

Propagazione *in vitro* di *Olea europaea* subsp. *oleaster*: ricorso a microtalee da semenzali

A. CHIAPPETTA, C. GAGLIARDI, M. TRIPEPI, L. BERNARDO e M.B. BITONTI

ABSTRACT - *In vitro propagation of Olea europaea subsp. oleaster: the use of microcutting by seedlings* - A regeneration protocol has been adapted to *Olea europaea* subsp. *oleaster* using seedlings as explant source. Different culture media have been tested, thus selecting suitable conditions for producing rooted propagated plantlets, successfully transferred in open field.

Key words: germinazione, micropropagazione, oleastro, zeatina

*Ricevuto il 20 Gennaio 2010
Accettato il 10 Febbraio 2010*

INTRODUZIONE

L'olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) è una delle piante arboree più antiche e diffuse nel bacino del Mediterraneo.

Nel corso dei tempi l'areale di distribuzione dell'olivo è stato fortemente influenzato dagli spostamenti umani ed oggi risulta molto vasto grazie alla sua capacità di adattamento ad ambienti con caratteristiche pedoclimatiche molto diverse quali, ad esempio, lunghi periodi di carenza idrica, alte temperature ed elevati livelli di irraggiamento, tipici degli ambienti mediterranei. Questi ultimi costituiscono, infatti, un'area di "élite" per la sua coltivazione, rappresentandone circa il 90% della superficie mondiale (TERRAL, ARNOLD-SIMARD, 1996).

Olea europaea L., e più in particolare la sottospecie spontanea, *Olea europaea* L. subsp. *oleaster*, più comunemente nota come "oleastro", ha un'elevata capacità di tollerare la carenza idrica mediante adattamenti anatomici, morfologici, fisiologici e biochimici. Questi adattamenti si manifestano con un elevato grado di sclerofillia, foglie piccole, presenza di peli stellati, elevata densità stomatica solo sulla pagina inferiore, vasi xilematici piccoli e numerosi, efficiente capacità dell'apparato radicale di esplorare velocemente il suolo a disposizione, ed infine una crescita lenta della porzione epigea rispetto all'apparato radicale (DICHIO *et al.*, 2002). L'oleastro, allo stato spontaneo, occupa nicchie precluse alle coltivazioni, quali falesie e pendii rocciosi oppure ex coltivi terrazzati; di fatto, in alcune regioni, tra cui Sardegna, Puglia e Calabria, costituisce una compo-

nente importante della macchia mediterranea (AA.VV., 1996). In agricoltura, inoltre, l'oleastro è usato come porta-innesto per le tante varietà coltivate di olivo, proprio perché, in virtù delle caratteristiche sopra dette, si adatta a condizioni di forte aridità, specialmente nei primi anni dell'impianto, quando l'apparato radicale fittonante permette un'esplorazione più profonda del terreno.

Attualmente l'interesse per l'olivo si è esteso su scala mondiale, non solo in relazione ad aspetti socio-economici, ambientali e paesaggistici, ma soprattutto in virtù dalle caratteristiche salutistiche e nutrizionali dell'olio d'oliva che si estrae dai frutti delle sue numerose cultivars. Risulta pertanto di interesse l'elaborazione di tecniche volte alla produzione in massa di piante di qualità. In tale ottica un valido aiuto è dato dalle tecniche di propagazione *in vitro*. A tutt'oggi, comunque, i progressi raggiunti nella micropropagazione dell'olivo sono piuttosto modesti rispetto a quelli ottenuti per altre piante da frutto ed hanno riguardato esclusivamente le varietà coltivate (SHIBLI *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; LEVA *et al.*, 2004).

Considerata l'importanza del porta-innesto sull'adattamento pedoclimatico della pianta, sulla sua vigoria, nonché sulla capacità di assorbimento di particolari principi attivi, il presente lavoro ha riguardato l'individuazione di efficienti protocolli sperimentali volti ad ottimizzarne la germinabilità dei semi e consentire la crescita *in vitro* dell'oleastro a partire da microtalee ottenute da semenzali.

