



Coltura in vitro: problemi e prospettive

I molti avanzamenti tecnici e progressi compiuti negli ultimi anni sulla micropropagazione dell'olivo vanno incontro alla crescente domanda del mercato

di M. Micheli, L. Catalano, C. Benelli, G. Zuccherelli, K. Zuccherelli, O. Navacchi, A. De Carlo, S.L. Facchin, D. Fernandes da Silva

La Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (Soi) ha tra i suoi obiettivi quello di far incontrare il mondo della ricerca con gli operatori del settore, dal vivaismo alle colture frutticole, ortive, floricole e ornamentali. In epoca di pandemia da Covid 19, ha continuato le sue attività divulgative grazie a iniziative telematiche. Il gruppo di lavoro “Micropropagazione e Tecnologie *in vitro*”, lo scorso 18 novembre ha organizzato un webinar intitolato “Micropropagazione dell'olivo: problemi e prospettive”, come momento di incontro tra gli studiosi del tema con imprenditori e professionisti che operano in vivaio, in campo o in laboratori commerciali per far fronte alle sfide a cui sono chiamati e garantire prodotti sempre migliori da un punto di vista qualitativo. Infatti la

lunga tradizione dell'Italia non basta più per rispondere alle problematiche economiche e, soprattutto, a quelle sanitarie (fra tutte la diffusione del ceppo di *Xylella fastidiosa* sub. *pauca*) che stanno seriamente minacciando gli olivicoltori italiani. Anche al settore olivicolo si chiede, quindi, un coraggioso scatto in avanti nell'investire in ricerca e sperimentazione per migliorare o introdurre nuove tecniche di propagazione e di coltivazione.

In questo contesto, il webinar promosso dalla Soi è stato focalizzato sulle conoscenze e i risultati scaturiti dagli studi di alcuni ricercatori in merito ad uno specifico settore del vivaismo olivicolo quale quello delle colture *in vitro* per la produzione di piante certificate, rispondenti alle richieste del mercato.

Panoramica sul settore

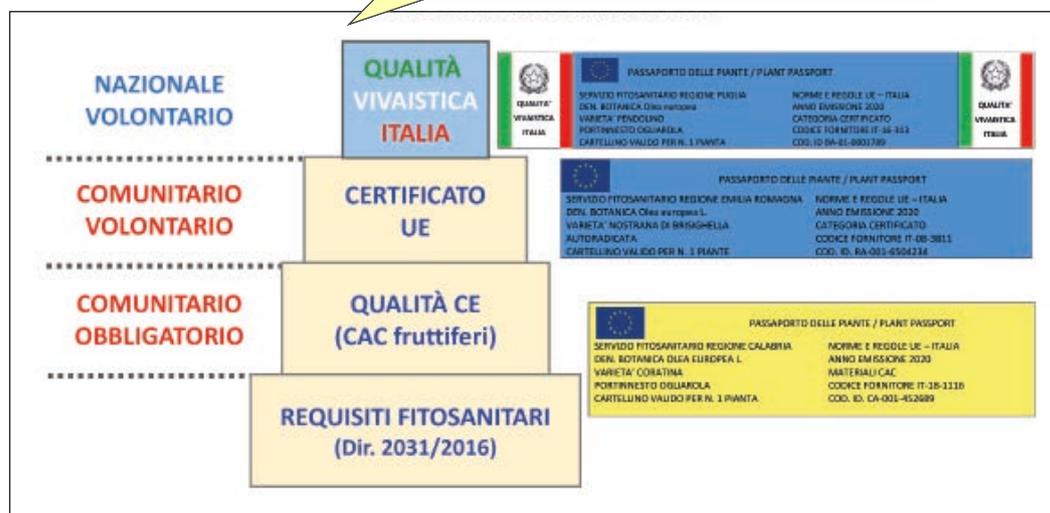
Il vivaismo olivicolo italiano, fino agli anni '90, è stato di riferimento per tutti i piani olivicoli sviluppatasi nei vari Paesi, con aziende ubicate in Toscana, Puglia, Calabria e Sicilia che negli anni d'oro hanno sfiorato una produzione annua di 13 milioni di piantoni, esportati in tutto il mondo. Da questi dati è partita la presentazione del dott. **Luigi Catalano** (Civi Italia) sullo stato dell'arte del settore e sulla normativa in vigore riguardante la certificazione. Di pari passo con il ridimensionamento dell'olivicoltura nazionale, sia in termini di superfici investite, sia di produzione, rispetto ad altri Paesi che nel frattempo hanno allestito e messo in pratica piani di settore, il vivaismo italiano ha risentito di questa crisi, nonostante sia stato ben supportato da istitu-



