

## Ottimizzazione della radicazione di piante di *Limonium sinuatum* micro-propagate

Serena Viglione\*, Margherita Beruto

Istituto Regionale per la Floricoltura, Sanremo (IM)

### Optimization for rooting of tissue-cultured *Limonium sinuatum* plantlets

**Abstract.** *Stative* (*Limonium sinuatum*) is a cut flower species which is increasing in popularity due to the wide range of flower colors, the good vase life and the adaptability to be cultivated under Mediterranean conditions. Seed propagation can be performed but the homogeneity of the population is not well guaranteed. Vegetative propagation by side shoot or rooting cuttings has low success rates (20-30%) and it is a time consuming process (6-8 months). For this reasons, micropropagation represents a quick way to reproduce selected and healthy genotypes. However, many cultivars have a low *in vitro* rooting percentage (60-70%). This study was undertaken to optimize the rooting phase and the subsequent acclimatization. The Regional Floriculture Institute (Sanremo), in close cooperation with local breeders, started a micropropagation program for different selected genotypes which are about to be released into the market. Therefore, it is mandatory to have an efficient micropropagation protocol and well performing *ex vitro* plantlets. In our study, we carried out two experiments. In the first trial, the rooting parameters were evaluated after 4 weeks on gelled Murashige and Skoog basalmedium (3% sucrose, 0.7% agar) supplemented with different plant growth regulators: 1 mg l<sup>-1</sup> 3-indoleacetic acid (IAA), 1 mg l<sup>-1</sup> 3-indolebutyric acid (IBA), 0.4 mg l<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA). The *in vitro* rooting percentage was 27%, 50% and 58% on the substrate with IAA, IBA, and NAA respectively. Interestingly, during the acclimatization phase, an increase of rooting percentage (about 10%) was observed due to root development for the unrooted *in vitro* shoots. In the second trial, the rooting phase was induced with a dipping method with high concentrations (0.5 g l<sup>-1</sup>) of NAA and subsequent transfer under *in vivo* conditions. According to this method, plantlets showed a high rooting percentage (96%) and a good homogeneity in growth. The outcome of this research

can suggest to perform a pre-rooting induction of the micro shoots from multiplication phase before passing to the acclimatization. A satisfactory plant quality is achieved and a cost-saving process is envisaged.

**Key words:**  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, rooting induction, micropropagation, *stative*.

### Introduzione

Il Genere *Limonium* appartiene alla famiglia delle *Plumbaginaceae* e comprende all'incirca 300 specie (Scordo, 1997). Tra queste, *Limonium sinuatum*, comunemente chiamato *stative*, presenta un'importanza rilevante nella produzione di fiori recisi, sia per l'ampia gamma di colorazioni, che si mantengono inalterate anche nel fiore essiccato, sia per la sua coltura a basso "input energetico", realizzabile in serra fredda o in pieno campo nelle condizioni pedoclimatiche mediterranee, anche con condizioni di elevata salinità e stress idrico. Il *Limonium* è un genere a fioritura tipicamente estiva e figura tra i dieci "summer flower" più venduti in Europa (CBI Market Information Database, 2009).

La sua propagazione viene realizzata da seme, ma tale tipo di propagazione non garantisce il mantenimento delle caratteristiche del genotipo prescelto (principalmente per cultivar di colore bianco e blu-viola); per alcune cultivar viene realizzata da divisione di cespi o per talee da radice, che necessitano tuttavia 6-8 mesi per lo sviluppo e presentano una riuscita limitata del 20-30% (Fujita, 1993). A partire dagli anni '80, sono stati sviluppati protocolli di micropropagazione (Leshem e Cohen, 1983; Harazy, 1985) che hanno permesso la riproduzione di un'ampia gamma di nuove varietà. Le piante micropropagate presentano una maggior produttività, una più ampia gamma e qualità di colori ed una maggiore omogeneità; altresì, le piante *ex vitro* possono essere coltivate ad una minor densità d'impianto e mostrano una maggior resistenza alle malattie (Borrelli, 2011).