MATERIALE E METODI

Germinazione dei semi

La capacità germinativa è stata testata su mezzo di coltura, utilizzando semi (n= 500) di *Olea europaea* L. subsp. *europaea* varietà *sylvestris*, raccolti presso la località "Pietra del Demanio" a Civita, in provincia di Cosenza nel mese di Marzo 2007. Di questi semi, una parte è stata opportunamente sterilizzata e posta immediatamente in coltura, i restanti hanno invece subito un trattamento di vernalizzazione a 4 °C e 10 °C per 1, 3 e 4 settimane e sono stati poi sterilizzati e posti in coltura (VOYIATZIS, 1995).

Per la messa in coltura, i semi, opportunamente privati dell'endocarpo legnoso, sono stati imbibiti per 2 giorni sotto acqua corrente. Successivamente, sono stati sterilizzati con EtOH 70% per 1min ed NaOCl 5% per 12min addizionato di Tween20 0,1%, lavati abbondantemente con acqua distillata sterile ed infine trattati con una miscela biostatica, il "Plant Preservative Mixture" (PPM, Sigma, Italia) 1,5% (v/v) addizionata di 50 mg/l di sali di magnesio. Il trattamento con il PPM è stato condotto in agitazione continua per 7 ore e successivamente è stato aggiunto al mezzo di coltura alla concentrazione 0,1% (v/v).

Infine i semi sono stati posti in coltura su differenti substrati. Per la germinazione sono stati utilizzati tubi pyrex del diametro di 25mm ed altezza di 150mm contenenti 15ml di substrato. In ogni tubo è stato posto a germinare un solo seme.

I substrati usati per la germinazione sono riportati in Tab. 1 e sono stati arricchiti o meno di regolatori di crescita quali l'acido a Naftalenacetico (NAA), la Kinetina e l'acido gibberellico (GA₃). I semi sono stati quindi trasferiti in una camera di crescita alla temperatura di 24 °C ed un fotoperiodo pari a 16 h di luce ed 8 h di buio. I campioni sono stati trasferiti su substrato fresco ogni 3 settimane, fino alla germinazione.

TABELLA 1

Composizione dei terreni di coltura testati per la germinazione dei semi di oleastro.

Composition of culture media used for the germination of oleaster seeds.

	A	T1	T2
Substrato di coltura	acqua	1/2 MS	MS
NAA (µM)	-	5,37	0,27
Kinetina (µM)	-	-	13,95
GA ₃ (µM)	-	-	5,78
Saccarosio(g/l)	-	0,2	30
Bacto-agar (%)	0,7	-	-
agar (%)	-	0,7	0,7
pH	5,8	5,8	5,7

Crescita e propagazione delle plantule

Le plantule (n= 100) ottenute dalla germinazione dei semi sono state quindi trasferite in beute da 250ml contenenti 25ml di substrato differente arricchito o

meno di zeatina (Tab. 2). Le plantule, due per beuta, sono state mantenute sempre in camera di crescita alla temperatura di 24 °C con medesimo fotoperiodo di cui sopra per 2 mesi, nel corso dei quali ne è stata monitorata la ripresa vegetativa.

Da queste plantule sono state prelevate, sotto cappa a flusso laminare, delle microtalee uninodali (n= 220) che sono state poste a crescere sui substrati MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) ed OR (RUGINI *et al.*, 1993) ed hanno costituito il materiale di partenza per le subcolture. Sono state effettuate cinque subcolture ogni 45 giorni.

TABELLA 2

Composizione dei terreni di coltura testati per la crescita "in vitro" delle plantule e delle microtalee di oleastro.

Composition of culture media used for "in vitro" growth of oleaster seedlings and microcuttings.

