

Progetto PORT.NOC

Valutazione di portainnesti per la tolleranza/resistenza a *Phytophthora* e black-line e valorizzazione di varietà di *Juglans regia* compatibili



La propagazione *in vitro* di genotipi di noce promettenti per il controllo di *Phytophthora* e 'black-line'

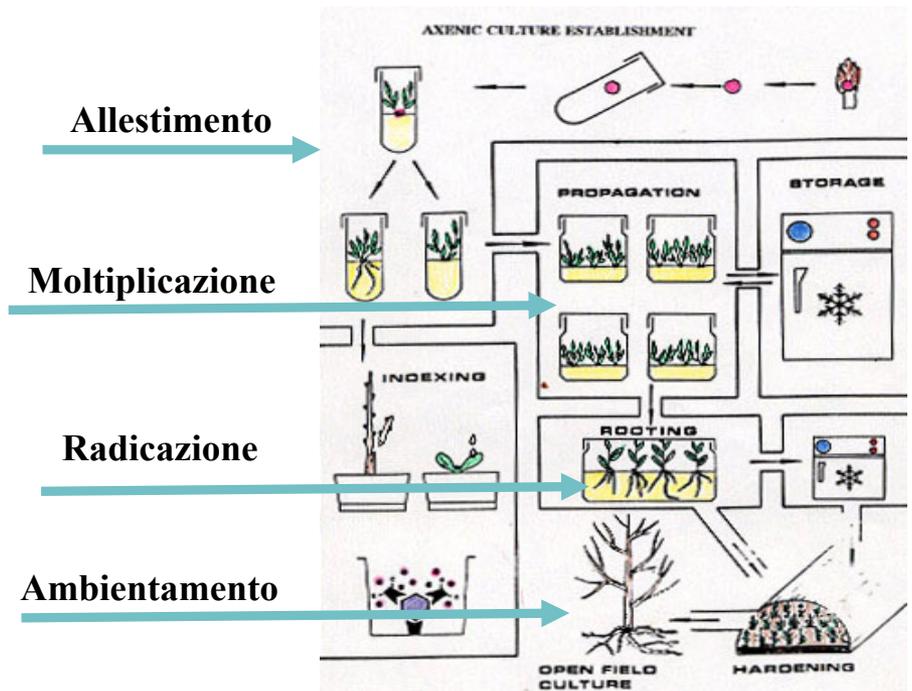
Emilia Caboni, Adele Gentile, Simona Lucioli, Andrea Frattarelli, Gaia Urbinati
CREA-Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), sede di Roma, Via di Fioranello 52, 00134 Roma

Produzione clonale di piante di elevata qualità genetico-sanitaria attraverso un percorso produttivo altamente controllato

La micropropagazione italiana ha un'importante posizione in Europa e nel mondo derivante da **40 anni di ricerca** (CNR, CREA e Univ.) e di elevato sviluppo di laboratori commerciali e loro interazione

2 grandi laboratori commerciali e 15-20 laboratori di medie e piccole dimensioni

Elevata produzione *in vitro* di fruttiferi (varietà e portinnesti), ma anche ornamentali (da fiore reciso, da giardino e da interno) e aromatiche. Produzione annua stimata circa **60 milioni di piante**



Risposta legata alla specie (legnose più difficili) e al genotipo

Protocolli da definire in funzione della specie e del genotipo

Gli studi sulla micropropagazione delle cultivar (*Juglans regia*) e portinnesti di noce sono iniziati negli anni 80' negli Stati Uniti (Driver e Kuniyuki, 1984; McGranahan e Leslie, 1988; Britton et al., 2009) e successivamente in Europa (Driver e Kuniyuki, 1984; Cornu e Jay-Allemand, 1989; Gruselle and Boxus, 1990; Caboni e Damiano, 2005; Licea-Moreno et al., 2015).

Questo metodo di propagazione si è molto diffuso a livello commerciale anche in Italia sulle principali cultivar partendo da alcuni laboratori commerciali pionieri.

