Innovazione e ricerca per colture floricole sostenibili

# I funghi micorrizici arbuscolari utili alleati nella produzione del Ranuncolo clonato in vitro

Capaci di migliorare la crescita e lo stato fisiologico dell'ospite con cui entrano in contatto, i funghi simbionti micorrizici sono al centro dello studio condotto per il progetto FIORI-BIO, nato con l'obiettivo di sviluppare una metodica di coltivazione low impact e, al tempo stesso, valorizzare il prodotto dal punto di vista quali-quantitativo

di Roberto Borriello\*, Alessandro Bisignano\*\*, Valeria Bianciotto\* e Margherita Beruto\*\*

### INTRODUZIONE

Il clima favorevole della Riviera ligure di Ponente, ha consentito, sin dal XIX secolo, lo sviluppo di una ricca biodiversità di piante floricole. Tale diversità floricola, continuamente implementata in seguito all'introduzione, acclimatazione e selezione di nuove specie e varietà, è diventata anche un'importante fonte di attrazione turistica per la Riviera. Secondo i recenti dati del 6º Censimento Generale in Agricoltura (2010), in Liguria sono presenti circa 4.000 aziende floricole, per una superficie utile di coltivazione

> Istituto per la Protezione delle Piante (IPP) del CNR - UOS TORI-NO, Torino, viale Mattioli 25.

\*\* Istituto Regionale per la Floricoltura (IRF), Sanremo (IM), via Carducci 12, E-mail: beruto@regflor.it

di circa 2.700 ha. La produzione floricola locale è costituita da fiori e fronde recise (soprattutto in provincia di Imperia, ma c'è una buona produzione di fronde anche in provincia di Savona), da piante in vaso (soprattutto piante grasse in provincia di Imperia e piante mediterranee ad Albenga) e da materiale vivaistico da ricoltivare (per fiore reciso o vaso).

Oggigiorno il settore florovivaistico ed in particolare il fiore reciso - si caratterizza ormai come un settore globale dove forte è la concorrenza da parte di grandi imprese internazionali e da Paesi a basso costo della manodopera. Conseguentemente, le aziende sono sottoposte a sfide pressanti che impongono la possibilità di poter produrre prodotti innovativi e di sapersi adeguare a nuove gestioni e pratiche agricole sostenibili da un punto di vista economico ed ambientale. Quest'ultimo aspetto riveste un particolare rilievo anche in considerazione della sempre maggiore sensibilità da parte della società verso le problematiche ecologiche ed ambientali.

È, quindi, chiaro che in un settore come quello del florovivaismo, in cui l'innovazione del prodotto è fondamentale e va di pari passo con l'innovazione delle tecniche colturali, la stretta collaborazione tra Enti di ricerca e produttori sta diventando di fondamentale importanza per sviluppare una floricoltura di qualità e a minor impatto ambientale. Proprio in quest'ottica, nell'ambito del programma di cooperazione transfrontaliera "Alcotra 2007-2013 - Obiettivo cooperazione territoriale europea Italia-Francia", si è sviluppato il progetto FIORIBIO (progetto n. 067) che si è da poco concluso ed ha interessato il biennio 2010-2012. Capofila del progetto è stato l'INRA (Istituto Nazionale di Ricerca Agronomica) di Sophie-Antipolis, Francia, e partner è stato l'Istituto Regionale per la Floricoltura (IRF) di Sanremo che ha interagito con le strutture del CRA-FSO, Sanremo, e del CNR (IPP-CNR),

Il progetto FIORIBIO si è posto l'obiettivo di supportare le imprese

le produzioni nel rispetto dell'ambiente ed in conformità del contesto locale.

agricole transfrontaliere nella gestione sostenibile della produzione delle specie ornamentali attraverso diverse attività che, oltre ad essere indirizzate alla formazione ed informazione del mondo professionale, hanno riguardato: azioni di sorveglianza fitosanitaria delle colture, sviluppo di protocolli di produzione per un materiale vivaistico di qualità e introduzione di nuove metodologie destinate ad accrescere la qualità fitosanitaria e fisiologica del-

Il presente articolo vuole riferire il lavoro condotto in tale ambito dall'IRF di Sanremo e dal CNR (IPP-CNR) di Torino che, unendo le competenze specifiche dei due gruppi di lavoro, hanno valutato un protocollo di inserimento di funghi micorrizici arbuscolari (AM) in una coltura di particolare rilievo floricolo per la regione Liguria, quella del ranuncolo (Ranunculus asiaticus – Fig. 1).