	MSZ	ORZ	MS	OR
Substrato di coltura	1/2 MS	OR	1/2 MS	OR
zeatina (µM)	22,8	22,8	-	-
mannitolo (g/l)	30	30	30	30
Bacto-agar (%)	0,8	0,8	0,8	0,8
pH	5,8	5,8	5,8	5,8

RISULTATI

Effetti della vernalizzazione sulla germinazione dei semi

Per i semi non vernalizzati la germinazione è avvenuta solo dopo 60 giorni dalla messa in coltura con una percentuale di germinati pari al 46% ± 3 (Tab. 3)

Per quanto riguarda i trattamenti di vernalizzazione, i risultati ottenuti sono stati, invece, piuttosto interessanti. In questo caso, infatti, si è registrato un significativo incremento della percentuale di semi germinati dopo solo 15 giorni dalla messa in coltura che è risultata essere del 68% ± 3, per i trattamenti condotti per 3 e 4 settimane, indipendentemente dalla temperatura di vernalizzazione utilizzata. I trattamenti condotti per 1 settimana non hanno indotto alcun effetto (Tab. 3). Dopo circa 1 mese dalla germinazione, gli embrioni si presentavano distaccati dal resto dell'endosperma, con i due cotiledoni espansi e di colore verde intenso (Fig. 1).

Prolungamenti della messa in coltura non hanno portato ad aumenti delle percentuali di germinazione nel campione di semi analizzato. I risultati ottenuti suggeriscono quindi che i trattamenti di vernalizzazione piuttosto che la composizione dei substrati usati hanno avuto effetti promotori sulla germinazione dei semi di oleastro (Tab. 3).

Dopo 30 giorni dalla messa in coltura sui substrati di germinazione, le giovani plantule sono state trasferite su diversi substrati di crescita: MS ed OR, privi di zeatina, ed MSZ ed ORZ contenenti zeatina.

Le plantule trasferite dal substrato di germinazione sui substrati privi di zeatina non hanno manifestato alcuna ripresa vegetativa, mentre quelle trasferite sui substrati MSZ ed ORZ hanno avuto una ripresa vegetativa molto rapida. Infatti, dopo 7 giorni dal

TABELLA 3

Percentuali finali e tempi di germinazione di semi di oleastro cresciuti su diversi substrati (A, T1, T2) e sottoposti a vernalizzazione a 4 °C e 10 °C per 1, 3 e 4 settimane. Percentages of germination of oleaster seeds grown on different media (A, T1, T2) and pre-treated at 4 °C and 10 °C for 1, 3 and 4 weeks.

Substrato	% max semi germinati	giorni dalla messa in coltura
A	46±2	60±1
A+V1 ₁	45±2	61±2
A+V1 ₃	68±3	15±2
A+V1 ₄	69±2	15±1
A+V2 ₁	46±4	60±2
A+V2 _{3/4}	68±2	15±1
A+V1 ₄	67±2	16±1
T1	45±3	64±2
T1+V1 ₁	48±2	58±1
T1+V1 ₃	68±2	15±2
T1+V1 ₄	66±3	16±1
T1+V2 ₁	48±1	59±21
T1+V2 ₃	69±2	15±2
T1+V2 ₄	70±3	18±3
T2	46±3	61±2
T2+V1 ₁	48±2	60±1
T2+V1 ₃	70±3	20±3
T2+V1 ₄	68±3	16±2
T2+V2 ₁	47±2	63±1
T2+V2 ₃	68±3	18±3
T2+V2 ₄	66±2	15±2

La composizione dei substrati A, T1, T2 è riportata in Tab. 1
 V1₁- V1₃- V1₄: vernalizzazione a 4 °C per 1-3-4 settimane rispettivamente;
 V2₁- V2₃- V2₄: vernalizzazione a 10 °C per 1-3-4 settimane rispettivamente.

I risultati riportati rappresentano la media di due differenti esperimenti. L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il programma StatWork.

trasferimento delle giovani plantule si è assistito alla formazione di nuove foglie nell'84% delle plantule e la formazione di 3,2±0,7 nodi entro 3 settimane dal trasferimento. In queste condizioni di crescita, tutte le plantule hanno però manifestato la formazione di callo alla base del fusto dopo circa 20 giorni.

