazione delle piantine esenti da malattia. Tuttavia, è ben noto che le micropiante coltivate *in vitro*, in condizioni asettiche, sono suscettibili a stress ambientali quando vengono trasferite su un substrato *ex vitro* per l'acclimatazione (Russo et al., 2008) e possono anche essere attaccate da agenti patogeni che, se trasmessi, possono moltiplicarsi nel frutteto. Pertanto, in fase di acclimatazione, le piante vengono inoculate con microrganismi fungini o batterici che migliorano la qualità delle piante e aumentano la tolleranza ad alcuni stress biotici e abiotici.

La conoscenza dei batteri associati alle piante e del loro potenziale come antagonisti è essenziale non solo per comprendere il loro ruolo ecologico e l'interazione con le piante, ma anche per future applicazioni biotecnologiche, ad esempio il controllo biologico dei patogeni delle piante o l'isolamento di composti bioattivi (Weller, 1988; Emmert e Handelsman, 1999; Bloemberg e Lugtenberg, 2001).

Sono ancora scarse le informazioni sulla persistenza dei microrganismi nelle piante durante l'intero ciclo produttivo in vivaio e sul loro possibile ruolo di antagonisti. Pertanto, l'obiettivo del presente studio è stato quello di verificare la persistenza dei microrganismi nelle piante di *Prunus* dopo un ciclo di crescita in condizioni asettiche in vivaio, attraverso l'identificazione batterica del gene 16S.

Materiali e Metodi

Campionamento delle piante di Prunus

La ricerca è stata condotta su tre specie arboree da frutto (susino, pesco, ciliegio) e per ciascuna specie sono state utilizzate combinazioni di portainnesto-nesso. I portinnesti micropropagati e biosanificati *in vitro* sono stati ottenuti in laboratorio. Sono state raccolte cinque piante per i tre portinnesti MX14 (1 - 5), GF677 (6 - 10), OHF19-89 (11 - 15) e quattro piante per GiSeLa6® (16 - 19).

Micropropagazione

Giovani espianti di *Prunus* sono stati micropropagati secondo le procedure standard del vivaio. Dopo la fase di proliferazione e radicamento, le piantine sono state trasferite in serra per l'acclimatazione. Durante il trapianto sono stati aggiunti inoculi batterici e fungini (*A. radiobacter* K84, *T. harzianum* ceppo T22 e *T. asperellum*). Alla fine del ciclo di acclimatazione, le piantine sono state analizzate per la presenza di batteri endofiti nei tessuti vegetali (fusti, foglie e radici).

Isolamento di batteri endofiti

I tessuti vegetali (foglie, fusti e radici) delle piante dei 4 portinnesti di *Prunus* sono stati raccolti e utilizzati per l'identificazione dei batteri endofiti. I tessuti sono stati sciacquati sotto acqua corrente per rimuovere i detriti superficiali prima di essere sottoposti a sterilizzazione superficiale.

Da 0,1 g di tessuto è stato recuperato il numero di cellule batteriche espresso come peso di tessuto fresco UFC g⁻¹. I ceppi batterici identificati come singoli UFC sono stati isolati e selezionati da ciascun tessuto e subcoltivati su terreni appropriati. Isolati batterici simili sono stati raggruppati sulla base delle caratteristiche fenotipiche (forma, colore, velocità di crescita, morfologia della coltura).

Estrazione del DNA genomico batterico

Per valutare la specificità dei primer generici 16S, sono state condotte amplificazioni PCR con DNA estratto da colture batteriche pure. Ciascuna colonia batterica è stata sottoposta a subcoltura su un terreno appropriato e il DNA è stato estratto dalle cellule presenti in 1 mL di brodo.

Amplificazione mediante PCR di geni 16S rDNA di batteri endofiti coltivabili

Per amplificare il DNA è stato utilizzato un termociclatore Labcycler (SensoQuest, GmbH). Per l'amplificazione PCR sono stati utilizzati primer oligonucleotidici specifici del gene 16S rDNA batterico universale (16 S2 CTTGTACACACCCCGTC, 16 S p4 GCTGGATCACCTCCTTTCT). I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio 1,5% (p/v) e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio.

Risultati*Isolamento e conta dei batteri endofiti da fusti, foglie e radici di *Prunus* spp.*

Usando la procedura di isolamento sopra descritta, la maggior parte dei batteri endofitici è diventata gradualmente visibile 3-5 giorni dopo l'inizio dell'incubazione. Sono state contate le unità formanti colonia (UFC) su piastre di diluizione 1:10 (LB, PDA, TSA) per ciascun tessuto vegetale di ogni portinnesto. Per i tessuti del fusto e delle foglie le colonie numerabili erano < 10 UFC mL⁻¹, mentre per le radici delle piante erano > 2.000 UFC mL⁻¹.

Diversità delle colonie di batteri endofiti su terreni LB, PDA e TSA.

Sulla base del colore, delle dimensioni e della morfologia della colonia, un totale di 110 isolati (80 per le piastre di diluizione 1:10, 30 per le piastre di diluizione 1:1000) è stato raccolto con successo dai tre tipi di piastra per ciascun tessuto di tutti e quattro i portinnesti di *Prunus*. Da 110 colonie batteriche isolate principalmente su terreno LB e TSA (solo il 10% su terreno PDA) sono stati selezionati 18 morfotipi distinti. La Fig. 1 mostra un esempio di colonie batteriche cresciute sui terreni LB e TSA.

Identificazione batterica mediante PCR

Tutte le 110 colonie batteriche sono state testate mediante amplificazione PCR del gene 16S rDNA. È stato ottenuto un pattern a bande su gel colorato con bromuro di etidio. Gli isolati endofitici coltivabili sono stati assegnati in gruppi distinti in base alle dimensioni dei loro ampliconi.

Il gel di agarosio dei 110 isolati testati mostrava uno o più prodotti di PCR da ciascun isolato. Nella Fig. 2 sono mostrati 38 prodotti di amplificazione PCR su gel di agarosio. Diverse bande di peso molecolare sono apparse in tutte le corsie. In Tab. 1 sono mostrate le lunghezze dei frammenti di DNA in pb per ciascun portinnesto. In tutti e quattro erano presenti frammenti delle seguenti dimensioni: 200, 250, 400, 500 e 600 bp. Nelle piante di GF677 e GiSeLa6[®] erano in comune le bande 300 e 1600 pb. In MX14 e GiSeLa6[®] erano in comune le bande 800 e 1100 pb. In OHF19-89 e MX14 era in comune la banda di 210 pb. In GF677 le bande da 150, 270 pb erano uniche. Per OHF19-89 le bande da 220, 350, 1000 pb erano uniche. Per GiSeLa6[®] le bande da 310 e 1600 pb erano uniche.

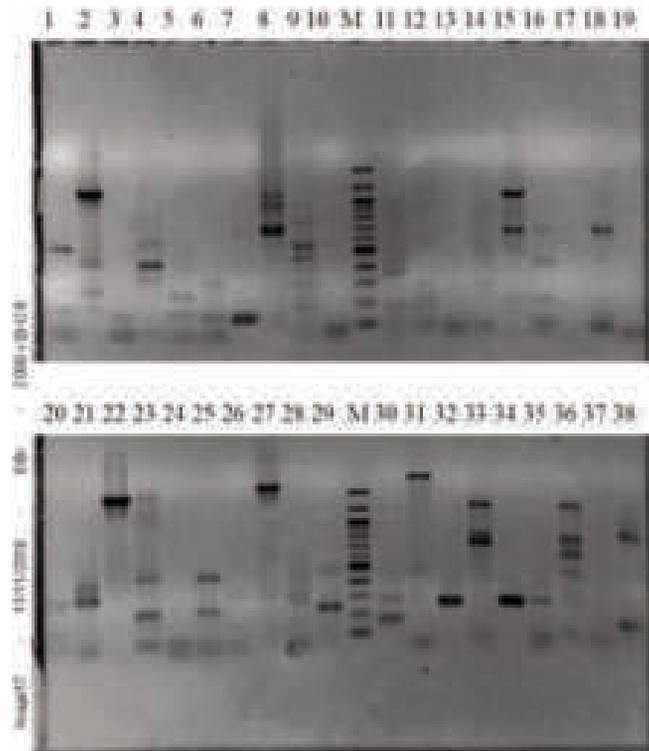


Fig. 1. Esempio di crescita su piastre LB e TSA di colonie batteriche.
Fig. 1. Example of bacterial colonies growth on LB and TSA plates.

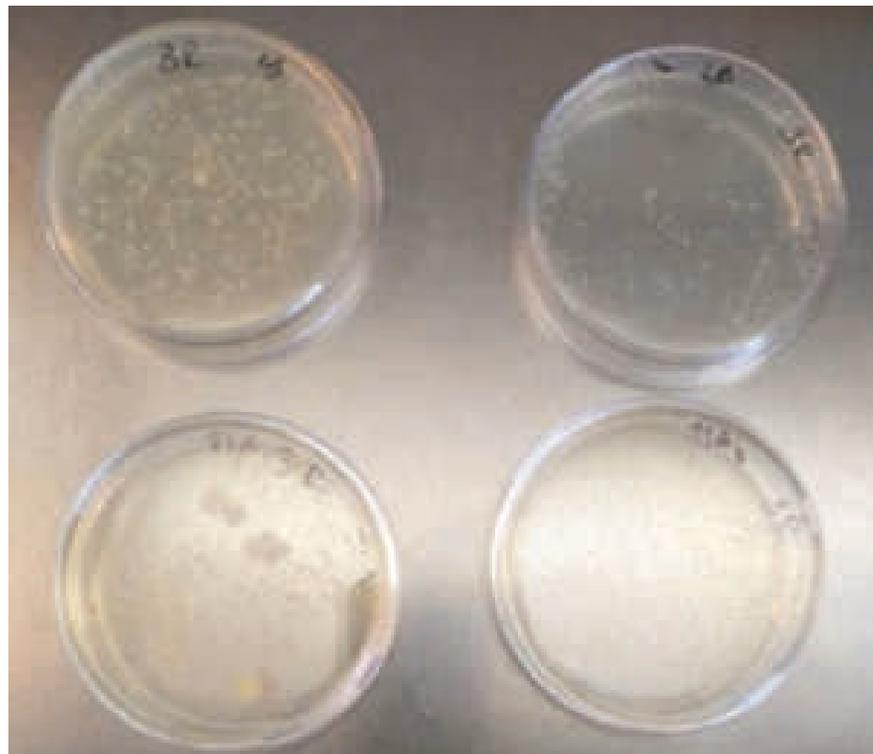


Fig. 2. Gel di agarosio colorato con bromuro di etidio mostrante i prodotti di PCR amplificati con primer 16S rDNA batterici universali. Lo standard di peso molecolare (100 pb DNA Ladder) è stato fatto correre in posizione centrale (M). Diverse bande di peso molecolare sono apparse in tutte le corsie.
Fig. 2. Ethidium bromide-stained gel of polymerase chain reaction (PCR)—amplification products with universal bacterial 16S rDNA primers. Molecular weight standard (100 bp DNA Ladder) was run in the middle line (M). Different molecular weight bands appearing in all lanes.

Tab. 1. Frammenti di DNA (pb) comuni e unici tra tutti e quattro i portinnesti.

Tab. 1. *The unique and common bands between all four rootstocks.*

Portinnesto	Tessuti	Dimensione frammento DNA (pb)
GF677	fusto	250/500/1000/1200
	foglia	250/270/400/600/1500
	radice	150/200/300/500/600
MX14	fusto	250/400/500/600/800/1100/1200/1600
	foglia	250/500/600/900/1500
	radice	200/500/600/800
OHF19-89	fusto	220/400/500/1000/1600
	foglia	200/250/350/800/1000/1500
	radice	210/250/500/600
GiSeLa6®	fusto	250/400/600/800/1000/1600
	foglia	250
	radice	200/210/250/300/310/400/500/1100

Tab. 2. Frammenti di DNA (pb) comuni e unici nei tessuti di fusto, foglie e radici dei quattro portinnesti.

Tab. 2. *Common and unique DNA fragments (bp) in stem, leaf and root tissues of the four rootstocks.*

Portinnesto	Dimensione (pb)
GF677	150/200/250/270/300/400/500/600/1600
MX14	200/250/400/500/600/800/1100/1500
OHF19-89	200/210/220/250/350/400/500/600/1000/1500
GiSeLa6®	200/210/250/300/310/400/500/600/800/1100/1600

Nei tessuti dei 4 portinnesti sono state ritrovate bande in comune e/o uniche tra loro. Ad esempio, nei fusti e nelle foglie di GF677, MX14 e GiSeLa6®, è stata rivelata la banda di 250 pb. Nei fusti di MX14, OHF19-89 e GiSeLa6® sono state trovate le bande da 400 e 1600 pb (Tab. 2). Nelle foglie di tutte e quattro i portinnesti di *Prunus* era presente la banda di 250 pb. Nelle foglie di MX14, GF677 e OHF19-89 la banda di 1500 pb era in comune (Tab. 2). La banda da 900 bp era unica per i tessuti fogliari MX14. Le bande da 350 pb erano uniche per le foglie di OHF19-89. Nei tessuti radicali di tutte e quattro i portinnesti era presente una banda di 500 pb in comune. Nei tessuti radicali di MX14, GF677 e GiSeLa6® era presente la banda di 200 pb (Tab. 2).

Discussione e Conclusioni

La presenza di batteri endofiti dopo la micropropagazione *in vitro* è risultata maggiore nei tessuti delle radici dei 4 portinnesti analizzati piuttosto che nei tessuti di fusti e foglie. I microrganismi endofitici persistenti possono essere trasferiti ad ogni subcoltura e possono essere identificati settimane o mesi dopo che il materiale è stato avviato *in vitro* (Leifert et al., 1989). Come confermato da Buckley et al. (1994), i batteri endofiti sono persistiti in assenza di danni evidenti alle piante anche nelle nostre osservazioni. Questo studio preliminare evidenzia come la presenza e la diversità di batteri endofiti in piante micropropagate sia tessuto e specie-specifica.

Abbiamo confermato la persistenza di comunità batteriche endofitiche nelle piante dopo la tecnica di micropropagazione in vivaio e ulteriori analisi saranno utili per aumentare la conoscenza del loro potenziale ruolo come agenti di biocontrollo.

Bibliografia

Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 343–350.

- Buckley P.M., Dewilde T.N., Reed B.M., 1994. Characterization and identification of bacteria isolated micropropagated mint plants. USDA-ARS, National Clonal Germplasm Repository, 33447 Peoria Road, Corvallis, Oregon 97333-2521.
- Emmert E.A.B., Handelsman J., 1999. Biocontrol of plant positive perspective disease: a (Gram+). FEMS Microbiol. Lett., 171: 1–9.
- Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W., 2011. Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Ston Fruits. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Leifert C., Waites W.M., Nicholas J.R., 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant tissue cultures. J. Appl. Bacteriol., 67: 353-361.
- Maliogka V.I., Olmos A., Pappi P.G., Lotos L., Efthimiou K., Grammatikaki G., Candresse T., Katis N.I., Avgelis A.D., 2015. A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. Virus Res., 203: 47–55.
- Martelli G.P., 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology, 96 (1S): 1-4.
- Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Verhagen B.W.M., Ton J., Van Wees S.C.M., Lon-Klosterziel K.M., Van Loon L.C., 2003. Induced systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria. Symbiosis, 35: 39–54.
- Russo A., Vettori L., Felici C., Fiaschi G., Morini S., Toffanin A., 2008. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. Journal of Biotechnology, 134: 312–319.
- Weller D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., 26: 379–407.

Messa a punto di protocolli di rigenerazione *in vitro* in *Ocimum basilicum* cv. FT Italiko, finalizzati al miglioramento genetico *via genome editing*

Chiara Forti^{1,2}, Sara Barberini^{1,3}, Marina Laura¹, Roberto Ciorba^{1,4}, Carlo Mascarello¹, Annalisa Giovannini¹, Barbara Ruffoni¹, Marco Savona^{1*}

* marco.savona@crea.gov.it

¹ CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (IM)

² Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA CNR), Milano (MI)

³ Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP- CNR), Sesto Fiorentino (FI)

⁴ CREA Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Roma

Riassunto

Ocimum basilicum L. è una pianta aromatica annuale usata in cucina e in erboristeria. ‘FT Italiko’ è la cultivar utilizzata per la produzione del pesto Genovese DOP e la sua coltivazione è gravemente minacciata e danneggiata dal fungo *Peronospora belbaharii*. Nel presente lavoro è stata verificata l’attitudine alla rigenerazione *in vitro* di cultivar di basilico resistenti o suscettibili a peronospora, al fine di mettere a punto per la cultivar di élite un protocollo efficiente a partire da differenti tessuti somatici. La rigenerazione *in vitro* rappresenta il presupposto iniziale e fondamentale per esperimenti di *genome editing* con la tecnologia CRISPR-Cas9.

Parole chiave: Basilico genovese, CRISPR-Cas9, Pesto

Preliminary results on *in vitro* regeneration of *Ocimum basilicum* ‘FT Italiko’ as a prerequisite for CRISPR-Cas9 transformation

Abstract: Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is an annual herbaceous plant with high economic value, used in aromatherapy, cosmetics and food production. *O. basilicum* ‘FT Italiko’ is used to produce “Genovese DOP” pesto sauce, the fresh sauce most sold in the world. Sweet basil is currently threatened by a severe fungal disease by the oomycete *Peronospora belbaharii* leading to a huge loss of production. The use of *genome editing* techniques as CRISPR-Cas9 which allows to precisely inactivate genes, especially those of susceptibility, has been rapidly increasing in horticultural field: however, the availability of edited plants depends on a high efficiency of *ex novo* regeneration of *in vitro* shoots. The aim of this work was to study the *in vitro* regeneration competence of the élite ‘FT Italiko’ and, to reach this goal, ‘Grand Vert’ and ‘Prospera’ have been analysed as a comparison. Different somatic tissues (cotyledons, hypocotyls, cotyledonary nodes, first true leaves, and roots) have been used for *in vitro* shoots regeneration. The most morpho-genetically responsive explants were young leaves from *in vivo* explants and the cotyledonary nodes (CN) from *in vitro* cultured explants. ‘FT Italiko’ showed more than 90% of regeneration on CN cultured onto medium with thidiazuron. Regeneration from CN has also been achieved in a selective *in vitro* medium containing kanamycin and cefotaxime, in order to speed up *Agrobacterium*-mediated transformation.

