

## MICROPROPAGAZIONE DI *VITIS BERLANDIERI*

Ivana GRIBAUDO<sup>1\*</sup>, Matteo MARCHISIO<sup>2</sup>, Danila CUOZZO<sup>1,2</sup>, Vittorino NOVELLO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CNR, Istituto Virologia Vegetale, UOS Grugliasco - Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO), I

<sup>2</sup>Università degli Studi di Torino, Dip. Colture Arboree - Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO), I

\*Corrispondente: tel. 011 6708746, email [i.gribaudo@ivv.cnr.it](mailto:i.gribaudo@ivv.cnr.it)

### Riassunto

La *Vitis berlandieri* Planch., specie di origine nord-americana, ha un apparato radicale tollerante agli attacchi della Fillossera e si adatta bene ai terreni calcarei; la sua scarsa attitudine rizogena però ha finora impedito di utilizzarla come portinnesto se non in programmi di ibridazione. Scopo della ricerca è stato verificare in che misura la *V. berlandieri* è adatta alla moltiplicazione per coltura *in vitro*. In parallelo è stato utilizzato come testimone il portinnesto Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*), genotipo che si presta molto bene alla micropropagazione. Nella fase di moltiplicazione sono state confrontate diverse formulazioni del substrato di base. I due genotipi hanno risposto in modo diverso, anche in funzione del substrato utilizzato; in linea generale il Kober 5 BB è risultato essere più reattivo e veloce nella crescita. Nella fase di radicazione, le microtalee di *V. berlandieri* hanno radicato in percentuale superiore all'88 %. Complessivamente la *V. berlandieri* quindi ha dimostrato buona attitudine alla micropropagazione, anche se il relativo protocollo deve essere ottimizzato. Ulteriori indagini sulla possibilità di innesto in verde durante la moltiplicazione in vivaio potranno fornire preziose indicazioni sulle potenzialità di questa specie nel quadro del vivaismo viticolo moderno.

*Parole chiave:* vite, *Vitis berlandieri*, micropropagazione, radicazione, substrati

### Abstract

*Vitis berlandieri* Planch. is a species native to the southern part of North America; it has a good tolerance to phylloxera and to lime-rich soils. It roots poorly, therefore it has never been directly used as a rootstock but has been crossed with other *Vitis* species to produce rootstocks with phylloxera and lime tolerance. Aim of this research was to ascertain its suitability to multiplication *in vitro*, using the rootstock Kober 5 BB, which is well-suited to micropropagation, as a control. Four different basal media were tested during the multiplication phase: the two genotypes reacted in a different way according to the substrate, and in general *V. berlandieri* grew slower than Kober 5 BB. In the rooting phase more than 88 % of *V. berlandieri* *in vitro* cuttings rooted successfully. Altogether this species showed a good suitability to micropropagation even if the protocol still needs improvements. Further trials using the green-grafting technique may provide data on the actual potentiality of *V. berlandieri* in the modern grapevine nursery.

*Key words:* grapevine, *Vitis berlandieri*, micropropagation, rooting, culture media

### INTRODUZIONE

La *Vitis berlandieri* Planch., specie di origine nord-americana, fu così battezzata in onore del botanico francese Berlandier che ne raccolse per primo dei campioni. Allo stato spontaneo è presente nei territori centrali e meridionali del Texas, meridionali del Nuovo Messico e settentrionali del Messico (Galet, 1988), in luoghi caldi e secchi, prediligendo boscaglie aperte e luminose (Schneider, 2012). Resiste alle temperature alte come a quelle basse invernali ed è una delle specie meglio adattate ai suoli calcarei e clorosanti, a differenza di altre specie americane che in suoli ricchi di calcare inducono sintomi da clorosi nella chioma. Il suo apparato radicale ha una buona tolleranza agli attacchi di Fillossera. Fu una missione compiuta da P. Viala in America nel 1887 che pose le basi per ritenere *V. berlandieri* la pianta che avrebbe risolto il problema della ricostituzione post-fillosserica dei vigneti nei terreni fortemente calcarei; la sua scarsa attitudine rizogena però ha di fatto impedito di utilizzarla direttamente come portinnesto. Al contrario è stata ampiamente impiegata in programmi di ibridazione, specialmente con *V. riparia* e *V. rupestris*, ma anche con *V. vinifera*, ottenendo molti dei portinnesti più comunemente utilizzati in viticoltura. La maturazione molto

tardiva dell'uva, invece, non ne ha reso interessante l'impiego per la creazione di ibridi produttori diretti (Schneider, 2012).

