

# TORNATA DELL'ACCADEMIA NAZIONALE DELL'OLIVO E DELL'OLIO NEL LAZIO

Venerdì, 24 giugno 2022



*Accademia Nazionale dell'Olivo e  
dell'Olio Spoletino*

«La micropropagazione nella produzione di  
piante di olivo per i sistemi intensivi e loro  
comportamento in campo»

Zuccherelli K., Silvestri C., Lambardi M.



# Sono passati 40 anni!

Compound	Olive medium (OM) (mg l <sup>-1</sup> )	Almond medium (MS) (mg l <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1 100	1 900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	412	1 650
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	600	—
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440	440
KCl	500	—
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 500	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340	170
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.5	37.5
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	22.3	22.3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.4	6.2
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	14.3	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.25	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
KI	0.83	0.83
Myo-inositol	100	100
Glycine	2	2
Thiamine · HCl	0.5	0.1
Pyridoxin · HCl	0.5	0.5
Nicotinic acid	5	0.5
Biotin	0.05	—
Folic acid	0.5	—
Sucrose	30 000	30 000
NAA	—	0.01
Zeatin or 2iP	4	—
BAP	—	0.7
Glutamine	2 190	—
Agar	6 000	9 000
(pH)	(5.8)	(5.8) Rugini, 1984

## RUGINI OLIVE MEDIUM

The Olive (*Olea europaea sativa* L.) plays an important role in the economies of countries in the Mediterranean area. The in vitro culture of Olive, a particular difficult species to propagate in vitro, required the development of a specific medium formulation. Rugini medium is dedicated to the proliferation of the olive shoots. The medium has an enriched composition compared to MS. Olive tissues are characterized by a high content of Ca, Mg, S, Cu and Zn. The best nitrogen source is a combination of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, supplemented with glutamine 2,19 mg/l. The better carbon source is mannitol (30-36 gr/l) compared to sucrose. A better cytokinin to be used is zeatin: 1 mg/l if filter sterilized, 3-4 mg/l when autoclaved. TDZ and 2iP are less effective. Shoots grow more rapidly compared to other media. The proliferation rate increases and more tender, sturdier shoots with less basal callus are obtained.

Rugini E., In vitro propagation of some olive cultivars, Scientia Horticulturae 24, 123 (1984)  
Jacoboni A., Luppino M., Rugini E., Role of basal shoot darkening Scientia Horticulturae, 53:63 (1993)

### R 0258 RUGINI OLIVE MEDIUM

R 0258.0001	1 l	(4.02 g)
R 0258.0010	10 l	(40.24 g)
R 0258.0050	50 l	(201.18 g)

Heuchera propagation, SBW International BV

Duchefa, NL

### MICRO ELEMENTS

	mg/l	µM
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.11
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25	1.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.40	200.55
KI	0.83	5.00
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16.90	100.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14.30	49.75

### MACRO ELEMENTS

	mg/l	mM
CaCl <sub>2</sub>	332.16	2.99
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	416.92	2.54
KCl	500.00	6.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340.00	2.50
KNO <sub>3</sub>	1100.00	10.88
MgSO <sub>4</sub>	732.60	6.09
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	412.00	5.15

Total concentration Micro and Macro elements: 3915.34 mg/l

### VITAMINS

	mg/l	µM
Biotin	0.05	0.20
Folic acid	0.50	1.13
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	5.00	40.62
Pyridoxine HCl	0.50	2.43
Thiamine HCl	0.50	1.48

