

Prove preliminari per l'individuazione di un protocollo di micropropagazione per *Ornithogalum thyrsoides* cv 'Mabele'

Ilaria Marchioni*, Carlo Mascarello, Manuela Pamato, Andrea Copetta, Barbara Ruffoni
CREA - Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (IM)

Preliminary experiments for the detection of a micropropagation protocol for *Ornithogalum thyrsoides* cv 'Mabele'

Abstract. *Ornithogalum thyrsoides* Jacq. is a bulbous plant indigenous to South Africa, belonging to *Asparagaceae* family. This species has an important ornamental value due to the beauty and the colour of its flowers. Thanks to a MTA (Material Transfer Agreement), CREA of Sanremo has received some bulbs of cultivar 'Mabele' from ARC of Pretoria (ZA), currently being patented, to evaluate its performances in the Mediterranean climate. In order to obtain enough bulbs available for field trials, the material received was used for preliminary experiments finalised to the detection of a micropropagation protocol for this cultivar. Potted bulbs has been sterilised and the effect of ethanol (70% for 30'') or sodium hypochlorite (2,5% or 5%), the latter for 20' or 30', has been analyzed. After two rinses with sterilized water for 10', the bulbs have been cut longitudinally and the two half obtained were placed in a culture medium composed by Murashige e Skoog (MS) salt and vitamins, benzyladenine (BA) (4 mg/L), naphtalenacetic acid (NAA) (0,5 mg/L), agar (7 g/L). The pH values of all media used in this work have been adjusted to 5,7 before autoclaving (1,2 atm and 121 °C for 20'). All cultures have been maintained at 23 ± 1 °C under light intensity of 30 µM m⁻² s⁻¹ with 16 h light period. After two weeks, the higher number of aseptic bulbs has been obtained with 5% sodium hypochlorite for 30', as well as 2,5 % sodium hypochlorite per 30'. Ethanol treatment was ineffective during sterilization. Sterile bulbils obtained have been *in vitro* propagated using the same culture medium described above, showing a multiplication rate of 1,7 ± 0,3 bulbils after 60 days with 0,24 ± 0,01 mm diameter. After numerous subcultures, bulbils have been subjected to a bulbs enlargement experiment, analysing the effect of different sucrose concentrations (30 or 90 g/L), type

of auxin (indolbutirric acid, IBA or NAA – 2mg/L) and salt composition (MS or WMP – Woody Plant Medium). After 90 days, bulbs diameter and weight, as well as callus presence/absence, have been examined. NAA in combination with 90 g sucrose increased significantly bulbs diameter, as well as NAA in combination with 30 g sucrose increased significantly bulbs weight and root number. The longer roots have been obtained without plant growth regulators, although their number decreased. Almost all the bulbs growth on NAA, regardless sugar concentration and salt composition of the culture media, developed callus (from 96,7 to 100% of the bulbs used in the experiment). There was less quantity of callus on bulbs grown on IBA (from 36,2 to 76,7%) and no callus developed on bulbs grown on control media. As callus is undesired, new experiments need to be performed, taking care to test other plant growth regulators modulating their concentration.

Key words: sterilization, bulb enlargement, indolbutirric acid, naphtalenacetic acid, sucrose.

Introduzione

Ornithogalum è un genere caratterizzato da specie bulbose native del Mediterraneo e del Sud Africa; le specie che lo compongono, comunemente conosciute come "Star of Bethlehem", sono coltivate per il loro elevato valore ornamentale (Naik e Nayak, 2005) e commercializzate sia come fiore reciso che come pianta in vaso. La propagazione vegetativa è molto lenta e le tecniche di coltura *in vitro* costituiscono un valido strumento per ridurne i tempi di moltiplicazione. Partendo da differenti tipologie di espianto, diverse specie di *Ornithogalum* sono state propagate *in vitro* con successo (Hussey, 1979; Rensburg *et al.*, 1989; Karuiki e Kako, 2003; Malabadi e van Staden, 2004; Naik e Nayak, 2005; Suh *et al.*, 2005; Ozel *et al.*, 2008; Karaguzel *et al.*, 2012). In questo lavoro sono state eseguite alcune prove preliminari per l'in-

* ilaria.marchioni.16@gmail.com

dividuzione di un protocollo di micropropagazione per *Ornithogalum thyrsoides* cv 'Mabele'.

