

# UnissResearch

---



Rigoldi, Maria Pia; Satta, Daniela (2009) *Propagazione in vitro di alcuni cloni di mirto della Sardegna meridionale*. Italian Journal of Agronomy, Vol. 4 (4 Suppl.), p. 753-758. ISSN 1125-4718.

<http://eprints.uniss.it/3711/>



# **Italian Journal of Agronomy** **Rivista di Agronomia**

*An International Journal of Agroecosystem Management*

III Convegno nazionale “Piante Mediterranee”  
27 settembre – 1 ottobre 2006  
Fiera del Levante, Bari, Italia



Università degli Studi di Bari  
Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali

## **Le piante mediterranee nelle scelte strategiche per l'agricoltura e l'ambiente**

a cura di  
Giuseppe De Mastro

## Propagazione in vitro di alcuni cloni di mirto della Sardegna meridionale

### *In Vitro Propagation of Some Myrtle Clones from Southern Sardinia*

M.P. Rigoldi<sup>1</sup>, D. Satta<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consorzio Provinciale per la Frutticoltura di Sassari, Viale Adua 2/c, 07100 Sassari, Italia

<sup>2</sup> Centro Regionale Agrario Sperim. sez. di Sassari, loc. Bonassai, 07040 Olmedo (SS), Italia

#### Riassunto

Il mirto (*Myrtus communis* L.) è una specie tipica della macchia mediterranea, ampiamente diffusa in Sardegna. L'attuale interesse alla coltivazione di questa specie è giustificato dall'aumento della domanda di bacche e di foglie, da parte dell'industria di trasformazione, per la produzione del tipico liquore. Vista la notevole variabilità dei diversi biotipi nella risposta alla moltiplicazione per talea, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'attitudine alla micropropagazione di cinque cloni di mirto selezionati nella Sardegna meridionale.

Sono stati saggiate tre substrati di moltiplicazione in vitro, per i quali è stato calcolato il coefficiente di proliferazione per ciascun clone, e quattro substrati di radicazione in vitro per ciascuno dei cinque cloni. Sono state inoltre effettuate prove di acclimatazione in cella climatica, con diversi tipi di radiazione luminosa, e in serra in differenti periodi dell'anno.

In base ai coefficienti di proliferazione si è potuto identificare, per ogni singolo clone, il substrato di moltiplicazione più adatto.

Per quanto riguarda la radicazione, i risultati ottenuti sui quattro substrati sono stati elaborati con il programma statistico SAS, individuando il substrato più idoneo per ogni clone.

Le osservazioni effettuate in fase di acclimatazione hanno evidenziato la necessità di utilizzare un ambiente controllato (cella o serra) al fine di garantire un'efficace sopravvivenza delle piantine nel passaggio dal *in vitro* al *vivo*.

#### Abstract

Myrtle (*Myrtus communis* L.) is a typical Mediterranean bush species, very spread in Sardinia.

Present interest in cultivating that species is caused by the increasing demand for berries and leaves to produce the typical liqueur. Due to the high variability of biotypes in response to cutting multiplication, the objective of that paper was to evaluate five south-Sardinian myrtle clones for their micropropagation aptitude. For each clone, three multiplication media and four rooting media were tested; during multiplication, proliferation rate of each clone on each medium was also calculated. Moreover, acclimatization tests were carried out, either in growth chamber (with different types of light radiation), or in green-house (in different periods of the year).

Based on proliferation rates, the most suitable multiplication medium was selected for each clone. As to rooting, data were analysed with SAS software, providing the most suitable rooting medium for each clone. Observations during acclimatization trials pointed out the requirement of a conditioned environment (either growth chamber or green-house) in allowing an effective survival of plantlets from *in vitro* to *in vivo* conditions.

*Parole chiave:* Mirto, micropropagazione, clone.

*Key words:* Myrtle, micropropagation, clone.

#### Introduzione

Il mirto (*Myrtus communis* L.) è utilizzato, fin dall'antichità, come pianta aromatica e medicinale, ricca di olii essenziali sia nelle foglie che nelle bacche, prevalentemente utilizzate per la produzione di liquore.

Le forti prospettive di sviluppo del mercato liquoristico pongono l'accento sulla scarsa disponibilità di bacche derivanti dalla raccolta spontanea e generano il problema biologico e naturalistico della raccolta indiscriminata di enormi quantità di semi spontanei, fondamento per la

biodiversità della specie e in generale dell'intero ecosistema. La soluzione del problema è, quindi, raggiungibile con la coltivazione industriale degli individui, ottenuti in seguito a selezione massale, secondo le tecniche usuali per la frutticoltura industriale, senza intaccare il germoplasma naturale della specie.