Total concentration Micro and Macro elements including vitamins: 4023.89 mg/l

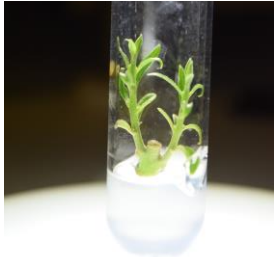
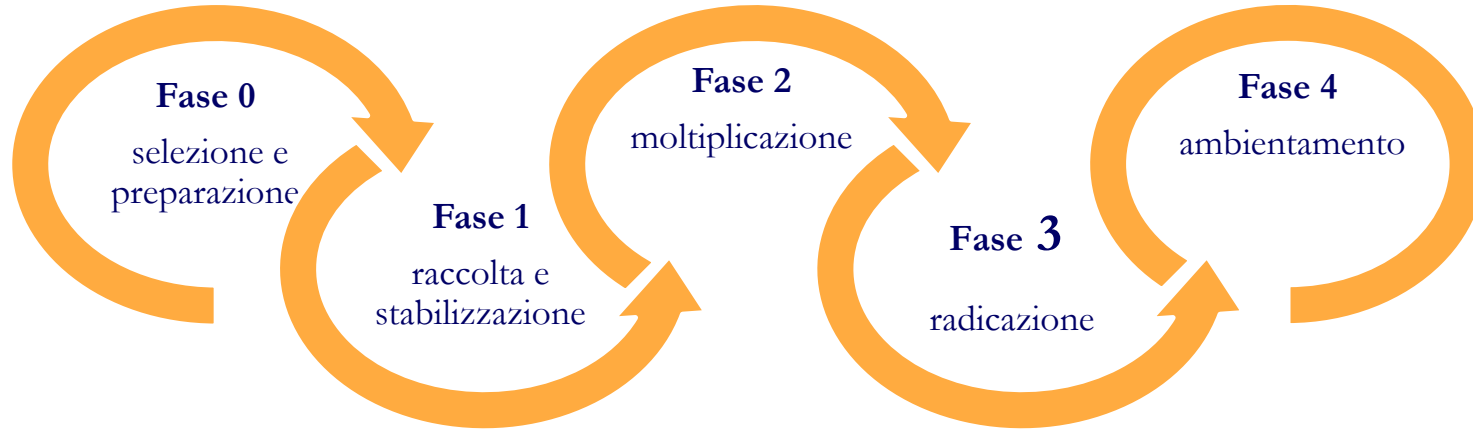
**La ricerca pubblica oggi in Italia  
nella micropropagazione dell'olivo:**



**Prodotto in vari laboratori commerciali**



# La micropropagazione dell'olivo

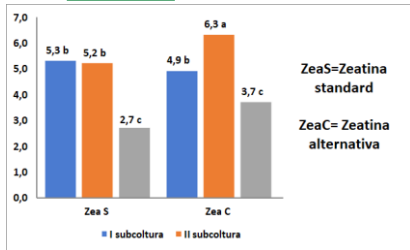


# Problematiche comuni

- alcune cvs sono molto efficienti in micropropagazione (Koroneiki, Arbequina, Galaga);
- Necessario l'uso della zeatina, con costi molto elevati;
- Bassi tassi di moltiplicazione (micro-taleaggio)
- Cvs recalcitranti alla radicazione;



# Possibili soluzioni e innovazioni



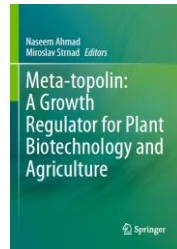
Prof. Micheli, UNIPG



- Necessità di usare un ormone molto costoso, la zeatina (Z-riboside, Z- transisomer);
- Attualmente la zeatina rimane il fitoregolatore più efficace nello stimolare la proliferazione di nuovi germogli per molte varietà;
- Incrementare l'efficacia della componente ormonale classica del substrato (o ridurre l'impiego/costo);
- Ricorso a nuove formulazioni di zeatina (ZeaC) di costo inferiore rispetto agli standard conosciuti, o a mix di ormoni (es. Zea+Kin)

Tab. 2 (Micheli et al., 2016)

Treatment	meta-Topolin (mg L <sup>-1</sup> )	Zeatin (mg L <sup>-1</sup> )	Shoots (n)	Length (mm)	Fresh Weight (mg)
T1	0	4	1.6 a	44.5 b	250.0 b
T2	1	3	1.7 a	39.3 b	240.0 b
T3	2	2	1.9 a	58.4 a	370.0 a
T4	3	1	1.8 a	65.5 a	330.0 a
T5	4	0	1.8 a	60.5 a	340.0 a
CV%			7.42	15.65	13.68



Prof. Micheli, UNIPG



# Possibili soluzioni e innovazioni

HORTSCIENCE 53(4):531–534. 2018. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI112731-17>

## Neem Oil Used as a “Complex Mixture” to Improve In Vitro Shoot Proliferation in Olive

Maurizio Micheli<sup>1,2</sup>

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno 74, Perugia 06121, Italy



Neem oil (mL·L <sup>-1</sup> )	Subculture (n)	Multiplication rate (n)
0.0	1	7.5 b
	2	5.2 c
	3	8.1 b
0.1	1	7.4 b
	2	8.0 b
	3	10.7 a