\* viglione@regflor.it

Sebbene esistano protocolli di micropropagazione consolidati, viene spesso evidenziata la difficoltà di radicazione di alcune cultivar (Zhao, 2010).

Nella presente ricerca si è voluto valutare l'efficienza di radicazione di genotipi selezionati ed in moltiplicazione presso il nostro laboratorio: valutando l'influenza di diverse auxine nel substrato di radicazione e confrontandola con l'efficacia di una strategia volta ad un pre-trattamento di induzione radicale e successiva radicazione *ex vitro*.

## Materiali e metodi

### *Il materiale vegetale e le condizioni di coltura*

Per le prove sono state utilizzate plantule micropropagate di 6 diverse cultivar, selezionate e fornite da un ibridatore del territorio (identificate con i seguenti codici: rosso 7, rosso 26, rosso 42, giallo 40, oro 22, bianco 24). La coltura *in vitro* è iniziata dall'inoculo di gemme ascellari prelevate da steli fiorali immaturi. Le gemme sono state sterilizzate mediante passaggio in etanolo 70% (v/v) per 1 minuto, ipoclorito di sodio 5% (p/v) per 15 minuti e 3 risciacqui finali con acqua deionizzata sterile. In fase di inoculo è stato utilizzato un substrato colturale base MS (Murashige e Skoog, 1962), gelificato con agar B&V 0,7%, saccarosio 3% e privo di ormoni. La fase di moltiplicazione, condotta, con subcolture regolari ogni 4 settimane per circa 1 anno, è stata realizzata sullo stesso substrato base, addizionato di 0,1 mg l<sup>-1</sup> di 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg l<sup>-1</sup> di acido  $\alpha$ -naftalen-acetico (NAA). Prima dell'inizio delle prove, i germogli (2-3cm) sono stati trasferiti per 4 settimane sullo stesso substrato dell'inoculo, privo di fitoregolatori, al fine di ridurre l'accestimento e favorire una maggiore reattività ai trattamenti radicali. Le condizioni di crescita in sala di coltura sono state per tutte le fasi le seguenti: 18±1°C, 50  $\mu$ mol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, lampade fluorescenti (OSRAM lumilux 36W/840), 16h luce.

### *Radicazione in vitro*

In una prima prova si è valutata la radicazione dopo 4 settimane di coltura in funzione di diverse auxine addizionate ad un substrato base MS: 1 mg l<sup>-1</sup> di acido indol-3 acetico (IAA), 1 mg l<sup>-1</sup> di acido indol-3 butirrico (IBA) e 0,4 mg l<sup>-1</sup> di NAA. La riuscita della radicazione è stata valutata in termini di percentuale di radicazione. Tutte le plantule, incluse quelle non radicate, sono state trasferite in serra per l'acclimatazione, in placche alveolari contenenti torba e perlite (70:30), all'interno di tunnel in plastica che sono stati aperti gradualmente. La riuscita dell'acclimatazione è stata valutata dopo 4 settimane dall'inizio della fase.

### *Radicazione ex vitro*

Nella seconda prova, si è applicato un breve trattamento d'induzione radicale con alte concentrazioni di NAA (*dipping method*), seguito da radicazione diretta *ex vitro*. La base delle plantule è stata immersa per 15 secondi in una soluzione liquida contenente 0,5 g l<sup>-1</sup> di NAA, e successivamente le plantule sono state poste a radicare direttamente in alveoli contenenti fibra di cocco e torba, all'interno di mini-serre, posizionate in sala di coltura per 4 settimane, sempre alle medesime condizioni di crescita presenti nelle fasi precedenti (fig. 1).