Il ranuncolo, apprezzato fin dall'inizio della floricoltura transfrontaliera per la qualità ed i colori del fiore e la possibilità di ben adattarsi a condizioni di coltivazione a basso impatto energetico (serre fredde o pieno campo), rappresenta una coltura che in questi ultimi dieci anni ha conquistato una larga **fetta di mercato** sia a livello produttivo che commerciale.

Tale sviluppo è stato favorito anche dall'applicazione di metodi tecnologici di propagazione (micropropagazione) che hanno permesso sia la clonazione di linee parentali utili nella produzione di sementi selezionate sia il raggiungimento di quantitativi commerciali di genotipi selezionati per le loro pregiate caratteristiche agronomiche, ben FIGURA 1 - II Ranunculus asiaticus 'Juny' utilizzato nelle prove.

esaltate nell'ambiente mediterraneo della zona transfrontaliera italo-francese. In particolare, il ranuncolo clonato in vitro ha mostrato di poter offrire alla filiera produttiva le caratteristiche di tempestività, qualità ed originalità non sempre ottenibili attraverso i tradizionali metodi di propagazione. Come noto, tuttavia, le tecniche di micropropagazione sono costose in quanto richiedono elevati *input* di energia e manodopera; costi che, nel caso del ranuncolo, sono parzialmente controbi-

I FUNGHI AM SONO IN GRADO DI ENTRARE IN SIMBIOSI CON LE RA-DICI DI CIRCA L'80% DELLE SPECIE VEGETALI NOTE. IL FUNGO AS-SORBE ATTIVAMENTE NUTRIENTI DAL SUOLO PER POI TRASFERIRLI ALL'OSPITE VEGETALE, IN CAMBIO LA PIANTA GLI FORNISCE PARTE DEGLI ZUCCHERI FOTOSINTETIZZATI.

2 | IL FLORICULTORE | GENNAIO-FEBBRAIO 2013 GENNAIN-FERBRAIN 2013 | IL FLORICULTORE | 3 SCIENZA & TECNICA
SCIENZA & TECNICA

➤ lanciati dalle linee maggiormente performanti ottenibili attraverso le tecniche *in vitro*.

In un'ottica di usufruibilità di innovazione da parte del territorio si rende, pertanto, necessario promuovere le azioni volte a migliorare la qualità delle plantule ex vitro ottenute e a ridurre le fallanze nella produzione, situazione che favorisce la possibilità di poter contenere i costi del materiale micropropagato. In particolare, visti i dati presenti in letteratura su altre specie del genere Ranunculus (Kytöviita e Routsalainen 2007; Krüeger et al. 2009), risulta interessante l'idea di inoculare i ranuncoli micropropagati con i funghi micorrizici arbuscolari (AM), un gruppo di funghi simbionti obbligati delle piante in grado di migliorare la crescita e lo stato fisiologico dell'ospite con cui entrano a contatto.

I funghi AM appartengono al phylum dei *Glomeromucota* e sono in grado di entrare in simbiosi con le radici di circa l'80% delle specie vegetali note, tra cui le più importanti piante coltivate. Alla base di questa simbiosi c'è un reciproco scambio di sostanze tra il fungo, che assorbe attivamente nutrienti dal suolo per poi trasferirli all'ospite vegetale, e la pianta che in cambio gli fornisce parte degli zuccheri fotosintetizzati. In questo modo la pianta migliora il suo sviluppo vegetativo mentre il fungo completa con successo il pro**prio ciclo vitale** (Balestrini, Bianciotto e Bonfante 2011).

In alcune situazioni sperimentali i funghi AM, impiegati nel substrato di crescita delle piante sotto forma di inoculo, hanno consentito una notevole riduzione degli *input* minerali chimici, dando prova di poter essere considerati come dei veri e propri biofertilizzatori.