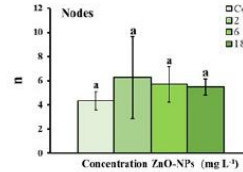
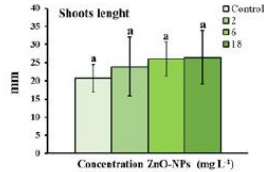
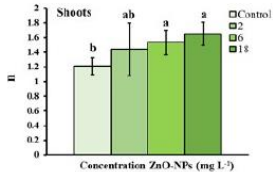
Article

## Effects of Biogenic ZnO Nanoparticles on Growth, Physiological, Biochemical Traits and Antioxidants on Olive Tree In Vitro

Luca Regni <sup>\*+@</sup>, Daniele Del Buono <sup>\*+@</sup>, Maurizio Micheli <sup>\*+@</sup>, Simona Lucia Fachin, Ciro Tolisano and Primo Proietti <sup>@</sup>



- Verificare l'uso di sostanze naturali nel potenziare l'efficacia della componente nutritiva (olio di neem, acqua di cocco, estratto di lievito)



- Impiego di nanoparticelle;

# Possibili soluzioni e innovazioni

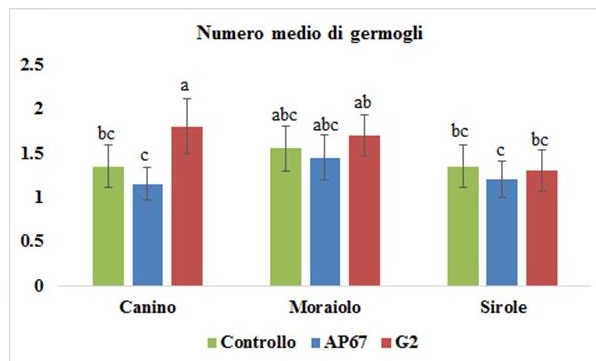
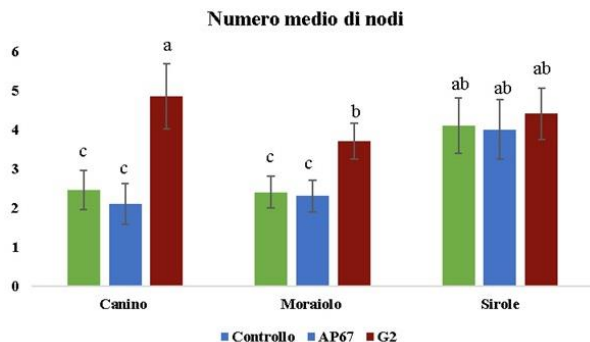


Article

## The First Evidence of the Beneficial Effects of Se-Supplementation on In Vitro Cultivated Olive Tree Explants

Luca Regni <sup>\*,†</sup>, Maurizio Micheli <sup>\*,†</sup>, Alberto Marco Del Pino, Carlo Alberto Palmerini, Roberto D'Amato, Simona Lucia Facchin, Franco Famiani, Alessandro Peruzzi, Hanene Mairech and Primo Proietti

- Impiego di microelementi rari
- Controllo dei parametri ambientali (**quantità e qualità della luce**)



EFFECT	F	ProbF	Sign.
VARIETA	21.08377175	6.54E-09	**
LUCE	28.45386483	2.15E-11	**
VARIETA x LUCE	5.801497369	0.000211	**
Residual			
Total			

EFFECT	F	ProbF	Sign.
VARIETA	5.109045849	0.006997	**
LUCE	7.086741016	0.001105	**
VARIETA x LUCE	2.071871128	0.086585	
Residual			
Total			



# Possibili soluzioni e innovazioni

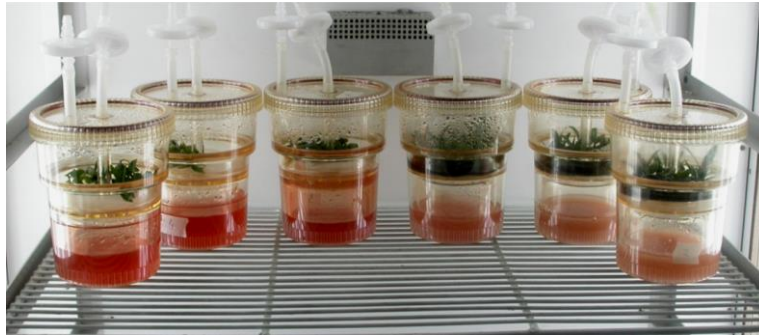
Micropropagazione in coltura liquida



Twin flasks



Rita™



Plantform



Nalgene™



Setis



- La coltura liquida in TIS combina i vantaggi di:
- assorbimento di nutrienti e PGR dall'intera superficie dell'espianto;
- periodico scambio gassoso dei contenitori che evita l'accumulo di etilene;
- diluizione dei fenoli che possono determinare ossidazione e imbrunimento dei tessuti
- riduzione dei costi di produzione (subcolture più lunghe, aumento proliferazione,...)