Effetti dei terreni di coltura testati sulla crescita delle microtalee

Al fine di ottenere dei cloni, dalle plantule allevate sui substrati MSZ ed ORZ sono state prelevate delle microtalee uninodali che sono state trasferite sui substrati MS ed OR, privi di zeatina. Come riportato in Tab. 4 le microtalee hanno manifestato un'apprezzabile e simile attività vegetativa su entrambi i nuovi substrati selezionati. E' interessante sottolineare che i substrati selezionati hanno determinato anche l'induzione di rizogenesi avventizia dopo circa 45 giorni (Fig. 2a). In nessun caso sono stati registrati sintomi di vitrificazione dei campioni.

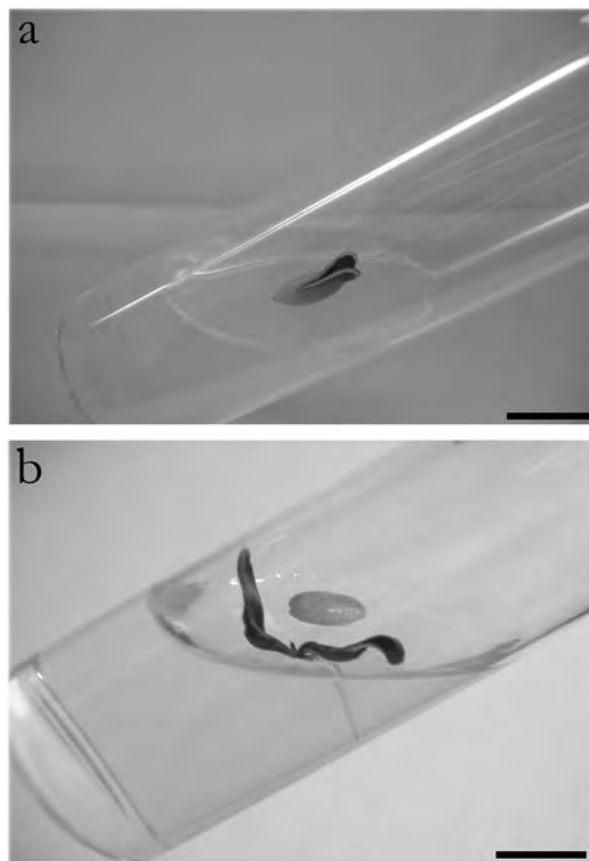


Fig. 1

Semi di *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* vernalizzati a 4 °C per 3 settimane e posti a germinare sul substrato A costituito da acqua sterile, 0,7% Bacto-agar, pH 5,8. a) dopo 15 giorni dalla messa in coltura; b) dopo 30 giorni dalla messa in coltura. a: bar = 1 cm; b: bar = 1,2 cm.

Olea europaea L. subsp. *oleaster* seeds vernalized at 4 °C for 3 weeks and induced to bud on A growth medium composed by water sterile, 0,7% Bacto-agar, pH 5,8. a) after 15 days; b) after 30 days. a: bar = 1 cm; b: bar = 1,2 cm.

Le plantule così ottenute sono state utilizzate per le successive subculture. Infine, alcuni dei cloni ottenuti mediante coltura *in vitro* sono stati trasferiti in serra per la fase di acclimatazione con ottimi risultati (Fig. 2b).

DISCUSSIONE

Sebbene la propagazione *in vitro* delle specie vegetali arboree abbia fatto notevoli progressi nel corso degli ultimi sessant'anni, restano, ancora, piuttosto modesti quelli riguardanti una specie agronomicamente e paesaggisticamente rilevante come l'olivo. I dati riportati in letteratura riguardano, inoltre, la propagazione *in vitro* di diverse cultivars (RUGINI, 1984; RUGINI, LAVEE, 1992; BRICCOLI-BATI *et al.*, 1999; LEVA *et al.*, 2004), mentre mancano a tutt'oggi dati relativi all'oleastro che, come precedentemente detto, oltre ad essere componente essenziale della macchia mediterranea, è usato in agricoltura come portainnesto per le tante varietà coltivate di olivo. Il pre-

TABELLA 4

Parametri morfometrici delle microtalee di oleastro cresciute sui substrati MS ed OR per 2 mesi.