La raccolta delle bacche dalle piantagioni spontanee, ha raggiunto dimensioni tali che, al fine di garantire la sicurezza degli approvvigionamenti di materia prima, si sta assistendo alla realizzazione d'impianti per la coltivazione intensiva di questa specie. In Sardegna si registrano già alcuni impianti per la coltivazione, ed è sempre più crescente la tendenza all'espansione della superficie coltivata. Importante, a tal proposito, è la scelta del materiale di propagazione che, se non selezionato e con caratteristiche agronomiche non conosciute, potrebbe vanificare i vantaggi della coltivazione intensiva di questa specie (Mulas, 2004).

È noto che la propagazione agamica presenta dei vantaggi in termini di precocità di sviluppo vegetativo e di messa a frutto rispetto a quella per seme (Mulas, 2001), pertanto risulta fondamentale lo studio delle tecniche di moltiplicazione del mirto. Tra di esse la micropropagazione è stata già applicata con successo a questa specie (Cadinu et al., 1998; Frau et al., 2001; Rigoldi et al., 2004) e, in considerazione del fatto che i diversi biotipi di mirto presentano una notevole variabilità nella risposta alla propagazione per talea, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la risposta alla coltivazione in vitro di cinque cloni selezionati nella Sardegna meridionale.

### **Materiali e metodi**

Per ognuno dei cinque cloni utilizzati (Tab. 1) sono stati prelevati, nel maggio del 2004, circa 60 apici vegetativi di germogli erbacei provenienti dalla collezione clonale del C.R.A.S. ubicata presso l'azienda di Uta.

Gli espianti sono stati sterilizzati per 8' con una soluzione allo 0,5% di cloro attivo, 4' con etanolo al 70% e con 3 risciacqui in acqua sterile. Sono stati poi posti in provette con substrato di sviluppo (Tab. 1) (Frau et al.) e incubati in camera di crescita a  $21 \pm 1$  °C di temperatura, con luce fredda ad intensità luminosa di 20 W/m<sup>2</sup> e con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

I germogli hanno raggiunto lo sviluppo in 10-12 settimane, dopo le quali sono stati trasferiti sul substrato di moltiplicazione denominato I (Frau et al.). Questo è stato messo a confronto (Tab. 2) con i substrati II e III (quest'ultimo anche con la sua variante IIIa), riunendo i germogli ottenuti in barattoli di vetro. La disomogeneità numerica dei germogli posti in moltiplicazione, non ha consentito la realizzazione di una elaborazione statistica dei dati, quindi ci si è limitati a valutare il coefficiente di proliferazione per ciascun clone per 6 subcolture, intervallate l'una dall'altra di circa 40 giorni.

Per ogni clone sono stati testati 4 substrati di radicazione (Tab. 3). Sono state effettuate 4 replicazioni, da 15 piantine ciascuna, per ogni substrato per ogni clone e la percentuale di radicazione è stata rilevata dopo 4 e dopo 6 settimane.

Per l'analisi statistica i valori percentuali sono stati trasformati mediante la formula arcoseno. È stata effettuata l'analisi della varianza utilizzando il software SAS, applicando il t-test ( $p = 0,05$ ) per il confronto fra le medie.

Le plantule radicate in vitro sono state trapiantate su terriccio costituito da torba neutra, con 85% di sostanza organica e pH compreso fra 5 e 6, sottoposte a trattamento fungicida con Carbendazim, coperte con film plastico e periodicamente irrigate a partire dal secondo giorno dal trapianto. Le prove di acclimatazione sono state effettuate sia in serra fredda che in camera di crescita. In serra le piantine sono state trapiantate in plateaux di polietilene, su bancale coperto da tunnel di film plastico, in tre periodi dell'anno compresi fra fine gennaio e aprile. In questo ambiente non condizionato tutti i cloni sono risultati essere molto sensibili agli sbalzi termici, così come sono risultati sensibili alla disidratazione su bancali coperti all'interno della camera di crescita ( $21 \pm$  °C di temperatura, fotoperiodo 16 ore di luce e 8 di buio). Si è effettuata allora una prova di acclimatazione in camera di crescita in vasetti di polietilene ( $\varnothing$  6,5 cm) protetti individualmente da bustine di plastica, in questo contesto si sono utilizzati anche due tipi di

lampade: quelle a luce fredda (con il picco della lunghezza d'onda nel blu-violetto e intensità luminosa di 20 W/m<sup>2</sup>), e quelle a luce fotosintetica (con il picco della lunghezza d'onda nel rosso e intensità 77 W/m<sup>2</sup>). Dopo un mese di permanenza in acclimatazione, è stata calcolata la percentuale di sopravvivenza per ogni clone sotto i due diversi tipi di illuminazione.