# Possibili soluzioni e innovazioni

## Micropropagazione in coltura liquida



***Olea europaea***

**Standard medium:** Macro, micronutrients and vitamins OM medium (Rugini, 1984), 50 mg/l FeEDDHA, 36 g/l mannitol and 10 µM of zeatin. In glass jars, 3 g/l gerlite was added. Three different zeatin concentrations (2.5, 5 and 10 µM) were used to evaluate the efficacy of the bioreactor on olive shoot growth.

Shoots after 4 weeks of culture with 5 µM zeatin

Glass jars Plant Form

Shoots in Plant Form with 5 µM zeatin

Some shoots showed browning and falling of leaves with 2.5 µM zeatin concentration; shoot quality is not good.

The zeatin concentration reduction, from 10 µM to 5 µM, improved the growth after 4 weeks of culture when compared to the culture in semi-solid medium.

Zeatin (µM)	RGR after 4 weeks	
	Glass jars	Plant Form
2.5	1.59	3.84
5.0	3.72	4.32
10.0	3.63	4.49

The use of Plant Form may be considered a possible tool for improving the quality of cultures and reducing plantlet production costs in olive micropropagation. Actually, only zeatin hormone ensures a good rate of olive proliferation and its high cost has always penalized the *in vitro* culture systems.

- **Plantform per la micropropagazione dell'olivo:**
- I germogli di olivo si adattano molto bene alla crescita in bioreattore con un elevato tasso di moltiplicazione e con un'ottima qualità del materiale propagato
- **Possibilità di ridurre la concentrazione dei nutrienti e degli ormoni nel terreno liquido**
- **Riduzione dei costi e migliore qualità dei germogli**

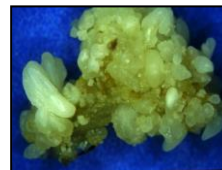
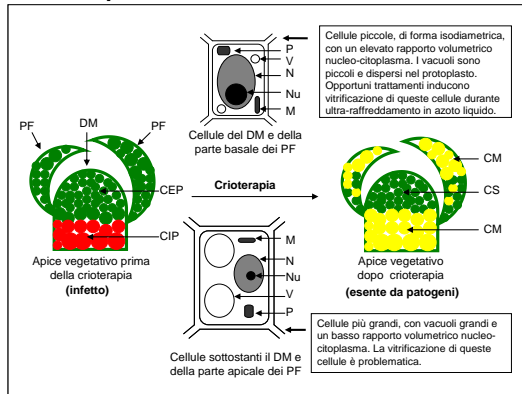
# Non solo micropropagazione



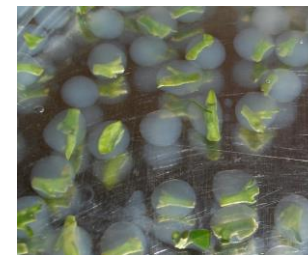
## Crioconservazione



## Crioterapia



## Capsule e semi sintetici...



## The challenge of successful cryopreservation of olive (*Olea europaea* L.) shoot tips

F.T. Lynch<sup>a</sup>, A. Siddika<sup>a</sup>, A. Mehra<sup>a</sup>, A. Fabbri<sup>a\*</sup>, C. Benelli<sup>b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t,u,v,w,x,y,z</sup>, M. Lambardi<sup>g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t,u,v,w,x,y,z</sup>  
<sup>a</sup> Biological Sciences Research Group, University of Derby, Kedleston Road, Derby, DE22 1GR, UK  
<sup>b</sup> Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma, Viale G.P. Usberti 1/A, 43100 Parma, Italy  
<sup>c</sup> Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR, Polo Scientifico, Via Madonna del Piano, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Table 2 - Effect of zeatin concentration in the post-thaw OM medium on the regrowth of olive shoot tips after PVS2 cryopreservation

Zeatin concentration (μM)	Regrowth (%)
9	6.6±6.6
18	20.0±0.0
36	20.0±11.5
46	38.3±6.7

Each value represents mean regrowth rate ± standard error (3 replicates, n = 15).