Morphometric parameter of oleaster microcuttings grown on MS and OR medium for 2 month.

Substrato di coltura	n° piante	altezza (cm)	n° nodi pianta	Lunghezza 1° internodo (cm)	Lunghezza internodi successivi (cm)	n° radici	Lunghezza foglia adulta (mm)
MS	70	10,6±1,0	3,5±0,9	1,9±0,05	2,1±0,7	1,1±0,05	12,2±0,8
OR	76	15,5±1,1	3,5±1,3	2,5±0,1	3,0±0,9	1,4±0,08	15,1±1,0

I risultati riportati rappresentano la media di tre differenti esperimenti. L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il programma StatWork.

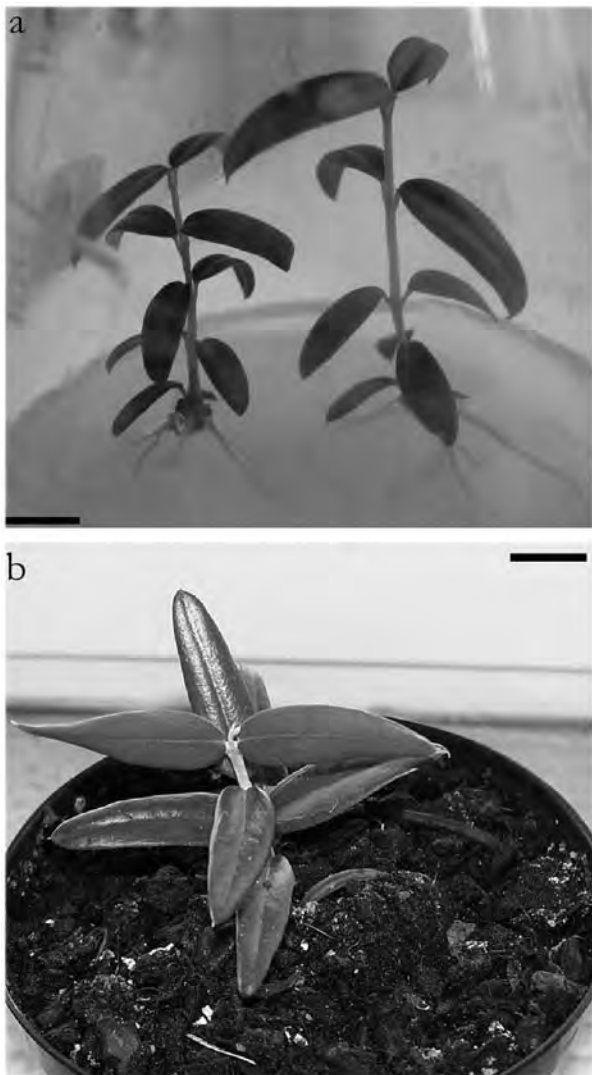


Fig. 2

Plantule di *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* propagate da microtalee uninodali. a) dopo 2 mesi su terreno OR; b) dopo 3 mesi dal trasferimento in serra. a: bar= 5 mm; b: bar= 4,5 mm.

Olea europaea L. subsp. *oleaster* plantlets spreaded by single node microset. a) after 2 month on OR medium; b) after 3 month of acclimatation in a greenhouse. a: bar= 5 mm; b: bar= 4,5 mm.

sente lavoro fornisce un contributo in tale direzione, poiché è volto all'ottimizzazione di un metodo per la propagazione *in vitro* dell'oleastro, utilizzando talee uninodali espiantate da plantule ottenute da seme.

Si sono, pertanto, preliminarmente, testate le condizioni più idonee per la germinazione dei semi che hanno incluso anche una fase di vernalizzazione. Considerato che la ripresa vegetativa di un espianto, oltre che da fattori genetici e fisiologici, è fortemente influenzata dalla composizione del mezzo di coltura, sono stati indagati anche gli effetti di due diversi terreni di coltura, ampiamente utilizzati per la propagazione *in vitro* dell'olivo, sulla ripresa vegetativa e sulla capacità di radicazione delle talee di oleastro, valutando, in particolare, gli effetti indotti dalla zeatina (RUGINI, 1986; MENCUCCHINI, 1995; ROKBA *et al.*, 2000).