Keywords: Sweet basil, Pesto sauce, CRISPR-Cas9

Introduzione

Il basilico (*Ocimum basilicum*) è una pianta aromatica annuale, commercializzata in tutto il mondo come erba culinaria, come aroma o spezia essiccata, ed è una ricca fonte di oli essenziali (Simon et al., 1984). Fra i vari genotipi, la cultivar di élite ‘FT Italiko’ è utilizzata per la produzione del pesto

Genovese DOP. Le coltivazioni del basilico sono pesantemente danneggiate da infezioni di *Peronospora belbahrii* (Minuto et al., 2004) e per ovviare a questo problema, sono stati avviati vari programmi di miglioramento genetico tradizionale: tuttavia, nonostante si possano ottenere ibridi di basilico resistenti ai vari patogeni, i tempi di ottenimento e di verifica si sono rivelati molto lunghi e con risultati penalizzanti dal punto di vista del contenuto degli olii essenziali (Wyenandt et al., 2015; Pyne et al. 2018). Grazie alle ultime tecniche di miglioramento genetico, quali ad esempio il *genome editing* (GE), è possibile modificare in maniera puntiforme geni di suscettibilità, mantenendo inalterato il profilo metabolico. Il principale ostacolo all'utilizzo delle biotecnologie in basilico è spesso la mancanza di un sistema di trasformazione e rigenerazione, step fondamentale ed indispensabile anche nei protocolli di GE.

In questo lavoro, l'obiettivo principale è stato quello di verificare l'attitudine alla rigenerazione di tre differenti cultivar di *O. basilicum* 'FT Italiko' e 'Grand Vert', utilizzate per il loro profilo aromatico e Prospera, un ibrido resistente a peronospora) valutando la tipologia di espianto di partenza e le varie combinazioni ormonali.

Materiali e Metodi

Materiale vegetale di partenza

Semi commerciali di tre genotipi di basilico ('FT Italiko', 'Prospera', 'Grand Vert') sono stati posti a germinare in serra su terriccio Klasmann® + sabbia 70:30 v/v. Per la semina *in vitro*, i semi sono stati sterilizzati con una soluzione 2,5% (v/v) di NaOCl per 20' seguiti da due risciacqui e posti a germinare su substrato agarizzato (agar 8 g/L) MS (Murashige e Skoog, 1962), 30 g/L saccarosio, pH = 5,7, a 24±1°C, al buio per i primi tre giorni e successivamente alla luce (PPFD 30 µmol m⁻² s⁻¹) con fotoperiodo di 16/8 h.

Esperimento 1: rigenerazione da foglie in vivo e in vitro di O. basilicum 'FT Italiko'

Sono state utilizzate le prime foglie vere di *seedlings in vitro* e *in vivo* di 14 giorni, tagliate lungo la nervatura centrale, come riportato da Phippen e Simon (2000) e poste su terreno solido MS medium shoot multiplication B (MSS, Duchefa Biochemie) addizionato con 30 g/L saccarosio, 1 mg/L 6-Benziladenina (BA) ± 100 mg/L acido ascorbico e 10 mg/L acido citrico, pH= 5,7. (24±1°C, buio, 3 subcolture ogni 30 giorni). È stata registrata la presenza di germogli avventizi per espianto e la percentuale di rigenerazione.

Esperimento 2: rigenerazione da ipocotili e cotiledoni in vitro di O. basilicum 'FT Italiko' e 'Prospera'

Dalle plantule ottenute *in vitro*, sono stati prelevati 120 ipocotili (3-5 mm) e 240 cotiledoni e posti a 24±1 °C, 16/8 h di luce su MS sono state aggiunti 12,9 mg/L di ZnSO₄·7H₂O e 1,0 mg/L di IAA (Verma et al., 2016). Dopo 30 giorni, sono state rilevate la proliferazione di callo e la presenza di radici e germogli.

Esperimento 3: rigenerazione da radici in vitro di O. basilicum 'FT Italiko' e 'Grand Vert'

Dalle plantule radicate *in vitro*, sono state prelevate le radici (ca. 10-15 mm) e posizionate a 24±1 °C, 16/8 h di luce, in piastre Petri contenenti MS addizionato con BA 0,5 mg/L o zeatina (ZEA) 0,5 mg/L (Fraj et al., 2017).

Esperimento 4: rigenerazione da nodi cotiledonari in vitro di O. basilicum 'FT Italiko'

Dalle piantine *in vitro* sono stati prelevati espianti di nodi cotiledonari (CN, Khan et al., 2015), cotiledoni e ipocotili e coltivati su terreno di rigenerazione (4,3 g/L MSS, 30 g/L saccarosio, 3,5 mg/L thidiazuron (TDZ), 8 g/L agar, pH 5,8) a 24±1°C, 16/8 h di luce (PPFD 30µE m⁻² s⁻¹). L'efficienza di rigenerazione (%) è stata registrata dopo 40 giorni. Il protocollo di rigenerazione è stato messo a punto direttamente anche su terreno selettivo (+ 100 mg/L cefotaxime + 30 mg/L kanamicina) al fine di ottimizzare il protocollo di trasformazione mediato da *Agrobacterium*.

Analisi statistica dei dati

I dati sono stati analizzati con il software “Statistica® 10”; i valori riportati in tabella si riferiscono alle medie e ai valori standard dalla media. Per la comparazione diretta delle medie di due condizioni, è stato utilizzato il test t di Student per campioni indipendenti.

Risultati

Esperimento 1

Dopo 30 giorni, le prime foglie vere, sia da *vitro* che da *vivo*, hanno mostrato una elevata capacità di rigenerazione (Tab. 1, Fig. 1A). L’aggiunta di antiossidanti ha garantito percentuali di rigenerazione maggiori rispetto al substrato con il solo ormone. La più alta percentuale di rigenerazione diretta (34,5%, a 75 gg dall’inizio della coltura) abbinata al maggior numero di germogli/espianto (1,16) si è osservata utilizzando foglie da semenzali *in vivo* su substrato contenente BA e antiossidanti.

Esperimento 2

In entrambe le cultivar, già dopo 7 gg, si è osservato callo in corrispondenza del punto di taglio dell’espianto (Fig. 1B e 1C), soprattutto sugli ipocotili mentre i cotiledoni hanno generato molti più germogli avventizi (Tab. 2) e la rigenerazione di germogli a partire dai cotiledoni avviene sul punto di taglio interno. La risposta genotipo-specifica è molto marcata: ‘Prospera’ ha sempre garantito percentuali di rigenerazione superiori rispetto a ‘FT Italiko’.

Esperimento 3

Le radici hanno sviluppato callo friabile in prossimità del punto di taglio, ma, dopo essere stato trasferito su substrato con aggiunta BA (0,5 mg/L) o ZEA (0,5 mg/L), la produzione di germogli si è avuta solo per ‘Grand Vert’ (Fig. 2).

Tab. 1. Rigenerazione diretta da prima foglia vera di *O. basilicum* ‘FT Italiko’ (50 espanti per trattamento).

Tab. 1. Direct regeneration from first true leaf of *O. basilicum* ‘FT Italiko’ (N. of explants: 50 per treatment).

‘FT Italiko’ Substrato	Rigenerazione da foglie (vitro)		Rigenerazione da foglie (vivo)	
	MSS + BA	MSS + BA + antiox	MSS + BA	MSS + BA + antiox
Espanti con germogli (%)	10,15 ± 6,45	18 ± 5,83	28,89 ± 6,33	34,45 ± 11,96
N° germogli/espianto	1 ± 0,55	1 ± 0,01	1,14 ± 0,05	1,16 ± 0,5

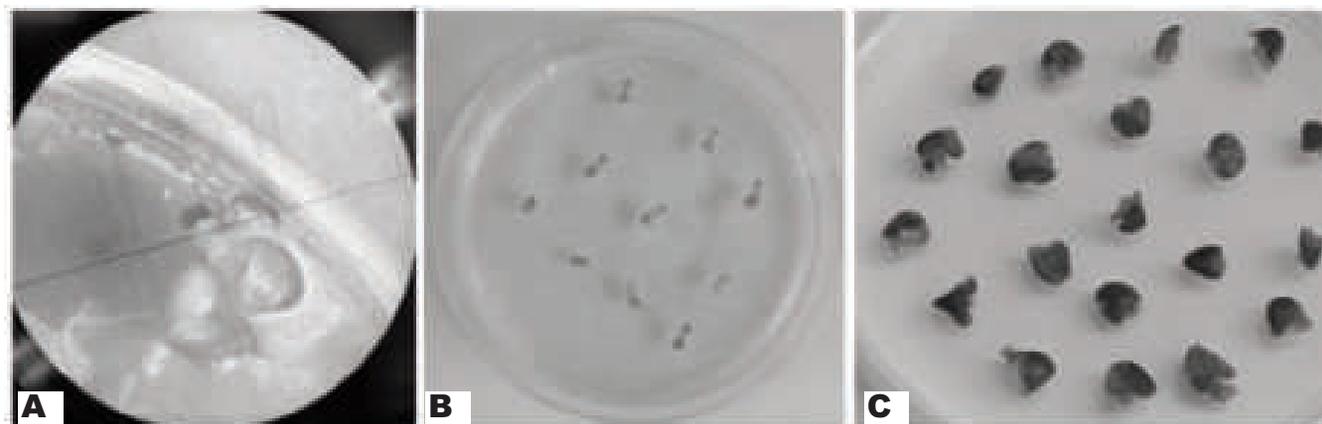


Fig. 1. *O. basilicum* ‘FT Italiko’: induzione di rigenerazione diretta da: (A) prima foglia vera (esperimento 1); (B) ipocotili e (C) cotiledoni (esperimento 1 e 2).

Fig. 1. *O. basilicum* ‘FT Italiko’: induction of direct regeneration from: (A) first true leaves, hypocotyls (B) and cotyledons (C) (experiment 1 and 2).

Tab. 2. Effetto del genotipo e dell'espianto di partenza per la rigenerazione di 'FT Italiko' e 'Prospera' (120 ipocotili e 240 cotiledoni per trattamento).

Tab. 2. Effect of genotype and explant type for regeneration of 'FT Italiko' and 'Prospera' (120 hypocotyls and 240 cotyledons per treatment).

Espianto di partenza	Cultivar	Callo (%)	Radici (%)	Germogli (%)
Ipocotili	'FT Italiko'	99,15 ± 0,9	85,83 ± 3,63	2,70 ± 1,94
	'Prospera'	97,50 ± 2,5	78,33 ± 6,49	9,17 ± 3,36
Cotiledoni	'FT Italiko'	52,50 ± 10,23	91,25 ± 3,59	37,08 ± 5,16
	'Prospera'	22,50 ± 8,31	100 ± 0,05	45,42 ± 1,78



Fig. 2. Valutazione della capacità di rigenerazione da radici per 'FT Italiko'.

Fig. 2. Evaluation of root regeneration capacity for 'FT Italiko'.

Esperimento 4

Tutti gli espianati testati hanno garantito rigenerazione e il 96,90% si è registrato utilizzando CN (Tab. 3). Gli ipocotili mostrano imbrunimento dopo 30 gg. A seguito di questi risultati, l'esperimento è stato ripetuto su un mezzo identico ma selettivo per la trasformazione e si conferma che i CN risultano il miglior espianto per la proliferazione e la trasformazione (Laura et al., 2021).

Tab. 3. Rigenerazione di *O. basilicum* 'FT Italiko' in relazione a vari espianati vegetali di partenza.

Tab. 3. O. basilicum 'FT Italiko' regeneration related to various explants as starting source.

Espianati di partenza	Rigenerazione (%) su MSS + TDZ 3,5 mg/L
Ipocotili	4,47 ± 1,88
Cotiledoni	16,16 ± 2,30
CN	96,90 ± 1,90

Discussione e Conclusioni

L'importanza di avere un efficiente e ripetibile protocollo di rigenerazione da abbinare alla trasformazione con agrobatterio ha portato a testare diverse cultivar commerciali, fra cui 'FT Italiko', per comparare l'efficienza e valutare le eventuali risposte cv specifiche.

'FT Italiko' mostra un'alta capacità di rigenerazione diretta ($34,45 \pm 11,96$) ed un maggiore numero di germogli per espianto ($1,16 \pm 0,5$) se gli espianti utilizzati sono foglie da semenzali *in vivo* poste su terreno contenente BA e antiossidanti, come riportato da Phippen et al. (2000) per 'Sweet Dani lemon'. Contrariamente a quanto riportato da Verma et al. (2016), 'FT Italiko' ha dato buoni risultati utilizzando i cotiledoni. I nodi cotiledonari hanno dato la massima percentuale di rigenerazione (96,9 %), risultato in accordo con i risultati di Khan et al. (2015) (98,6 %) per *O. gratissimum*.

In accordo con Fraj et al. (2017) 'Grand Vert' ha prodotto germogli, ma non 'FT Italiko', confermando che il processo di rigenerazione è strettamente genotipo/varietà dipendente.

In conclusione, i nodi cotiledonari risultano essere gli espianti vegetali di partenza che garantiscono una più alta percentuale di rigenerazione e possono essere utilizzati per esperimenti di trasformazione. Questi dati risultano consistenti e costituiscono il punto di partenza fondamentale per la messa a punto del protocollo sperimentale di trasformazione tramite *genome editing* della cultivar di pregio 'FT Italiko'.

Bibliografia

- Fraj H., Hannachi C., Werbrouk S.P.O., 2017. Efficient adventitious shoot organogenesis on root explants of *Ocimum basilicum* L. Acta Hort., 1187: 89-92.
- Khan S., Fahim N., Singh P., Rahman L.U., 2015. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Ocimum gratissimum*: a medicinally important crop. Industrial Crops and Products, 71: 138-146.
- Laura M., Forti C., Barberini S., Ciorba R., Mascarello C., Cassetti A., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M., 2021. Highly efficient CRISPR/Cas9 mediated gene editing in *Ocimum basilicum* cv. FT Italiko to induce resistance to *Peronospora belbahrii*. LXIV Annual SIGA Congress. Online, 14-16 settembre 2021.
- Minuto G., Minuto A., Gullino M.L., Garibaldi, A., 2004. Lotta chimica alla peronospora del basilico: primi risultati. Informatore fitopatologico – La difesa delle piante, 54 (4): 54-57
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Phippen W.B., Simon J.E., 2000. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.). In vitro cellular & developmental biology-plant, 36 (4): 250-254.
- Pyne R.M., Honig J.A., Vaiciunas J., Wyenandt C.A., Simon J.E., 2018. Population structure, genetic diversity and downy mildew resistance among *Ocimum* species germplasm. BMC Plant Biology, 18 (1): 69.
- Simon J.E., Chadwick A.F., Craker L.E., 1984. Herbs: an indexed bibliography, 1971-1980. In: The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Archon Books (Hamden, CT).
- Verma S.K., Sahin G., Das A.K., Gurel E., 2016. In vitro plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. is accelerated by zinc sulfate. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52 (1): 20-27.
- Wyenandt C.A., Simon J.E., Pyne R.M., Homa K., Mcgrath M.T., Zhang S., Raid R.N., Ma L.-J., Wick R., Guo L., Madeiras A., 2015. Basil Downy Mildew (*Peronospora belbahrii*): Discoveries and challenges relative to its control. Phytopathology, 105 (7): 885-894.

