



Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

DRG n. 1463 del 08/10/2019

Cod. Ente: 2105 Rag. Sociale Università degli Studi di Padova Asse Occupabilità

Cod. progetto: 2105-0048-1463-2019; **Titolo progetto:** «Attitudine alla produzione di antociani in biotipi di mirtillo nero selvatico e ottimizzazione dello scaling up di colture in vitro per la preparazione di estratti ad alto titolo di antociani per l'impiego nel cibo biologico»; **COD. CUP:** C94E19000820008

Cod. intervento: 2105/10260354-001/231/DEC/20; **Titolo dell'intervento:** «Caratterizzazione e moltiplicazione di biotipi di mirtillo nero ad elevato contenuto in antociani per lo "sviluppo di prodotti e attrezzature più efficienti e tecnologie abilitanti per la produzione nell'agricoltura biologica»

Sede: Dipartimento di Agronomia, Animali; Alimenti; Risorse Naturali e Ambiente – DAFNAE, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (Padova)

Azienda partner: Rigoni di Asiago S.r.l., via G. Oberdan, 28, 36012 Asiago (VI).



Destinatario del progetto: Dr. Pietro Carraro
Responsabile del progetto: Prof. Silvia Quaggiotti
Responsabile per la ricerca: Prof. Benedetto Ruperti



Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

Una panoramica sulla ricerca svolta

1. La micropropagazione:
 - Cos'è la micropropagazione?
 - Fasi della micropropagazione
 - Micropropagazione vs talea
2. Il mirtillo nero: *Vaccinium myrtillus* L.
 - *Vaccinium myrtillus* L.
 - Le proprietà nutraceutiche del mirtillo
3. La micropropagazione di *V. myrtillus* L.
 - La camera di crescita
 - Micropropagazione di *V. myrtillus*: fase *in vitro*
 - Micropropagazione di *V. myrtillus*: fase *ex vitro*
4. Il nocciolo turco: *Corylus colurna* L.
 - *Corylus colurna* come portainnesto
5. La micropropagazione di *C. colurna* L.
 - Micropropagazione di *C. colurna*: fase *in vitro*
 - Micropropagazione di *C. colurna*: fase *ex vitro*
6. Risultati:
 - Il fitormone zeatina e il tasso di moltiplicazione degli espianti di *V. myrtillus*
 - Tasso di radicazione di *V. myrtillus*
 - Un protocollo di sterilizzazione per gli espianti di *C. colurna*
7. Conclusioni e prospettive future

Cos'è la micropropagazione?

La micropropagazione è una tecnica di **moltiplicazione clonale** in condizioni asettiche che consente di ottenere un elevato numero di espianti identici alla pianta madre da cui sono stati prelevati. Piccole porzioni di tessuti o organi vengono prelevati dalla pianta madre, sterilizzati e posti in coltura su specifici substrati. Questi terreni artificiali sono composti da acqua, macronutrienti e micronutrienti, una o più fonti di carbonio, vitamine e ormoni. Gli espianti vengono coltivati in camere di crescita nelle condizioni ambientali più idonee.

Tra i metodi utilizzati per micropropagare espianti vegetali la **stimolazione delle gemme ascellari** è sicuramente il più diffuso. Questa tecnica consiste nel moltiplicare **gemme apicali** o **segmenti internodali** suddividendo un espianto in più porzioni e trasferendolo in un nuovo terreno di coltura.

Fasi della micropropagazione



1. Sterilizzazione
degli espianti

2. Moltiplicazione
degli espianti

3. Radicazione e
ottenimento di plantule

4. Radicazione e
acclimatazione ex vitro

Micropropagazione vs. talea



VANTAGGI

- Rapida moltiplicazione clonale
- Miglioramento del germoplasma
- Conservazione di geni utili
- Piante virus-esenti
- Possibile miglioramento del profilo metabolico

SVANTAGGI

- Possibile variazione somaclonale
- Elevati costi di produzione
- Specificità del protocollo
- Formazione del personale

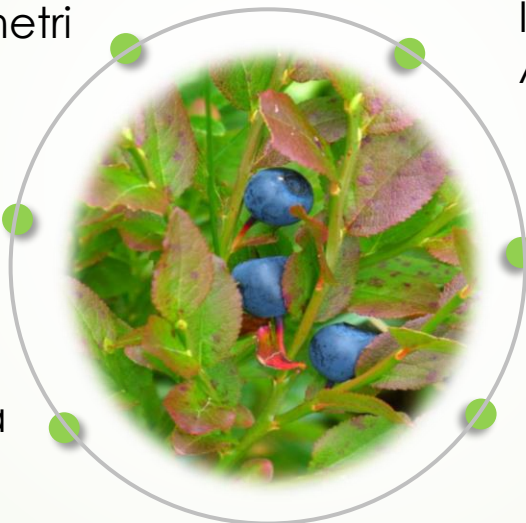


Vaccinium myrtillus

Pianta arbustiva alta 20-50 centimetri

Cresce in terreni acidi (pH 5 – 5.5)