Annals of Applied Biology ISSN 0003-4746

## REVIEW ARTICLE

### Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation

Q.C. Wang<sup>a,b</sup>, B. Panis<sup>a</sup>, F. Engelmann<sup>a,b</sup>, M. Lambardi<sup>c</sup> & J.P.T. Valkonen<sup>d</sup>

- 1 Key Laboratory of Plant Genetic Improvement of Northwest China, College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forest University, Yangling, Shaanxi, China
- 2 Department of Applied Biology, University of Helsinki, Helsinki, Finland
- 3 Laboratory of Tropical Crop Improvement, Division of Crop Biotechnology, Katholieke University Leuven, Leuven, Belgium
- 4 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France
- 5 Bioerity International, Rome, Italy
- 6 INRA/Forest and Timber Institute, National Research Council (CNR), Florence, Italy

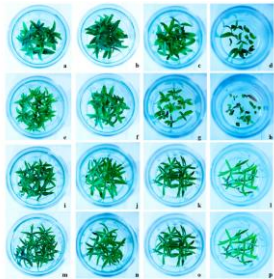
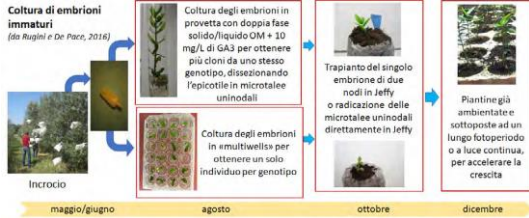
Prof. Micheli Maurizio, UNIPG



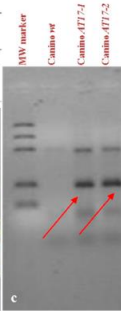
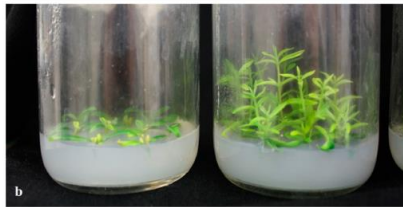
# Non solo micropropagazione



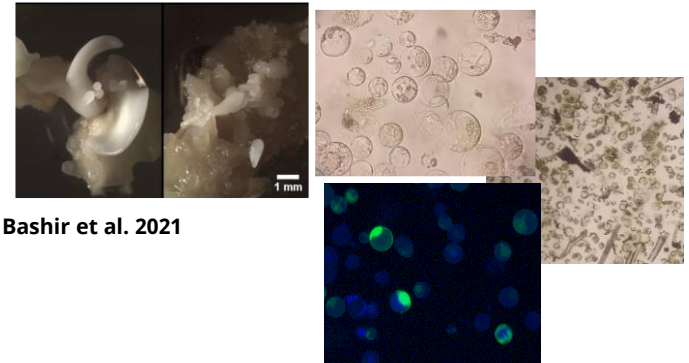
## Miglioramento genetico...



Gene name	Primers	GenBank Accessions
<i>nt_om</i>	fwd: CCAACAACCAACTTGTTAAA rev: CGACAGAATAATTGACAAAAG	M29279



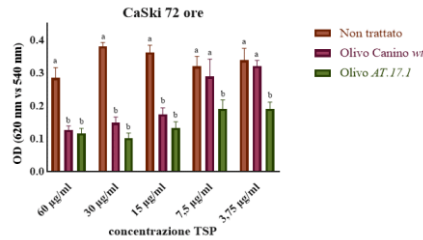
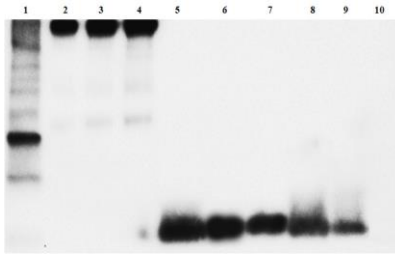
## ... E al servizio delle Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA)...