Nonostante la diffusione di questa tecnica per la produzione commerciale di questa specie, **rimangono problematiche per nuovi genotipi di interesse relative principalmente alle fasi di allestimento della coltura e della radicazione.**



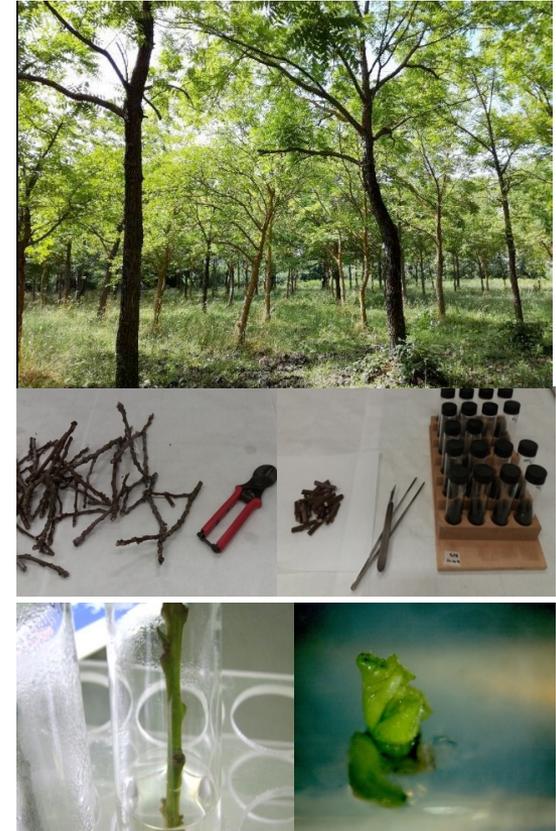
Piante di *J. microcarpa* Berland. presso
CREA-FL di Roma

Vari studi (Browne et al., 2015; Knipfer et al., 2019; Vitale et al., 2019; 2021), alcuni dei quali svolti in Italia nell'ambito del progetto, **indicano *J. microcarpa* Berland.**, specie originaria del Nord America, **tra i migliori portinnesti per la resistenza a *P. cinnamomi*.**

Progetto finanziato dal Mipaaf "Valutazione di portinnesti per la tolleranza/resistenza a *Phytophthora* e *Black-line* e valorizzazione di varietà di *Juglans regia* compatibili" (PORT.NOC), coordinato dal CREA-DC.

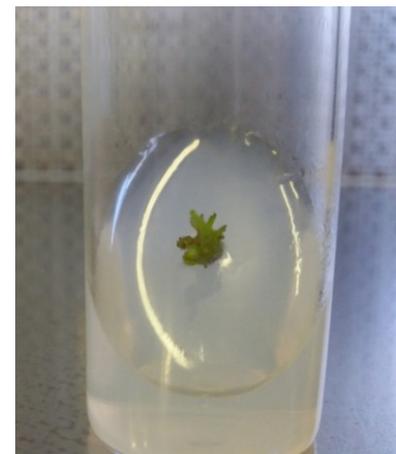
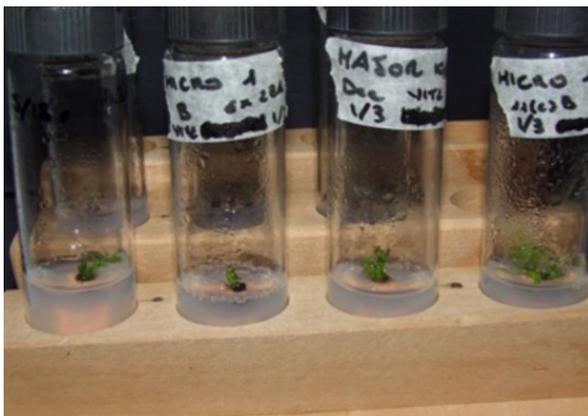
CREA-OFA, sede di Roma, si è occupato della definizione di protocolli di micropropagazione per *J. microcarpa* Berland. per la produzione vivaistica di genotipi da utilizzare come portinnesti per cultivar di *J. regia*.

