

Realizzazione di un protocollo di micropropagazione per la produzione di *Musa basjoo*

Federico Dei*, Carlo Mascarello, Andrea Copetta, Manuela Pamato, Barbara Ruffoni

CREA; Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Unità di ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (IM)

Realization of an efficient *in vitro* micropropagation protocol for massive production of *Musa basjoo*

Abstract. Banana (*Musa* spp.) is one of three genera belonging to the Musaceae family, and is one of the major sources of nutrition in tropical and sub-tropical countries. Indeed, *M. basjoo* Siebold & Zucc. ex Iinuma (known variously as Japanese banana) is native to southern China and it is one of the most well-known species of the genus; it is suitable for ornamental cultivation because it resists at temperatures close to -15 °C. Banana is triploid and can be propagated generally by rhizome division, although this technique can lead to the spread of pathogens and reduce the initial propagation capacity of mother plant. For this reason, banana is propagated *in vitro* with high rates of multiplication and quality of plant material. CREA of Sanremo has developed an efficient micropropagation protocol for the rapid production of *M. basjoo*. Suckers grown from rhizome are used to begin the aseptic cultivation. To optimize *in vitro* culture, several experiments have been performed to reduce tissue oxidation and the high level of microorganism contamination during sterilization, as well as to identify the better conditions for the culture medium and the environment. To overcome tissue oxidation and the high rate of contaminations, it has been compared the effect of two pre-treatment: 1) a solution with acetylsalicylic acid (1 g/L) for 24 hour or 2) warm water with a few drops of sodium hypochlorite and Tween 20 for 60' followed by 70% ethanol immersion per 1'. In addition, the explants were treated with a solution of sodium hypochlorite 2.5% and three exposure times (10', 20' and 30') were compared. Then, all the suckers were rinsed twice in sterile distilled water for 10' and placed on a culture medium with MS salts, BA 5 mg/L, IAA 0.5 mg/L and Cefotaxime 10 mg/L. After that, a multiplication experiment was performed to find the best saline composition (MS or WPM), the most effective cytokinin (BA or

2ip to 5 mg/L), to combine with IAA 1 mg/L, and the optimal white light source in the culture chamber (fluorescent or LED). After 30 days, the multiplication rate of explants was detected. The material obtained from the multiplication test was placed on culture medium with MS salts and vitamins and sucrose (30 g/L), without hormones. The rooted plantlet was transplanted into commercial substrate with perlite (30:70 v/v) and recovered in greenhouse under a mist system. After 30 days the survival rate was performed. In our experimental conditions, the use of acetyl salicylic acid did not significantly increase the sterility of explants and did not avoid tissue oxidation. Furthermore, the bud washing longer than 20 minutes in sodium hypochlorite treatment kills the explants. The shoot proliferation shown statistically significant differences between the two types of light source: thanks to fluorescent light, the greatest multiplication rate was obtained with MS salts (3,3), while, under the LED light, the best results was with WPM salt (4,9) both integrated with BA and IAA. The rooting and the following acclimatization to the greenhouse were more than 90% and 100% respectively.

Key words: banana, multiplication, sterilization.

Introduzione

Musa basjoo Siebold & Zucc. ex Iinuma (detto "banano giapponese") appartenente alla famiglia delle Musaceae, è originaria del sud della Cina ed è coltivata a scopo ornamentale e per la capacità di sopportare -15 °C: in primavera il rizoma è in grado di rigenerare nuove foglie anche se la parte aerea subisce danni da freddo. In genere il banano, essendo sterile (triploide), viene propagato vegetativamente per divisione del rizoma (Cronauer *et al.*, 1984); con tale tecnica si possono ottenere fino a 5-10 nuove piante per anno (Al-Amin *et al.*, 2009). Questa tecnica però può portare, con il passare dei cicli, la diffusione di patogeni

* federico.dei.90@gmail.com

e ridurre la capacità di propagazione iniziale della pianta madre. Per questo motivo il banano viene propagato *in vitro*, ma è necessario trovare la giusta combinazione di ormoni per migliorare la propagazione dei diversi genotipi (Al-Min *et al.*, 2009). Lo scopo del presente lavoro è di realizzare un protocollo di micropropagazione di *M. basjoo* per la rapida produzione di piantule.