La vite è stata fra le prime specie vegetali ad essere coltivata *in vitro* e fin dagli anni '60 è oggetto di ricerche per definire tecniche efficienti di micropropagazione, anche se i primi risultati significativi sono stati pubblicati a partire dalla fine degli anni '70. Da allora molti studi sono stati dedicati ad ampliare il numero di specie e cultivar di vite coltivabili con successo *in vitro* (Torregrosa *et al.*, 2001); tuttavia, la *V. berlandieri* compare raramente tra i genotipi di cui è riportata la coltura *in vitro*. Piagnani e Zocchi (1997) partendo da colture di gemme hanno indotto la formazione di callo utilizzato per studiare la risposta di *V. berlandieri* e *V. riparia* a stress da carenza di ferro. Analogamente Grzegorzczak e Walker (1998) hanno micropropagato 4 genotipi di *V. berlandieri*, in parallelo a numerosi altri cloni di varie specie di *Vitis*, per valutarne *in vitro* la resistenza alla fillossera.

Scopo della presente ricerca è stato verificare l'attitudine della *V. berlandieri* alla moltiplicazione per coltura *in vitro*, preliminarmente ad una sua ipotetica futura rivalutazione come portinnesto. In effetti la disponibilità di moderne tecniche vivaistiche, in particolare di attrezzature per l'innesto in verde, potrebbe far riconsiderare la possibilità di moltiplicare ed usare questa specie come portinnesto adatto a condizioni fortemente clorosanti. In parallelo per questa indagine è stato utilizzato come testimone il portinnesto Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*), genotipo che si presta molto bene alla micropropagazione.

## MATERIALI E METODI

*Produzione delle piante madri in vitro.* Talee legnose di *V. berlandieri* e di Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) sono state raccolte durante l'inverno da piante in campo e poste a germogliare in acqua; i germogli così ottenuti sono stati prelevati e sterilizzati superficialmente immergendoli per 15' in una soluzione al 30 % di candeggina commerciale (2 % circa di cloro attivo). Le gemme ascellari (8-10 mm) sono state isolate e poste in coltura *in vitro* su substrato di Murashige e Skoog (1962) modificato con sali minerali a metà concentrazione, 20 gL<sup>-1</sup> di saccarosio, 8 gL<sup>-1</sup> di agar (SB) con l'aggiunta di 3 μM di Benzil Amino Purina (BAP). I germogli così ottenuti sono stati trasferiti su un substrato di radicazione (SB + 2,5 μM di acido indol butirrico e 2,5 μM di acido naftalen acetico) per 5-7 giorni e successivamente su un substrato di mantenimento (SB senza fitoregolatori). Per la sperimentazione tutte le colture sono state mantenute a 24 °C con un fotoperiodo di 16 ore e 50 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> di irraggiamento.

*Fase di moltiplicazione.* La prova è stata eseguita utilizzando singole gemme ascellari prelevate dalla parte centrale dell'asse vegetativo di piante madri *in vitro*. Sono state confrontate diverse formulazioni del substrato di base: Murashige e Skoog (1962) (MS), Chee e Pool (1987) (CP), Nitsch e Nitsch (1969) (NN) e Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (B5). Tutti i substrati saggiati contenevano 20 gL<sup>-1</sup> di saccarosio, 8 gL<sup>-1</sup> di agar e 2 μM di BAP.

*Fase di radicazione.* Talee apicali di circa 30 mm di lunghezza sono state prelevate dalle piante madri *in vitro* e trasferite direttamente sul substrato sopra descritto (SB) privo di fitoregolatori.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

*Fase di moltiplicazione.* I risultati relativi alle gemme ascellari coltivate sui quattro substrati in esame sono stati raccolti dopo 40 giorni di coltura (tab. 1). I substrati erano stati scelti per la diversa composizione, particolarmente per quanto riguarda i macroelementi. In linea generale i substrati MS e CP sono più ricchi in N, soprattutto sotto forma di nitrati; inoltre il NN ha un minor contenuto in K. I due genotipi hanno risposto in modo diverso, anche in funzione del substrato utilizzato. La *V. berlandieri* (fig. 1) complessivamente è risultata meno vigorosa del Kober 5 BB, con molte gemme ferme, ovvero non germogliate, e germogli di lunghezza minore; anche le percentuali di proliferazione, cioè di gemme che hanno sviluppato più di un germoglio, sono state complessivamente inferiori per la *V. berlandieri*. La differenza tra i substrati si è evidenziata soprattutto nella lunghezza dei germogli: per entrambi i genotipi i germogli si sono maggiormente accresciuti sui substrati MS e CP, seppur con variabilità relativamente ampia. In tutte le colture si è rilevata la formazione di callo alla base degli espianti, non legata al tipo di substrato o al genotipo. La prova non ha chiarito univocamente quale composizione del substrato possa considerarsi migliore per la moltiplicazione *in vitro* della *V. berlandieri*: in particolare occorrerà definire condizioni più adatte a indurre lo sviluppo di tutte

le gemme poste in coltura e ad incrementare la proliferazione delle stesse gemme, eventualmente anche variando la presenza di citochinine nel substrato.