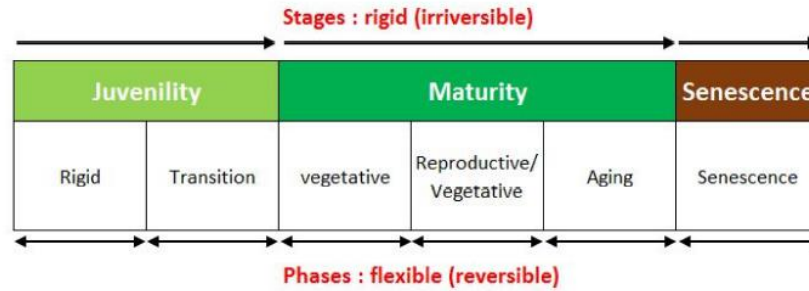
Bashir et al. 2021

DNA-free genome editing

## e molecular farming ...



# Quali dubbi?





## Micropropagation Effects on Juvenile Traits, Flower Differentiation, and Tree Architecture in Young Olive Trees

Davide Neri <sup>1</sup>, Tonino Ciocolanti <sup>2</sup>, Giuseppe Zuccherelli <sup>3</sup>, Oriano Navacchi <sup>3</sup>,  
Veronica Giorgi <sup>1</sup> and Enrico Maria Lodolini <sup>4,\*</sup>

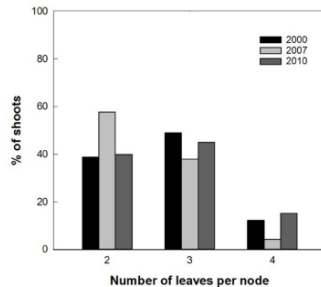
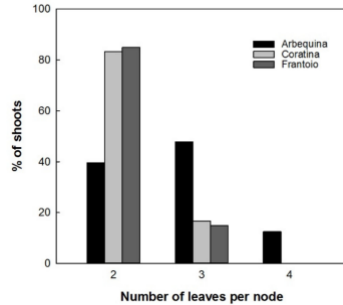
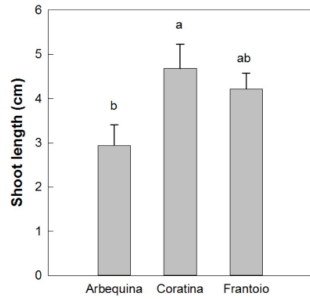
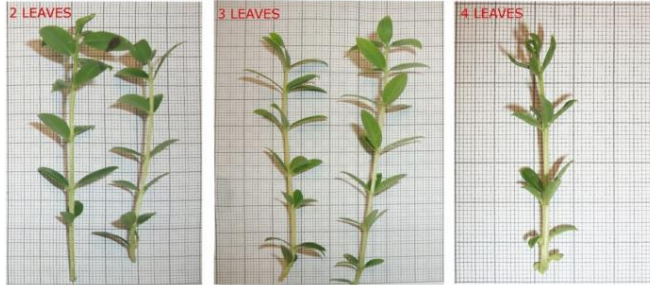
**Confronto del  
comportamento delle  
varietà soggette a  
diverse subcolture**

(Arbequina, Coratina e  
Frantoio)

**Confronto tra  
materiale  
micropropagato con  
differente carattere  
di "giovanilità"**

(Arbequina)