I risultati ottenuti confermano che, come per le forme coltivate, anche nel caso dell'oleastro la zeatina applicata per un breve periodo favorisce rapidamente la ripresa vegetativa. Degna di rilievo è la scelta della composizione ormonale risultata efficace nell'indurre un'adeguata radicazione delle talee, essendo la fase di rizogenesi alquanto critica per la propagazione *in vitro* delle specie arboree.

I substrati di crescita da noi utilizzati per le propagazione *in vitro* delle microtalee sembrano, inoltre, offrire il giusto apporto di nutrienti a questa specie, considerato che su entrambi i substrati le plantule hanno manifestato una rapida ripresa vegetativa ed un fenotipo simile per quanto riguardava il numero di nodi sviluppati e di radici prodotte. Unica interessante differenza è il maggiore sviluppo in lunghezza della foglia nelle plantule cresciute sul substrato OR, mezzo di coltura ampiamente utilizzato per la micropropagazione di olivo. Un'ulteriore conferma dell'adeguato apporto nutrizionale offerto dai substrati da noi scelti è data dal fatto che in tutti i casi considerati non abbiamo mai registrato sintomi di vitrificazione. È noto, ad esempio, che in pesco tale evento dipende dall'elevata concentrazione di nitrati d'ammonio nel substrato di crescita (ZRYD, 1988).

In conclusione, il protocollo proposto permette di ottenere, a partire da microtalee prelevate da sementali di oleastro e ripetute subculture, cloni in grado di radicare e manifestare una soddisfacente ripresa vegetativa. Ne conseguono concrete prospettive per

una rapida propagazione vegetativa di tale essenza su larga scala, in vivaio, funzionale al suo utilizzo non solo come porta-innesto, ma anche per azioni di reimpianto sia a protezione dei coltivi che in interventi di riqualificazione naturalistica di ambienti degradati. In tale ottica, la scelta di utilizzare dei semenzali e non talee prelevate da piante adulte sottende all'ottenimento di più cloni tra loro diversi, in modo da preservare la variabilità genetica garantita dal seme e non impoverire la sopravvivenza e la naturale evoluzione delle eventuali popolazioni trapiantate in habitat in continuo cambiamento.

Ringraziamenti - Tale ricerca è stata supportata da un finanziamento erogato dall'Ente Provincia di Cosenza-Assessorato all'Ambiente, nell'ambito di un protocollo d'intesa con il dipartimento di Ecologia dell'Unical (Responsabile scientifico: prof. M.B. Bitonti). Per lo svolgimento del lavoro la dott.ssa C. Gagliardi ha fruito di una borsa di studio per tirocinio di ricerca extraregionale (Programma Integrato di Voucher e Borse per l'Alta Formazione- POR Calabria) erogato dalla Regione Calabria.

LETTERATURA CITATA

- AA.VV., 1996 - *Enciclopedia Agraria Italiana*, Ramo editoriale degli Agricoltori, VIII: 298-324.
- BRICCOLI BATI C., FODALE A., MULE' R., TROMBINO T., 1999 - *Trials to increase in vitro rooting of Olea europaea L. cuttings*. Acta Hort., 474: 91-94.
- DICHIO B., ROMANO M., NUZZO V., XILOYANNIS C., 2002 - *Soil water availability and relationship between canopy and roots in young olive trees (cv Coratina)*. Acta Hort., 586: 255-258.
- KHAN M.R., RASHID H., QURAIISHI A., 2002 - *In vitro shoot development from juvenile cutting of field-grown olive (Olea europaea L.) cv. Leccino*. Bio Sci., 2: 438-440.
- LEVA A.R., PETRUCCCELLI R., POLSINELLI L., 2004 - *In vitro propagation from the laboratory to the production line*. Olivae, 101: 18-26.
- MENCUCINI M., 1995 - *Micropropagazione e miglioramento genetico in vitro dell'olivo: stato dell'arte e prospettive future*. Frutticoltura, 12: 73-82.
- MURASHIGE T., SKOOG F.A., 1962 - *Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 154: 73-479.
- ROKBA Z.A., LOXOU V.K., LIONAKIS S.M., 2000 - *Regeneration of olive (Olea europaea L.) in vitro*. 1st Meeting "Developmental biology of regeneration". 12-15 oct. 2000, Geisenheim: 25-26.
- RUGINI E., 1984 - *In vitro propagation of some olive (Olea europaea sativa L.) cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from*