## Risultati

Il coefficiente di proliferazione (rapporto tra numero di germogli ottenuti e numero iniziale), è stato calcolato per ciascun clone su ciascun substrato nel corso delle 6 subcolture (Tab. 4).

Tutti e cinque i cloni hanno mostrato una buona risposta alla moltiplicazione, ottenendo un coefficiente di proliferazione medio sempre oltre il valore 2; il clone che ha dato risultati migliori è stato il n. 7, che si è attestato ad un valore medio pari a 2,95, mentre il più costante è stato il clone 5, che ha dato valori superiori a 2 in tutte e tre le combinazioni clone-substrato.

Per quanto riguarda i substrati di moltiplicazione (Tab. 2), la presenza del PVP nei terreni di moltiplicazione I e II è sembrata avere un'azione rallentante della moltiplicazione, in particolare se abbinata alla componente ormonale della sola BA (substrato II, che ha raggiunto il valore medio più basso); si è stabilito quindi di utilizzare il PVP solo nella fase di sviluppo, come antiossidante per contrastare l'abbondante produzione di fenoli in quella fase della coltura *in vitro*.

Il substrato I, contenente sia IAA che BA alla concentrazione di 1 mg/lit, ha dato un discreto coefficiente di moltiplicazione medio, ma ha causato la produzione di molto callo e di tessuti vitrificati nel corso di tutte le subcolture. Il substrato III, contenente solo BA a concentrazione inferiore, ha dato i migliori risultati sia in termini di moltiplicazione che di qualità del materiale. In particolare, per i cloni 2 e 6 la variante denominata IIIa (con concentrazione 0,4 mg/lit di BA anziché 0,7 mg/lit), ha consentito, a parità di tasso di moltiplicazione, la produzione di materiale esente da vitrificazione.

Nella prova di radicazione il disegno sperimentale ha considerato, nell'influenzare la percentuale di radicazione, l'effetto dei fattori clone, substrato e interazione clone-substrato. Le osservazioni sono state fatte in due tempi, dopo 4 e dopo 6 settimane, vista la scalarità di radicazione caratterizzante il mirto allevato *in vitro*.

I risultati ottenuti con l'analisi della varianza (Tabb. 5 e 6) hanno evidenziato che il fattore substrato non ha avuto effetto significativo né dopo 4 né dopo 6 settimane. Sono risultati invece significativi gli effetti del clone ( $p < 0,01$  dopo entrambi i periodi di permanenza *in vitro*) e dell'interazione clone-substrato ( $p < 0,01$  dopo 4 settimane;  $p < 0,05$  dopo 6 settimane). Nelle figure, i valori con la stessa lettera non sono significativamente differenti per  $p \leq 0,05$ .

Dopo 4 settimane, i cloni 6 e 7 sono quelli che hanno radicato di meno (Fig. 1), con percentuali di radicazione non significativamente diverse fra loro (rispettivamente di 37,1% e 49,1%). Non diverse statisticamente fra di loro sono state anche le percentuali di radicazione dei cloni 1 e 2 (79,7% e 74,0%), mentre il clone 5 ha dato i risultati migliori, con media significativamente diversa anche dai cloni 1 e 2 (91,5%).

Dopo 6 settimane, il clone 7 ha mostrato un forte incremento nella radicazione (87,4%), per cui ha raggiunto lo stesso livello di significatività dei cloni 1 e 2 (91,5% e 93,6), mentre i cloni 6 e 5 sono rimasti sempre rispettivamente all'ultimo (59,6%) e al primo posto (98,3%).

L'interazione clone-substrato, riportata nella Figura 2, ha messo in evidenza che, dopo 4 settimane, i substrati A e B sono risultati adatti alla radicazione di tutti i cloni, in particolare sul substrato B il clone 7 ha mostrato un evidente incremento della percentuale di radicazione rispetto alla media (80,5% contro 49,1%).

Il substrato C ha mostrato una differenza significativa fra tutti i cloni, mentre sul substrato D i migliori risultati sono stati ottenuti con il clone 5. Invece, dopo una permanenza di 6 settimane, le differenze fra i cloni all'interno di ciascun substrato si sono appiattite (Fig. 3).

L'acclimatazione ha avuto successo solo in camera di crescita e con copertura individuale delle piantine. La percentuale di sopravvivenza è risultata del 100% ad eccezione dei cloni 1 e 7 la cui percentuale è stata leggermente più bassa (Tab. 7).