Le popolazioni naturali tendono a raggrupparsi in cluster clonali



In Italia è presente soprattutto su Alpi e Appennini ad altitudini tra 1200 e 2000 metri

Tende a riprodursi per via vegetativa attraverso rizomi

Non sono disponibili cultivar, le bacche vengono raccolte su piante spontanee

Le proprietà nutraceutiche del mirtillo



- Elevato contenuto di **composti antiossidanti** (flavonoidi e tannini)
- Frutti ricchi di **pigmenti naturali** (antociani e carotenoidi)
- Elevato contenuto di **acido ascorbico**

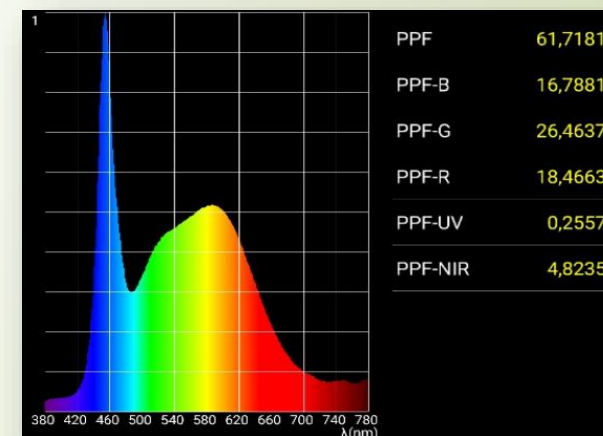
► **Obiettivi della ricerca:** identificare un protocollo di micropropagazione adatto per *V. myrtillus* varietà dolomiti.

La camera di crescita



Per micropropagare mirtillo e nocciolo sono state utilizzate le medesime condizioni ambientali nella camera di crescita

- Temperatura di 23 ± 2 °C
- Fotoperiodo di 16/8 ore di luce/buio
- Espianti ad una distanza di 40 cm dai led
- Flusso fotonico di $61,7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$



Micropropagazione di *V. myrtillus*: fase *in vitro*



1. Gli espianti di mirtillo vengono coltivati in un terreno colturale sviluppato appositamente, dopo due mesi di crescita sono sufficientemente grandi per poter essere moltiplicati
2. Le piantine vengono tagliate con lame bisturi in condizioni di sterilità (sotto cappa biologica)
3. Gli espianti vengono suddivisi in porzioni di 2-3 internodi
4. I nuovi espianti vengono posizionati in un nuovo terreno colturale, il numero ottenuto è circa il triplo degli espianti di partenza del punto 1

Micropropagazione di *V. myrtillus*: fase ex vitro



1. Gli espianti di mirtillo vengono trasferiti in dischetti di torba acidificata jiffy
2. Le piantine di mirtillo, ancora prive di radici, vengono acclimate all'interno di piccole serre. Queste piantine vengono esposte gradualmente ad un ambiente aperto e trattate periodicamente con radicanti e fertilizzanti. Questa è una fase molto delicata perché le piantine in vitro possiedono tessuti molto fragili e stomi poco funzionali
3. Al termine del periodo di acclimatazione (8 settimane) si ottengono piantine completamente formate

Corylus colurna L. come portainnesto

Nocciolo che non emette polloni dalla base del fusto (gli interventi di spollonatura sono molto costosi per i coltivatori di nocciole)

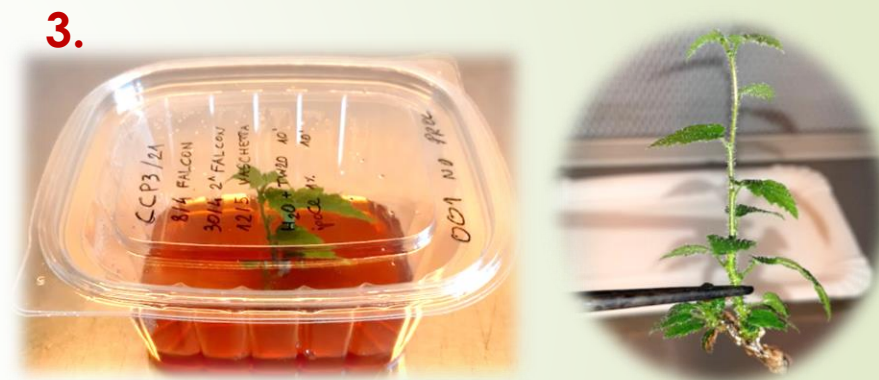
Apparato radicale fittonante e profondo



Poco impiegato nel settore corilicolo, se impiegato si utilizzano semenzali e non piante clonali micropropagate