Riassunti

La micropropagazione nel vivaismo frutticolo italiano

Luigi Catalano

CIVI-Italia, Roma - Agrimeca Grape and Fruit Consulting srl, Turi (Bari)

Parole chiave: vivaismo, produzioni in vitro, qualità genetica, controllo fitosanitario, innovazione, tecnologica

L'Italia vanta lunga esperienza di studi e ricerche sulle tecniche di propagazione delle piante, sia sviluppate da Istituti e Centri di Ricerca, sia dai vivaisti stessi, comprese quelle sulla micropropagazione che, fin dagli anni '70, sono state adottate dal comparto del vivaismo frutticolo professionale per la produzione massale di piante. La propagazione in vitro rappresenta, per il vivaismo moderno e meglio di altri casi, l'innovazione tecnologica trasferita al processo produttivo. Attualmente operano in Italia una decina di aziende vivaistiche dotate di laboratorio di micropropagazione commerciale che propagano in vitro circa 50 milioni di piante tra portinnesti di fruttiferi e varietà autoradicate. Grazie all'adozione delle tecniche di propagazione in vitro ed alla sanità che contraddistingue i materiali così prodotti, è stato possibile disporre nel corso degli anni di linee clonali di portinnesti che costituiscono la base della moderna frutticoltura in tutto il mondo. Ciò ha permesso la piena qualificazione delle produzioni vivaistiche attraverso l'adozione di schemi di certificazione genetico-sanitaria, che oggi rappresenta la più alta garanzia che il comparto, sotto il controllo delle competenti autorità fitosanitarie, può assicurare. Per questo motivo, precise metodiche tecniche sono incluse nei protocolli di certificazione volontaria attuati in Italia e EU. Attraverso l'utilizzo delle colture in vitro e la messa a punto di protocolli adeguati è oggi possibile propagare su larga scala non solo portinnesti di drupacee, ma anche portinnesti di pero, melo e, recentemente, portinnesti di agrumi, oltre a moltissime varietà autoradicate di actinidia, melograno, noce, olivo, carciofo, nocciolo ed anche di piccoli frutti, in particolare di mirtilli e lamponi. La competitività dei laboratori di micropropagazione italiani risiede nella capacità di rispondere prontamente alle richieste del mercato attraverso la messa appunto di protocolli di moltiplicazione affidabili ed efficienti, anche per specie vegetali che saranno richieste dal mercato in futuro. Un esempio si sta avendo con le piante di colture tropicali come banana e palma da dattero, che soffrono l'infezione di organismi nocivi a diffusione epidemica. La diffusione di nuovi organismi nocivi a livello mondiale rende la micropropagazione uno strumento indispensabile per garantire la sanità delle piante, facilitando nello stesso tempo il superamento delle barriere fitosanitarie e supportando la possibilità di scambi commerciali in tutto il mondo, in grandi quantità, e con volumi ridotti. Le prossime sfide saranno quelle di cercare di automatizzare i processi produttivi ancora di più, al fine di ridurre i costi di produzione e di adottare tecnologie che rendano possibile il risparmio energetico, così come materiali di consumo e contenitori plastic-free o biodegradabili. Per questo la micropropagazione, intesa come tecnologia innovativa a supporto del vivaismo moderno, risulta essere una scelta strategica vincente per affrontare il mercato globale da parte del comparto vivaistico professionale nazionale.

e-mail: l.catalano@agrimeca.eu

Vitroplant: esperienze di 40 anni di attività nella micropropagazione industriale dell'olivo e altre piante da frutto

Oriano Navacchi

Vitroplant Italia SRL, Società Agricola, Cesena (FC)

Parole chiave: micropropagazione industriale, olivo, fruttiferi, certificazione, giovanilità

Vitroplant Italia ha iniziato la sua attività a fine anni '70. Il Prof. Giuseppe Zuccherelli, insieme al Prof. Gilberto Zuccherelli, nel 1979 crearono Vitroplant, in un momento storico nel quale la tecnica della moltiplicazione in "vitro" non era stata ancora utilizzata per il vivaismo frutticolo. Nei primi anni di attività le difficoltà tecniche erano tante, ma il valore del prodotto vivaistico innovativo rappresentato dai portinnesti del pesco (GF 677 e pochi altri) permise di affermare questa nuova tecnologia e affrontare le nuove richieste che provenivano dal mercato. Dalle prime esperienze sull'olivo si capì subito che tale specie di pianta aveva una forte difficoltà nell'adattarsi alle condizioni del "vitro", dimostrandosi una specie recalcitrante a questa tecnica di propagazione. Gli iniziali incidenti di percorso come il nostro incauto utilizzo di varietà adattate alle condizioni del "vitro" da altri ricercatori del settore (risultate poi di identità genetica ignota e non rispondente alla varietà dichiarate), i dubbi sulla stabilità genetica per l'aspetto morfologico delle piante da "vitro" (che è diverso rispetto alle piante ottenute con i metodi tradizionali quali talea e innesto), smorzarono il nostro entusiasmo iniziale in merito alla reale fattibilità della propagazione in "vitro" dell'olivo. Inoltre, nonostante un'enorme quantità di pubblicazioni scientifiche sulla moltiplicazione in "vitro" dell'olivo, si può affermare che non esistono dati sul comportamento agronomico produttivo delle piante ottenute con questa tecnica. Oggi c'è un nuovo interesse sulla micropropagazione di moltissime specie, anche perché sono comparse patologie molto gravi per le quali il vitro è un'arma importantissima per la propagazione e risanamento delle piante (per esempio la comparsa della *Xylella fastidiosa* su *Olea europea*). La micropropagazione infatti consente di produrre rapidamente piantine di qualità utilizzando espianti prelevati da greenhouse in Centri di conservazione. Il ciclo produttivo può essere effettuato in ambiente totalmente protetto e questo permette di fornire garanzie sanitarie che le tecniche di propagazione tradizionali non possono dare. In questa relazione si riportano i risultati di ricerche e le recenti acquisizioni sull'olivo da "vitro" prodotto presso le strutture del Laboratorio Vitroplant Italia Srl Società Agricola, relativamente ad aspetti quali il confronto di produttività tra piante di olivo micropropagate e da talea in impianti ad alta densità. Inoltre, si presentano alcune importanti riflessioni sulla micropropagazione del noce, nocciolo, portinnesti del melo e fragola, nonché sulla presunta 'giovanilità' del materiale da micropropagazione, una credenza che, nonostante le evidenze scientifiche contrarie, ancora persiste.

e-mail: orianonavacchi@vitroplant.it

Application of plant cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, production, virus eradication and as a tool for modern breeding techniques

Bart Panis

Katholieke Universiteit Leuven, Belgio

Keywords: bananas, cryopreservation, embryogenic cells, genetic resources

Plant cryopreservation is increasingly becoming a widely accepted and applied method for the long-term conservation of plant genetic resources that can not be conserved through seeds. This is caused by the fact that efficient and reliable cryopreservation protocols, applicable to a wide variety of species and cultivars such as droplet vitrification and plate cryopreservation methods became available. Currently, between 20000 and 25000 accessions are safely preserved in liquid nitrogen and more initiatives to increase these numbers are in the pipeline. Crops with more than 1000 accessions cryopreserved are apple, banana, mulberry, cassava, garlic and potato. It is estimated that worldwide between 100 000 and 150 000 unique accessions of vegetatively propagated and recalcitrant seed crops are currently held in field and in vitro and genebanks. A global initiative is thus needed to make sure that all these accessions are safely maintained for next generations. Like the Svalbard Global Seed Vault that is storing almost one million seed samples as backup for national and international seed banks, a safety cryopreservation back up facility should be established. Besides for storage of genetic resources, cryopreservation can also be applied in clonal plant production systems or as a tool for molecular biology. For example, hundreds of cryotubes containing transformation competent embryogenic cell lines of *Musa* species (bananas) are safely stored in liquid nitrogen for already more than 20 years and are being used on a regular base. Another but equally important application of cryopreservation is its use for the eradication of plants from pathogens such as viruses, phytoplasmas and bacteria.

e-mail: Bart.Panis@kuleuven.be

La coltura in vitro delle piante officinali ed esempi di sviluppo commerciale

Barbara Ruffoni

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo (CREA-OF), Sanremo (IM)

Parole chiave: piante officinali, bioreattori, metaboliti secondari, micropropagazione

L'intervento vuole proporre una panoramica dell'utilizzo delle tecniche di coltura in vitro delle piante officinali partendo dalla micropropagazione ad arrivando all'utilizzo dei bioreattori per la produzione dei metaboliti secondari. Saranno presentati i differenti approcci per la definizione dei protocolli colturali e verranno presentati esempi di utilizzo a scopi commerciali delle soluzioni biotecnologiche adottate al fine di ridurre i costi di produzione e, contemporaneamente, preservare l'ambiente da depauperamento riguardo alle specie utili che ancora attualmente subiscono la raccolta spontanea.

e-mail: barbara.ruffoni@crea.gov.it

Innovazione nell'acclimatazione delle piante da vitrocoltura

Andrea Vitale

Consulente tecnico in micropropagazione e acclimatazione delle piante in serra

Parole chiave: micropropagazione, acclimatazione, sviluppo sostenibile.

Il potenziale della micropropagazione è molto più alto di quanto si immagini. Nel prossimo futuro il settore probabilmente giocherà un ruolo sempre più importante nell'ambito della sostenibilità cui si parla sempre più spesso, ma i cambiamenti climatici ed il continuo incremento dei costi di produzione rendono necessarie nuove misure di efficientamento all'interno dei processi che determinano il prodotto finale. In tale contesto gli interventi più incisivi devono essere demandati soprattutto all'automazione e alle risorse tecniche (agronomi interni, consulenti, etc...), capaci di mettere in campo prodotti e tecnologie efficaci nel fronteggiare le nuove esigenze aziendali. Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta alla fase di acclimatazione delle piante provenienti da vitro poiché è noto che le perdite registrate in tale fase risultano incidere in modo pesante sulle spese aziendali. Negli anni si è assistito ad una evoluzione delle strategie legate all'acclimatazione che hanno portato a numerosi vantaggi quali la riduzione dei tempi di radicazione e del lavoro in laboratorio, l'incremento della qualità del materiale e dunque crescita sul mercato. L'innalzamento delle temperature e la riduzione delle risorse idriche sono effetti del cambiamento climatico che possono creare non poche problematiche in questo settore. Oggi le tecniche di acclimatazione messe in campo tengono principalmente in considerazione lo spazio (soprattutto nel periodo invernale) e la gestione dei fattori ambientali: alcune aziende infatti hanno iniziato ad acclimatare in ambienti chiusi (coltivazione indoor) che permettono un controllo più efficiente dei parametri fisici (temperatura, luce, umidità) utilizzando principalmente substrati tipo "preforma", che garantiscono un certo grado di ossigeno alla base della pianta riducendo i rischi di patologie, seguiti dai paperpot, che viceversa richiedono maggiore attenzione nella gestione delle piante. In considerazione degli spazi e delle strutture richieste è però più frequente osservare come il controllo dei fattori ambientali sia realizzato all'interno della serra: qui gli elementi principalmente utilizzati sono il cooling e gli schermi termoriflettenti per il raffrescamento, il riscaldamento basale ed i bruciatori per il riscaldamento, mentre per quel che riguarda la gestione dell'umidità si ha un controllo manuale da parte del responsabile preposto. Un settore in forte crescita è quello dello sviluppo delle luci led dotate di spettro luminoso adatto alla coltivazione indoor e outdoor, che se in serra viene utilizzato per integrare le ore di luce solare, nel sistema indoor costituisce elemento essenziale per la crescita e la radicazione delle piante. Osservazioni in campo hanno mostrato quindi come ancora molto si possa fare in questo settore, dall'utilizzo di lampade artificiali sempre più performanti all'utilizzo di sistemi plug in plug su base preforma per efficientare la radicazione anche in assenza di riscaldamento; dall'impiego del fog system come sistema di raffrescamento alternativo al cooling all'automazione delle aperture dei tunnel. La corretta gestione delle risorse tecniche a disposizione è dunque la chiave per ottenere prodotti ad alta qualità senza l'utilizzo di prodotti fitosanitari in serra.

e-mail: vitale.andrea@yahoo.it

Somatic embryogenesis: great potential with limited commercial exploitation

Traud Winkelmann

Leibniz, Universitaet Hannover, Germania

Keywords: somatic embryogenesis, mass propagation, genetic transformation, germplasm storage, protoplasts

Since the first description in 1958, somatic embryogenesis has been regarded as the most promising plant regeneration pathway in terms of efficiency. Embryogenic cultures bear a huge potential to be applied for mass propagation, genetic transformation, germplasm storage and source for protoplasts. However, if it comes to commercial exploitation for micropropagation, success stories are rather scarce. The presentation focus on limitations of somatic embryogenesis and approaches to overcome them.

e-mail: traud.winkelmann@zier.uni-hannover.de

Micropropagazione del noce: ottimizzazione delle fasi di immissione, risanamento e radicazione in vitro

Daniele Vichi^{1*}, Cecilia Domenichini², Filippo Dalmonte¹, Paola Negri², Stefano Tartarini²

¹*Dalmonte Micro Societa' Agricola S.s., Brisighella (RV)*

²*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari – DISTAL, Università di Bologna*

Parole chiave: immissione, risanamento, radicazione, *Juglans regia*

Il noce *Juglans regia* L. è una specie nota per essere recalcitrante alla coltivazione in vitro, per cui con il presente studio si è cercato di implementare i protocolli sperimentali del processo di micropropagazione. Uno dei punti che si è rivelato particolarmente critico è la sterilizzazione degli espianti che preclude all'immissione in vitro. A questo scopo sono state effettuate diverse prove di immissione in vitro sia presso l'Università di Bologna (DISTAL), sia presso il laboratorio commerciale della Dalmonte Micro al fine di iniziare la micropropagazione di diversi genotipi di noce. Da queste prove è emerso che il metodo più efficace che riduce drasticamente le contaminazioni di batteri è quello che utilizza il cloruro di mercurio. Un altro problema della micropropagazione presso il laboratorio commerciale era la presenza di contaminazioni da lieviti o batteri in colture del portinnesto 'Vlach'. A questo fine sono state effettuate diverse prove sperimentali utilizzando antibiotici (cefotaxime, vancomicina o streptomicina) o antimicotici (nistatina, amfotericina o Nimrod 250 EW) per tentare di eliminare queste contaminazioni. Inoltre, si è provato a risanare le colture di Vlach tramite infiltrazione a vuoto di lisozima, in associazione ad altri antibiotici e antimicotici. Il risanamento di germogli di 'Vlach' affetti da contaminazioni batteriche per incapsulamento con alginato di sodio associato a cefotaxime, vancomicina, tiosolfato d'argento e lisozima ha avuto successo. Per rilevare gli eventuali microrganismi sono stati utilizzati terreni specifici per batteri (LB) o lieviti (YPD). Infine è stata testata l'influenza della vermiculite sulla rizogenesi di germogli di "Vlach" immessi su terreno ½DKW a cui sono stati aggiunti IBA, saccarosio e agar. La vermiculite ha fornito i risultati sperati ottimizzando l'induzione e lo sviluppo radicale.

* e-mail: daniele.vichi92@gmail.com

Propagazione *in vitro* di *Tanacetum cinerariaefolium* (Trev.) Schultz-Bip.

Patrick Angelo Guarini*, Giuseppe De Mastro, Claudia Ruta

Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari A. Moro

Parole chiave: fitoregolatori, micropropagazione, moltiplicazione, piretrine, protocollo.

Il Piretro (*Tanacetum cinerarifolium* (Trev.) Schultz-Bip.) è una specie appartenente alla famiglia delle Asteraceae. È originario dell'Albania e della Dalmazia, anche se attualmente i principali produttori di piretro sul mercato mondiale sono Kenya e Australia. L'importanza di questa specie è dovuta alle piretrine, sostanze di riconosciuto valore insetticida, estratte dai fiori essiccati. Negli ultimi anni si è registrato un crescente interesse per la sua introduzione nella coltivazione nel Salento (area più meridionale della Puglia), per i vantaggi economici e ambientali. In realtà, la coltivazione del piretro nel Salento era stata suggerita già all'inizio del 1900 e alcune attività sperimentali sono state svolte in Puglia all'inizio degli anni 2000 con risultati incoraggianti, utilizzando sementi provenienti dalla Dalmazia. Nonostante questi buoni risultati, la fornitura di materiale di propagazione per garantire la produzione di piante con buone caratteristiche produttive e qualitative è ancora limitata. Pertanto, si ritiene particolarmente interessante intraprendere ricerche che possano contribuire allo sviluppo di un programma di produzione di semi e propagazione clonale.

Lo scopo del presente studio è stato di sviluppare un efficiente protocollo di propagazione *in vitro* per *Tanacetum cinerarifolium* (Trev.) Schultz-Bip, per ottenere un gran numero di piante di alta qualità. I semi sono stati fatti germogliare in piastre Petri e le piantine sono state accresciute su un terreno nutritivo semisolido arricchito con saccarosio e tre diversi fitoregolatori (benzilamminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ) e metatopolina (MT)) per stabilire l'adattamento alle condizioni di *in vitro* e indurre la moltiplicazione dei germogli. Il mezzo di crescita arricchito con MT (0.5 mg l⁻¹) ha dato il miglior indice medio di moltiplicazione (5). Tre diverse concentrazioni di acido indol-3-butirrico (IBA) sono state aggiunte al terreno di coltura per indurre la radicazione: 0.1 mg l⁻¹, 0.5 mg l⁻¹ e 1.0 mg l⁻¹. La maggiore concentrazione di IBA ha comportato un maggior numero di radici a scapito della loro lunghezza, mentre la minore concentrazione ha dato radici più lunghe ma meno numerose. Questo studio ha sviluppato un protocollo efficace e riproducibile per la micropropagazione del piretro.

* email: guarinipatrick@gmail.com

Adattabilità del timo toscano alla coltura *in vitro*: induzione e *scale-up*

Waed Tarraf^{1*}, Tolga Izgu¹, Gabriele Cencetti², Felicia Menicucci³, Eleonora Palagano², Marco Michelozzi², Alfonso Crisci¹

¹ IBE-Istituto di BioEconomia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino (Firenze)

² IBBR-Istituto di Bioscienze e BioRisorse, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino (Firenze)

³ ICCOM-Istituto di Chimica dei Composti Organometallici, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino (Firenze)

Parole chiave: *Thymus*, piante officinali, moltiplicazione, biomassa, principi attivi.

In questi ultimi anni il consumo delle piante officinali è aumentato sensibilmente e di conseguenza è cresciuta la necessità di garantire al mercato una produzione stabile di biomassa fonte di principi attivi d'origine vegetale. Per superare numerosi inconvenienti relativi alla produzione in vivo è stata utilizzata la micropropagazione come un'alternativa ai metodi tradizionali di coltivazione in campo. In tal senso, questa tecnica potrebbe consentire di standardizzare il processo produttivo ed aumentare la resa del materiale vegetale destinato alla lavorazione industriale. Lo scopo del presente lavoro è mettere a punto un protocollo ottimale per programmare la produttività sia quantitativa che qualitativa di piante di timo (*Thymus* spp.) selezionate da cinque popolazioni della montagna pistoiese in Toscana. Le piante sono state disinfettate con etanolo e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio. La stabilizzazione in vitro è stata effettuata su un substrato MS privo di ormoni. In seguito i germogli sono stati moltiplicati utilizzando lo stesso substrato della stabilizzazione ma saggiando due diverse combinazioni di citochinine e auxine. I primi risultati sottolineano che gli ecotipi rispondono diversamente alle due combinazioni di ormoni, registrando il massimo tasso di moltiplicazione di 2:1 ogni 4 settimane. Per quanto riguarda la composizione chimica, le concentrazioni dei terpenoidi presi in esame variano tra la pianta coltivata in vitro e la stessa nel suo habitat di prelievo. Ulteriori analisi e studi sono in corso. Il presente protocollo ha consentito di ottenere un elevato numero di piante in tempi brevi superando le problematiche che riguardano le variazioni nella produzione di biomassa di alta qualità, soprattutto in relazione alla composizione biochimica di interesse farmaceutico.