## Risultati

Nella prova di radicazione *in vitro*, realizzata confrontando 3 substrati gelificati contenenti diverse auxine, sono state ottenute le seguenti percentuali di radicazione: 27,33%±9,82 su substrato con addizionato 1 mg l<sup>-1</sup> di IAA, 50,35%±10,71 su substrato con 1 mg l<sup>-1</sup> di IBA, 58,03%±10,34 su substrato con 0,4 mg l<sup>-1</sup> di NAA (tab. 1). Per tutte le sei cultivar le percentuali di radicazione maggiori sono state ottenute con l'impiego del substrato contenente NAA; generalmente, risultati intermedi sono stati ottenuti con l'impiego di IBA, mentre, l'utilizzo di IAA ha stimolato di meno la radicazione (fig. 2). Si è riscontrata, inoltre, una variabilità di risposta genotipo-dipendente, ed analizzando nello specifico i risultati ottenuti su substrato contenente NAA, si è ottenuta una % di radicazione inferiore al 30% solo per 1 cultivar delle 6 iniziali (giallo 40), compresa tra 30-70% per 3 cultivar (rosso 7, oro 22, bianco 24) e maggiore del 70%

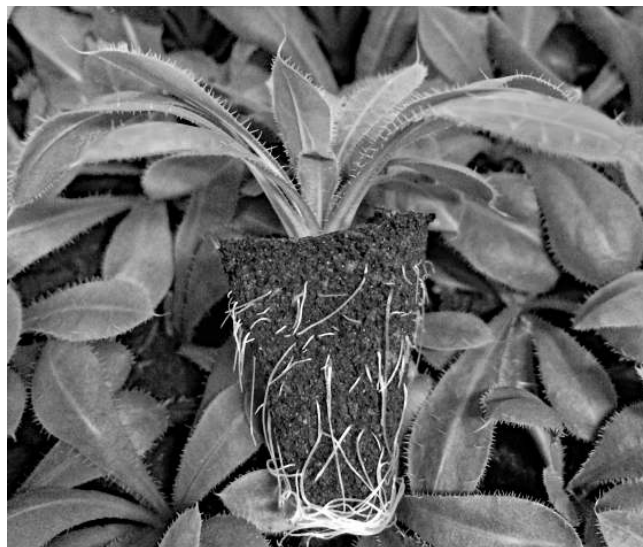


Fig. 1 - Pianta acclimatata di *Limonium sinuatum* dopo trattamento di radicazione *ex vitro*.

Fig.1 - *Limonium sinuatum* acclimatized plant after *ex vitro* rooting treatment.

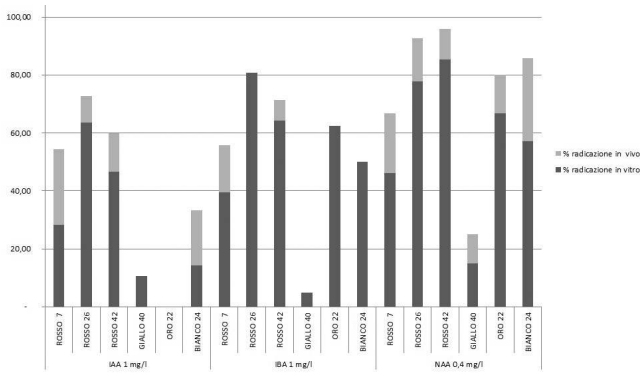


Fig. 2 - Effetto di diverse concentrazioni di auxine sulla radicazione di sei cultivar di *Limonium sinuatum*.

Fig. 2 - Effect of different auxine concentrations on rooting of six *Limonium sinuatum* cultivar.

Tab.1 - Effetto medio di diverse concentrazioni di auxine sulla radicazione del *Limonium sinuatum*.

Tab. 1 - Average effect of different auxine concentrations on *Limonium sinuatum* rooting.

