

## Effetti della composizione nutritiva del substrato e della tipologia di auxine sulla radicazione in vitro di un'accessione siciliana di Iperico

Giancarlo Fascella<sup>1\*</sup>, Alessandra Carrubba<sup>2</sup>, Silvia Lazzara<sup>1</sup>, Gaetano Giardina<sup>1</sup>, Michele Massimo Mammano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, Bagheria (PA)

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università di Palermo

### Effects of substrate nutrients concentration and different auxins on in vitro rooting of a Sicilian St. John's wort

**Abstract.** *Hypericum perforatum* L. is traditionally used as a medicinal plant because of different bioactive compounds with documented antidepressant and anti-inflammatory activities. Micropropagation for plantlets mass production with high content of secondary metabolites has often been prevented in the final rooting phase because rooted plantlets are not necessary for the extraction of metabolites. Therefore, a study was conducted in order to set up an efficient in vitro rooting and acclimatization protocol of a Sicilian genotype well-adapted to local conditions. Shoots were in vitro multiplied on Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 1 mg/L of 6-benzyladenine over a 40 day-period. The rooting efficiency was evaluated as a function of the minerals and growth regulators supplement. Particularly, full and half-strength MS formulations supplemented or not with 1 mg/L indole-3-acetic acid (IAA) or 1 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) have been tested. The highest rooting rate (98.4 and 96.6%, respectively) was achieved on MS with IAA and for all ½MS media; the formulation ½MS with no auxins gave the highest number of roots/plant (8.3) while the longest roots (34.4 mm) were observed when MS without auxins was used. Rooted plantlets were ex-vitro acclimatized by transferring them into benches under mist and using peat:perlite and sand:perlite mixtures (1:1, v/v): acclimatization rate was higher (84.6%) for rooted plantlets grown in sand:perlite substrate.

**Key words:** *Hypericum*, micropropagation, rooting hormones, ex-vitro acclimatization.

### Introduzione

L'Iperico (*Hypericum perforatum* L. o Erba di S. Giovanni) viene comunemente utilizzato come pianta

medicinale per la presenza di composti bioattivi (iperforina, ipericina e pseudoipericina) con proprietà antidepressive (Mccoy e Camper, 2002; Zobayed *et al.*, 2005) ed antinfiammatorie (Pasqua *et al.*, 2003; Wojcik e Podstolski, 2007).

Già da alcuni anni, la propagazione in vitro della specie è una tecnica utilizzata per la produzione massale di plantule virus-essenti ed uniformi da cui estrarre metaboliti secondari (Gadzovska *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2002), anche attraverso l'uso di bioreattori (Cui *et al.*, 2010). Spesso, però, il processo micropropagativo viene interrotto nella fase di moltiplicazione (Savio *et al.*, 2012) poiché, per l'estrazione dei metaboliti, non è necessario disporre di plantule radicate; di conseguenza, sono poche le informazioni disponibili sulla radicazione e sull'acclimatamento ex-vitro di questa specie.

Per colmare il gap conoscitivo e definire un protocollo completo per la micropropagazione di genotipi di Iperico dotati di particolari caratteristiche (rusticità, ridotte esigenze, crescita rapida), è stato condotto uno studio sulla radicazione *in vitro*, valutando l'influenza della composizione nutritiva del substrato e di differenti ormoni auxinici e l'acclimatamento di un'accessione siciliana ben adattata alle condizioni pedoclimatiche locali (elevata temperatura e luminosità).

### Materiali e metodi

Le prove sperimentali sono state condotte, nel biennio 2014-2015, presso il laboratorio di micropropagazione del CREA Centro di Ricerca Difesa e Certificazione di Bagheria (PA).