### Conclusioni

Lo studio sulla messa a punto del protocollo di micropropagazione dei 5 cloni di mirto in oggetto, ha evidenziato che tutti e cinque i cloni hanno mostrato una buona attitudine alla moltiplicazione in vitro; il substrato di moltiplicazione più adatto è risultato essere l'MS con l'aggiunta di BA in due differenti concentrazioni: 0,7 mg/lt per i cloni 1, 5, 7 e 0,4 mg/lt per gli altri due. Riguardo alla radicazione, le differenze fra i cloni e fra le interazioni substrato-clone, marcate dopo 4 settimane in radicazione, si sono ridotte dopo 6 settimane. Il clone migliore è risultato il n. 5, seguito dai cloni 1 e 2, e poi dai cloni 6 e 7. Tra i substrati di radicazione utilizzati, quello B (contenente 1 mg/lt di IBA e phloroglucinolo) è risultato essere il più adatto nell'interazione con tutti e cinque i cloni di mirto.

I risultati ottenuti indicano che il clone con migliore attitudine alla micropropagazione è stato il clone 5. I cloni 1 e 2 hanno avuto delle performance leggermente inferiori a causa di una minore attitudine alla radicazione, mentre i cloni 6 e 7 hanno mostrato un'attitudine decisamente inferiore a causa di una scarsa capacità rizogena, che però è suscettibile di miglioramento quando le piantine permangono in radicazione per 6 settimane anziché 4. Per quanto riguarda l'acclimatazione, l'utilizzo di vasetti coperti singolarmente in camera di crescita ha dato ottimi risultati ma, per una produzione su larga scala, sarebbe auspicabile l'utilizzo di plateau e di una serra condizionata.

### Ringraziamenti

Si ringrazia l'Istituto d'Istruzione Superiore N. Pellegrini di Sassari, per aver contribuito alla realizzazione delle fasi iniziali del lavoro con l'apporto delle proprie strutture e del personale tecnico.

### Bibliografia

- CADINU M., REPETTO A., BENEVENTI S. 1998. Trattamento induttivo della rizogenesi in piantine di mirto micropropagate. Giornate scientifiche SOI, 1-3 aprile, Sanremo.
- FRAU A., CADINU M., REPETTO A., ZEDDA A. 2001. Micropropagazione di cinque cloni di mirto sardo. *L'Informatore Agrario*, 63 (17): 65-67.
- MULAS M. 2001. Nuove acquisizioni e ricerche per la coltivazione del mirto (*Myrtus communis* L.). *Frutticoltura*, 63 (10): 55-58.
- MULAS M. 2004. Problematiche legate alla coltivazione del mirto. *Italus Hortus*, 11 (4): 308-312.
- RIGOLDI M.P., CANI M.R., CHESSA G., ZURRU R. 2004. Prime valutazioni sulla risposta alla coltura in vitro di cloni di *Myrtus communis*. *Italus Hortus*, 11 (4): 315-317.

Tabella 1. Cloni.

Table 1. Clones.

Clone	Denominazione	Colore della bacca	Provenienza
1	Palmas	Rosso	Palmas Arborea
2	Stella	Rosso	Guspini
5	Neapolis	Rosso	Guspini
6	Architano	Bianco	S.Nicolò Arcidano
7	San Michele	Rosso	Ussana

Tabella 2. Substrati di sviluppo e moltiplicazione.

Table 2. Development and multiplication media.

Ingredienti e pH	Substrato di sviluppo	Substrati di moltiplicazione		
		I	II	III (IIIa)
Macroelementi	MS	MS	MS	MS
Microelementi	MS	MS	MS	MS
Chelati	MS	MS	MS	MS
Vitamine	0,1 mg/lt	MS	MS	MS
Tiamina HCl	100 mg/lt			
Mio-inositolo				
Saccarosio	30 gr/lt	30 gr/lt	30 gr/lt	30 gr/lt
Mio-inositolo	100 mg/lt			
Benziladenina (BA)	1 mg/lt	1 mg/lt	1 mg/lt	0,7mg/lt (0,4 mg/lt)
Acido indolacetico (IAA)	1 mg/lt	1 mg/lt	-	-
Polivinilpirrolidone (PVP)	6 gr/lt	6 gr/lt	6 gr/lt	-
pH	5,6	5,6	5,6	5,6
agar	6,2 gr/lt	6,2 gr/lt	6,2 gr/lt	6,2 gr/lt

Tabella 3. Substrati di radicazione.

Table 3. Rooting media.