- Nella **prima parte del progetto** per avviare la coltura *in vitro* sono state effettuate varie prove di sterilizzazione di materiale di piante madri allevate in pieno campo (forniti da CREA-FL) di genotipi di *J. microcarpa*.
- Per quanto riguarda la **sterilizzazione**, basandoci sulle precedenti esperienze sull'allestimento della cv. Chandler (*J. regia*), sono stati confrontati:
 - **pretrattamenti** delle porzioni di ramo (**immersione in soluzione di citochinina**);
 - **diversi tempi di sterilizzazione** con **ipoclorito di sodio**, **mertiolato di sodio** e **alcool (70%)**, **diversi tipi di espianto** (porzione di ramo o solo gemma ascellare deperulata), anche in relazione al **periodo di prelievo** (ottobre, novembre, maggio, giugno); negli ultimi allestimenti il mertiolato è stato sostituito con una seconda immersione in ipoclorito.



Allestimento colture

Sempre **prima fase del progetto** per quanto riguarda l'effetto dei terreni di coltura sullo sviluppo delle gemme, sempre basandoci sulle precedenti esperienze nell'allestimento delle cv. Chandler e Sorrento (*J. regia*), sono state confrontate **concentrazioni e combinazioni di diversi fitoregolatori (ZEA, BA, KIN, 2iP, mT, GA₃, TDZ, ABA, CPPU).**



- Nella prima parte del progetto è stato definito un protocollo di sterilizzazione (tempi di applicazione di ipoclorito e alcool) più idoneo in relazione al periodo di prelievo e i terreni di coltura più idonei.
- Gli inquinamenti erano comunque elevati (50-60%), ma compatibili con i prelievi fatti su piante adulte allevate in pieno campo.

Risposta genotipo dipendente

Il protocollo di allestimento messo a punto ha consentito di allestire uno solo dei genotipi (N. 3) di *J. microcarpa* su cui proseguire le fasi successive di definizione del protocollo *in vitro* del portinnesto.



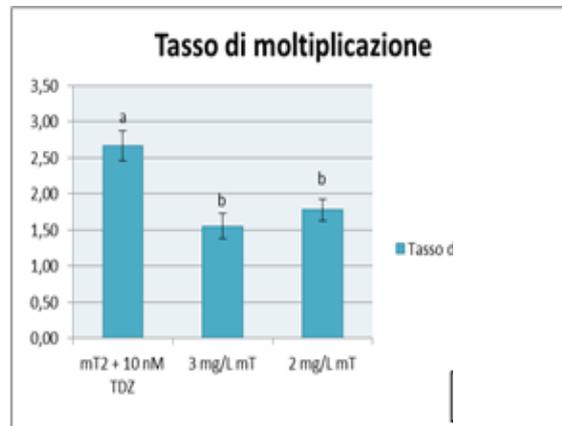
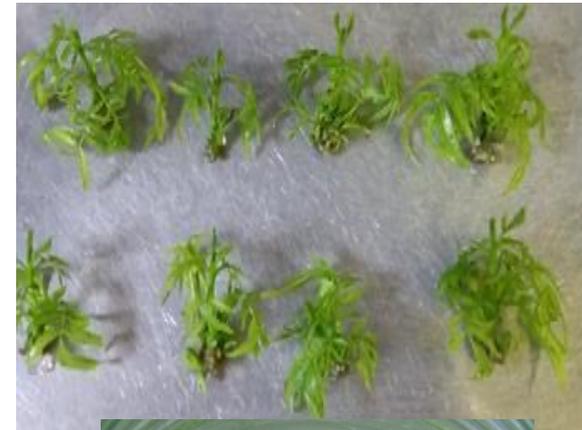
Allestimento in vitro di *J. microcarpa*

- Nella **seconda parte del progetto**, per favorire questa fase che ha presentato difficoltà con la maggior parte dei genotipi, **i prelievi di gemme** ascellari e apicali sono stati effettuati **non in pieno campo con piante adulte**, ma **sulle piante di alcuni genotipi valutati come di interesse innestate e allevate in vaso all'aperto o mantenute in serra, messe a disposizione dal CREA-DC.**
- Si è **proceduto ad effettuare i trattamenti di disinfezione** delle gemme ascellari prelevate con il **protocollo precedentemente messo a punto**, che ha permesso di ottenere **gemme ascellari non inquinate da batteri e/o funghi (fino al 70%)**, ma non si è osservata ripresa vegetativa.
- Il prelevamento delle gemme da materiale vegetale giovane tenuto in ombraio o in serra ha **migliorato solo la risposta alla fase di sterilizzazione dell'allestimento** ma non la successiva risposta nel passaggio alla fase moltiplicazione

Moltiplicazione

Durante la **prima parte del progetto** si era proceduto ad **un'ottimizzazione della fase di moltiplicazione sul genotipo allestito**.