#### *Sterilizzazione e moltiplicazione*

Porzioni nodali prelevati da semenzali di 8 settimane d'età sono stati sterilizzati tramite immersione in soluzione acquosa di etanolo (70%) per 60 sec e successivamente in soluzione di ipoclorito di sodio (1:2, v/v - 5% Cl attivo) per 20 min. Gli espianti sono stati posti su un substrato agarizzato Murashige e Skoog (MS) additivato di 1 mg/L di benziladenina (BA) per indurre la moltiplicazione dei germogli. Il

\* giancarlo.fascella@crea.gov.it

materiale vegetale è stato allevato in una camera di crescita a  $23\pm 1^\circ\text{C}$  (fotoperiodo 16h) con lampade fluorescenti a luce bianca 40W Osram. Il tasso di moltiplicazione (numero di germogli/espianto) è stato rilevato dopo 30 giorni.

### Radicazione

I germogli sono stati trasferiti su substrati per valutare l'influenza della composizione nutritiva e di differenti ormoni auxinici sulla radicazione: MS intero o dimezzato ( $\frac{1}{2}\text{MS}$ ) privo di auxine, o con l'aggiunta di 1 mg/L di acido 3-indolacetico (IAA) o di 1 mg/L di acido 3-indolbutirrico (IBA). Il materiale vegetale è stato allevato alle stesse condizioni della fase di moltiplicazione. È stato adottato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati, con tre repliche per trattamento; ogni replica era costituita da 20 cluster. Il tasso di radicazione dei cluster, il numero di radici/cluster, la lunghezza delle radici e il peso fresco delle plantule radicate sono stati rilevati dopo 40 giorni.

### Acclimatamento

Le plantule radicate sono state acclimatate in serra all'interno di bancali dotati di impianto di nebulizzazione tipo mist (U.R. 80%) e coperti con un telo di plastica trasparente che veniva gradualmente sollevato per ridurre l'umidità e facilitare l'ambientamento. Sono stati utilizzati vasi riempiti con miscugli a base di torba/perlite e sabbia/perlite (1:1, v/v). La percentuale di acclimatamento delle piantine radicate è stata rilevata dopo 30 giorni.

### Elaborazione statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le medie separate con il test di Duncan al 5% di probabilità. Prima dell'ANOVA, i dati espressi in percentuale (radicazione e ambientamento) sono stati trasformati in valori angolari.

## Risultati

Durante la fase di moltiplicazione, sono stati mediamente ottenuti 17,4 germogli/espianto (dato non riportato).

Durante la fase di radicazione, i tassi di radicazione in vitro sono stati influenzati sia dalla composizione del substrato, sia dalla tipologia di auxina utilizzata in quanto i valori più elevati sono stati registrati su MS piena forza con IAA (98,4%) e in tutti i substrati  $\frac{1}{2}\text{MS}$  (96,6% in media) mentre quelli più bassi su MS con IBA (50,9%) (tab. 1).

Il più elevato numero di radici/cluster è stato rilevato sui substrati privi di auxine (rispettivamente 8,1 e 8,3 per MS0 e  $\frac{1}{2}\text{MS0}$ ), quello più ridotto sui terreni arricchiti con IBA. La maggior lunghezza media delle radici (32,1 mm) è stata osservata in cluster su MS0; le radici più corte (in media 11,7 mm) nei substrati con IAA (tab. 1).

La più elevata altezza media dei cluster è stata rilevata su MS0,  $\frac{1}{2}\text{MS0}$  e  $\frac{1}{2}\text{MS}$  con IBA (rispettivamente 44,0-43,8-41,5 mm). Il maggior peso fresco delle plantule è stato osservato su MS0 (1,31 g), mentre i valori più bassi (0,30 g) sono stati registrati nei

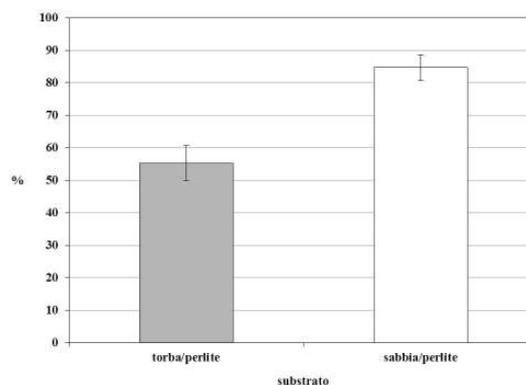


Fig. 1 - Influenza dei diversi substrati di coltivazione (1:1, v/v) sull'acclimatamento ex-vitro di plantule di Iperico. Media  $\pm$  errore standard.