▲ Luigi Catalano

zioni di ricerca autorevoli e sia sempre stato all'avanguardia con tecniche di propagazione poi adottate per le produzioni massali, come nel caso dell'innesto, della produzione di talee mono-nodali e della micropropagazione. Un patrimonio di capacità tecniche ed imprenditoriali oggi da rilanciare alla luce delle nuove sfide che necessitano di elasticità dei cicli produttivi per meglio rispondere alle esigenze del

mercato, di garanzie fitosanitarie dei materiali di propagazione, di nuove tipologie di piante e di capacità di esportare grandi quantità in piccoli volumi verso Paesi terzi. Allo stato attuale anche il vivaismo olivicolo è sottoposto a norme obbligatorie che regolamentano la produzione e la commercializzazione, come il Passaporto delle piante Ce (Reg. Ue 2031/2016) e la C.a.c.- Norme di qualità Ce (Dir. Esecuzione Ue 2020/177) e a norme volontarie, come il Certificato Ue (Dir. Esecuzione Ue 2020/177, valido anche per la categoria volontaria), il Certificato Ue e la Certificazione volontaria nazionale (Decreto 19 marzo 2019) che determinano la definizione di diverse categorie di materiali di propagazione, identificate attraverso etichette di diverso colore, come previsto da precise norme Ue (fig. 1). Le piante certificate sono il risultato di un processo che si articola in fasi specifiche, come schematizzato in figura 2. L'intervento di Luigi Catalano si è concluso ricordando l'immensa biodiversità del patrimonio olivicolo coltivato in Italia, con 735 accessioni con 597 varietà iscritte nel Registro Nazionale. Di queste,



▲ 1 - Il webinar della Soi "Micropropagazione e Tecnologie in vitro" tenutosi lo scorso novembre.

ben 233 accessioni, in rappresentanza di 159 varietà, sono riconosciute nell'ambito del Servizio nazionale di certificazione volontaria Qvi - Qualità Vivaistica Italia.

Aggiornamenti sulla micropropagazione

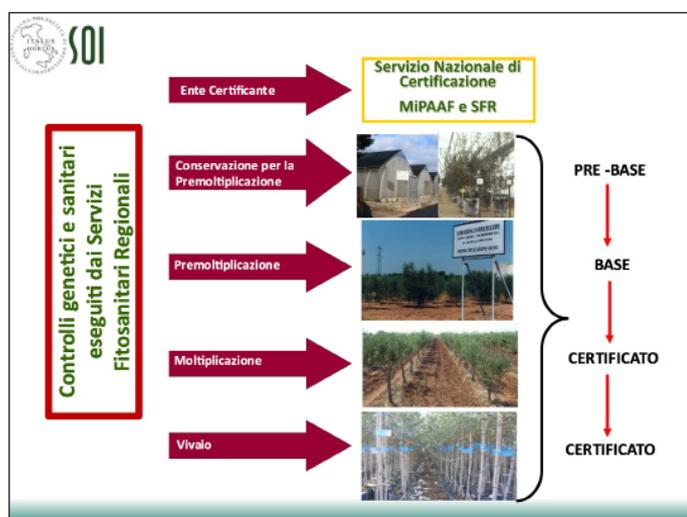
A seguire, con l'intervento del dott. **Maurizio Micheli** (Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (DSA3) dell'Università degli Studi di Perugia) il webinar è entrato nel vivo delle tecniche di coltura *in vitro* applicate all'olivo (fig. 3) (v. anche l'articolo di Rugini e Zuccherelli a pag. 40). Per quanto riguarda