**Confronto tra  
materiale derivante  
da  
micropropagazione e  
da talea  
(Arbequina)**

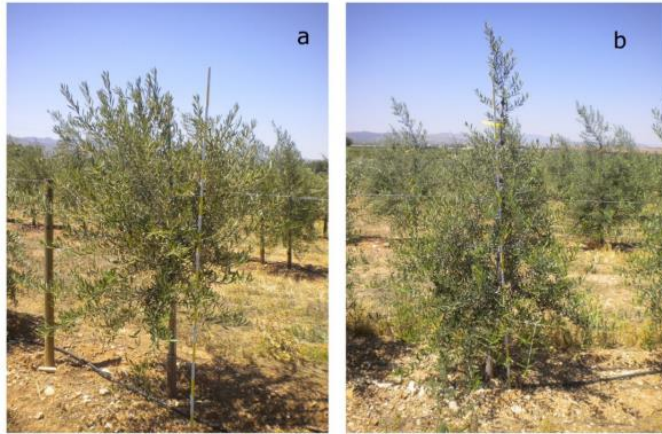


## Micropropagation Effects on Juvenile Traits, Flower Differentiation, and Tree Architecture in Young Olive Trees

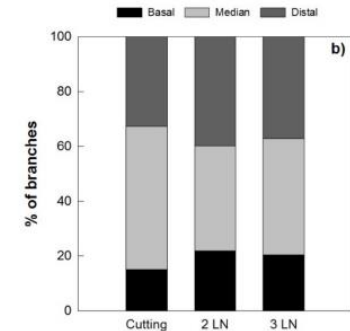
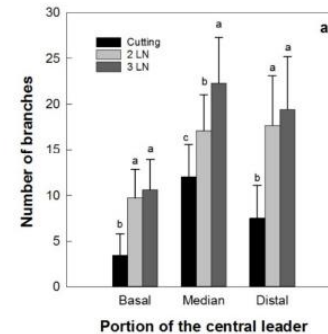
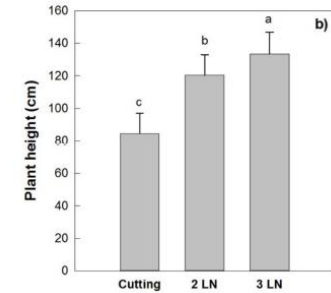
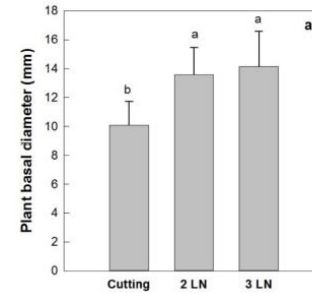
Davide Neri <sup>1</sup>, Tonino Ciocolanti <sup>2</sup>, Giuseppe Zuccherelli <sup>3</sup>, Oriano Navacchi <sup>3</sup>, Veronica Giorgi <sup>1</sup> and Enrico Maria Lodolini <sup>4,\*</sup>

- Materiale propagato in vitro (Arbequina, Coratina e Frantoio) da diversi anni (2000, 2007, 2010);
- Sono stati condotti rilievi sulla crescita delle giovani piantine sull' espressione della giovanilità (3 o + foglie per nodo);
- **Effetto limitato del carattere giovanile** (Arbequina plasticità superiore);
- **La presenza di 3-4 foglie per nodo correlata al fattore genetico;**

# Confronto tra materiale micropropagato con differente carattere di "giovaniltà')

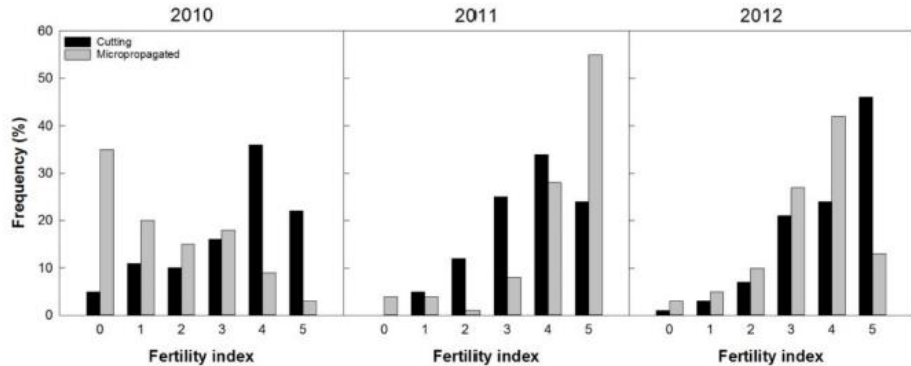
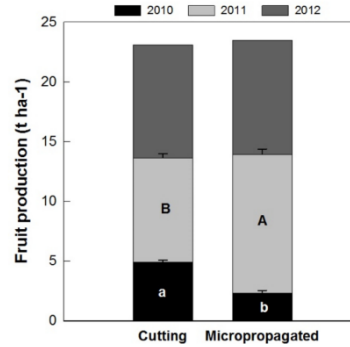
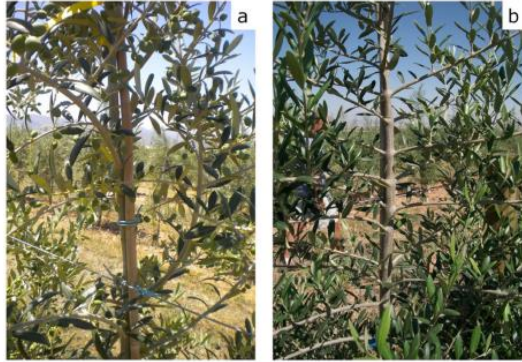


- Altezza e diametro maggiori nelle piante vitro-derivate;
- La distribuzione delle branche lungo l' asse è maggiormente uniforme nelle piante micropropagate
- **Le piante ottenute da micropropagazione mostrano un numero superiore di ramificazioni secondarie**