Sebbene l'utilizzo di questi funghi sia stato largamente studiato in molti ambiti, si hanno ancora poche informazioni sulla loro applicazione in campo florovivaistico. Lo scopo del lavoro è stato, quindi, quello di verificare e valutare l'applicabilità e l'efficacia di tre diversi formulati a base di funghi micorrizici arbuscolari nella coltura del ranuncolo micropropagato nell'ottica di sviluppare una metodica di coltivazione low impact e una contemporanea valorizzazione del prodotto dal

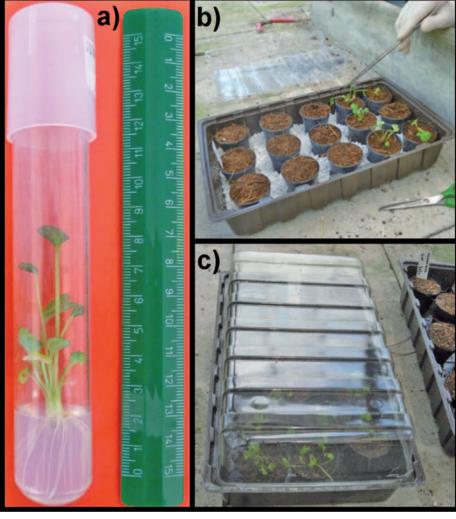


FIGURA 2 – Fase di acclimatazione ex vitro di plantule di ranuncolo: a) plantule; b) fase di trasferimento in vasetti contenente torba; c) incubazione in miniserre con temperatura di 22 °C, luce 80 μmol·m²s¹ e fotoperiodo di 16 h di luce. La fase di acclimatazione ha interessato un periodo complessivo di tre settimane.

punto di vista quali-quantitativo.

# **MATERIALI E METODI**

In questo lavoro, sono state utilizzato 360 plantule *ex vitro* di *Ranunculus asiaticus* cv 'Juny' (collezione 'Success' dell'azienda Biancheri Creations di Camporosso Mare, Imperia - *Fig. 1*). La clonazione e successiva micropropagazione è stata effettuata seguendo il protocollo descritto in precedenti pubblicazioni (Beruto & Debergh, 2004; Beruto, 2010).

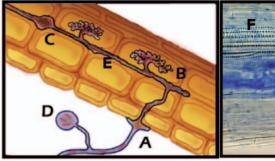
Le plantule radicate *in vitro*, sono state acclimatate in vasetti (ø 5,5 cm) contenenti torba e deposti su un letto di agriperlite inumidito in miniserre



dotate di copertura trasparente al fine di favorire un graduale adattamento alle condizioni ex vitro (Fig. 2) ed è in questa fase che si è proceduto alla micorrizazione (per i dettagli sugli inoculi vedere dopo). Il materiale vegetale è stato posizionato in fitotrone a 22 °C, umidità relativa del 90%, luminosità di circa 80 µmol·m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e fotoperiodo di 16 ore di luce, per una settimana. Si è, quindi, proceduto ad un graduale adattamento a condizioni di umidità ambientale e, dopo circa ulteriori due settimane, la fase di acclimatazione si è completata permettendo il successivo trasferimento delle plantule alle condizioni di coltivazione usualmente applicate per il ranuncolo.

Nella coltivazione sono stati utilizzati bancali posizionati in una serra con copertura a vetri. Le diverse parcelle sono state chiaramente delineate mediante divisori di plastica separati tra loro da circa 50 cm di substrato che non è mai stato irrigato nel corso della prova per prevenire eventuali contaminazioni tra gli inoculi (*Fig. 3*). Per evitare di compromettere la micorrizazione, le piante sono state irrigate una volta alla settimana con soluzioni a basse concentrazioni di fertilizzante (1,25%), caratterizzate dai seguenti rapporti di nutrienti: N:P:K=21:7:14, dall'impianto in serra all'inizio della fioritura fertilizzante; N:P:K=8:16:24, durante la fioritura.

La valutazione dell'effetto dei fun-



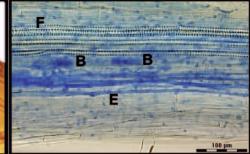


FIGURA 4 – A sinistra: rappresentazione del parenchima corticale radicale colonizzato da un fungo AM (disegno a cura di Erica Lumini). A destra: foto ottenuta al microscopio ottico di una radice di Ranunculus asiaticus colonizzata da Funneliformis mosseae. Le lettere maiuscole evidenziano le strutture caratteristiche dei funghi AM nell'interazione simbiontica con la radice: A) Ifopodio; B) Arbuscolo; C) Vescicola intraradicale; D) spora extraradicale; E) Ifa intercellulare; F) cilindro centrale della radice.