Materiali e metodi

Rizomi di banano *Musa basjoo* sono stati lavati sotto acqua corrente, ripuliti dalla terra e da questi sono state isolate le gemme con l'aiuto di un bisturi (fig. 1). Per ottimizzare la coltura *in vitro* sono stati effettuati diversi esperimenti per ridurre l'ossidazione dei tessuti e le contaminazioni da microrganismi. Per superare tali difficoltà sono stati confrontati due pre-trattamenti: una soluzione con acido acetil salicilico (1 g/L) per 24 h oppure immersione diretta degli espianti in acqua tiepida, con alcune gocce di detergente e di ipoclorito di sodio per 60' seguito da trattamento in etanolo 70% per 1'. Dopo tali pretrattamenti, gli espianti sono stati sanificati con NaClO 2,5% e sono stati confrontati tre tempi di esposizione (10', 20' and 30') a tale soluzione. Tutti gli espianti sono stati risciacquati due volte in acqua distillata sterile per 10' e posti in barattoli di vetro (8 cm di diametro, 8 cm di altezza e 360 ml di volume) contenenti 60 mL di mezzo di coltura MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato con BA 5 mg/L, IAA 1 mg/L, Cefotaxime (10 mg/L) e agar (7 g/L) a pH 5.7. Con gli espianti sterili ottenuti (fig. 2) è stata impostata una prova di moltiplicazione (16 piante suddivise in 4 barattoli) per cercare la composizione salina migliore (MS o WPM – Lloyd e McCown, 1980), la citochinina più efficace (BA o 2ip a 5 mg/L) in aggiunta a IAA 0.5 mg/L e la fonte di luce bianca ottimale in camera di coltura:



Fig. 1 - Espianti isolati dai rizomi di *Musa basjoo*.
Fig. 1 - Suckers from *Musa basjoo* rhizomes.



Fig. 2 - Espianto sterile ottenuto *in vitro* su mezzo di coltura costituito da sali MS + saccarosio 30 g/l + BA 5 mg/l + IAA 0,5 mg/l + cefotaxime (10 mg/l).

Fig. 2 - In vitro sterile explant obtained on MS + sucrose 30 g/L + BA 5 mg/L + IAA 0.5 mg/L + cefotaxime 10 mg/L culture medium.

fluorescente (Philips Master TL-D 36W/840 - luce irradiata ad altezza del barattolo pari a $209 \pm 5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) oppure LED (Philips T8 LED Tube Light 20W - luce irradiata ad altezza del barattolo pari a $198 \pm 6 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). Le piante sono state coltivate a $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ con ciclo luce/buio 16/8 h. Dopo 30 giorni è stato rilevato il tasso di moltiplicazione degli espianti (fig. 3) mediante la formula: $(\sum (\text{numero di germogli finali}/\text{numero di germogli iniziali}))/N$ dove N è il numero



Fig. 3 - Espianti in moltiplicazione *in vitro* su substrato semisolido costituito da sali MS + saccarosio 30 g/L + BA 5 mg/L + IAA 0,5 mg/L e coltivate in cella climatica con luci fluorescenti.

Fig. 3 - In vitro explants multiplied on MS salts + sucrose 30 g/L + BA 5 mg/L + IAA 0.5 mg/L semisolid substrate and grown under fluorescent light in climatic cell.

di piante usate per ogni trattamento. Tutto il materiale derivato dalla fase di moltiplicazione è stato posto su mezzo di coltura con sali e vitamine MS e saccarosio (30 g/L) privo di ormoni. Le plantule radicate (fig. 4) sono state trapiantate in substrato commerciale con perlite (30:70 v/v) e portate in serra di ambientamento sotto impianto mist. Dopo 30 giorni è stata rilevata la sopravvivenza delle piante. I dati della percentuale di sopravvivenza e della sterilità degli espianti e del tasso di moltiplicazione sono stati analizzati statisticamente tramite ANOVA seguita dal test di Fisher ($p \leq 0.05$).