Portion of the central leader

# Confronto tra materiale derivante da micropropagazione e da talea (Arbequina)



## Micropropagation Effects on Juvenile Traits, Flower Differentiation, and Tree Architecture in Young Olive Trees

Davide Neri <sup>1</sup>, Tonino Cioccolanti <sup>2</sup>, Giuseppe Zuccherelli <sup>3</sup>, Oriano Navacchi <sup>3</sup>, Veronica Giorgi <sup>1</sup> and Enrico Maria Lodolini <sup>4,\*</sup>

- La prima fioritura è stata osservata dopo due anni dalla messa a dimora, sia le piante derivanti da vitro sia da talea ;
- **Dai risultati del fertility index si evince che la coltura in vitro ha indotto alcuni caratteri di giovanilità, ma in condizioni ex vitro le piante sono in grado di maturare rapidamente, mostrando anche un maggior vigore.**
- La produzione cumulata nei tre anni di indagine non evidenzia differenze significative tra materiale derivante da micropropagazione e da talea.
- **Le piante ottenute da micropropagazione mostrano un numero superiore di ramificazioni secondarie**

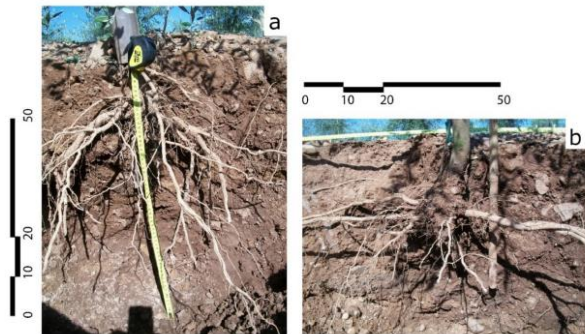
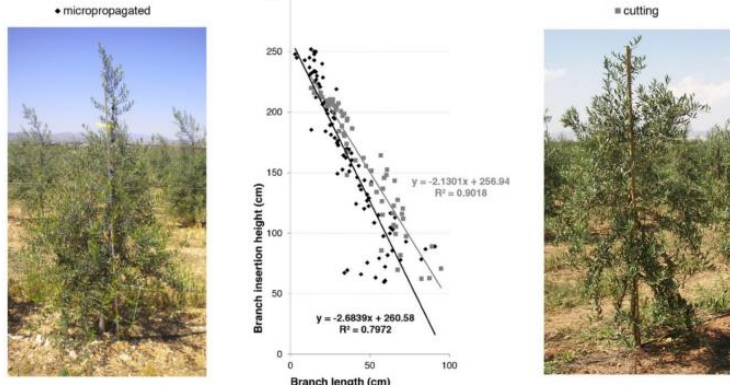
# Confronto tra materiale derivante da micropropagazione e da talea (Arbequina)

Article


## Micropropagation Effects on Juvenile Traits, Flower Differentiation, and Tree Architecture in Young Olive Trees

Davide Neri <sup>1</sup>, Tonino Cioccolanti <sup>2</sup>, Giuseppe Zuccherelli <sup>3</sup>, Oriano Navacchi <sup>3</sup>, Veronica Giorgi <sup>1</sup> and Enrico Maria Lodolini <sup>4,\*</sup>


- Le piante vitro-derivate hanno una forma più conica rispetto a quelle da talea, rendendo tali piante più adatte per l'olivicoltura superintensiva;
- Le piante micropropagate presentano una maggiore uniformità nella distribuzione dell'apparato radicale, con un maggior numero di radici secondarie.



# Ancora dubbi?

- **Il materiale di propagazione derivante da vitro non mostra alcuno svantaggio rispetto al materiale derivante da talea;**
  - Per alcune varietà (vedi Arbequina), il materiale da micropropagazione risulta essere di qualità superiore rispetto a quello derivante da talea;
  - **E' necessario approfondire gli studi e ampliare le conoscenze anche su altre varietà;**
  - **E' fondamentale farlo, e farlo ora, per rispondere alla forte domanda del mercato;**
- 

# Obiettivi della ricerca?

- **Affiancare ai programmi di conservazione della biodiversità, attività di caratterizzazione e valorizzazione della stessa, anche ai fini del miglioramento genetico;**
  - **Ampliare il panorama varietale micropropagato;**
  - **Conservazione e crioconservazione del materiale vegetale;**
- 

# TORNATA DELL'ACCADEMIA NAZIONALE DELL'OLIVO E DELL'OLIO NEL LAZIO

Venerdi, 24 giugno 2022

**Grazie per l'attenzione**

«La micropropagazione nella produzione di piante di olivo per i sistemi intensivi e loro comportamento in campo»

Zuccherelli K., Silvestri C., Lambardi M.