la fase iniziale (preparazione della pianta madre e prelievo degli espianti), il materiale di partenza migliore è sempre rappresentato da espianti nodali prelevati dai getti dell'anno di piante madri, gestite in coltura protetta per limitare la carica di parassiti che potrebbero rendere difficoltoso il successivo allestimento della coltura aseptica. Il controllo di eventuali contaminazioni passa, oltre che attraverso una efficace sterilizzazione, anche dall'adozione di alcuni accorgimenti, come la riduzione della componente nutritiva e dei carboidrati nei terreni agarizzati e l'impiego di sostanze biocide/biostatiche non antibiotiche, come per esempio Plant Preservative Mixture (PPM®). Relativamente alla fase di proliferazione *in vitro*, dopo avere ricordato la limitata capacità di accostamento della maggior parte delle varietà di olivo propagate in asepsi, a causa di una forte dominanza apicale che è responsabile di tassi di moltiplicazione non molto elevati, è stato sottolineato come ad oggi, per molte cultivar, la citochinina più efficace rimane la zeatina, ancora molto costosa e come tale possibile fattore limitante alla ampia diffusione della micro-



▲ Maurizio Micheli

propagazione anche in campo olivicolo. Tuttavia, studi recenti condotti presso il laboratorio del DSA3 di Perugia hanno dimostrato l'efficacia di alcuni accorgimenti metodologici sulla proliferazione degli espianti di olivo, come l'aggiunta al substrato di crescita di sostanze di origine vegetale con effetto biostimolante, per esempio, l'olio estratto dai semi di neem (*Azadirachta indica*) una specie arborea tropicale o il latte di cocco. Infine, per quanto riguarda l'ultima fase della micropropagazione condotta in asepsi, l'attitudine rizogena dei vari genotipi sembra ancora essere un carattere determinante nella risposta dei germogli di olivo alla radicazione, anche se la corretta modulazione dei principali fattori che concorrono al processo (modalità di applica-



▲ 2 - Schema della certificazione volontaria adottato in Italia (L. Catalano).

zione e dosaggio dell'auxina e regolazione della fase luminosa) riesce ad incidere sulle performance degli espianti. In ogni caso, anche le ultime esperienze condotte nel laboratorio del DSA3 vanno verso l'adozione di sistemi di radicazione mista *vitro-vivo*, ricorrendo all'uso di substrati non agarizzati (terricci) che consente ai germogli di indurre lo sviluppo di radici già funzionali direttamente nel loro pane di terra; ciò facilita le attività di trapianto delle plantule micropropagate e consente di ridurre i tempi della successiva fase dell'ambientamento.

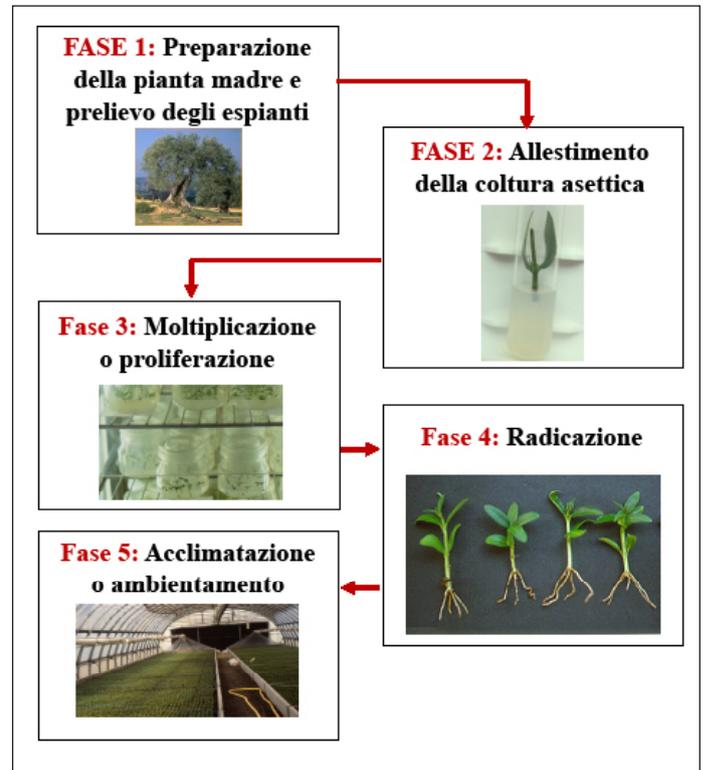
Sistemi alternativi di propagazione *in vitro*