Fig. 1 - Ex-vitro acclimatization rate of *Hypericum perforatum* rooted plantlets in different growing substrates (1:1, v/v). Vertical bars are means  $\pm$  standard error

Tab. 1 - Effetti della composizione nutritiva del substrato e del tipo di auxina sulla radicazione *in vitro* di cluster di Iperico  
Tab. 1 - Effect of nutrients concentration and auxin typology of substrate on *in vitro* rooting of *Hypericum perforatum* shoots.

Substrato	Radicazione (%)	Radici per cluster (n.)	Lunghezza radici (mm)	Altezza cluster (mm)	Peso fresco plantule (g)
MS 0	81,9 b	8,3 b	32,1 a	44,0 a	0,57 c
MS 0 + IBA 1 mg/L	59,0 c	13,3 ab	19,2 b	27,0 b	1,31 a
MS 0 + IAA 1 mg/L	98,4 a	7,4 b	10,9 c	33,5 ab	0,35 d
$\frac{1}{2}$ MS <sup>0</sup>	99,1 a	8,1 b	22,9 b	43,8 a	0,26 d
$\frac{1}{2}$ MS + IBA 1 mg/L	93,2 a	6,1 b	18,9 b	40,5 a	0,54 c
$\frac{1}{2}$ MS + IAA 1 mg/L	97,5 a	18,9 a	34,4 a	41,2 a	0,92 b
Significatività	*	*	**	*	**

Per ogni colonna, i valori medi contrassegnati da lettere diverse sono significativi per  $p < 0.05$  (test di Duncan)

\*, \*\*=significativo rispettivamente per  $p \leq 0.05$  e  $0.01$ .

terreni con IAA (tab. 1).

Durante la fase di ambientamento *ex vitro*, le plantule radicate allevate su sabbia/perlite hanno fatto registrare una più elevata percentuale di acclimatamento rispetto a quelle poste su torba/perlite (rispettivamente 84,6 e 55,2%) (fig. 1).

## Discussione e conclusioni

Gli effetti positivi dell'IAA sull'induzione radicale dell'Iperico siciliano sono in linea con i risultati ottenuti da Oluk e Orhan (2009) che hanno osservato un più elevato tasso di radicazione in plantule di *H. triquetrifolium* su MS piena forza con IAA 5.7  $\mu\text{M}$  rispetto allo stesso terreno privo di ormoni. Gadzovska *et al.* (2005) riferiscono di elevate percentuali di radicazione *in vitro* di germogli di *H. perforatum* su substrati arricchiti con IAA (0.05–1.0 mg/L) e che le radici formatesi erano lunghe, sottili e verdi; inoltre, concentrazioni superiori a 1 mg/L causavano necrosi delle radici e inficiavano la produzione di metaboliti secondari.

In linea con i nostri risultati sull'acclimatamento, Gadzovska *et al.* (2005) riferiscono di buone percentuali di sopravvivenza di plantule in vaso di Iperico su miscuglio di sabbia e perlite al 50%. Inoltre, Oluk e Orhan (2009) riportano come i migliori tassi di sopravvivenza in plantule di *H. triquetrifolium* siano stati ottenuti su substrato a base di sabbia:torba:perlite rispetto alla sola perlite.

In conclusione, si può affermare che un opportuno dosaggio della composizione nutritiva e la presenza/assenza di auxina nel substrato di radicazione abbiano consentito di definire un protocollo micropropagativo completo per un Iperico siciliano. Tale accessione si è rivelata alquanto rustica poiché i migliori risultati sono stati ottenuti su terreni privi di ormoni radicanti, probabilmente a causa di un elevato contenuto di auxine endogene del genotipo studiato, la cui rusticità sembra essere confermata dal maggior acclimatamento in sabbia/perlite piuttosto che in torba/perlite.