CRESCITA DELLE

PIANTE SOTTO

FORMA DI INOCU-

LO, HANNO DATO

PROVA DI POTER

**ESSERE CONSI-**

**DERATI COME DEI** 

VERI E PROPRI BIO-

FERTILIZZATORI.

ghi AM sulle piante micropropagate ha previsto la comparazione di tre diversi inoculi commerciali: uno costituito da un unico fungo AM, il Funneliformis mosseae (inoculo GM). un secondo costituito da tre funghi AM Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices e Glomus sp. (inoculo MIX) ed il terzo costituito da una miscela di funghi AM Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices, Viscospora viscosa e batteri Plant Growth Promoting (**inoculo MF**).

Nelle prove, pertanto, sono stati considerati 4 gruppi di plantule (90 piante per ciascun grup-

**po)** corrispondenti alle tre tipologie di inoculo micorrizico (GM, MIX e MF) ed il controllo (CT). Gli inoculi sono stati addizionati al substrato durante la fase di acclimatazione. Le stesse piante sono state ri-inoculate durante la fase di trapianto da vasetto a bancale.

La **risposta delle plantule** è stata monitorata eseguendo controlli sia sull'incremento di biomassa durante la fase di acclimatazione sia sulla produzione dei fiori in coltivazione ed il peso delle

FIGURA 3 – Plantule di ranuncolo ex acclimatazione trasferite in bancali per la coltivazione.

radici tuberizzate raccolte alla fine del ciclo colturale che, come noto, rappresentano l'unità di propagazione utilizzata dai coltivatori dell'area mediterranea.

Al fine di identificare, vesticare raccolte alla fine del ciclo colturale che, come noto, rappresentano l'unità di propagazione utilizzata dai coltivatori dell'area mediterranea.

Al fine di identificare, vesticare raccolte alla fine del ciclo colturale che, come noto, rappresentano l'unità di propagazione utilizzata dai coltivatori dell'area mediterranea.

Al fine di identificare, verificare e tracciare la presenza dei funghi all'interno delle radici delle piante si sono utilizzati due diversi tipi di approccio: uno morfologico e uno molecolare. L'analisi morfologica delle radici delle piante di ranuncolo inoculate, volta all'individuazione di strutture fungine intraradicali, è stata svolta mediante microscopio ottico secondo il metodo Trouvelot et al. (1986). Parallelamente.

l'analisi molecolare basata su un gene *marker* per i funghi AM – la subunità minore (SSU) del gene ribosomale – è stata condotta sia sugli inoculi commerciali utilizzati sia sulle radici dei ranuncoli prelevate in varie fasi della coltivazione. Questo ha consentito di identificare e tracciare i funghi AM penetrati nelle radici durante le diverse fasi della coltivazione.

# **RISULTATI E CONCLUSIONI**

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno messo in evidenza l'effettiva capacità delle piante di ranuncolo di entrare in simbiosi con i funghi AM (Fig. 4), anche se con efficienza diversa a seconda

SCIENZA & TECNICA
SCIENZA & TECNICA

TABELLA 1 - Produzione di fiori durante la fase di coltivazione in serra per plantule di ranuncolo *ex vitro* trattate con tre diversi inoculi fungini

TRATTAMENTO	DISTRIBUZIONE DELLE CLASSI DI QUALITÀ DEGLI STELI (%)							
	EXTRA		PRIMA		SECONDA		NON VENDIBILE	
Controllo (CT)	11,4	b	30,4	ab	36,9	а	21,2	а
GM	7,8	b	25,2	ab	40,7	а	24,7	а
MIX	9,4	b	36,8	b	41,0	а	14,4	а
MF	0,8	а	22,4	а	37,2	а	39,6	b

La produzione è stata classificata secondo i parametri richiesti dal mercato di qualità extra, prima e seconda. Inoculo GM = costituito da un unico fungo AM (Funneliformis mosseae); inoculo MIX = costituito da tre funghi AM (Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices e Glomus sp.); inoculo MF = costituito da una miscela di funghi AM (Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices, Viscospora viscosa) e batteri Plant Growth Promoting. Il controllo (CT) è rappresentato da plantule non trattate/non micorizzate. I valori seguiti dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