Concentrazione e tipologia di auxina addizionata al substrato	% di radicazione <i>in vitro</i>	% di radicazione <i>in vivo</i> (incremento radicazione a fine acclimatazione)
1 mg l <sup>-1</sup> IAA	27,23±9,82	11,26±4,25
1 mg l <sup>-1</sup> IBA	50,35±10,71	3,90±2,74
0.4 mg l <sup>-1</sup> NAA	58,03±10,34	16,27±2,91

rispettivamente per altre 2 cultivar (rosso26 e rosso42) (fig. 2). Un aumento della percentuale di radicazione variabile dal 5 al 20% è stato registrato nella fase di acclimatazione a seguito dell'immissione di radici in plantule non radicate *in vitro*, in particolare l'incremento maggiore, pari al 16,27%±2,91, è stato riscontrato con il materiale indotto a radicare su substrato contenente NAA (tab. 1).

Nella seconda prova, basandoci sui risultati migliori ottenuti nella prova precedente con l'impiego del NAA, ci siamo limitati ad utilizzare questa auxina a concentrazioni maggiori e tramite un trattamento breve di induzione, che ha permesso di ottenere il 96%±5,28 di materiale radicato ed acclimatato con successo: di rilievo il fatto che non siano state riscontrate differenze a livello di cultivar.

## Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti mostrano come NAA sia il regolatore di crescita più performante. Il suo impiego in un substrato agarizzato, alla concentrazione di 0,4 mg l<sup>-1</sup>,

ha permesso di ottenere una percentuale media di materiale ottimale, radicato ed acclimatato, del 70%. Questi dati sono coerenti con altri lavori condotti su questa specie (Zhao, 2010). L'impiego di questo ormone ad alte concentrazioni (0,5 g l<sup>-1</sup>), tramite un trattamento breve di induzione ed il metodo della radicazione *ex vitro*, permette di ottimizzare il processo di propagazione di questa specie, sia tramite l'incremento delle percentuali di radicazione ed acclimatazione, ma anche tramite una riduzione delle tempistiche e di conseguenza anche dei costi, rendendo più agevole la lavorazione.

## Riassunto

Lo stivice (*Limonium sinuatum*) è una specie ornamentale da fiore reciso di crescente interesse. La ricerca è stata mirata all'ottimizzazione della fase di radicazione di 6 genotipi selezionati. La radicazione *in vitro* su substrato Murashige e Skoog addizionato di diverse auxine (1 mg l<sup>-1</sup> di acido indol-3 acetico; 1 mg l<sup>-1</sup> di acido indol-3 butirrico; 0,4 mg l<sup>-1</sup> di acido  $\alpha$ -naftalen-acetico) ha fornito la migliore percentuale di radicazione (58%) con l'impiego di NAA. La radicazione *ex vitro*, ottenuta tramite un breve trattamento con alte concentrazioni di NAA (0,5 g l<sup>-1</sup>, 15 secondi), ha permesso di ottimizzare la percentuale di radicazione al 96%.

**Parole chiave:** acido  $\alpha$ -naftalen-acetico, induzione radicale, micropropagazione, stivice.

## Bibliografia

- BORRELLI C., 2011. *Stivice programmato*. Clamer informa, pp. 17-25.
- FUJITA M., 1993. *Breeding and Cultivation: Stivice (Limonium)*. Seibunndo-Shinkosha CO. Ltd. (Tokyo), pp. 136-150.
- HARAZY A., LESHEM B., COHEN A., RABINOWITCH H. D., 1985. *In vitro propagation of Stivice as an aid to breeding*. HortScience, 20 (3): 361-362.
- LESHEM B., COHEN A. 1983. *Clonal propagation of stivice (Limonium sinuatum L.) in vitro*. Hassadesh, 64 (2): 318-319.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*. Physiol. Plant 15:473-497.
- SCORDO E., 1997. *Limonium, steli fioriti in tutte le stagioni*. ColtureProtette 2: 41-46.
- ZHAO H., 2010. *Optimization of Limonium sinuatum rooting by using multiplication media and pre-rooting media during tissue culture*. Wagenin University and Research. www.Edepot.wur.nl/166714
- CBI MARKET SURVEY: THE EU MARKET FOR SUMMER FLOWERS, 2009. www.cbi.eu/marketinfo/cbi/docs/cut\_flowers\_and\_foliage\_the\_eu\_market\_for\_summer\_flowers