* e-mail: waed.tarraf@ibe.cnr.it

Recupero da conservazione a 4°C di mora di rovo (*Rubus fruticosus*) mediante coltura liquida in immersione temporanea in bioreattore ElecTIS

Doaa Elazab^{1*}, Claudio Depaoli², Tommaso Falciani³, Maurizio Capuana⁴, Elif Aylin Ozudogru⁵, Maurizio Lambardi¹

¹ IBE/Istituto per la BioEconomia, CNR, Sesto Fiorentino (Firenze)

² Laboratorio di Micropropagazione 'Depaoli Claudio', Predaia (Trento)

³ DISPAA, Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino (Firenze)

⁴ IBBR/Istituto di Bioscienze e Biorisorse, CNR, Sesto Fiorentino (Firenze)

⁵ Department of Molecular Biology and Genetics, Istinye University, İstanbul, Turkey

Parole chiave: conservazione in crescita rallentata, micropropagazione, RGR, TIS

La coltura liquida in immersione temporanea (TIS, Temporary Immersion System) si sta affermando come l'innovazione più interessante e promettente nel panorama della micropropagazione. I bioreattori disponibili a livello commerciale sono a singolo (RITA[®], Plantform[®]) o a doppio contenitore (SETI-STM). In questi bioreattori è il substrato liquido l'elemento "in movimento", cosa che avviene con l'insufflamento forzato di aria dall'esterno all'interno dei contenitori attraverso filtri per gas. Questo meccanismo rappresenta un punto debole di tali sistemi, che spesso vanno incontro a frequenze di inquinamento superiori alla coltura in substrato gelificato. ElecTIS è un bioreattore innovativo a singolo contenitore (brevetto di Claudio Depaoli n° 2617282) che non richiede insufflamento forzato di aria, rendendo invece mobile la coltura di germogli e stazionario il substrato liquido. Il movimento temporizzato di salita e discesa del cestello contenente la coltura assicura il contatto periodico col substrato liquido, posizionato alla base del contenitore. Il prototipo è stato già testato presso il CNR-IBE per la coltura di germogli di paulownia, crisantemo e nandina, con eccellenti risultati. In questo studio si è voluto affrontarne, per la prima volta, l'impiego nel recupero di colture di germogli di mora di rovo (*Rubus fruticosus*, cvs Thornfree e Chester), provenienti da prolungata conservazione in crescita rallentata (5 mesi), a 4°C, presso i Battistini Vivai di Cesena (che si ringraziano). La coltura di recupero è stata effettuata su due diverse tipologie di ElecTIS (contenitore medio, 20x14 cm-247 cm² e contenitore grande, 25x17-326 cm²), confrontando la coltura in TIS (ciclo di 8 min ogni 6 h) con quella in substrato gelificato. La coltura, liquida o gelificata, è stata effettuata impiegando il substrato DKW, addizionato di 0.5 mg/L di BA e 0.01 mg/L IBA come regolatori di crescita. Dopo 5 settimane sono stati effettuati i rilievi (qualità del materiale e RGR/tasso di crescita relativa) di recupero dopo la prima subcoltura, seguente la conservazione in crescita rallentata, che hanno subito evidenziato una evidente superiorità del materiale proveniente da recupero in ElecTIS, rispetto al tradizionale substrato gelificato. E' attualmente in corso la verifica dopo le successive subcolture.

* e-mail: doaa.elkassas@ibe.cnr.it

Studi preliminari sull'incapsulamento di propaguli vitro-derivati di *Rubus fruticosus* (L.)

Luca Regni^{1*}, Simona Lucia Facchin¹, Antonello Marinotti¹, Primo Proietti¹, Maurizio Micheli^{1#}

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli studi di Perugia

Parole chiave: rovo, micropropagazione, seme sintetico, endosperma artificiale

Negli ultimi decenni l'attenzione per la coltivazione del rovo (*Rubus fruticosus* L.) è cresciuta grazie sia all'aumento del consumo di more come prodotto fresco sia per la rusticità della specie che consente la valorizzazione di aree marginali. Di interesse è anche la possibilità di diversificazione delle produzioni aziendali. Conseguentemente, è aumentata la richiesta di materiale vivaistico di qualità e la coltura *in vitro* può essere un valido sistema di propagazione. In tale contesto, la possibilità di incrementare la produttività, anche attraverso una gestione più efficace del materiale *vitro*-derivato, può essere conseguita mediante la tecnologia dell'incapsulamento per la produzione di semi sintetici. La presente sperimentazione è stata condotta sulla cultivar Thornfree per individuare il tipo di propagulo da incapsulare e i trattamenti per favorire la radicazione. In particolare, sono stati sottoposti a incapsulamento due tipi di propaguli: il singolo nodo e la base dei cespi. Per migliorare i parametri relativi alla radicazione sono stati saggiati tre diversi trattamenti: immersione dei propaguli in una Soluzione Liquida Induttiva (SLI) prima o dopo l'incapsulamento e aumento della concentrazione di IBA nell'endosperma artificiale. Dai risultati ottenuti emerge che la base dei cespi è il propagulo più idoneo in quanto le plantule ottenute mostrano un maggior numero di radici e un peso fresco e secco più elevati rispetto a quelle derivanti dal singolo nodo incapsulato. Inoltre, l'aumento dell'IBA nella matrice incapsulante garantisce migliori livelli di conversione con lo sviluppo di plantule vigorose rispetto all'immersione dei propaguli o delle capsule in SLI. Ulteriori studi potranno valutare altri fattori, come l'effetto della temperatura e del tempo di conservazione delle capsule, nonché della tipologia del substrato di semina.

* e-mail: luca.regni@unipg.it

Uso dei protoplasti nel *gene editing* della vite (*Vitis vinifera* L.)

Floriana Nuzzo*, Chiara Pagliarani, Amedeo Moine, Paolo Boccacci, Giorgio Gambino, Irene Perrone

Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Torino

Parole chiave: recalcitranza, *direct delivery*, variazione somaclonale, rigenerazione, embriogenesi somatica

L'alto valore culturale ed economico della vite (*Vitis vinifera* L.) la rende una delle colture più importanti fra le piante da frutto. La vite è facilmente propagabile mediante colture *in vitro* ed è possibile rigenerare nuovi individui a partire da singole cellule somatiche attraverso il processo di embriogenesi somatica (ES). L'ES presenta delle criticità, quali la recalcitranza di alcuni genotipi e la variazione somaclonale dei rigeneranti, ossia la loro divergenza genetica dalla pianta madre. Tuttavia, nella maggior parte dei genotipi, l'ES viene ottenuta a partire da ovari ed antere prelevate da infiorescenze immature, coltivate su terreni contenenti citochinine e auxine. L'ES può essere ottenuta anche da protoplasti, ossia da cellule private della parete, a condizione che provengano da calli embriogenici ovvero da cellule che abbiano già acquisito una competenza embriogenica. I vantaggi dell'uso dei protoplasti nel *gene editing* (GE) sono molteplici, quali la trasfezione diretta del complesso CRISPR Cas9/sgRNA e la rigenerazione da una singola cellula di piante trasformate non chimeriche. La trasfezione diretta del CRISPR *machinery*, denominato complesso ribonucleoproteico (RNP), permette di aggirare l'uso di vettori come *Agrobacterium tumefaciens* e quindi l'integrazione di DNA esogeno nella cellula. Le difficoltà legate al GE effettuato sui protoplasti di vite sono numerose: problemi di isolamento, purificazione e trasfezione dei protoplasti sommati alla bassa percentuale di *editing* e alla rigenerazione difficoltosa di una pianta intera. Qui riportiamo alcune delle esperienze condotte ed in corso presso il laboratorio di Genomica Funzionale dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR quali l'ottimizzazione dei protocolli relativi all'isolamento dei protoplasti di vite e della messa in coltura per la rigenerazione di piante, e di quelli relativi alla *direct delivery* del complesso RNP finalizzati all'ottenimento di piante editate.

* e-mail: floriana.nuzzo@ipsp.cnr.it

La tecnologia dei protoplasti, strumento indispensabile nell'era del *Next Generation Breeding*

Cristian Silvestri^{*}, Andrea Limitone¹, Michela Lupo¹, Vera Pavese², Giuseppe Vaia¹

¹*Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo*

²*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari-DISAFSA, Università di Torino, Grugliasco (Torino)*

Parole chiave: isolamento dei protoplasti, digestione enzimatica, purificazione, mezzi di coltura, rigenerazione

Le nuove tecnologie di miglioramento genetico, che si basano su cisgenesi e genome editing, rappresentano lo strumento principale per raccogliere la sfida aperta per un sistema agroalimentare salubre e resiliente, anche se ad oggi tali tecnologie sono considerate, secondo una sentenza della Corte Europea di Giustizia, alla stessa stregua degli OGM. Nel processo di applicazione delle nuove tecnologie di evoluzione assistita (TEA), la rigenerazione da cellule e tessuti vegetali, rappresenta ancora oggi il vero collo di bottiglia, in particolare per la maggior parte delle specie arboree da frutto, molto spesso recalcitranti alla coltura *in vitro*. La tecnologia dei protoplasti oggi diventa lo strumento strategico e innovativo perché, a differenza dell'editing mediato da agrobatterio, permette di inserire direttamente nella cellula le componenti dell'editing (proteina Cas9 e RNA guida) che vengono poi degradati naturalmente, lasciando solo le mutazioni desiderate, e indistinguibili da potenziali mutazioni casuali. A causa della sua importanza, la tecnologia dei protoplasti oggi sta attirando di nuovo l'attenzione di molti ricercatori. In questa presentazione sono discussi alcuni risultati recenti per l'ottimizzazione dei processi di isolamento, purificazione, coltura, trasfezione e rigenerazione, con l'obiettivo di poter diventare strumento di routine nell'editing dei genomi delle specie arboree da frutto, con particolare attenzione a fico, gelso, olivo, nocciolo, castagno e mirtillo.

* e-mail: silvestri.c@unitus.it

Biotechnology in biodiversity conservation: an overview of its application for the conservation of the critically endangered conifer *Abies nebrodensis* (Sicilian Fir) in Sicily

Tolga Izgu^{1*}, Carla Benelli¹, Waed Tarraf¹, Nourhen Jouini², Maria Antonietta Germanà², Maurizio Lambardi¹

¹ *IBE-Institute of the BioEconomy, National Research Council (CNR), Florence*

² *Department of Agricultural, Food and Forest Sciences, University of Palermo*

Keywords: cryopreservation, cryobanks, pollen, seedbanks, somatic embryogenesis

Abies nebrodensis (Sicilian or Madonie Fir) is a critically endangered conifer in Sicily, Italy. The relic population consists of only 30 adult trees, located in the “Parco delle Madonie” (North-Central part of Sicily), spread in an area between 1400 and 1650 meters of altitude. It is considered Critically Endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN), due to dramatic genetic erosion and poor natural regeneration. The main aim of the LIFE4FIR project is to improve the conservation status of *A. nebrodensis* by: (i) protecting the residual population, (ii) increasing the genetic diversity of the offspring, (iii) implementing a reforestation plan to restore the dynamic structure of the population, and (iv) implementing innovative strategies for the long-term ex situ conservation of organs and tissues in seed-bank and in cryobank. We report here the progress of the project after 3 years (2020-2022). As for conifers, the seed represents an important and valid germplasm conservation system. Therefore, the seeds of different *Abies nebrodensis* genotypes were examined and imaged of zygotic embryos by X-Ray instrument to separate full and empty seeds (i.e., not containing a viable embryo). After the X-Ray analysis, the viability of the seeds was examined by performing the TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) test. Before the introduction in collection, the characteristics of full seeds (moisture content, viability, weight) were determined in each sample. Seeds were then transferred to the seed-bank of the “MAN-Museum of *Abies nebrodensis*” in Polizzi Generosa (Palermo) for the conservation at -18°C. Moreover, the possibility of inducing somatic embryogenesis from mature and immature zygotic embryos was explored with very promising results. As an important tool for the long-term conservation of the 30 genotypes, a cryobank for the cryopreservation (in liquid nitrogen, at -196°C) of pollen, seeds, embryogenic callus, and mature zygotic embryos of *A. nebrodensis* has also been established at the MAN. The strategy developed with the LIFE4FIR project for the Sicilian Fir germplasm preservation will pave the way for similar initiatives with other critically endangered conifer species.

LIFE18_NAT_IT_000164 “LIFE4FIR, Decisive in situ and ex-situ conservation strategies to secure the critically endangered Sicilian fir, Abies nebrodensis (Coordinator: Dr. Roberto Danti, CNR-IPSP) is a project co-financed with the contribution of the LIFE financial instrument of the European Union

* e-mail: tolga.izgu@ibe.cnr.it

Assessment of salicylic acid as a pretreatment on alleviating cadmium toxicity on *in vitro* banana shoots

Doaa Elazab^{1,2}, Marwa El-Mahdy^{1*}, Muhamed Youssef³, Mamdouh A. Eissa⁴, Ahmed Amro⁵, Maurizio Lambardi²

1 Department of Pomology, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut (Egypt)

2 IBE/Institute of BioEconomy, National Research Council (CNR), Sesto Fiorentino (Florence)

3 Genetics Department, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut (Egypt)

4 Department of Soils and Water, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut (Egypt)

5 Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut (Egypt)

Keywords: *Musa acuminata*, Cd, heavy metals, Cd uptake, micropropagation, salicylic acid

Ecosystem contamination by toxicants such as heavy metals affect human health through the physical contact with polluted soil, polluted water, and food contaminated with toxic metals Cadmium (Cd) toxicological effects remains on population for many years in the ecosystem. In this study, *in vitro* growth of banana shoots was evaluated under different concentrations of Cd (0, 50, 100, 200, 500 and 1000 μ M) for two subsequent subcultures. Also, salicylic acid (SA) was studied as a pretreatment to assess Cd tolerance in banana shoots, using different concentrations (0, 0.5 and 1.0 mM). Cd toxicity decreased plantlet height, as well as fresh and dry biomass at all concentrations evaluated. The highest reduction was observed at the 2nd subculture (2S) on Cd medium at 200 μ M, ending with shoot death at 500 μ M. However, SA pretreated banana shoots exhibited a better performance, even in 2S and under the culture in high Cd-containing media, comparing to non-pretreated shoots, and this protective effect was higher at the SA concentration of 0.5 mM than at 1 mM. The high performance due to 0.5 mM SA included shoots survival, plantlet length, biomass, photosynthetic pigments, and proline content. To our knowledge, this is the first study to examine the effect of Cd on *in vitro* banana shoots for two successive subcultures, as well as to give a significant indication of the role of SA as a pretreatment in alleviating the toxicity of Cd, even at high concentrations. Findings of this study concluded that SA has a great and extended influence on reducing the harmful effects of Cd in banana.

* e-mail: m.elmahdy08@yahoo.com

Germinazione simbiotica e asimbiotica di otto specie di orchidee spontanee incluse nel progetto LIFEorchids

Andrea Volante^{1*}, Laura Cornara², Claudia Turcato², Samuele Voyron³, Martino Adamo³, Mariangela Girlanda³, Miriam Bazzicalupo¹

¹ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo (CREA-OF), Sanremo (IM)

² Dipartimento di Scienze della Terra dell'Ambiente e della Vita, Università di Genova

³ Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino

Parole chiave: colture in vitro, micorrize, simbiosi

In natura, le orchidee intrecciano simbiosi con funghi micorrizici, essenziali per la germinazione dei semi, per il trasferimento dei nutrienti e per la resistenza alla siccità nelle piante giovani e adulte; inoltre è noto che l'uso di ceppi fungini compatibili favorisce e velocizza la germinazione *in vitro*. Studi sulla traslocazione di orchidee indicano che l'infezione preliminare del materiale vegetale con simbionti compatibili è efficace per aumentare il tasso di sopravvivenza degli individui. In tale ambito, in questo lavoro è stato valutato l'effetto di diversi ceppi di funghi *Rhizoctonia*-like nello stimolare la germinazione di 8 specie di orchidee incluse nel progetto LIFEorchids (LIFE17NAT/IT/000596). Per la quasi totalità delle specie è stato osservato un aumento delle percentuali di germinazione e/o progressione nello sviluppo in presenza di diversi ceppi fungini, con modalità ed entità variabili (da 1.8 a 6.7 volte maggiore, fino a 27.9-34.5 volte per *Ophrys holosericea*). Per *Himantoglossum adriaticum* e *H. robertianum* sono state ottenute buone germinazioni anche in condizioni asimbiotiche (60.7 e 21.8% rispettivamente), mentre in presenza di ceppi fungini la germinazione è stata scarsa oppure tardiva. Diversi isolati di *Tulasnella calospora* hanno promosso la germinazione di *Ophrys apifera* e *O. bertolonii*, mentre i semi maturi di entrambe queste specie non sono germinati in condizioni asimbiotiche durante questo test. I nostri risultati migliorano le conoscenze sulle interazioni orchidea-funghi durante le prime fasi della germinazione dei semi, in particolare per due specie notoriamente di difficile germinazione (*Orchis anthropophora* e *O. holosericea*), e sono di particolare interesse per futuri studi sulla propagazione *in vitro* di orchidee finalizzata alla conservazione. Ulteriori analisi sono necessarie per comprendere le tempistiche di tali meccanismi, e caratterizzare la capacità dei ceppi fungini analizzati di influenzare anche lo sviluppo a plantula.