▶ dell'inoculo utilizzato. Questo non stupisce visto che sebbene questi funghi siano generalisti (cioè uno stesso fungo può entrare facilmente in simbiosi con piante di specie diverse), alcune combinazioni pianta-fungo possono risultare più efficaci di altre. Questo è confermato dal tasso di micorrizazione ottenuto con le differenti combinazioni di

funghi AM nei diversi inoculi. Gli inoculi GM e MIX hanno infatti fatto registrare un'intensità dell'80% e dell'85% rispettivamente; mentre la stessa efficienza non è stata registrata per l'inoculo MF, il cui utilizzo ha portato ad avere piante con un valore di micorrizazione decisamente inferiore (35%).

Alla fine della fase di acclimatazione,

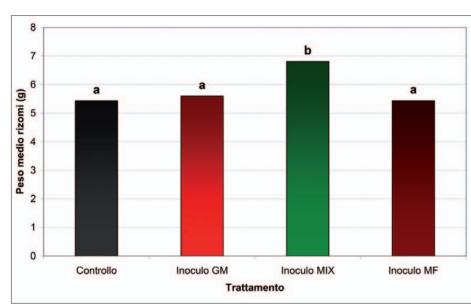


FIGURA 5 – Peso medio delle radici tuberizzate ottenute da plantule ex vitro alla fine del ciclo colturale. Inoculo GM = costituito da un unico fungo AM (Funneliformis mosseae); inoculo MIX = costituito da tre funghi AM (Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices e Glomus sp.); inoculo MF = costituito da una miscela di funghi AM (Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices, Viscospora viscosa) e batteri Plant Growth Promoting. Il controllo (CT) è rappresentato da plantule non trattate/non micorizzate. I valori seguiti dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

le plantule controllo (CT) e quelle trattate con l'inoculo MIX e GM hanno mostrato un buon sviluppo. I rilievi effettuati sulla crescita e sulla produttività delle piante hanno evidenziato come in particolare l'inoculo misto (MIX) abbia accresciuto significativamente il peso dei rizomi a fine coltura (Fig. 5) e la produzione di fiori vendibili, intesa come l'insieme delle categorie extra e prima (Tab. 1). L'inoculo MF ha portato invece ad un generale decremento del contenuto idrico delle plantule a fine acclimatazione (*Fig. 6*), del numero e qualità dei fiori prodotti (*Tab. 1*) e del peso del rizoma (Fig. 5), rispetto alle piante non inoculate o trattate con gli altri inoculi.

Le **analisi molecolari** effettuate sugli inoculi hanno permesso di individuare le firme genetiche che contraddistinguono gli isolati di funghi AMF presenti negli inoculi. Queste informazioni hanno dato la possibilità di identificare quali specie fungine sono entrate in simbiosi con la pianta e di tracciarle durante le varie fasi della coltura. Da queste analisi è emerso che le piante inoculate con MF erano colonizzate solamente da Rhizophagus intraradices, mentre sia le piante inoculate con GM che quelle inoculate con MIX presentavano nelle radici prevalentemente il fungo Funneliformis mosseae. Questo dato suggerisce che R. intraradices sia un simbionte poco efficiente per il ranuncolo e candida invece F. mosseae

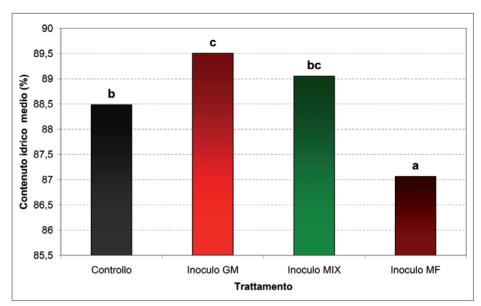


FIGURA 6 – Contenuto idrico medio delle plantule di ranuncolo al termine della fase di acclimatazione ex vitro. Il valore è stato ottenuto in base al rapporto tra peso fresco e peso secco delle plantule. Inoculo GM = costituito da un unico fungo AM (Funneliformis mosseae); inoculo MIX = costituito da tre funghi AM (Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices e Glomus sp.); inoculo MF = costituito da una miscela di funghi AM (Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices, Viscospora viscosa) e batteri Plant Growth Promoting. Il controllo (CT) è rappresentato da plantule non trattate/non micorizzate. I valori seguiti dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