La relazione della Dott.ssa **Carla Benelli** (Istituto per la Bioeconomia del Consiglio Nazionale delle Ricerche) è stata incentrata sull'impiego



▲ Carla Benelli

della coltura ad immersione temporanea (Temporary Immersion System, TIS). per la propagazione *in vitro* di olivo, utilizzando diversi tipi di bioreattori. Questa tecnica si basa sull'alternanza tra un periodo di immersione in substrato liquido e un periodo di asciutto degli espianti, tutto regolato da un timer. Infatti, in alternativa alla modalità tradizionale di micropropagazione su substrato gelificato, alcune esperienze, ancora in fase sperimentale, condotte presso il laboratorio del Cnr di Sesto Fiorentino, hanno fornito interessanti indicazioni circa l'adozione di bioreattori denominati RITA® (*Réceptif à Immersion Temporaire Automatique*), Plantform™ (figura 4) e Novel TIS, applicati su colture di olivo. In corso sono, invece, ricerche inerenti all'uso di altri bioreattori denominati SETIS™ (figura 4) ed ElectTIS. Al momento, i risultati dimostrano ampiamente i vantaggi che questi sistemi possono presentare, come la maggiore facilità di traslocazione degli elementi nutritivi, idonea a soddisfare le esigenze trofiche degli espianti di olivo, oltre che la possibilità di diluire alcune sostanze che potrebbero risultare dannose (se non tossiche) per i germogli, come i fenoli rilasciati durante la col-



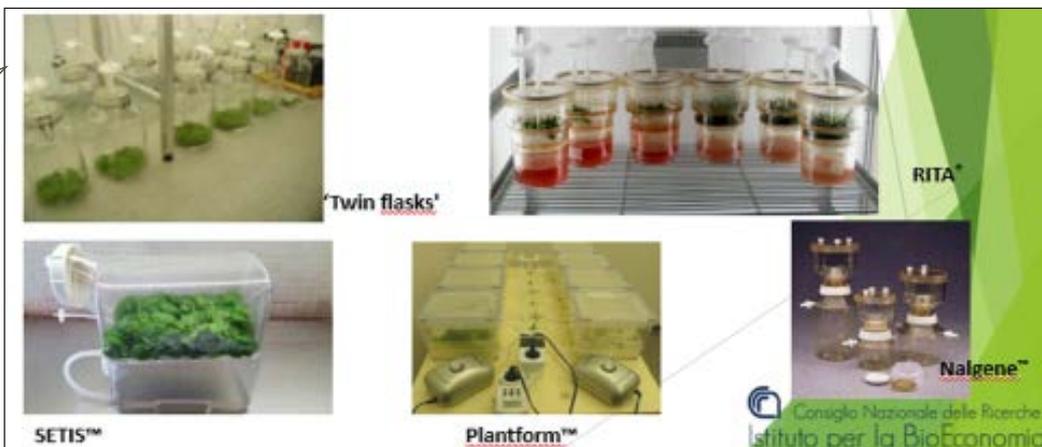
▲ 3 - Articolazione dello schema della micropropagazione di olivo (M. Micheli).

tura, che possono essere causa di ossidazione e imbrunimento dei tessuti vegetali. La coltura ad immersione temporanea, inoltre, sembra rappresentare un ottimo strumento per ridurre i costi di produzione, in quanto: consente di ridurre la manodopera, limitando il numero di subcolture e, soprattutto, tutte le operazioni connesse con la sostituzione periodica dei substrati; azzerare la necessità di acquistare

gli agenti gelificanti; richiede l'impiego di minori quantità di elementi nutritivi (sali minerali, composti organici, fonti di carbonio e fitoregolatori). Infine, la coltura ad immersione temporanea influenza in positivo il funzionamento degli stomi e l'adattamento delle piante alle condizioni di *ex vitro*, favorendo la riduzione dei tempi di acclimatazione. Tutto ciò promuove l'applicazione di questa tecnica, in generale, per la micropropagazione delle piante e la rende promettente per la coltura dell'olivo.