Ingredienti e pH	Substrati di radicazione			
	A	B	C	D
Macroelementi	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2
Microelementi	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2
Chelati	MS	MS	MS	MS
Vitamine	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2
Saccarosio	30 gr/lt	30 gr/lt	30 gr/lt	30 gr/lt
Acido indolbutirrico (IBA)	1 mg/lt	1 mg/lt	-	0,5 mg/lt
Acido indolacetico (IAA)	-	-	2 mg/lt	-
Phloroglucinolo	-	162 mg/lt	-	-
pH	5,6	5,6	5,6	5,6
agar	5,8 gr/lt	5,8 gr/lt	5,8 gr/lt	5,8 gr/lt

Tabella 4. Coefficiente di proliferazione medio.

Table 4. Average proliferation rate.

Cloni	Substrati			Medie cloni
	I	II	III (IIIa)	
1	2.1	1.64	2.72	2.15
2	0.89	0.99	4.71	2.20
5	3.11	2.29	3.27	2.89
6	2.5	1.82	3.2	2.51
7	2.41	1.75	4.69	2.95
Medie substrati	2.20	1.70	3.72	

Tabella 5. Analisi statistica della percentuale di radicazione dopo 4 settimane.

Table 5. Statistical analysis of rooting percentage after 4 week.

Effetto	Gradi di Libertà	Valore F	P
Substrato	3	0,94	0,4286
Clone	4	29,88	<0.0001
Subs*Clone	12	3,51	0.0006

Tabella 6. Analisi statistica della percentuale di radicazione dopo 6 settimane.  
 Table 6. Statistical analysis of rooting percentage after 6 week.

Effetto	Gradi di Libertà	Valore F	P
Substrato	3	2,49	0,0689
Clone	4	16,64	<0.0001
Subs*Clone	12	2,23	0,0209

Tabella 7. Sopravvivenza piantine dopo l'acclimatazione.  
 Table 7. Plant survival after acclimatization.

Clone	Percentuale di piantine sopravvissute	
	Luce fotosintetica	Luce fredda
1	80	80
2	100	100
5	100	100
6	100	100
7	90	100

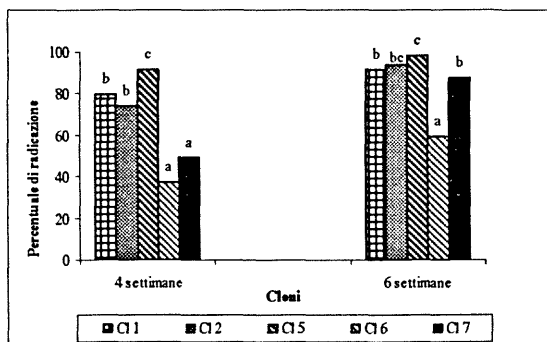


Figura 1. Percentuale media di radicazione dopo 4 e 6 settimane.  
 Figure 1. Rooting percentage after 4 and 6 weeks.

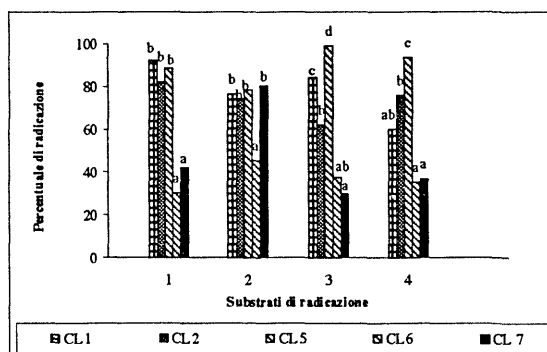


Figura 2. Percentuale di radicazione nell'interazione clone-substrato dopo 4 settimane.  
 Figure 2. Rooting percentage in clone-medium interaction after 4 week.

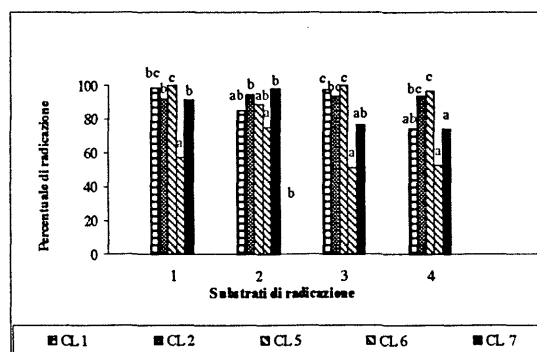


Figura 3. Percentuale di radicazione nell'interazione clone-substrato dopo 6 settimane.  
 Figure 3. Rooting percentage in clone-medium interaction after 6 week.