Compatibilità d'innesto con le principali cultivar italiane ancora da valutare

Micropropagazione di *C. colurna*: fase *in vitro*



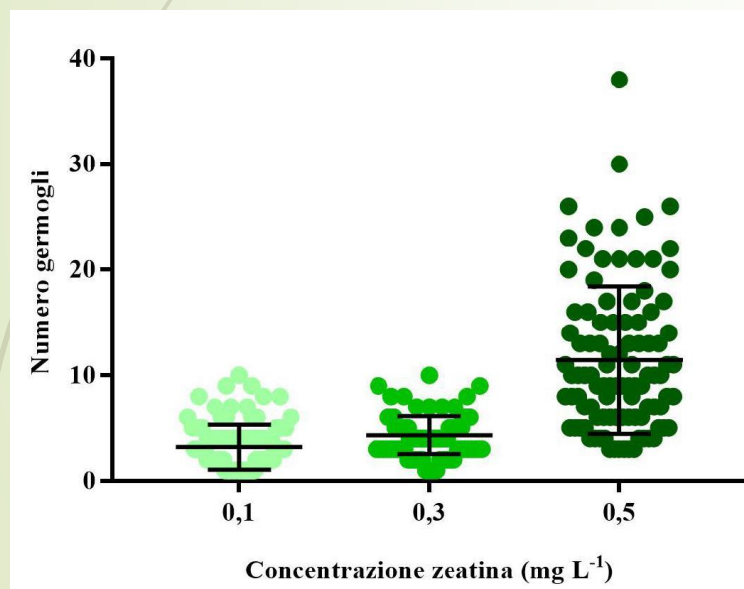
1. Marza di *C. colurna* cresciuta in un ambiente chiuso per ridurre la presenza di contaminanti (funghi e batteri)
2. Prelievo di porzioni di internodi sterilizzati superficialmente con lavaggi in etanolo e ipoclorito
3. Trasferimento degli espianti *in vitro* e sviluppo di un individuo geneticamente identico alla pianta madre

Micropropagazione di *C. colurna*: fase ex vitro



Gli espianti di *C. colurna* vengono coltivati per 8 settimane *in vitro* (1), successivamente vengono trasferiti in cubetti di torba jiffy (2) all'interno di vassoi coperti da una pellicola impermeabile. Dopo un mese di acclimatazione, i vassoi vengono aperti progressivamente per esporre la pianta all'aria. Dopo 2 mesi di crescita in queste condizioni, le piantine vengono trasferite in contenitori paperpot (3) dove possono crescere ulteriormente. La fase successiva prevede il trasferimento in vaso.

Il fitormone zeatina e il tasso di moltiplicazione degli espianti di *V. myrtillus*



Confronto multiplo tra dosaggi di zeatina	Differenza media tra ranghi	<i>p</i>
0,1 vs. 0,3 mg L ⁻¹	- 44,03	< 0,0009
0,1 vs. 0,5 mg L ⁻¹	- 140	< 0,0001
0,3 vs. 0,5 mg L ⁻¹	- 96	< 0,0001

Il numero di germogli per espianto è risultato fortemente dipendente dal dosaggio di zeatina utilizzato

Il fitormone zeatina e il tasso di moltiplicazione degli espianti di *V. myrtillus*

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

Aumentando il dosaggio di zeatina la qualità dei germogli non migliora. Il dosaggio di 0,5 mg/l è risultato eccessivo e ha comportato fenomeni di **vitrescenza** oltre il 40%.



1 cm

Tasso di radicazione di *V. myrtillus*



Radicazione valutata dopo 8 settimane in cubetti 80%
fibra di cocco 20% terriccio
1987 piantine su 2400 presentavano
radici

Tasso di radicazione \approx 80%

Radicazione valutata dopo 8 settimane in cilindri
paperpot con torba e perlite
1743 piantine su 2400 presentavano
radici

Tasso di radicazione \approx 73%

Un protocollo di sterilizzazione per gli espianti di *C. columna*



- In primavera, prelevare segmenti internodali verdi con singole gemme
- Lavare gli internodi in acqua demineralizzata sterile
- Sterilizzare in etanolo
- Sterilizzare in ipoclorito
- Lavare gli espianti con acqua demineralizzata sterile
- Trasferire gli espianti nel terreno di coltura

Resa del protocollo: **il 35% degli espianti risulta pulito e vitale**

Conclusioni e prospettive future



- L'utilizzo della micropropagazione per moltiplicare specie spontanee a rischio come *V. myrtillus* rappresenta una risorsa importante:
 - Ottenimento di un elevato numero di individui dalle caratteristiche note per ripopolare aree danneggiate
 - Impiego di materiale micropropagato per studi di espressione genica
- Lo sviluppo di un protocollo di micropropagazione per *C. colurna* potrebbe facilitare gli studi di compatibilità nesto/portainnesto con le principali cultivar e consentire la produzione su larga scala di piante innestate certificate.