Era stato **individuato il terreno e la combinazione di citochinine** che consentono di ottenere **un buon tasso di moltiplicazione** dei germogli **del clone 3** e di avere il **materiale disponibile per le successive prove di radicazione**



Nella seconda fase del progetto per la **rizogenesi** delle microtalee del **clone 3**, sono state fatte **varie prove** utilizzando un **terreno DKW modificato** (McGranahan et al., 1987) o **MS** (Murashige e Skoog, 1962), con **concentrazione intera o ridotta a 1/4 di sali**, e **20 o 40 mg/L di saccarosio**.

Per la **fase di induzione**, sono state applicate **varie concentrazioni di acido indolbutirrico (IBA)** (da **3 a 5 mg/L**) per **5-10 giorni**, mantenendo le microtalee **al buio**.

Alla fine del periodo di induzione le **microtalee** sono state **trasferite alla luce sullo stesso terreno della fase precedente**, in **assenza di auxine**, con o senza **vermiculite**.

Il miglior risultato (circa 60%) è stato ottenuto utilizzando, in **fase di induzione**, **DKW con sali ridotti**, **20 mg/L di saccarosio**, **3 mg/L di IBA**, e mantenendo le **microtalee al buio per 10 giorni**. Nella successiva **fase di espressione** è risultata **migliorativa** per la rizogenesi la **presenza di vermiculite nel terreno di coltura**.



In **successive prove sperimentali** per ottimizzare ulteriormente la rizogenesi sono stati applicati i seguenti trattamenti:

come pretrattamento i germogli sono stati **moltiplicati per 2 sub-culture in presenza di solo agar (5,7 g/L) o agar e pectine (3,5 g/L agar e 8 g/L pectine);**

per la fase di induzione alla radicazione è stato utilizzato il **terreno DKW** (McGranahan *et al.* 1987) con **concentrazione di sali ridotta e 20 g/L di saccarosio**, a cui sono stati aggiunti **3 mg/L di IBA**, combinazione che si era evidenziata idonea nelle precedenti prove. Questo trattamento è stato applicato **per 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 agar, agar e vermiculite** (miglior risultato prime prove) o direttamente in **dischetti di torba Jiffy**.

Radicazione

Il **miglior risultato (80%) di espianti radicati** è stato ottenuto utilizzando le microtalee provenienti dal **pretrattamento in moltiplicazione con solo agar** come gelificante e **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**.

<i>J. microcarpa</i> , clone 3		
Tratt.	% radic	N. radic/esp
Agar	20 c	1,0 c
Agar + Verm	60 b	1,5 b
Jiffy	80 a	2,2 a



Radicazione in Jiffy e ambientamento (destra) del clone 3 di *J. microcarpa*.

J. microcarpa (clone 3): effetto dell'utilizzo nella seconda fase di radicazione di agar, agar e vermiculite o dischetti di torba Jiffy. I germogli utilizzati sono stati moltiplicati su terreno contenente agar e indotti a radicare con 3 mg/L di IBA.

L'**utilizzo dei Jiffy** per la fase di espressione radicale, oltre a semplificare e rendere più rapida la successiva fase di ambientamento, ha consentito di **migliorare la risposta rizogena delle microtalee.**

Il **pretrattamento con agar e pectine non ha ulteriormente migliorato la risposta rizogena e nemmeno l'ulteriore allungamento della fase di induzione.**

Microinnesto

Nel corso di tutto il progetto i protocolli definiti sono stati utilizzati per effettuare prove di microinnesto della cv. Chandler sul clone *in vitro* di *J. microcarpa*.