Materiali e metodi

Sterilizzazione e moltiplicazione del materiale

Grazie ad un MTA (*Material Transfer Agreement*), il CREA di Sanremo ha ricevuto dall'ARC di Pretoria (ZA) alcuni bulbi della cultivar 'Mabele', attualmente in fase di registrazione. Per avviare la coltura *in vitro*, i bulbi sono stati selezionati, privati di foglie e radici e lavati ripetutamente sotto l'acqua corrente. Successivamente, il materiale è stato pretrattato per 60' in 500 mL di acqua tiepida (addizionata di Tween20® e di 1 mL di candeggina) e mantenuto in continua agitazione. Per verificare l'influenza del trattamento di sterilizzazione sulla vitalità e l'asepsi dei bulbi *in vitro*, è stato valutato l'effetto di tre fattori: 1) l'etanolo (70% per 30''); 2) la concentrazione di ipoclorito di sodio (2,5% + Tween20® o 5% + Tween20®); 3) il tempo di esposizione all'ipoclorito di sodio (20' o 30'). I bulbi sono stati risciacquati due volte in acqua distillata sterile per 10' ciascuno, sezionati a metà lungo il loro asse longitudinale e adagiati su mezzo di coltura contenente sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), saccarosio (30 g/L), BA (4 mg/L) e NAA (0,5 mg/L) (Karaguzel *et al.*, 2012). Sono stati utilizzati 3 bulbi per ciascuna combinazione di trattamenti (6 metà distribuite in 3 barattoli diversi) e posti in camera di crescita a 23 ± 1 °C, con un fotoperiodo di 16 ore (intensità luminosa = $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dopo due settimane dalla sterilizzazione, è stato rilevato il numero degli espianti vivi e sterili. Il materiale ottenuto è stato moltiplicato sul mezzo di coltura sopra riportato. Dopo 60 giorni di coltura, sono stati valutati il tasso di moltiplicazione e il diametro dei bulbilli.

Effetto dei sali, della concentrazione di saccarosio e delle auxine sull'ingrossamento del bulbo

Parte del materiale moltiplicato è stato utilizzato per una prova *in vitro*, finalizzata all'ingrossamento del bulbo. Il disegno sperimentale ha previsto l'impianto randomizzato di 10 bulbilli per vaso con 3 repliche per trattamento. I fattori considerati sono stati: la composizione salina (sali MS e WPM - Lloyd e McCown, 1980), l'effetto di due diverse auxine (IBA e NAA a 2 mg/L) e la concentrazione di saccarosio (30 e 90 g/L) (tab. 1). Tutti i mezzi di coltura sono stati portati a pH 5,7, addizionati con 7 g/l di agar e autoclavati a 121 °C per 20' (1,2 atm). L'esperimento si è svolto per 90 giorni al termine dei quali sono stati rilevati i seguenti parametri di sviluppo: il diametro e

Tab.1 - Composizione dei terreni impiegati nella prova di ingrossamento del bulbo.

Tab.1- Composition of the culture media used in the bulbs enlargement experiment.

Terreno	Sali	Auxina (2 mg/L)	Saccarosio (g/L)
T1	MS	IBA	30
T2	MS	IBA	90
T3	MS	NAA	30
T4	MS	NAA	90
T5	WPM	IBA	30
T6	WPM	IBA	90
T7	WPM	NAA	30
T8	WPM	NAA	90
T9	MS		30
T10	WPM		30

peso del bulbo principale, il numero e la lunghezza delle radici e la presenza/assenza di callo.

Analisi statistica dei dati

I dati relativi al diametro e al peso finale dei bulbi al termine della prova sono stati analizzati statisticamente con l'analisi della varianza tramite test ANOVA a una via e il confronto tra le medie con il test PLSD di Fisher (significatività per $p \leq 0.05$).

Risultati

I bulbi prelevati per la sterilizzazione possedevano un diametro pari a $1,1 \pm 0,1$ cm. Il trattamento con etanolo è risultato inefficace in fase di sterilizzazione (tab. 2); in sua assenza, il maggior numero di numero di espianti vivi e sterili è stato ottenuto grazie all'impiego dell'ipoclorito di sodio al 5% per 30', sebbene anche la combinazione 2,5 % di ipoclorito di sodio per 20' abbia fornito riscontri positivi (tab. 2). In entrambi i casi, gli espianti non sono stati danneggiati

Tab. 2 - Effetto di diversi trattamenti di disinfezione dei bulbi sulla vitalità e sterilità degli espianti.

Tab. 2 - Effect of different treatments on sterilization of bulbs.