- developing shoots and embryos*. Sci. Hort., 24: 123-134.
- , 1986 - *Olive (Olea europaea L.)*. In: BAJAJ YPS. (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*. Trees I, 5: 253-267. Berlin, Springer-Verlag.
- RUGINI E., JACOBONI A., LUPPINO M., 1993 - *Role of basal darkening and exogenous putrescine treatments on in vitro rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species*. Sci. Hort., 53: 63-72.
- RUGINI E., LAVEE S., 1992 - *Olive*. In: HAMMERSCHLAG F.A., LITZ R.E. (Eds), *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB, Wallingford, UK. 371-382 pp.
- SANTOS C.V., BRITO G., PINTO G., FONSECA H.M.A.C., 2003 - *In vitro plantlet regeneration of Olea europaea spp. maderensis*. Sci Hort., 97: 83-87.
- SHIBLI R.A., SHATNAWI M., EIN A., AL-JUBOORY K.H., 2001 - *Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' olive (Olea europaea L.)*. Sci Hort., 88: 243-256.
- VOYIATZIS D.G., 1995 - *Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature*. Physiologia Plantarum, 95: 444-448.
- TERRAL J.F., ARNOLD-SIMARD G., 1996 - *Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes*. Quatern. Res., 46: 176-185.
- ZRYD J.P., 1988 - *Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques*. Lausanne, Suisse: Presses Polytechnique Romandes Ed. Tech & Doc Diffusion. 305 pp.

RIASSUNTO - L'olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) è una delle piante arboree coltivate più antiche e diffuse nel bacino del Mediterraneo. Attualmente l'interesse per questa sottospecie si è esteso su scala mondiale, sia per il suo valore economico, ambientale e paesaggistico che per le caratteristiche salutistiche e nutrizionali dei suoi prodotti: olio di oliva ed olive da tavola. Risulta pertanto di interesse l'elaborazione di tecniche volte alla produzione in massa di piante di qualità. In tale ottica un valido aiuto è dato dalle tecniche di propagazione *in vitro*. Nel presente lavoro si sono voluti mettere a punto dei protocolli sperimentali idonei ad ottimizzarne la germinabilità dei semi e consentire la propagazione *in vitro* di *Olea europaea* subsp. *oleaster* conosciuto anche come oleastro. L'oleastro è infatti spesso usato come porta-innesto per le numerose cultivar di olivo e dalle sue caratteristiche dipendono l'adattamento pedoclimatico della pianta, la sua vigoria e soprattutto la capacità di assorbimento dei nutrienti. In particolare, a partire da microtalee prelevate da semenzali di oleastro e ripetuti cicli di subculture, sono stati ottenuti cloni in grado di radicare e manifestare una soddisfacente ripresa vegetativa. Ne conseguono concrete prospettive per una rapida propagazione vegetativa di tale essenza su larga scala, in vivaio, funzionale al suo utilizzo non solo come porta-innesto, ma anche per azioni di reimpianto sia a protezione dei coltivi che in interventi di riqualificazione naturalistica di ambienti degradati.

AUTORI

Adriana Chiappetta, Cinzia Gagliardi, Manuela Tripepi, Liliana Bernardo, Maria Beatrice Bitonti, Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (Cosenza); e-mail per la corrispondenza a.chiappetta@unical.it