Pur osservando la **formazione di callo nel punto di innesto, i **germogli ottenuti sopravvivono per alcune subcolture** ma il **protocollo deve essere ulteriormente ottimizzato.****



Definizione di protocolli per il risanamento di materiale di *Juglans* spp. infetto da CLRV mediante tecniche di colture *in vitro*, in collaborazione con CREA-DC

Nella seconda fase del progetto al fine di definire i protocolli per il risanamento si è cercato di allestire gemme di piante (VM141 e VX246) della cv. Chandler infette, mantenute in serra presso il CREA-DC applicando protocolli precedentemente definiti per la cv. Chandler.

Una buona % (superiore al 50%) di gemme prelevate si sono mostrate moderatamente inquinate e vitali dopo la sterilizzazione. Tuttavia, nonostante si fosse osservata un'iniziale ripresa vegetativa, i germogli della cv. Chandler non sono ulteriormente cresciuti.

E' risultato evidente che questa tecnica di risanamento, utilizzata per altre specie quale la vite che sono più facilmente allestibili *in vitro*, presenta limitazioni in *Juglans* spp. che presenta difficoltà nella fase di allestimento, forse anche incrementate dalla presenza del virus nella pianta e deve essere ulteriormente studiata per essere applicabile

- L'attività svolta nell'ambito del progetto, pur mettendo ulteriormente in evidenza la difficoltà in *Juglans* spp. nella fase di allestimento della coltura *in vitro*, ha portato all'individuazione di un genotipo di *J. microcarpa* che affianca ad una buona resistenza a *Phytophthora* una buona capacità di essere propagato *in vitro*.
- La definizione del protocollo per la sua propagazione ne può favorire l'utilizzo come portinnesto per cultivar di *J. regia* nell'ambito della nocicoltura specializzata da frutto dove siano presenti fenomeni di deperimento e morie riconducibili a *Phytophthora*.

La divulgazione dei risultati, sia a livello scientifico che applicativo agli operatori del settore, è stata effettuata attraverso partecipazione a convegni e pubblicazioni

Gentile A., Lucoli S., Frattarelli A., Urbinati G., Forni C., Caboni E. **2019**. Effect of different iron sources and cytokinins on *in vitro* shoot multiplication of *Juglans* spp. Poster. XV Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 5-7 giugno, Praga.

Gentile A., Urbinati G., Lucoli S., Frattarelli A., Forni C., Caboni E. **2021**. *In vitro* shoot multiplication of *Juglans* spp.: the effect of different iron chelates and cytokinins. Acta Hort. 1307, 291-298.

Urbinati G., Gentile A., Lucoli S., Vitale S., Forni C., Caboni E. **2021**. Micropropagazione di *Juglans microcarpa* Berl, un portinnesto per cultivar di *J. regia* promettente per il controllo di *Phytophthora cinnamomi* - Poster. XIII Giornate Scientifiche SOI. “I traguardi di Agenda 2030 per l’ortoflorofrutticoltura italiana” Catania 22-23 giugno.

Urbinati G., Gentile A., Lucoli S., Frattarelli A., Caboni E. **2022**. Fattori che influenzano la radicazione *in vitro* di *Juglans microcarpa*, un portinnesto per cultivar di *J. regia* promettente per il controllo di *Phytophthora cinnamomi*. Poster al IV Convegno Nazionale Sulla Micropropagazione: Un Incontro Tra Gli Operatori Di Settore e della Ricerca - Bari, 12-14 ottobre.

In preparazione:

Gentile, A., Urbinati, G., Lucioli, S., Frattarelli, A. Caboni, E. An Efficient Micropropagation system for *Juglans microcarpa*, a potential rootstock for *Juglans regia* cultivars to control the decline syndrome induced by *Phytophthora cinnamomi*. Article for PLANTS speciale issue

Tesi di dottorato

Dr. Adele Gentile, CREA-OFA, Roma. Università degli studi di Roma "Tor Vergata" dottorato di ricerca in biologia evolutiva ed ecologia ciclo XXXIV "Salt stress tolerance in walnut (*Juglans* spp.): a study on mechanisms of adaptation to salinity. Relatore prof Cinzia FORNI, Università degli studi di Roma "Tor Vergata. Correlatori: dott. ssa Emilia Caboni; dott. ssa Simona Lucioli, CREA-OFA, sede di Roma.