Effetto		Vivi e sterili (%)	Inquinamenti batterici (%)	Inquinamenti fungini (%)
Applicazione di etanolo 70% per 30''	Si	12,5	53,1	34,4
	No	40,6	28,1	31,3
Concentrazione ipoclorito di sodio (%)	2,5	25	28,1	46,9
	5	28,1	53,1	18,8
Minuti di esposizione all'ipoclorito	20	31,2	34,4	34,4
	30	21,9	46,9	31,2

dal trattamento subito; sono stati capaci di generare bulbilli sul mezzo di coltura utilizzato (fig. 1). I bulbilli sterili ottenuti sono stati propagati *in vitro*, con un tasso di moltiplicazione pari a $1,7 \pm 0,3$ bulbilli (dopo 60 giorni) con un diametro di $0,24 \pm 0,01$ mm.

Il diametro del bulbo è aumentato in modo statisticamente significativo sui mezzi di coltura contenente NAA in combinazione con 90 g di saccarosio, mentre la presenza nel substrato semisolido di NAA e saccarosio in quantità pari a 30 g ha indotto un incremento significativo del peso del bulbo principale (tab. 3). Nei terreni in cui NAA e 30 g di saccarosio erano compresenti, si è ottenuto il maggior numero di radici, mentre l'assenza di ormoni riduce il numero di radici ma ne aumenta la lunghezza (dati non mostrati). Inoltre, in tutti i terreni in cui è presente NAA, il materiale in prova ha sviluppato masse callose più o meno estese (dal 96,7 al 100% di bulbi con callo), fenomeno che si è ridotto in presenza dell'IBA (dal 36,2 al 76,7% di bulbi con callo), fino ad annullarsi



Fig. 1 - Bulbi rigenerati dopo la sterilizzazione
Fig. 1 - Bulb regeneration after sterilization

Tab. 3 - Effetto della composizione salina, delle auxine e della concentrazione di saccarosio sul diametro e sul peso dei bulbi dopo 90 giorni *in vitro*. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante ANOVA seguita dal test PLSD di Fisher (significatività per $p \leq 0.05$).

Tab. 3 - Effect of salts, auxins and sucrose concentrations on bulb diameter and weight after 90 days *in vitro*. Data were statistically analysed by ANOVA followed by Fisher's PLSD test (cut-off significance at $p \leq 0.05$).

Effetto	Trattamento	Diametro finale (cm±es)	Peso finale (g±es)
Composizione salina	MS	$0,42 \pm 0,02$ a	$0,539 \pm 0,051$ a
	WPM	$0,39 \pm 0,02$ a	$0,586 \pm 0,060$ a
Tipo di auxina (2 mg/L)	controllo	$0,28 \pm 0,02$ a	$0,184 \pm 0,014$ a
	IBA	$0,38 \pm 0,02$ b	$0,334 \pm 0,028$ a
	NAA	$0,49 \pm 0,02$ c	$0,966 \pm 0,079$ b
Concentrazione saccarosio (g/L)	30	$0,36 \pm 0,01$ a	$0,788 \pm 0,059$ b
	90	$0,47 \pm 0,02$ b	$0,388 \pm 0,031$ a

nei due controlli (0% di callo). Nella figura 2 è possibile osservare l'aspetto dei bulbi al termine della prova di ingrossamento.

Discussione e conclusioni

Le condizioni di sterilizzazione testate hanno permesso di ottenere un numero sufficiente di espianti sterili pronti per la micropropagazione. Per questa fase, è stato scelto uno dei mezzi di coltura utilizzati da Karaguzel *et al.* (2012), grazie al quale 7 delle 8 specie oggetto di studio hanno mostrato una rilevante produzione di bulbilli per espianto.

Dopo tre mesi di coltura sullo stesso terreno di crescita, i bulbilli di *O. thyrsoides* cv 'Mabele' ottenuti presentavano un diametro ridotto, incompatibile con un immediato ciclo di micropropagazione *in vitro*. Le condizioni che stimolano la produzione di bulbi *in vitro* sono diverse (Marinangeli, 2012), alcune delle quali posso favorire l'ingrossamento del bulbo stesso. In questo lavoro, è stato osservato come la combinazione NAA/90g di saccarosio permetta il raggiungimento di tale scopo. Data l'elevata produzione di callo come effetto indesiderato, è necessario effettuare nuove prove modulando la concentrazione ormonale.