* e-mail: andrea.volante@crea.gov.it

La luce e il processo di proliferazione delle colture *in vitro*

Rosario Muleo^{1*}, Ivano Forgione¹, Alessandra Pellegrino², Valeria Cavallaro²

¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

²IBE-Istituto di BioEconomia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, sede di Catania

Parole chiave: qualità spettrale, intensità, fotoperiodo, moltiplicazione *in vitro*

Le tecnologie delle colture *in vitro*, siano esse commerciali o sperimentali, prevedono l'inderogabile impiego di un artefatto umano come fonte di radiazione luminosa. L'illuminazione fornisce luce nelle regioni dello spettro elettromagnetico del visibile o immediatamente adiacenti ad esse per attivare le risposte fotomorfogenetiche e del metabolismo fotosintetico. Il controllo della qualità della luce, della irradianza e del fotoperiodo consente di ottenere piante *in vitro* con le caratteristiche desiderate. La tecnologia LED permette di ottenere un significativo risparmio economico utilizzando lampade più appropriate e a minor consumo energetico. In questa review, l'attenzione è posta sugli effetti delle caratteristiche della luce sulla proliferazione dei germogli, un processo fondamentale per la propagazione *in vitro*. Inoltre, è stata analizzata l'interazione tra lo spettro luminoso e i regolatori di crescita al fine di pervenire a una migliore regolazione dell'apporto esogeno (nel substrato) degli ormoni in funzione dello spettro luminoso. Per ogni tipologia di luce sono stati analizzati gli effetti sulla proliferazione, ma anche sulla qualità delle piantine (lunghezza, peso fresco e secco e attività fotosintetica dei germogli). L'esame della letteratura ha evidenziato che, nonostante la vastità di contributi, i risultati sugli effetti della luce sulla proliferazione *in vitro* sono spesso contrastanti. Infatti, il tasso di proliferazione/ramificazione delle piante è il complesso risultato dell'allungamento del fusto, dello sviluppo di meristemi ascellari all'ascella delle foglie (nodi) e della regolazione spazio-temporale della crescita delle gemme ascellari, che rifuggono dall'inibizione dovuta alla dominanza apicale. Inoltre, molti fattori esogeni ed endogeni, nonché l'assenza di un protocollo comune, rendono difficile la scelta dello spettro luminoso più efficace per ciascuna delle numerose specie. Tuttavia, dall'analisi della letteratura sono emerse anche indicazioni di carattere generale che potrebbero fornire utili informazioni per gli operatori.

* e-mail: muleo@unitus.it

Interazione pianta-patogeno: caso studio su *Mentha arvensis* L. e *Mentha x piperita* L. tramite tecniche di micropropagazione e biosensoristica

Matteo Caser^{1*}, Guido Pivaro¹, Marcello Valente², Kieran Maede³, Alan O’Riordan², Paola Maria Chiavazza¹

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Grugliasco (Torino)

² Nanotechnology group, Tyndall National Institute - University College Cork, Ireland

³ UCD - University College Dublin, Ireland

Parole chiave: elettrochimica, menta nera, menta selvatica, microtalee

La menta è stata fin dall’antichità una pianta apprezzata per le sue proprietà medicinali. Come altre specie coltivate, la menta, sia durante le fasi di propagazione sia in coltivazione, è suscettibile all’esposizione ad un ampio spettro di agenti patogeni, che causano gravi perdite economiche dovute principalmente al deterioramento della qualità dell’olio essenziale. Il presente lavoro ha l’obiettivo di indagare sia a livello morfologico che a livello molecolare la risposta difensiva a due patogeni: uno radicale (*Verticillium albo-atrum*) ed uno fogliare (*Alternaria alternata*) di due specie di menta, la *M. x piperita* e la *Mentha arvensis* L. propagate sia *in vivo* che *in vitro*. Tale lavoro è stato suddiviso in due fasi parallele. La prima ha previsto la propagazione per talea delle piante madri, il loro successivo sviluppo in vaso e, infine, l’inoculazione dei patogeni. La seconda, invece, comprendeva la propagazione *in vitro* degli espianti di menta, la loro successiva messa a dimora e l’inoculazione. La *M. x piperita* è risultata una specie di media vigoria sia nel caso in cui essa venga coltivata *in vitro* che *in vivo*. Sebbene si sia dimostrata sensibile ad entrambi i patogeni, è possibile affermare che essa mostra una buona capacità di ripresa. La *M. arvensis* ha mostrato un’elevata vigoria in entrambe le condizioni e ha evidenziato resistenza nei confronti di entrambi i patogeni. Dopo circa 30 giorni dalla inoculazione, porzioni radicali e fogliari sono state sottoposte ad analisi molecolare su miRNA associati alla risposta biotica ed abiotica tramite sensori elettrochimici interdigitati, al fine di valutare l’interazione pianta-patogeno avendo un riferimento quantitativo calibrato.

* e-mail: matteo.caser@unito.it

Valorizzazione della biodiversità di ecotipi di carciofo pugliese, mediante risanamento e caratterizzazione molecolare

Roberta Spanò^{1*}, Antonia Campanale², Giovanna Bottalico¹, Tiziana Mascia¹

¹ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari A. Moro

² IPSP-Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

Parole chiave: micropropagazione, virus, crioterapia, composti bioattivi, trascrittomica

Il carciofo (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) è una coltura con un interesse di mercato crescente grazie al suo alto valore nutrizionale ma presenta caratteristiche agronomiche variabili e un precario stato fitosanitario. Nell'ambito dei progetti finanziati dalla Regione Puglia (BiodiverSO, RICAR, REFIN-ERiCa) è stato possibile recuperare e valorizzare il germoplasma autoctono grazie all'applicazione di protocolli di risanamento da virus e funghi mediante coltura *in vitro* dell'apice meristematico e termoterapia. Al fine di ridurre i tempi necessari per l'ottenimento di piante risanate sono state valutate tecniche alternative basate sulla crioterapia. I risultati ottenuti su due ecotipi di carciofo pugliese a produzione tardiva, Locale di Mola tardivo e Troianella, hanno evidenziato che gli apici sottoposti a crioterapia mediante vitrificazione erano maggiormente protetti da danni meccanici durante il trattamento rispetto agli apici incapsulati in perle di sodio-alginato, anche se entrambi i procedimenti hanno evidenziato una scarsa vitalità e basse percentuali di rigenerazione degli espianti. Pertanto, seppure con tempi di esecuzione più lunghi, la termoterapia associata alla coltura *in vitro* degli apici meristematici è risultata la tecnica più valida per il risanamento anche di varietà tardive di carciofo. L'aumento della vigoria e del tasso di crescita delle piante risanate promuove lo sviluppo di una 'economia circolare' anche per il carciofo attraverso l'estrazione di composti bioattivi (BAC) di interesse biomedico dalla biomassa di matrici sane e igienicamente controllate coltivate in fuori suolo. Al fine di individuare geni chiave legati alla biosintesi di BAC e comprenderne i meccanismi molecolari è stato analizzato il trascrittoma delle piante risanate. L'analisi bioinformatica dei dati ha evidenziato l'attivazione dei metabolismi primari e secondari e delle *pathway* di risposta a stimoli, utili alla caratterizzazione molecolare delle varietà risanate.

*e-mail: roberta.spano@uniba.it

La coltura *in vitro*, uno strumento utile per lo studio dei biostimolanti: gli essudati di *Pantoea agglomerans* e la radicazione avventizia in microtalee di pero

Gabriele Medori^{1*}, Caterina Valerio¹, Francesca Luziatelli², Ivano Forgione¹, Anna Grazia Ficca², Maurizio Ruzzi², Rosario Muleo^{1*}

¹*Tree Physiology and Fruit Crop Biotechnology Lab, University of Tuscia, Department of Agriculture and Forest Sciences (DAFNE), Viterbo*

²*Dipartimento per la Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia, Viterbo*

Parole chiave: biostimolatori, epigenetica, geni ARF, *Pyrus communis*, radicazione avventizia

I batteri Gram-negativi appartenenti alla specie *Pantoea agglomerans* (Enterobacteriaceae) includono ceppi capaci di: promuovere la crescita delle piante (Plant Growth-Promoting, PGP); contrastare lo sviluppo di fitopatogeni; risanare suoli inquinati. *P. agglomerans* ceppo C1, isolato dalla fillosfera di *Lactuca sativa*, in terreno addizionato con triptofano, rilascia quantità elevate di acido indolo-3-acetico (IAA), l'auxina endogena implicata nell'induzione della radicazione avventizia (RA). Scopo del lavoro è stato quello di validare se il modello *in vitro* fosse adeguato a studiare l'efficacia dei metaboliti secreti dal ceppo C1 (C1-sm) sulla RA in microtalee della cv Dar Gazi (*Pyrus communis* L) e di suoi varianti che sovra-esprimono i geni *GOX*, *PHYB* e *CRYI*. Le indagini hanno valutato sia caratteri fenotipici sia vie di regolazione dell'espressione genica, Auxin-induced genes (ARF) ed epigenetica (miRNAs) dell'iniziazione ed emergenza della RA. I risultati indicano una diversa regolazione degli eventi fisiologici e fenotipici generati nelle microtalee dopo il trattamento con i metaboliti secreti da C1: riduzione del tempo di comparsa delle radici; origine delle radici direttamente dal tessuto delle microtalee dello stelo; assenza di sviluppo del callo, associata a diminuzione nel numero medio di radici; lunghezza delle radici rispetto a quelle ottenute nel trattamento con IBA. L'analisi dei dati indica un'interazione tra i metaboliti secreti e il background genetico dei varianti. L'espressione genica ed epigenetica suggerisce che, nelle microtalee trattate con metaboliti batterici, l'espressione di alcuni geni è regolata in modo differente rispetto ad IBA. I risultati saranno discussi in base all'interazione tra il background genetico e fisiologico delle varianti e la composizione dell'esometaboloma di *P. agglomerans*.

* e-mail: muleo@unitus.it

Innesto erbaceo di nocciolo cv. Tonda Francescana[®] su portainnesto clonale CoCo4[®] (*Corylus colurna* L.)

Katiuscia Zuccherelli^{*}, Vita Capaccio¹, Roberto Cappelletti¹, Daniela Farinelli², Maurizio Micheli², Oriano Navacchi¹, Giuseppe Zuccherelli¹

¹*Vitroplant Italia, Cesena (FC)*

²*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università di Perugia*

Parole chiave: nocciolo, innesto erbaceo, *Corylus colurna*

Il crescente interesse per il nocciolo innestato su portainnesti non polloniferi di *Corylus colurna* ha orientato la ricerca di Vitroplant Italia verso l'ottimizzazione della propagazione *in vitro* di questa specie e all'ottimizzazione della tecnica di innesto avendo come obiettivo quello di ottenere piante innestate fuori suolo in serra. Per la sperimentazione è stato utilizzato materiale di 'Tonda Francescana[®]', selezionata presso l'Università degli Studi di Perugia (brevetto EU 52157) e inserita nell'elenco delle varietà certificate del sistema QVI, e del portainnesto CoCo4[®] selezionato da Vitroplant (domanda di privativa numero 2021/3476. Sono state impiegate piante madri conservate presso il CAV (Centro Attività Vivaistiche), da cui sono stati prelevati espianti iniziali utilizzati per essere immessi *in vitro*. Le piantine *vitro*-derivate, ambientate e indurite della varietà e del portainnesto sono cresciute in serra in paperpot da 40 mm in alveolo da 60 fori e, una volta raggiunta l'altezza di circa 30 cm e di circa 60 giorni di età, sono state utilizzate per la prova di innesto. Sono state testate le marze di 'Tonda Francescana[®]' di due diverse origini: da apici di piante ambientate di 4/6 cm (1) e da internodi con una gemma e una foglia di lunghezza di 4/6 cm (2). Entrambe le tipologie di marze sono state innestate su piantine di CoCo4[®] micropropagate. La tecnica impiegata è comparabile a quella utilizzata per l'innesto erbaceo del pomodoro, con taglio obliquo e clip da 1.5 mm. Le piante innestate sono state messe per la prima settimana in serra, con temperature di 28/30°C e umidità relativa prossima al 100%. Dopo 30 giorni dall'innesto sono stati valutati: la percentuale di attecchimento e lo sviluppo delle due tipologie di marza. Gli apici (1) hanno fornito migliori risultati sia come percentuale di attecchimento che come sviluppo rispetto agli internodi con una gemma e una foglia (2). Le giovani piantine innestate hanno mostrato il vigore tipico della piantina micropropagata legato alla giovanilità dei materiali utilizzati. Va ora indagato se, lo sviluppo più lento nei primi anni delle piantine innestate su *C. colurna* (Farinelli 2021) con i sistemi tradizionali rispetto alle piante micropropagate, potrà essere superato con l'utilizzo di giovani portainnesti e varietà micropropagate.

* e-mail: katiusciazuccherelli@vitroplant.it

Ottimizzazione della radicazione *in vivo* del portainnesto ibrido euro-giapponese Marsol (*Castanea sativa* × *Castanea crenata*)

Giuseppe Zuccherelli, Massimo Bastianelli, Vita Capaccio, Roberto Cappelletti, Oriano Navacchi, Katuscia Zuccherelli*

Vitroplant Italia, Cesena (FC)

Parole chiave: castagno, radicazione, acclimatazione

Il vivaismo castanicolo ad oggi utilizza prevalentemente portainnesti ottenuti da seme. In alcuni casi si tratta di semi ottenuti da varietà ibride, per esempio Bouche de Betizac, caratterizzati da estrema eterogeneità nello sviluppo. La scarsa disponibilità dei portainnesti clonali è legata alla difficoltà nella propagazione *in vitro* di questi portainnesti. Negli ultimi anni l'interesse verso i portainnesti micropropagati è aumentato notevolmente perché la diffusione di patogeni orienta il mondo vivaistico verso la micropropagazione e la coltivazione protetta. Obiettivo di questo lavoro è l'ottimizzazione della fase di radicazione e ambientamento in serra. Le piante madri del portainnesto sono conservate presso il CAV (Centro Attività Vivaistiche) e inserite nel sistema di certificazione del materiale vivaistico. La moltiplicazione *in vitro* è stata effettuata su substrato MWPM (Song, 2021), substrato utilizzato per mirtillo, con aggiunta di BAP 1 mg per litro e ZR 2 mg per litro filtrata. L'allungamento stesso substrato con ZR filtrata a 2 mg per litro. La fase di radicazione è stata effettuata direttamente in serra su due tipologie di alveolari in polistirolo, con torba da taleggio tal quale (360 fori) e pressata (240 fori). È stato testato l'utilizzo di polveri con IBA (0, 0.5-1%) applicate nella porzione basale del fusto. Il rilievo è stato effettuato dopo 6 settimane di crescita in serra valutando la % di sopravvivenza e di radicazione delle microtalee. L'utilizzo di torba da taleggio ha fornito i migliori risultati sia come sopravvivenza che come radicazione.

* e-mail: katusciazuccherelli@vitroplant.it

Germinazione asimbiotica di specie di orchidee italiane per l'alimentazione

Maurizio Antonetti*, Domenico Prisa, Stefania Nin, Ilaria Landi, Gianluca Burchi

Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di Orticoltura e Florovivaismo, sede di Pescia (PT)

Parole chiave: *in vitro*, semina, ambientamento, conservazione, *Orchidaceae*

In alcune aree del Mediterraneo orientale viene utilizzata una farina di radici secche di orchidee selvatiche (*salep*) per la produzione di alimenti tradizionali. Recentemente la produzione e il consumo di *salep* ha subito un forte incremento, nonostante sia stato messo al bando dall'UE in quanto ottenuto unicamente dalla raccolta in natura di specie protette. La loro coltivazione è infatti ancora oggi non praticabile a causa della necessità di specifici funghi simbiotici per la germinazione dei semi. Allo scopo di rendere attuabile una produzione su piccola e media scala di rizotuberi per il *salep*, salvaguardando le popolazioni naturali, la sede di Pescia del CREA partecipa al Trattato Internazionale FAO sulle Risorse Fitogenetiche per l'alimentazione con la linea di programma "Conservazione e produzione *in vitro* di specie rare di orchidee per l'alimentazione umana" (2020-2022). Nei primi 2 anni sono stati messi a punto efficienti protocolli di germinazione asimbiotica *in vitro* utilizzando substrati a base di M551 e BM-1 (PhytoTechnology Lab.). Tali protocolli sono stati applicati con successo a 55 accessioni (24 specie, 9 generi, 2 ibridi interspecifici) germinate e conservate *in vitro*. Su 4 specie di *Ophrys*, 2 di *Serapias* e una di *Dactylorhiza*, è stato inoltre possibile ottenere elevati tassi di moltiplicazione *in vitro* mediante rigenerazione da callo dei protocormi su M551 modificato. Nell'autunno 2021 sono state effettuate prove di ambientamento su un totale di 11 accessioni riferite a 10 specie e 5 generi botanici. Sono stati testati 4 diversi substrati a base di torba (70% v/v), sabbia (20% v/v), agriperlite (10% v/v) 3 dei quali arricchiti con: 1) vermicompost biologico di lombrico, 2) inoculo di micorrize simbiotiche e antagoniste 3) inoculo di *Trichoderma spp.* Circa il 93% delle piantine ha superato con successo la fase di ambientamento, con qualche perdita in più nella tesi con vermicompost (circa il 14.5%, dopo 2 mesi).