**Tabella 1 – Risultati della fase di moltiplicazione.**

Dati raccolti dopo 40 giorni di coltura di singole gemme ascellari prelevate da piante in vitro. Tutti i substrati contenevano 2 µM di BAP. <sup>a</sup>: % di gemme che hanno sviluppato 2 o più germogli; <sup>b</sup>: media ± errore standard.

Substrato	<i>V. berlandieri</i>				Kober 5 BB			
	N°	Gemme ferme (%)	Proliferazione (%) <sup>a</sup>	Lunghezza germoglio principale (mm) <sup>b</sup>	N°	Gemme ferme (%)	Proliferazione (%) <sup>a</sup>	Lunghezza germoglio principale (mm) <sup>b</sup>
MS	33	58	9	29 ± 13	26	35	4	41 ± 14
CP	37	70	0	34 ± 16	30	13	17	40 ± 10
NN	35	23	17	23 ± 7	31	13	42	23 ± 10
B5	32	25	6	24 ± 5	33	6	30	28 ± 13



**Figura 1 – Sviluppo di germoglio da gemma ascellare di *V. berlandieri* durante la fase di moltiplicazione.**

**Fase di radicazione.** In questa fase talee apicali di circa 30 mm di lunghezza sono state coltivate sul substrato SB privo di fitoregolatori. Le talee di *V. berlandieri* hanno radicato in percentuale molto alta, anche se inferiore a quella del Kober 5 BB (tab. 2). Questo risultato indica che, nonostante le sue caratteristiche, la radicazione non rappresenta un collo di bottiglia per la micropropagazione di questa specie.

La successiva fase di ambientamento alle condizioni di coltura *in vivo* non ha comportato particolari problemi.

**Tabella 2 – Risultati della fase di radicazione.**

Dati raccolti dopo 40 giorni di coltura su substrato senza fitoregolatori di talee apicali provenienti da piante in vitro.

<i>V. berlandieri</i>		Kober 5 BB	
N°	Radicazione (%)	N°	Radicazione (%)
94	88	73	99

**CONCLUSIONI**

La *V. berlandieri* ha complessivamente dimostrato buona attitudine alla micropropagazione: nonostante abbia mostrato un minor vigore rispetto al Kober 5 BB, i risultati sono stati soddisfacenti. La fase di moltiplicazione potrà essere migliorata, tuttavia i risultati della fase di radicazione permettono di considerare

positivamente la micropropagazione di questa specie, di cui è nota la scarsa attitudine alla rizogenesi *in vivo*. Ulteriori indagini durante la fase di vivaio riguarderanno la possibilità di utilizzo di tale materiale per l'innesto in verde o come barbatella selvatica in vaso (cartonaggio), e potranno fornire preziose indicazioni sulle potenzialità di questa specie nel quadro del vivaismo viticolo moderno.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- CHEE P., POOL R.M., 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae*, 32, 85-95.
- GALET P., 1988. *Vitis berlandieri*. In: *Cépages et vignobles de France*. Tome 1. *Les vignes Américaines*. 2<sup>e</sup> édition. Impr. C. Dehan, Montpellier, F, 94-99.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K., 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151.
- GRZEGORCZYK W., WALKER M.A., 1998. Evaluating resistance to grape phylloxera in *Vitis* species with an *in vitro* dual culture assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 17-22.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- NITSCH J.P., NITSCH C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87.
- PIAGNANI C., ZOCCHI G., 1997. Physiological responses of grapevine callus cultures to Iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 20, 1539-1549.
- SCHNEIDER A., 2012. Specie del genere *Vitis*. In: A. Schneider, G. Mainardi e S. Raimondi (eds), *Ampelografia Universale Storica Illustrata. I vitigni del mondo*. L'Artistica Editrice, Savigliano (CN) e Centro Studi Piemontesi, vol. I, 19-27.
- TORREGROSA L., BOUQUET A., GOUSSARD P.G., 2001. *In vitro* culture and propagation of grapevine. In: K. Roubelakis-Angelakis (ed), *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*. Kluwer Acad. Publ., NL, 281-326.