Riassunto

Ornithogalum thyrsoides Jacq. è una bulbosa endemica del Sud Africa, appartenente alla famiglia

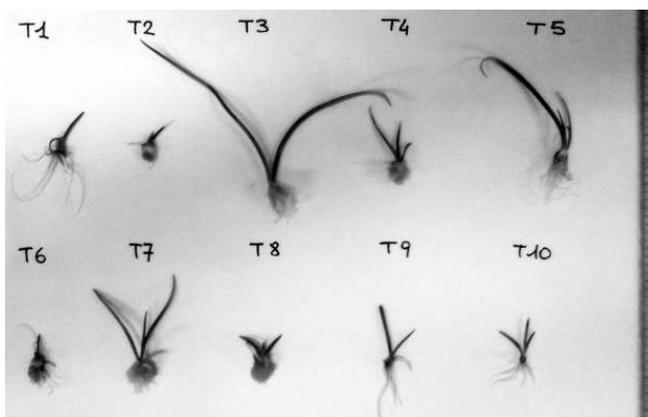


Fig. 2 - Bulbi al termine della prova di ingrossamento. T1: MS, IBA, 30g saccarosio; T2: MS, IBA, 90g saccarosio; T3: MS, NAA, 30g saccarosio; T4: MS, NAA 90g saccarosio; T5: WPM, IBA, 30g saccarosio; T6: WPM, IBA, 90g saccarosio; T7: WPM, NAA, 30g saccarosio; T8: WPM, NAA, 90g saccarosio; T9: MS, 30g saccarosio; T10: WPM, 30g saccarosio.

Fig. 2 - Bulbs at the end of the bulb enlargement experiment. T1: MS, IBA, 30g sucrose; T2: MS, IBA, 90g sucrose; T3: MS, NAA, 30g sucrose; T4: MS, NAA 90g sucrose; T5: WPM, IBA, 30g sucrose; T6: WPM, IBA, 90g sucrose; T7: WPM, NAA, 30g sucrose; T8: WPM, NAA, 90g sucrose; T9: MS, 30g sucrose; T10: WPM, 30g sucrose.

delle Asparagaceae, con un importante valore ornamentale. Bulbi della cultivar 'Mabele', forniti dall'ARC di Pretoria (ZA), sono stati oggetto di alcune prove preliminari finalizzate all'individuazione di un protocollo di micropropagazione. Dai risultati è emerso che: 1) si ottengono bulbi sterili impiegando ipoclorito di sodio al 5% per 30'; 2) la presenza di 2mg/L di acido naftalenacetico e 90g di glucosio nello stesso mezzo di coltura garantisce l'incremento del diametro dei bulbilli rigenerati, sebbene con indesiderata produzione di callo.

Parole chiave: sterilizzazione, ingrossamento, acido indolbutirrico, acido naftalenacetico, saccarosio.

Bibliografia

- HUSSEY G., 1976. *Plantlet regeneration from callus and parent tissue in Ornithogalum thyrsoides*. Journal of Experimental Botany, 27(97): 375-380.
- KARIUKI W., KAKO S., 2003. *Micropropagation of Ornithogalum saundersiae Bak.* Acta Horticulturae 624:521-526.
- LLOYD G., MCCOWN B.H., 1980. *Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (Kalmia latifolia) by use of shoot tip culture*. Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society, 30:421-427
- MALABADI R.B., VAN STADEN J., 2004. *Regeneration of Ornithogalum in vitro*. South African Journal of Botany, 70(4): 618-621.
- MARINANGELI P., 2012. *Micropropagazione delle geofite ornamentali*. Italus Hortus 19(1):65-76
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Physiologia Plantarum, 15(3):473-497
- KARAGUZEL O. ET AL., 2012. *In vitro propagation of native Ornithogalum species in West Mediterrean region of Turkey*. African Journal of Agricultural Research, 7(17):2669-2673
- NAIK P.K., NAYAK S., 2005. *Different modes of plant regeneration and factors affecting in vitro bulblet production in Ornithogalum virens*. Science Asia, 31(4): 409-414.
- OZEL Ç.A., KHAWAR K.M., KARAMAN S., ATEŞ M.A., ARSLAN O., 2008. *Efficient in vitro multiplication in Ornithogalum ulouphyllum Hand.-Mazz. from twin scale explants*. Scientia Horticulturae, 116:109-112.
- RENSBURG J.G.J., VCELAR B.M., LANDBY P.A., 1989. *Micropropagation of Ornithogalum maculatum*. South African Journal of Botany, 55(1): 137-139.
- SUH K.J., LEE W., LEE A., 2005. *New plantlet proliferation and bulbing promotion in vitro of Ornithogalum hybrid*. Acta Horticulture, 683:155-163.