* e-mail: maurizio.antonetti@crea.gov.it

Duplicazione cromosomica in *Actinidia chinensis* var. *Rufopulpa*

Gloria De Mori*, **Guido Cipriani**

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, ambientali e animali, Università di Udine

Parole chiave: kiwi, tetraploidi, colchicina, manipolazione ploidia, rigenerazione

Il kiwi è una delle colture più recentemente addomesticate. Lo sviluppo di nuove cultivar caratterizzate da tratti interessanti per il consumatore, tra cui sapore, aspetto, componenti salutistici, ha guidato il successo commerciale di questo frutto negli ultimi 35 anni. Recentemente l'interesse dei consumatori si è rivolto in particolare verso il kiwi a polpa rossa. Il sapore caratterizzato da note tropicali, l'elevato contenuto zuccherino e il caratteristico colore rosso della polpa in prossimità dei semi, hanno fatto di questo frutto la novità dei mercati ortofrutticoli. Uno dei maggiori problemi che ha interessato le colture del kiwi negli ultimi anni è il "cancro batterico dell'*Actinidia*", una malattia dovuta all'azione del batterio *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* (PSA). La malattia è stata segnalata per la prima volta in Giappone nel 1989 e da lì si è diffusa divenendo una malattia pandemica che causa morte o generale indebolimento delle piante causando gravi perdite economiche nelle principali aree di coltivazione del kiwi nel mondo. Diversi studi hanno rivelato che il diverso grado di ploidia del kiwi è collegato con una maggiore o minore suscettibilità a questa malattia. In particolare si è osservato che varietà diploidi, come quelle a polpa rossa sono più suscettibili all'infezione e mostrano anche maggiore severità dei sintomi. Con il fine di preparare del materiale di *pre-breeding* per lo sviluppo di varietà con frutto a polpa rossa meno sensibili alla PSA, due diversi genotipi diploidi a polpa rossa sono stati sottoposti a duplicazione cromosomica. Le piante tetraploidi sono state ottenute trattando in vitro segmenti di picciolo fogliare, incubati in un terreno di iniziazione per quattro settimane e successivamente trattati con una soluzione di colchicina allo 0,05%. Le piante rigenerate sono state analizzate per verificare la ploidia e le linee tetraploidi sono state ambientate e poste in coltivazione in pieno campo per le successive analisi fenotipiche.

* e-mail: gloriademori@uniud.it

Effetti della qualità della luce sull'accrescimento e la moltiplicazione *in vitro* di ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

Valeria Cavallaro^{1*}, Giancarlo Fascella², Alessandra Pellegrino¹, Roberto Rapisardi³, Anita Ierna¹

¹IBE-Istituto di BioEconomia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, sede di Catania

² Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, Bagheria (PA)

³IPCB- Istituto per i Polimeri, Compositi e Biomateriali (IPCB), Consiglio Nazionale delle Ricerche, sede di Catania

Parole chiave: ananas, spettro luminoso, luce a LED, luce a fluorescenza, coltura in vitro

Le esigenze in luce delle piante *in vitro* potrebbero essere efficacemente soddisfatte utilizzando lampade a LED con la possibilità, tra l'altro, di poter regolare ed adattare la lunghezza d'onda alle diverse fasi di crescita, riducendo al minimo il dispendio di energia e ottimizzando i processi di propagazione. Le ricerche finora svolte hanno evidenziato risposte non sempre univoche in relazione all'intensità e/o allo spettro dei LED. Sulla base di queste considerazioni, in una camera di crescita appositamente predisposta (fotoperiodo 18 ore di luce), sono stati valutati gli effetti sulla propagazione *in vitro* dell'ananas di 2 diverse intensità di luce (80 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e di 4 tipologie di luce: luce a fluorescenza (controllo); luce LED prevalentemente bianca (blu 21%; verde 38%; rosso 35%; rosso scuro 6%); luce LED prevalentemente rossa (blu 12%; verde 19%; rosso 61%; rosso scuro 8%); luce LED rosso-blu (blu 33%; rosso 66%); luce LED rossa (rosso 100%). Sono stati analizzati il numero di germogli secondari, l'indice di copertura, il numero di foglie sul germoglio principale e il peso fresco e secco delle piantine. I primi risultati ottenuti ci consentono di affermare che: l'intensità di luce 80 ha mostrato una maggiore efficacia sulla differenziazione dei germogli secondari rispetto alla luce 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; a 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, tutte le lampade a LED, con la sola eccezione della di quelle a LED rosso-blu, hanno determinato un significativo aumento del numero di germogli secondari rispetto a quelle a fluorescenza. L'intensità di luce 100 ha determinato un significativo aumento dell'indice di copertura rispetto all'intensità 80 ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) solo in corrispondenza delle lampade a fluorescenza ma non nei LED. Il trasferimento delle plantule dalla luce LED prevalentemente rossa alla luce LED prevalentemente bianca ha comportato un significativo aumento della proliferazione dei germogli e dell'indice di copertura rispetto a tutti gli altri trattamenti.

* e-mail: valeria.cavallaro@cnr.it

Messa a punto del processo di propagazione *in vitro* di carrubo (*Ceratonia siliqua* L.) in relazione anche alla coltura su un sistema a immersione temporanea.

Valeria Cavallaro^{*}, Alessandra Pellegrino¹, Salvatore La Rosa¹, Gaetano Giardina², Giancarlo Fascella²

¹Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Bio-Economia, Catania

²CREA, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, Bagheria (PA)

Parole chiave: *Ceratonia siliqua*, propagazione *in vitro*, substrato di crescita solido, substrato liquido a immersione temporanea

Il carrubo è una leguminosa arborea caratterizzata da elevata rusticità e adattabilità alle condizioni climatiche del bacino del Mediterraneo dove è presente sia come pianta coltivata che spontanea. La sua importanza è legata al valore economico dei suoi prodotti (farina e sciroppo di carrube) ed alla possibilità di coltivarla in zone aride e marginali al fine di contrastare i processi di erosione e desertificazione. La micropropagazione potrebbe risultare utile per superare i limiti delle tecniche moltiplicative tradizionali di questa specie e garantire una produzione massale di ecotipi selezionati ma presenta ancora alcune problematiche che ne limitano l'efficienza dell'impiego a fini commerciali. Pertanto, allo scopo di migliorare l'efficienza propagativa *in vitro* del carrubo, è stato effettuato uno studio per valutare gli effetti di: 1) due composizioni del substrato di coltura (1/2 e dose piena Murashige e Skoog-MS); 2) due tecniche di sterilizzazione dell'espianto (immersione in una soluzione 2.5 % di ipoclorito di sodio per 20 min; in una soluzione 2.5 g L⁻¹ di cloruro di mercurio per 5 min); 3) tre diversi espienti: germogli apicali, nodi, apici di plantule provenienti da seme. In una seconda prova, sono stati valutati gli effetti, sulla proliferazione delle plantule provenienti da seme, della coltivazione su mezzo solido e su mezzo liquido in un sistema a immersione temporanea (TIS) e dell'aggiunta al mezzo di MS di due concentrazioni (1 e 2 mg L⁻¹) di 6-benzyladenina (BA). I migliori risultati, nella fase d'induzione, sono stati ottenuti utilizzando: la disinfezione con cloruro di mercurio, gli apici provenienti da seme, il mezzo contenente 1/2 MS. Per quanto riguarda la seconda prova, i germogli ottenuti col sistema TIS hanno evidenziato i valori più elevati per tutti i parametri considerati, ad eccezione della lunghezza. Il trattamento con mezzo solido e 2 mg L⁻¹ BA ha evidenziato valori leggermente inferiori a quelli registrati nel sistema TIS.

* e-mail: valeria.cavallaro@cnr.it

Applicazione dell'embriocoltura per una più veloce produzione di F1 nel miglioramento genetico dell'olivo

Leonardo Susca*, Vito Montilon, Vincenzo Roseti, Giovanna Bottalico, Antonia Campanale, Cinzia Montemurro

Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università di Bari Aldo Moro

Parole chiave: *Xylella fastidiosa*, coltura *in vitro*, embrioni, resistenza, propagazione

Nell'ambito del progetto regionale REDOXY, è stata avviata un'attività finalizzata al miglioramento genetico dell'olivo per ottenere linee resistenti al patogeno da quarantena *Xylella fastidiosa*. Selezionate le linee portatrici di caratteri di resistenza, sono stati eseguiti gli incroci controllati e quindi, una volta ottenuta la progenie F1, una parte di questa è stata seminata con il classico protocollo vivaistico e un'altra parte avviata alla coltura *in vitro* mediante estrazione di embrioni. L'embriocoltura è stata applicata sia per far germinare i semenzali nel più breve tempo possibile sia per sottoporre le giovani piante *in vitro* ad una rapida propagazione clonale per ottenere un sufficiente numero di individui necessari alle prime valutazioni di resistenza al batterio. I semi raccolti durante l'invasatura sono stati stratificati e dopo opportuni trattamenti, gli embrioni sono stati messi in coltura, seguendo un protocollo già in uso presso il laboratorio di coltura *in vitro* e risanamento del materiale di propagazione vegetale del DiSSPA. Gli embrioni insediati *in vitro*, in breve tempo hanno prodotto le plantule, che, al momento opportuno sono state moltiplicate e successivamente trasferite su un mezzo di coltura di radicazione; successivamente alla fase di radicazione, le piante sono state ambientate e trasferite in ambiente protetto. I trasferimenti *in vitro* del materiale sono avvenuti su mezzi di coltura OM Rugini, modificati. L'embriocoltura si è confermata essere una tecnica molto valida sia per l'elevata germinabilità dei semi sia per la rapida possibilità di moltiplicazione, indispensabile per ottenere elevati numeri di piante clonali in breve tempo.

* email: leonardo.susca@uniba.it

Fattori che influenzano la radicazione *in vitro* di *Juglans microcarpa* un portinnesto per cultivar di *J. regia* promettente per il controllo di *Phytophthora cinnamomi*

Gaia Urbinati, Adele Gentile, Simona Luciola, Andrea Frattarelli, Emilia Caboni*

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria. Centro di ricerca olivicoltura, frutticoltura e agrumicoltura (CREA-OFA), Roma

Parole chiave: acido indolbutirrico, dischetti di torba, preconditionamento degli espianti, tempo di induzione con auxina

J. microcarpa Berland. è una specie che recenti studi indicano come interessante potenziale portinnesto per cultivar di *J. regia* data la sua resistenza all'oomicete *P. cinnamomi* la cui diffusione provoca nei noceti fenomeni di deperimento e morie associati ad alterazioni presenti sia sulla zona del colletto che sul tronco. Nell'ambito del progetto finanziato dal Mipaaf PORT.NOC, l'attività del CREA-OFA, sede di Roma, è indirizzata alla definizione di protocolli di micropropagazione di genotipi di *J. microcarpa*. Per l'allestimento della coltura *in vitro*, sono state prelevate gemme ascellari da piante adulte mantenute presso l'azienda del CREA-FL, sede di Roma, decontaminate e moltiplicate applicando un protocollo precedentemente definito presso il nostro laboratorio. Per ottimizzare i risultati sulla rizogenesi sono stati applicati i seguenti trattamenti: a) come pretrattamento i germogli sono stati moltiplicati per 2 sub-colture in presenza di solo agar (5.7 g/L B&V) o agar e pectine (3.5 g/L agar B&V e 8 g/L pectine); b) per la fase di induzione è stato utilizzato il terreno DKW (McGranahan et al., 1987) con concentrazione di sali ridotta, 20 mg/L di saccarosio e 5.7 g/L agar B&V, combinazione che si era evidenziata idonea in precedenti studi, a cui sono stati aggiunti 3 o 5 mg/L di acido indolbutirrico (IBA). Questo trattamento è stato applicato per 5, 10 o 20 giorni, mantenendo le microtalee al buio. Alla fine del periodo di induzione le microtalee sono state trasferite alla luce nello stesso terreno della fase precedente ma privo di fitoregolatori in presenza di solo agar, di agar e vermiculite o direttamente in dischetti di torba Jiffy. Il miglior risultato (80%) di radicazione è stato ottenuto con le microtalee provenienti dal pretrattamento in moltiplicazione con solo agar come gelificante, indotte a radicare sul terreno di coltura con 3 mg/L di IBA per 10 giorni al buio e trasferite per l'espressione radicale alla luce direttamente nei dischetti di torba Jiffy.

* email: emilia.caboni@crea.gov.it

Studio della crescita *in vitro* dell'orchidea *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge: comparazione tra un sistema a immersione temporanea e uno convenzionale

Elisabetta Sgarbi^{1*}, Raffaella Ranieri² Giulia Santunione³

¹ Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia

² Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

³ Dipartimento di Ingegneria "Enzo Ferrari", Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

Parole chiave: Orchidaceae, semi, protocormi, Plantform, Microbox

Malgrado siano disponibili diversi protocolli di coltura i semi di molte specie di orchidee terrestri germinano *in vitro* con difficoltà e servono molti mesi per ottenere plantule, con percentuali variabili di successo. Scopo di questa ricerca è la valutazione dell'efficacia di un sistema TIS (*Temporary Immersion System*) nello stimolare la crescita di orchidee in confronto ad un sistema di coltura su substrato gelificato. Semi di *H. robertianum* sono stati messi in coltura su BM₂ (*Basic Medium*) con 1 g/L di CA (Carbone Attivo), 1 ml/L di PPM® e 6 g/L di *Plant Agar*. Dalla germinazione sono stati ottenuti nel corso di 12 settimane oltre 1700 protocormi, usati in seguito per i test di crescita delle plantule. In un primo test, 50 protocormi (diametro 2-3 mm) sono stati fatti crescere per 1 mese sul mezzo di coltura precedentemente descritto in Microbox (senza CA) e in Plantform (senza CA e agar): il test è stato ripetuto due volte (prove T1a e T1b) a distanza di un mese l'uno dall'altro. Un secondo test (T2) ha riguardato protocormi di diametro 4-5 mm. Alla fine del test T1 non sono emerse differenze tra gli RGR (*Relative Growth Rate*) calcolati nei due sistemi di coltura; si è registrato tuttavia un RGR significativamente più alto per i protocormi della prova T1a rispetto a T1b, a prescindere dal sistema usato. Il dato può essere correlato al fatto che i semi usati per la prova T1a erano quelli germinati per primi e avevano maggiori potenzialità di sviluppo. Dal test T2 sono state ottenute piante ben sviluppate, con foglie e radici, in entrambi i sistemi di coltura, ma quelle cresciute in TIS mostravano un maggiore RGR rispetto a quelle in Microbox. Il sistema Plantform, usato per la prima volta per la crescita di orchidee terrestri, sembra stimolare la crescita *in vitro* di queste piante rispetto ai sistemi tradizionali. Emerge una correlazione tra il tasso di crescita delle piante *in vitro* e lo stadio di sviluppo dei protocormi usati per le prove di crescita.

* e-mail: elisabetta.sgarbi@unimore.it

La coltura *in vitro* delle piante da frutto a servizio del risanamento per la qualificazione del materiale vivaistico

Giorgio De Paoli*, Elena Tura, Pierluigi Lucchi,
Centro Attività Vivaistiche, Faenza (RA)

Parole chiave: virus free, fragola, micropropagazione, certificazione

Il Centro Attività Vivaistiche è una società cooperativa di vivaisti il cui scopo principale è l'attuazione della certificazione genetico-sanitaria. Fornisce servizi di conservazione delle piante di categoria Pre-base, analisi per i controlli sanitari e genetici e produzione di piante di categoria Per-Base e Base sia per i propri associati che per clienti esterni. Il CAV dispone di un moderno laboratorio accreditato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali in grado di svolgere analisi fitopatologiche per la diagnosi dei patogeni elencati nei protocolli di certificazione italiana ed europea. La cooperativa dispone di screen house destinate alla conservazione delle piante pre-base e una camera di termoterapia per il risanamento di piante, appartenenti a diverse specie frutticole, da *virus* e fitoplasmi. Da qualche anno ha avviato anche un laboratorio di micropropagazione a supporto dell'attività di risanamento che recentemente ha assunto un'importanza sempre maggiore alla luce della crescente attività di innovazione varietale svolta sia da Enti Pubblici che privati. Le principali specie soggette alle colture *in vitro* per il risanamento sono: fragola, melo, pero, ciliegio e vite. Il laboratorio produce anche piante indicatrici per melo, ciliegio, rubus e fragola: *Malus pumila* Radiant, *Malus sylvestris* R 12740 7A, *Malus pumila* Virginia Crab, Shirofugen, Canindex, Bing, Sam, *Rubus occidentalis* Cumberland, UC 11, necessarie per lo svolgimento dei saggi biologici, come indicato dai protocolli nazionali ed internazionali. Fra le specie soggette all'azione di risanamento, attraverso l'integrazione fra termoterapia e il prelievo dei meristemi, la fragola ha dato ottimi risultati, ottenendo una elevata percentuale di cloni risanati. Le tecniche di coltura *in vitro* del meristema di fragola da noi impiegate, si rifanno alle metodologie suggerite per primo da Boxus (1974), successivamente integrate da numerosi altri autori. Il protocollo adottato dal CAV prevede l'utilizzo di sali macro e microelementi e vitamine di MS (Murashige T. and Skoog R. 1962), a cui si aggiungono 30 gr/l di saccarosio, 5.5 gr/l di agar ed infine 0.2 mg/l di BAP (Benzil Amino Purina). Nel caso di espunti da termoterapia, una volta prodotte e radicate, le piantine vengono ambientate in serra e dopo circa 5-6 settimane è possibile avviare i controlli sanitari per determinare se il risanamento è avvenuto con successo. I principali virus risanati in questa specie sono: SMYEV (*Strawberry mild yellow edge virus*), SCV (*Strawberry crinkle virus*), SMV (*Strawberry mottle virus*). Per la conferma dell'avvenuto risanamento, le piante sono sottoposte a ripetuti controlli di laboratorio, in periodi e fasi vegetative diverse, attraverso saggio biologico (DAS-ELISA), saggio molecolare (RT-PCR) e saggio biologico (UC4, UC5, UC10, UC11).