## Riassunto

L'Iperico viene comunemente utilizzato come pianta medicinale per la presenza di composti bioattivi con proprietà antidepressive ed antinfiammatorie. La micropropagazione della specie per la produzione massale di plantule da cui estrarre metaboliti secondari viene spesso interrotta nella fase di moltiplicazione poiché, per l'estrazione, non è necessario disporre di plantule radicate. Pertanto, al fine di colmare questo gap conoscitivo, è stato condotto uno studio sulla

radicazione *in vitro* e l'acclimatamento di un'accessione siciliana ben adattata alle condizioni pedoclimatiche locali. Germogli moltiplicati su substrato agarizzato di Murashige & Skoog (MS) additivato di 1 mg/L di benziladenina sono stati trasferiti su specifici substrati per valutare l'influenza della composizione nutritiva e di differenti ormoni auxinici sulla radicazione: MS intero (MS0) o dimezzato ( $\frac{1}{2}$ MS) privo di auxine, oppure con l'aggiunta di 1 mg/L di acido indolacetico (IAA) o di 1 mg/L di acido indolbutirrico (IBA). I tassi di radicazione sono stati influenzati sia dalla composizione del substrato sia dalla tipologia di auxina utilizzata: i valori più elevati sono stati registrati su MS con IAA (98,4%) e in tutti i substrati  $\frac{1}{2}$ MS (96,6% in media). Il maggior numero di radici/plantula è stato rilevato su  $\frac{1}{2}$ MS0 (8,3) e su MS0 (8,1). Le radici più lunghe (34,4 mm) sono state misurate in plantule su MS0. Le plantule radicate *in vitro* sono state acclimate in bancali riscaldati sotto mist, utilizzando miscugli a base di torba/perlite e sabbia/perlite (1:1, v/v); le plantule allevate su sabbia/perlite hanno fatto registrare la più elevata percentuale di acclimatamento (84,6%).

**Parole chiave:** acclimatamento, Erba di S. Giovanni, micropropagazione, ormoni auxinici

## Bibliografia

- CUI X., CHAKRABARTY D., LEE E., PAEK K., 2010. *Production of adventitious roots and secondary metabolites by Hypericum perforatum L. in a bioreactor*. Bioreactor Techn. 101: 4708-4716.
- GADZOVSKA S., MAURY S., OUNNAR S., RIGHEZZA M., KASCÁKOVA S., REFREGIERS M., SPASENOSKI M., JOSEPH C., HAGÈGE D., 2005. *Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different Hypericum perforatum L. in vitro cultures*. Plant Physiology and Biochemistry 43: 591-601.
- MCCOY J.A., CAMPER N.D., 2002. *Development of a micropropagation protocol for St. John's Wort (Hypericum perforatum L.)*. HortScience 37: 978-980.
- OLUK E.A., ORHAN S., 2009. *Thidiazuron induced micropropagation of Hypericum triquetrifolium Turra. African Journal of Biotechnology 8 (15): 3506-3510*.
- PASQUA G., AVATO P., MONACELLI B., SANTAMARIA A.R., ARGENTIERI M.P., 2003. *Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of Hypericum perforatum cv. Topas*. Plant Science 165: 977-982.
- SAVIO L.E.B., ASTARITA L.V., SANTAREM E.R., 2012. *Secondary metabolism in micropropagated Hypericum perforatum L. grown in non-aerated liquid medium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 108: 465-472.
- WALKER T.S., BAI S.H.P., VIVANCO J.M., 2002. *Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of Hypericum perforatum L. (St. John's wort)*. Phytochem. 60: 289-293.
- WOJCIK A., PODSTOLSKI A., 2007. *Leaf explant response in in vitro culture of St. John's wort (Hypericum perforatum L.)*. Acta Physiologia Plantarum 29: 151-156.
- ZOBAYED S.M.A., MURCH S.J., RUPASINGHE H.P.V., SAXENA P.K., 2004. *In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (Hypericum perforatum L. cv 'New Stem')*. Plant Science, 166: 333-340.