Produzione e sperimentazione nel settore privato

Sullo sviluppo della micropropagazione dell'olivo a livello commerciale, fondamentale in Italia è stato il lavoro condotto dalle aziende private. Esemplificativa l'esperienza di Vitroplant Italia Srl, in rappresentanza della quale sono intervenuti nel webinar



▲ 4 - Sistemi di propagazione in asepsi in coltura liquida ad immersione temporanea (C. Benelli).



▲ Oriano Navacchi

i dott. Giuseppe e Katuscia Zuccherelli e il dott. Oriano Navacchi. I primi due hanno sinteticamente illustrato l'attività vivaistica dell'azienda, con particolare riferimento alle produzioni derivanti da

micropropagazione consistenti in oltre 2 milioni di piantine di olivo di differenti varietà negli ultimi 5 anni, affermando che le richieste di mercato per futuro prossimo si attestano sulle stesse quantità. Questo intervento ha poi fornito indicazioni molto interessanti su alcune modalità procedurali adottate presso il loro laboratorio, ad esempio il ricorso a cespi e non, come di consuetudine, a propaguli uni- o bi-nodali, da utilizzare come espanti iniziali delle subcolture di proliferazione di olivo (fig. 5). Infine, sono stati elencati i traguardi tecnici che l'azienda si propone di raggiungere, come la riduzione

Capacità di adattamento in ordine decrescente:

- Leccino, Arbosana, Koroneyky (18/+24 mesi)
- Galega, Madural, Leccio del Corno, Maurino, Piantone di Mogliano (12/16 mesi)
- Arbequina la più semplice (6/12 mesi)



▲ 5 - Adattamento alla coltura in vitro: confronto tra diverse varietà (K. Zuccherelli).



▲ 6 - Comparazione della struttura dell'apparato radicale di una pianta ottenuta da talea (a sinistra) e di una da micropropagazione (a destra) (O. Navacchi).

ne dei costi della manodopera, valutando la possibilità di automatizzare alcune fasi oppure adottando protocolli che consentano il contenimento dei tempi dei cicli di proliferazione/radicazione o, ancora, programmando la produzione delle piantine di olivo contemporaneamente a quella di altre specie. Molto interessante è stato il contributo finale di Navacchi, che ha affrontato un aspetto molto delicato della micropropagazione, inerente alla forte diffidenza che alcuni olivicoltori hanno sempre manifestato in merito alle performance di campo delle piante *in vitro*-derivate. Partendo dalla similitudine tra la struttura e la fisiologia dei succhioni che si sviluppano sulle branche degli olivi in campo e quelle dei germogli ottenuti *in vitro*, si è spesso diffuso l'assunto che le piante di olivo ottenute per micropropagazione mantengono i caratteri di giovanilità una volta messe a dimora, a scapito dell'entrata in produzione e della qualità della fase riproduttiva. Tuttavia, numerosi lavori hanno dimostrato a più riprese l'infondatezza

di tali ipotesi, dimostrando, invece, che spesso le piante *in vitro*-derivate esprimono produttività maggiore. In uno specifico studio, il materiale prodotto *in vitro* di 'Arbequina', 'Coratina' e 'Frantoio' ha recuperato pienamente la capacità riproduttiva superando le piante da talea dopo due anni di campo, in termini di produzione di infiorescenze per ramo (numero mignole). Altre ricerche condotte su 'Arbequina' hanno dimostrato che nelle piante micropropagate è stata riscontrata una perfetta struttura dell'asse centrale con ottima gerarchia conica della chioma, elevata e uniforme ramificazione lungo il fusto e ottimo apparato radicale, ben distribuito e profondo, rispetto alle piante ottenute da talea (fig. 6). Lo studio ha, infine, consentito di individuare le più efficaci modalità di potatura delle giovani piante propagate *in vitro* quando utilizzate per realizzare impianti ad alta densità. ■

La bibliografia di approfondimento è disponibile su richiesta.