* email: giorgio.depaoli49@gmail.com

Prove di risanamento di varietà antiche di crisantemo da fiore reciso

Andrea Copetta^{1*}, Paolo Mussano¹, Laura Miozzi², Manuela Pamato¹, Pasquale Restuccia³, Daniele Marian², Gianluca Vinci³, Anna Maria Vaira¹

¹ CREA – Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (IM)

² IPSP-CNR, Torino

³ Florcoop Sanremo, Taggia (IM)

Parole chiave: recupero, *Chrysanthemum*, micropropagazione, termoterapia

Nel crisantemo da fiore reciso, le perdite di produzione sono spesso dovute all'infezione di numerosi virus e viroidi trasmessi da insetti, pratiche colturali o da seme. Virus e viroidi possono causare clorosi e necrosi su fusti e foglie, nanismo, screziature, decolorazioni e deformazioni nei fiori. Alcune varietà antiche di crisantemo da fiore reciso molto attraenti sono scomparse dai cataloghi dei costitutori a causa delle malattie virali accumulate con la continua propagazione agamica. Tra queste, le varietà Dilana, Snowdon e Turner sono molto richieste dal mercato nazionale e per questo mantenute da molti produttori della Riviera ligure. Lo scopo del lavoro è rilevare nelle varietà antiche sopra citate la presenza di tutti gli agenti virali con tecnologie Next Generation Sequencing (NGS) e risanare il materiale utilizzato per la propagazione in modo da rendere disponibili per i coltivatori liguri piante madre sane. Per il risanamento, porzioni epigee delle varietà di crisantemo Dilana, Snowdon e Turner di vari colori sono state raccolte e suddivise in microtalee defogliate da 1-2 cm di lunghezza con 1-3 gemme. La sterilizzazione superficiale delle microtalee è stata ottenuta con passaggi in successione: etanolo al 70%, candeggina al 2% per 20' e lavaggi con acqua sterile. Le microtalee sono state poste *in vitro* su substrato MS (Murashige e Skoog). I nuovi germogli sono stati posti sul substrato di propagazione MS, con 30 g/l di saccarosio, BAP 1 mg/l, IAA 0.1 mg/l e pH 5.7 (Wassen et al., 2009). Successivamente, le piante *in vitro* sono state sottoposte a termoterapia (37 °C) per almeno due settimane, i meristemi apicali sono stati coltivati su substrato MS senza ormoni e, ottenute le nuove piantine, queste sono state poste su substrato di propagazione. Le varietà risultano sane, radicano in substrato agarizzato privo di ormoni e sono ambientabili in serra. Questo lavoro è stato finanziato con i fondi PSR Regione Liguria misura 16.01- progetto CRIREC.

* e-mail: andrea.copetta@crea.gov.it

Allestimento in coltura *in vitro*, moltiplicazione e radicazione per la propagazione e conservazione di varietà e accessioni della biodiversità olivicola

Muhammad Ajmal Bashir¹, Samanta Zelasco², Amelia Salimonti², Kamel Atrouz², Valerio Cristofori¹, Cristian Silvestri^{1*}

¹ *Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Via San Camillo De Lellis s.n.c., 01100 Viterbo, Italia*

² *Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Contrada Li Rocchi, 87036 Rende (Cosenza), Italia*

Parole chiave: *Olea europaea* L., sterilizzazione degli espianti, micropropagazione, qualità degli espianti

L'applicazione delle colture *in vitro* in olivo non è stata ancora sufficientemente sfruttata e valorizzata, sebbene possa essere considerata uno strumento molto valido per rispondere ai nuovi orientamenti colturali proiettati all'infittimento dell'impianto che negli ultimi anni sta interessando anche l'olivicultura italiana. La coltura di tessuti vegetali rappresenta, infatti, un importante strumento per la propagazione clonale, la conservazione della biodiversità e per la produzione di materiali genetici sani e talora in grado di garantire *performance* agronomiche migliori rispetto a piante derivate da metodi di propagazione tradizionali. Anche per l'olivo, l'applicazione di questa tecnica risulta molto complessa perché l'adattamento alle condizioni *in vitro* dipende fortemente dal genotipo. In questo studio, è stata valutata la risposta alla coltura *in vitro* di sette cultivar di olivo di interesse commerciale (Canino, Leccino, Leccio del Corno, Maurino, Pendolino, Cipressino, Olivastra Seggianese), di alcune varietà minori (Montegibbio, Montecalvo 2, Pampagliosa, Quarantoleto), alcune accessioni reperite sul territorio (CS3-T, Maggianico, 4SA, 5SA, 6SA, 10SA) e la selezione da incrocio controllato F7P3 [Peranzana x Nociara] come nuove risorse genetiche. Sono stati analizzati gli effetti di due diversi protocolli di sterilizzazione e diverse modalità/epoche di prelievo sulle percentuali di allestimento dei germogli *in vitro*. La lunghezza dei germogli e il coefficiente di moltiplicazione delle accessioni, così come l'attitudine alla radicazione, hanno mostrato evidenti differenze, confermando la marcata genotipo-dipendenza dell'olivo. L'applicazione dei protocolli sperimentali ha consentito di ottenere un'elevata rispondenza alle condizioni di vitro di quasi tutti i genotipi testati ampliando ulteriormente le potenzialità applicative della tecnica di propagazione *in vitro* per l'olivo.

* e-mail: silvestri.c@unitus.it

Ottimizzazione del protocollo di micropropagazione per diverse cultivar di nocciolo presso Battistini Vivai

Massimiliano Meneghini^{*}, Fabiano Gattabria¹, Alice Patella¹, Gianluca Magnani¹, Eva Herrmannová², Romano Roncasaglia¹, Giuliano Dradi¹

¹ Battistini Vivai, Cesena (FC)

² Vitrotree by Battistini, Šakvice, Repubblica Ceca

Parole chiave: *Corylus avellana*, fitoregolatori, *in vitro*, Virus Esente, propagazione

Lo sviluppo di un efficiente protocollo di micropropagazione per quattro *cultivar* italiane di *Corylus avellana* (“Tonda di Giffoni”, “Tonda Gentile Romana”, “Tonda Gentile Trilobata” e “Nocchione”) è stato condotto dal 2012 presso Battistini Vivai a Cesena, Italia. La micropropagazione rappresenta un approccio relativamente nuovo per la fornitura su larga scala di piante di alta qualità come “materiale vegetale certificato” per l’industria delle nocciole. Il processo di certificazione delle piante di nocciolo in Italia è stato possibile grazie al supporto di Ferrero Hazelnut Company, dell’Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare (ISMEA) e del Centro Interprofessionale per le Attività Vivaistiche (CIVI-ITALIA). Il materiale vegetale Virus Esente, conservato e analizzato presso il Centro di Attività Vivaistiche (CAV), è indispensabile per la produzione di ‘piante certificate’ che rispettino la qualità CE (cat.VE) e le norme tecniche per la certificazione volontaria stabilite nel 2017 dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF). Diversi sali inorganici (DKW, WPM, MS), differenti fonti di ferro (compresi i chelati come il FeEDDHA) e molti fitoregolatori sono stati testati in varie combinazioni per ottenere un mezzo di coltura altamente efficace in fase di moltiplicazione. Allo stesso tempo sono stati confrontati i metodi di radicazione *in vitro* ed *ex-vitro* combinati con diversi sistemi di ambientamento. L’ottimizzazione dell’intero processo di micropropagazione, mirato all’ottenimento di una pianta sana e di elevata qualità si è rivelato cruciale per la commercializzazione su larga scala di piante di nocciolo.

* e-mail: mmeneghini@battistinivivai.com

Studio di un protocollo di micropropagazione per il recupero di accessioni di mandorlo a fioritura tardiva

Michela Lupo¹, Vera Pavese^{2*}, Cristian Silvestri¹, Antonella Minandri¹, Eddo Rugini¹, Valerio Cristofori¹

¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari-DISAFA, Università di Torino, Grugliasco, (Torino)

Parole chiave: *Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb, decontaminazione, moltiplicazione, biodiversità, conservazione *in vitro*

Fino agli anni '50, l'Italia era il principale produttore mondiale di mandorle, con impianti diffusi prevalentemente in Puglia e Sicilia, regioni ad elevata vocazione mandorlicola, spesso in aree agricole non irrigue a limitata fertilità. Attualmente la mandorlicoltura nel bacino del Mediterraneo è trainata dalle produzioni spagnole che, negli ultimi decenni, hanno acquisito il primato produttivo in questa area, e a livello mondiale dagli USA. Ciò è dovuto a forti investimenti nella ricerca, nell'innovazione delle tecniche agronomiche e ad un'attenta analisi delle esigenze del mercato. Pur essendo una specie coltivata in specifici areali, è presente in forma spontanea in diversi ambienti, e spesso tale biodiversità è inesplorata. In un'ottica di ampliamento varietale del mandorlo, a seguito di una prospezione del territorio del centro Italia, sono state individuate due accessioni a fioritura tardiva (prima decade di aprile), dalle quali sono state prelevate alcune talee da destinare alla introduzione della coltura *in vitro* e relativa conservazione. La coltura *in vitro*, oltre a giocare un ruolo strategico nella conservazione del germoplasma offre la possibilità di una più rapida produzione di materiale propagativo franco di piede. Nel lavoro sono riportate le fasi di allestimento e le fasi di radicazione-acclimatazione dei due genotipi, a confronto con la cv Genco. Per l'allestimento della coltura *in vitro* è stata testata l'efficacia del prodotto STERIL® a tre diverse concentrazioni, al fine di controllare lo sviluppo di contaminazioni nel tempo. Inoltre, sono state condotte prove di allungamento con l'impiego di substrato liquido con diverse concentrazioni di saccarosio e sorbitolo. Il materiale derivante da tali prove è stato radicato e acclimatato con successo.

* e-mail: vera.pavese@unito.it

Embriogenesi somatica per l'*editing* genetico in *Vitis vinifera* (cv. Aglianico e Primitivo)

Adriana Lucia Stigliani¹, Vitale Nuzzo², Giovanni Giorio¹, Caterina D'Ambrosio^{1*}

¹Centro Ricerche Metapontum Agrobios, Agenzia Lucana di Sviluppo e di Innovazione in Agricoltura, Metaponto (MT)

²Dipartimento delle Culture Europee e del Mediterraneo (DICEM), Università della Basilicata, Matera

Parole chiave: CRISPR/Cas9, trasformazione biolistica, protoplasti, PEG

La *Vitis vinifera* L. è una specie caratterizzata da grande variabilità varietale, frutto di un lungo processo di domesticazione e selezione su viti spontanee. Al fine di mantenere gli attributi varietali, che determinano la qualità ed unicità dei vini, il sistema di moltiplicazione impiegato è stato quello della propagazione vegetativa. Il miglioramento genetico in questa specie si è pertanto basato prevalentemente sulla selezione di nuovi caratteri derivati da mutazioni somatiche spontanee. Questa fonte di variabilità non è più sufficiente a soddisfare le esigenze di sostenibilità della moderna viticoltura. Una valida alternativa alla selezione clonale per la generazione di nuove varianti alleliche è costituita dall'*editing* genetico con il metodo CRISPR/Cas9. L'applicazione di tale sistema richiede che siano disponibili specifici protocolli di rigenerazione per ogni singolo vitigno. In questo studio riportiamo i risultati dello sviluppo dei protocolli di rigenerazione mediante embriogenesi somatica e di trasformazione genetica sui vitigni Aglianico e Primitivo utilizzati per la produzione dei più importanti vini della Basilicata. I calli embriogenici sono stati ottenuti partendo dagli stami, prelevati da infiorescenze immature di piante coltivate in pieno campo. Gli espianti sono stati posti su un substrato contenente auxine e citochinine in quantità equimolari, tenuti in camera di crescita al buio a 25°C e subculturati mensilmente. La differenziazione degli embrioni è stata ottenuta trasferendo i calli su terreno privo di auxine e la loro germinazione è stata indotta dall'esposizione alla luce. Allo scopo di definire le condizioni ottimali per l'*editing* genetico mediante CRISPR/Cas9 sono stati condotti esperimenti di trasformazione genetica transiente con gene reporter (β -glucuronidase) su masse pro-embriogeniche, utilizzando il metodo biolistico, e su colture di protoplasti, ottenuti da calli embriogenici, con il metodo di trasfezione mediante PolyEthylene Glycol (PEG).

* e-mail: caterina.dambrosio@alsia.it

New developments in the micropropagation and selection of *Corylus colurna* clonal rootstocks towards the improvement of hazelnut yield

Doaa Elazab^{1*}, Claudio Todeschini², Giuliano Dradi³, Romano Roncasaglia³, Massimiliano Meneghini³, Fabiano Gattabria³, Alice Patella³, Maurizio Lambardi¹

¹*National Research Council (CNR) of Italy, IBE-Institute of BioEconomy, Sesto Fiorentino (Firenze)*

²*Ferrero Hazelnut Company, Senningerberg, Luxembourg*

³*Battistini Vivai, Cesena*

Keywords: explants, in vitro culture, organogenesis, proliferation

Modern hazelnut farming is increasingly moving towards contemporary and intensive orchard systems. This trend has given rise to the need of selecting clonal rootstocks that favor early bearing of high and constant quality nuts, and can be efficiently produced in nursery and grafted on economically-important cultivars. The latter aim, in particular, should be achieved by focusing on propagation techniques of high reproductive efficiency that can guarantee a constant supply of superior plants in terms of quality and quantity. In this sense, the micropropagation of selected rootstocks of *Corylus colurna* is today considered a strategic sector to focus on, and it can be pursued through the optimization of the various *in vitro* and *ex vitro* steps, from the mother plant to the multiplication *in vitro*, rooting and acclimatization in greenhouse and in the nursery, up to the evaluation of their good adaptation to the graft and valuable characteristics induced on *C. avellana* cultivars. With this aim, a collaborative project was launched in the 2021 between Ferrero Hazelnut Company, Battistini Vivai nursery of Cesena and the National Research Council, Institute of BioEconomy of Florence, Italy. In the first year of the project, 12 genotypes of *C. colurna* have been selected and tested for their reproduction by micropropagation. A protocol of explant collection and decontamination, introduction *in vitro*, culture establishment and shoot proliferation has been optimized for 6 of the 12 genotypes. An effective medium of proliferation has been also selected, while the *ex vitro* acclimatization of plantlets is in progress. In addition, the possibility of shoot regeneration by organogenesis, starting from leaf explants, has been explored with very promising results.

* e-mail: doaa.elazab@ibe.cnr.it

Colture *in vitro* e rigenerazione in carota di Polignano

Claudia Ruta^{1*}, Simona Ancona¹, Anna Tagarelli¹, Federica Blando²

¹ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

² Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA)-CNR, UO di Lecce, Monteroni (Lecce)

Parole chiave: *Daucus carota* ssp. *sativus* L., *Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef., micropropagazione, embriogenesi somatica

La carota giallo-viola di Polignano è una popolazione mista autoctona (*Daucus carota* ssp. *sativus* L. and *Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), che si ritrova in un areale ristretto del Comune di Polignano (Bari), dove viene coltivata e conservata da agricoltori ‘custodi’. E’ un biotipo a rischio di estinzione, per questo motivo la Regione Puglia lo ha inserito in un progetto di conservazione della biodiversità locale (nell’ambito del Programma di Sviluppo Agricolo 2007-2013). Le strategie di conservazione delle specie a rischio includono azioni sia di conservazione *in situ* che *ex situ*. Le metodiche biotecnologiche (micropropagazione e rigenerazione *in vitro*) appartengono alla seconda categoria di conservazione. Per questo motivo, sono state condotte ricerche per la coltura *in vitro* della carota giallo-viola di Polignano. Da carote in campo di diversi colori (giallo, arancio e viola), dopo opportuna sterilizzazione, sono stati prelevati espianti di colletto, che sono stati messi *in vitro* per allestire una coltura di germogli. Diverse concentrazioni di citochinina (BA) sono state saggiate per valutare le migliori condizioni (in termini di tasso di moltiplicazione, numero e altezza delle foglie) nelle progenie di carota con differenti colori. Dalla porzione mediana del fittone *in vivo* sono stati anche prelevati espianti messi su mezzo di callogenese contenente sali minerali e vitamine di Murashige e Skoog (MS) e come ormone la sola auxina 2,4-D. Tale mezzo ha dato origine ad un callo embriogenetico, che, trasferito in un mezzo senza ormoni, ha rigenerato embrioni somatici. Gli embrioni, ambientati in serra, hanno prodotto nuove piante che mantenevano il carattere delle piante di origine (colore del fittone), dimostrando un processo ‘true-to-type’.