L'APPLICAZIONE DI

INOCULI FUNGINI

A BASE DI FUNGHI

AM PUÒ ESSERE

**UN VALIDO STRU-**

MENTO PER INCRE-

**MENTARE LA PRO-**

**DUTTIVITÀ DELLE** 

PIANTE EX-VITRO.

al ruolo di buon colonizzatore radicale nelle condizioni testate. Sebbene a fine coltura le analisi molecolari abbiano

evidenziato la presenza di una sola specie fungina, la maggiore produttività evidenziata dalle piante inoculate con l'inoculo MIX potrebbe essere dovuta ad un avvicendarsi dei diversi isolati fungini presenti nel substrato durante le diverse fasi della coltura. Questo avvicendamento avrebbe consentito alla pianta di sfruttare al meglio le diverse caratteristiche funzionali garantite dalla simbiosi con funghi diversi.

Sulla base di questi risultati preliminari sembra, quindi, ragionevole ipotizzare che, nonostante a fine ciclo di crescita del ranuncolo si sia riscontrata la presenza di una sola specie, l'insieme di più isolati (specie di funghi AM) nello stesso inoculo possa aumentare l'efficienza e i vantaggi della micorrizazione. Possiamo

pertanto concludere che l'applicazione di inoculi fungini a base di funghi AM può essere un valido strumento per in-

crementare la produttività delle piante ex-vitro. Tale aspetto riveste un'importanza notevole nell'ambito della produzione dei cloni di ranuncolo, in quanto l'efficienza produttiva delle plantule ex vitro e la possibilità di ottenere radici tuberizzate di buona qualità sono elementi fondamentali alla buona riuscita produttiva del successivo ciclo colturale che rappresenta il ciclo produttivo dei coltivatori dell'area mediterranea.

Sulla base dei risultati ottenuti in questa sperimentazione sembra, quindi, importante mettere a punto un inoculo specifico che includa più specie altamente efficienti e che in cicli colturali come quello del ranuncolo possano consentire il mantenimento di una colonizzazione in grado di offrire effetti benefici a lungo termine. È pertanto fondamentale testare altri isolati commerciali di funghi AM ed eventualmente selezionarne di nuovi utili alla costituzione di inoculi misti in grado, da un lato di migliorare i risultati sino a qui ottenuti sul ranuncolo e dall'altro di essere applicati su altre *Ranunculaceae* di interesse commerciale.

# **RINGRAZIAMENTI**

Gli autori ringraziano coloro i quali hanno supportato lo svolgimento dell'attività di ricerca: la dott.ssa Christine Poncet dell'INRA-URIH di Sophia-Antipolis per il suo contributo come coordinatrice del progetto FIORIBIO; il dott. Fabio Capone dell'IPP-CNR di Torino e la dott.ssa Serena Viglione dell'IRF di Sanremo per il loro contributo nell'allestimento delle prove. Il dott. Fabio Capone è stato finanziato dai progetti FIORIBIO e CIPE-BioBITs.

# **BIBLIOGRAFIA**

Balestrini R., Bianciotto V., Bonfante P. (2011). Mycorrhizae. In: Huang, P.M., Li, Y., Sumner, M.E. (eds.), Handbook of Soil Sciences: Properties and Processes, Second edition. CRC Press, Boca Raton, FL 24/29-39.

Beruto M. (2010). In vitro Propagation Through Axillary Shoot Culture of *Ra-nunculus asiaticus* L. Methods in Molecular Biology 589: 29-37.

Beruto M. e Debergh (2004). Micropropagation of *Ranunculus asiaticus*: A Review and Perspectives. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 77:221-230.

Krüger M., Štockinger H., Krüger C. e Schüßler A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 183: 212-223.

Kytöviita M.M. e Ruotsalainen A.L. (2007). Mycorrhizal benefit in two low arctic herbs increases with increasing temperature. American Journal of Botany 94(8): 1309-1315.

Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système radiculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (Eds) Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae INRA Press, Paris, pp 217-221.

6 | IL FLORICULTORE | GENNAIO-FEBBRAIO 2013 | IL FLORICULTORE | 7