* e-mail: claudia.ruta@uniba.it

Micropropagazione di varietà di *Cannabis sativa* L. subsp. *ruderalis*

Giuseppe Basile*, Giuseppe De Mastro, Claudia Ruta

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

Parole chiave: propagazione clonale, Finola, autofiorente, moltiplicazione, radicazione

La *Cannabis sativa* L. subsp. *ruderalis* viene, da sempre, propagata per seme. Tuttavia ciò non garantisce uniformità genetica per la predominanza della variabilità, prodotto di mutazioni, crossing-over, segregazione, assortimento indipendente e fecondazione. La propagazione clonale in generale e la micropropagazione nello specifico consentono di mitigare l'elevato livello di diversità fenotipica, ottenendo colture uniformi nel tempo e di alta qualità. Oggetto di studio è la *Cannabis sativa* L. subsp. *ruderalis* var. Finola, varietà dioica di canapa da olio di origine finlandese, interessante per il suo ciclo inferiore ai 3 mesi. Sono state effettuate prove con l'obiettivo di superare problematiche legate all'adattabilità alle condizioni di *vitro*, trattandosi di una varietà autofiorente, indipendente dal fotoperiodo e dal brevissimo ciclo, tutte caratteristiche che rendono complesse le operazioni di moltiplicazione. Il fine ultimo è la redazione di un protocollo di micropropagazione efficiente per ottenere piante *in vitro* e successivamente *in vivo* di *C. sativa* subsp. *rudelaris* varietà Finola. Come materiale di partenza, al fine della micropropagazione, sono state utilizzate gemme prelevate da piante madri accresciute per circa un mese in condizioni controllate, sotto led bianchi con fotoperiodo impostato a 24 h di luce e temperatura di 22°C ±1°C. Il substrato che ha dato migliori risultati è stato ottenuto combinando Mezzo Base (mezzo nutritivo comunemente impiegato presso il Laboratorio di Micropropagazione e Microscopia del Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali dell'Università di Bari Aldo Moro) arricchito con saccarosio (20 gr l⁻¹), thidiazuron (0.4 mg l⁻¹) e acido naftalenacetico (0.2 mg l⁻¹). Relativamente alla radicazione e al successivo ambientamento, le piante hanno mostrato una buona radicazione su acido indol-3-butirrico (0.1 mg l⁻¹) ed una successiva sopravvivenza di oltre il 50% delle piantine, una volta trapiantate in serra condizionata.

* e-mail: g.basile18@studenti.uniba.it

Coltura *in vitro* di due Lamiaceae da fiore edule: *Agastache aurantiaca* e *A. mexicana*

Andrea Copetta^{1*}, Paolo Mussano¹, Poonam Devi², Angelo Lanteri¹, Ilaria Marchioni^{1,3}, Laura Pistelli^{3,4}, Angela Bisio², Marco Savona¹, Barbara Ruffoni¹

¹ CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (IM)

² DIFAR Dipartimento di Farmacia, Università di Genova

³ Dipartimento di Scienze Agrarie, Ambientali e Agro-alimentari, Università di Pisa

⁴ Centro Interdipartimentale di Ricerca “Nutraceutica e Alimentazione per la Salute” (NUTRAFOOD), Università di Pisa

Parole chiave: *Agastache*, micropropagazione, benzilaminopurina, antiossidanti, fiori commestibili.

Le 22 specie del genere *Agastache* (Lamiaceae), originario del Nord America, sono piante erbacee aromatiche e mellifere di piccola taglia, annuali o perenni. Molte specie sono utilizzate a scopo medicinale, come fonte di oli essenziali o per la preparazione di thè e diverse varietà sono usate a scopo ornamentale per la loro fioritura vistosa e duratura. I fiori sono commestibili e oggetto dei Progetti INTERREG-ALCOTRA 2014-2020 “ANTEA” e “ANTES”. Le varietà perenni vengono moltiplicate per talea, ma due varietà interessanti per il loro gusto e aroma radicano difficilmente. *Agastache aurantiaca* (Gray) Lint & Epling “Sunset Yellow” produce fiori giallo-oro dolci al gusto di menta e limone; mentre *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling ha fiori rosso porpora al gusto di menta. Espianti da piante coltivate in serra, sono stati privati delle foglie, sterilizzati superficialmente per 20’ in soluzione di ipoclorito di sodio 1.5% e sciacquati due volte per 10’ con acqua distillata sterile. Gli espianti sono stati propagati *in vitro* su substrato contenente sali e vitamine MS (Murashige and Skoog, 1962), saccarosio al 3%, 0.3 mg/L BA e agar (0.7%) (pH 5.7) e subculturati una volta al mese. Su entrambe le specie è stata impostata una prova di moltiplicazione da 15 piante per trattamento suddivise in 5 barattoli. Sono state testate 5 concentrazioni di BA (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0 mg/L) e valutati lo sviluppo e la qualità degli espianti (senza segni di vitrificazione o malformazioni), e il numero di espianti ottenibili da 1 cm di lunghezza e almeno due gemme fogliari opposte. I fiori delle due specie sono stati analizzati circa il loro contenuto di zuccheri solubili, polifenoli, flavonoidi, antociani, carotenoidi, vitamina C e l’attività antiossidante di estratti metanolici. In entrambe le specie la concentrazione di BA pari a 0.5 mg/L risulta essere la migliore per la micropropagazione.

* e-mail: andrea.copetta@crea.gov.it

Morphophysiological response of *in vitro* sugar cane plants (*Saccharum* spp. Hybrids) with sodium silicate (Na_2SiO_3)

Gael F. García-Merino¹, Gianluca Burchi², Otto R. Leyva-Ovalle¹, Noé Aguilar-Rivera¹, Juan V. Hidalgo-Contreras³, Marco A. Ramírez-Mosqueda^{1*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

²Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di Orticoltura e Florovivaismo, Pescia (PT)

³Campus Córdoba, Colegio de Postgraduados, Veracruz, México

Parole chiave: *in vitro*, sodium silicate, biostimulation

Sugar cane (*Saccharum* spp. Hybrids) is a crop used in the agri-food and bioenergy industry. Recently a main problem is the renewal of the plantations of this crop, due to the lack of commercial propagules. Vegetable tissue culture allows us to obtain a large number of these plants, but new compounds/substances are always sought to increase the number of plants obtained, as well as better physiological characteristics. Silicon (Si) is an element considered non-essential, which has been shown to have positive effects on the morphophysiological development of plants. The aim of this study was to evaluate the biostimulating effect of sodium silicate (Na_2SiO_3) during the *in vitro* propagation of two varieties (CP 72-2086 and MEX 69-290) of sugar cane. The vertices of the plants in production of the aforementioned varieties were established. The sprouts obtained were grown in MS based soil supplemented with different concentrations of Na_2SiO_3 (0, 2.5, 5 and 10 mg L⁻¹). After 40 days, morphometric analysis, quantification of photosynthetic pigments and stomatal index were performed for each of the treatments. The results showed that sodium silicate added in high concentrations (10 mg L⁻¹) has positive effects on the morphology of both varieties. Ten mg L⁻¹ of Na_2SiO_3 in the CP 72-2086 variety generated more shoots, leaves and roots compared to the control treatment. While the same concentration of Na_2SiO_3 in the MEX 69-290 variety generated a greater length of shoots and roots, fresh weight and dry weight compared to the control treatment. The addition of lower concentrations (2.5 and 5 mg L⁻¹) in both varieties reduced the variables evaluated. Due to the content of photosynthetic pigments, the addition of Na_2SiO_3 in both varieties had a biostimulating effect. However, a positive effect of Na_2SiO_3 on stomatal index and stomatal closure was not observed. The results obtained will allow the use of Na_2SiO_3 as a biostimulating agent during the commercial micropropagation of sugar cane.

* e-mail: marcoramirez@uv.mx

***In vitro* effect of silicon on vanilla plants (*Vanilla planifolia* Jacks.) under water stress conditions**

Arturo A. Armas Silva, Gael F. García Merino, Joaquín Murguía González, Marco V. Rodríguez Demeneghi, Pablo Andres Meza, Marco A. Ramírez Mosqueda*

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

Keywords: water deficit, abiotic stress, silicates

Vanilla planifolia is a species of economic importance due to the compound called vanillin, obtained from processed fruits. The main vanilla producing region in Mexico is Totonacapan, a region that has experienced varying degrees of drought, causing the fruit of this crop to fall prematurely. In this context, silicon has been reported to help minimize the negative effects caused by water deficit in plants. *In vitro* 5 cm sprouts were transferred to MS and MS medium + 7 μM sodium metasilicate (Na_2SiO_3), exposed to four concentrations of polyethylene glycol (PEG6000; 0, 5, 10 and 15%). After 45 days of cultivation, the morphological response (number of shoots, length of shoots, number of leaves, number of roots and length of roots) as well as the physiological response (content of photosynthetic pigments and proline synthesis) was analyzed. All experiments had a fully randomized design with 20 replicates per treatment and were performed in duplicate. The data were subjected to variance analysis, followed by a Tuckey test ($p \leq 0.05$) using the SPSS software. In general, it was observed that the addition of 7 μM of Na_2SiO_3 minimized the negative effects of the water deficit on the morphology of the sprouts. The greatest lengths, number and length of the roots were obtained with the addition of Na_2SiO_3 . However, they were decreasing with increasing PEG concentration. It should be noted that the decrease in these variables was not as drastic as in the medium without Na_2SiO_3 . There were no significant differences in the number of shoots and leaves. For physiological variables, the increase in proline content was observed in plants grown in MS with the addition of Na_2SiO_3 exposed to high concentrations of PEG. This contrasts with results obtained in plants grown without Na_2SiO_3 , where a reduced synthesis of proline was observed. This may indicate a biostimulating effect of silicon in the synthesis of this osmoregulator in water-deficient vanilla plants. While in the synthesis of photosynthetic pigments, this biostimulatory effect of Na_2SiO_3 was not observed. The presence of 7 μM Na_2SiO_3 in the culture medium stimulated the development of morphological structures and had a positive effect on proline synthesis in water-deficient vanilla plants *in vitro*.

* e-mail: marcoramirez@uv.mx



Indicazioni per la preparazione dei manoscritti per la pubblicazione di Atti di Convegno su *Italus Hortus*

Invio dei Manoscritti

I testi degli Atti da pubblicare dovranno giungere alla Redazione presso il Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura dell'Università di Firenze, viale delle Idee 30, 50019 Sesto Fiorentino (FI) almeno 45 giorni prima della data prevista di pubblicazione del numero di *Italus Hortus*. I dattiloscritti devono essere inviati in singola copia cartacea e in versione elettronica, riuniti in un CD-Rom (completo di indice), stampati su una sola facciata di fogli A4, con interlinea doppia e margini di 3 cm (sinistro e destro). Il carattere del testo deve essere Times New Roman 12. Le pagine devono essere numerate. Il numero massimo di caratteri (o di parole) per ogni articolo sarà indicato dal Comitato Scientifico-Editoriale del Convegno stesso, sulla base degli accordi con il Direttore Responsabile della Rivista.

Supporti accettati: I testi e le tabelle devono necessariamente essere in formato Word (estensione DOC) o Rich Text Format (estensione RTF). Eventuali grafici e figure devono essere in formato JPG con risoluzione minima 300 dpi e larghezza pari a cm 10 (una colonna). Si raccomanda di salvare in files separati il testo e le tabelle (1 file) i grafici e le figure (1 file per grafico e/o figura). La pubblicazione avverrà in bianco e nero; eventuali figure o tabelle a colori saranno a carico dell'autore che ne farà richiesta.

Procedura per l'accettazione

Il Comitato Scientifico-Editoriale del Convegno sarà responsabile dell'accettazione del lavoro e potrà richiedere revisioni ed integrazioni all'autore. La responsabilità della qualità degli Atti del Convegno ricade sul Comitato Scientifico-Editoriale del Convegno e sul suo Coordinatore (Curatore - *Guest Editor*).

Le bozze tipografiche saranno inviate al Curatore per la correzione e dovranno essere restituite entro 15 giorni, anche qualora non si rilevino correzioni da fare. Il mancato ritorno delle bozze corrette nei termini stabiliti comporta l'accettazione delle medesime. Copyright: dopo l'accettazione il copyright del lavoro diventa proprietà della Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana. L'autorizzazione alla stampa in qualsiasi forma dei lavori o parti dei lavori deve essere richiesta alla Segreteria Generale della SOI.

Preparazione del manoscritto

La prima pagina deve comprendere nell'ordine: Titolo in Italiano, nome e cognome dell'Autore(i), indirizzo(i) dell'Istituzione(i) di appartenenza, nome e l'indirizzo dell'autore corrispondente (compreso fax, e-mail), riassunto in Italiano, parole chiave (non presenti nel titolo, max 5), titolo in Inglese, abstract in Inglese, key-words (max 5). **Riassunto:** il riassunto Italiano è limitato a 100 parole; l'abstract in Inglese è compreso tra 100-200 parole. In entrambi i casi devono essere riportati scopi e risultati della ricerca senza abbreviazioni, equazioni e citazioni bibliografiche. L'abstract in Inglese deve contenere con chiarezza tutte le informazioni e consentire la massima visibilità del lavoro ad un pubblico più ampio.

Parole chiave: la lista di parole chiave, in Italiano e Inglese, non usate nel titolo, include nomi comuni e scientifici, nomi delle specie, nome comune degli elementi chimici, termini fisiologici e patologici.

Testo: il testo dovrà essere organizzato nel seguente modo:

- nel caso di contributi sperimentali dovrà contenere: Introduzione (che deve terminare con indicazione degli scopi del lavoro), Materiale e metodi, Risultati, Discussione, Conclusioni. Bibliografia. Risultati e discussione possono anche essere accorpate in un unico paragrafo.

- nel caso di relazioni ad invito con le caratteristiche di "Review" il testo sarà articolato in paragrafi a discrezione dell'autore; lo scopo della "Review" dovrà essere chiaramente indicato nell'Introduzione ed il testo dovrà includere un paragrafo "Conclusioni" che potranno assumere anche la forma di "Prospettive future" o "Ricadute pratiche".

Gli elenchi devono essere puntati, secondo l'esempio sotto riportato.

- Il punto deve essere tondo e pieno;
- Il testo deve rientrare;
 - L'eventuale sotto punto è tondo, ma vuoto;
 - Non sono ammessi ulteriori livelli.

Non sono ammesse note a piè di pagina.

Unità di misura: le unità di misura e il relativo simbolo devono essere quelle del Sistema Internazionale (SI). Il simbolo, senza punto, deve seguire il valore numerico.

Nomi delle Piante: i nomi scientifici di piante e animali sono indicati in corsivo. I nomi delle cultivar vanno scritti con la prima lettera maiuscola senza virgolette, preceduti dall'abbreviazione "cv" senza punto (es. *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv Snow Don).

Corsivo: il corsivo nel testo deve essere usato solo per espressioni latine, nomi scientifici e parole straniere, limitate a quelle per cui non esiste il corrispettivo italiano.

Tabelle: le tabelle devono essere riportate a fine testo, in pagine separate e comunque non inserite all'interno del testo. In ogni caso deve essere possibile intervenire all'interno delle tabelle per modificare bordi, dimensioni e caratteri di stampa. Il titolo delle tabelle deve essere in Italiano e Inglese (questo in corsivo). Non riportare gli stessi dati in tabelle e grafici. Le tabelle devono essere intelleggibili senza ricorrere al testo e numerate con numero arabo progressivo (es. Tab. 1). Le unità di misura devono essere chiaramente indicate. Ogni colonna deve riportare un'appropriata intestazione. I riferimenti bibliografici in calce a tabelle e figure vanno in parentesi.

Grafici: i grafici devono essere in formato JPG con risoluzione minima 300 dpi e larghezza minima di cm 10 (una colonna). Il titolo dei grafici deve essere in Italiano e Inglese (questo in corsivo). I grafici devono essere in bianco e nero; la pubblicazione di grafici a colori sarà a carico dell'autore. I grafici non devono essere inseriti all'interno del testo. All'interno del testo il grafico è indicato come Figura e numerato con numero arabo progressivo (es. Fig. 1).

Immagini: foto, diapositive e disegni devono essere forniti in originale. Qualora l'originale non sia disponibile, è possibile inviare un file in formato JPG o TIF; ogni altro formato non sarà accettato. La larghezza minima è pari a cm 10 (una colonna). La pubblicazione a colori dovrà essere concordata con il curatore degli atti.

La didascalia di grafici e immagini deve essere riportata in Italiano e Inglese (questo in corsivo) in files separati o al termine del testo. Le figure devono essere intelleggibili senza ricorrere alla lettura del testo e numerate con numero arabo progressivo. Tutte le figure devono avere un riferimento nel testo.

Bibliografia: le citazioni bibliografiche all'interno del testo devono avvenire mediante il riferimento al cognome dell'Autore o degli Autori (se due) e all'anno di pubblicazione. Nel caso di più Autori, al nome primo seguirà l'abbreviazione *et al.* Nel caso di più lavori nello stesso anno dello stesso Autore, all'anno si faranno seguire lettere minuscole progressive (es. 2003a, 2003b). La bibliografia dei lavori citati deve essere indicata in ordine alfabetico secondo il seguente schema, con i caratteri speciali e la punteggiatura indicati:

CASO N. 1 PUBBLICAZIONE SU RIVISTA

AUTORE/I (la virgola separa gli Autori uno dall'altro), anno di pubblicazione. *Titolo del lavoro*. Rivista, volume (numero della rivista): numero pagine. Es. ROSSI G., BIANCHI M., 1990. *Le rose dei Romani sono belle*. *Italus Hortus*, 1 (1): 22-26.

CASO N. 2 CAPITOLO DI UN LIBRO

AUTORE/I, anno di pubblicazione. *Titolo del lavoro*. In: Curatore libro, Titolo del volume, Casa editrice (città): numero pagine. Es. ROSSI G., BIANCHI M., 1990. *Le rose dei Romani*. In: M. Bianchi ed., *Le rose nel mondo antico*, Società Orticola Italiana (Firenze): 22-26.

CASO N. 3 MONOGRAFIA

AUTORE/I, anno di pubblicazione. *Titolo del lavoro*. Casa editrice (città), numero pagine. Es. ROSSI G., BIANCHI M., 1990. *Le rose dei Romani*. Società Orticola Italiana (Firenze), pp. 200.

Acta Italus Hortus

Pubblicazione della Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI)
Numero 30

Atti del IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione
Un incontro tra gli operatori del settore e della ricerca
VitroSOI2022

Sommario

Presentazione	Pag. 12
Saluto dei Coordinatori del Gruppo di Lavoro SOI 'Micropropagazione e tecnologie in vitro'	“ 13
Articoli	“ 15
Riassunti	“ 199