Risultati

L'impiego di acido acetil salicilico non ha incrementato la sterilità degli espianti e non ha evitato l'ossidazione dei tessuti, mentre il trattamento con ipoclorito di sodio al 2,5% per tempi pari a 10' e 20' permette di ottenere espianti sani e vitali (tab.1). Il tasso di moltiplicazione risulta pari a $3,3 \pm 1,0$ sul substrato con sali MS addizionati con BA 5 mg/L e IAA 0,5 mg/L sotto luce fluorescente. Con la luce a LED, invece, i sali WPM con 5 mg/L e IAA 0,5 mg/L forniscono un tasso di $4,9 \pm 0,5$. (fig. 5). La radicazione è stata pari al 90% trasferendo gli espianti su mezzo con sali MS, con saccarosio (30 g/L) e privo di ormoni. Il 100% del materiale posto in serra per l'ambientamento è sopravvissuto (fig. 6).



Fig. 4 - Espianto radicato dopo 30 giorni di coltura *in vitro* su mezzo costituito da sali MS + saccarosio 30 g/L e privo di ormoni.
Fig. 4 - Rooted explant from MS salts + sucrose 30 g/L without hormones after 30 days of *in vitro* culture.

Tab. 1 - Percentuale di sopravvivenza e sterilità degli espianti trattati con ipoclorito di sodio al 2,5% per 10, 20 o 30 minuti e posti su terreno di coltura MS + saccarosio 30 g/L + BA 5 mg/L + IAA 0,5 mg/L + cefotaxime 10 mg/L. Il trattamento con ipoclorito di sodio al 2,5% per 30' causa la morte degli espianti.

Tab. 1 - Survival and sterility percentage of explants treated with 2.5% sodium hypochlorite for 10, 20 or 30 minutes and placed on MS + 30g/L + BA 5 mg/L + IAA 0.5 mg/L + cefotaxime 10 mg/L culture medium. The treatment with bleach at 2.5% for 30' induce the death of explants.

Pretrattamento	Tempo di sterilizzazione	Espianti vivi e sterili (%)
Presenza di acido acetil salicilico	10'	66,7 ± 33,3 a
	20'	50,1 ± 28,9 a
	30'	0,0 ± 0,0 b
Assenza di acido acetil salicilico	10'	44,4 ± 29,4 a
	20'	55,5 ± 22,2 a
	30'	0,0 ± 0,0 b

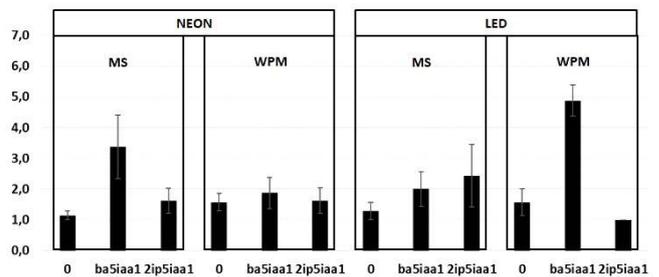


Fig. 5 - Fase di moltiplicazione: confronto tra tasso di moltiplicazione delle piante coltivate *in vitro* sotto luce fluorescente e LED, e coltivate su substrato contenenti sali MS o sali WPM, e le citochinine BA oppure 2ip e IAA 0,5 mg/l.

Fig. 5 - Multiplication phase: compares among *in vitro* multiplication rate of cultured plants under fluorescent or LED lights, on substrate containing MS or WPM salts (with IAA 0.5 mg/L), and with cytokinines BA or 2ip.

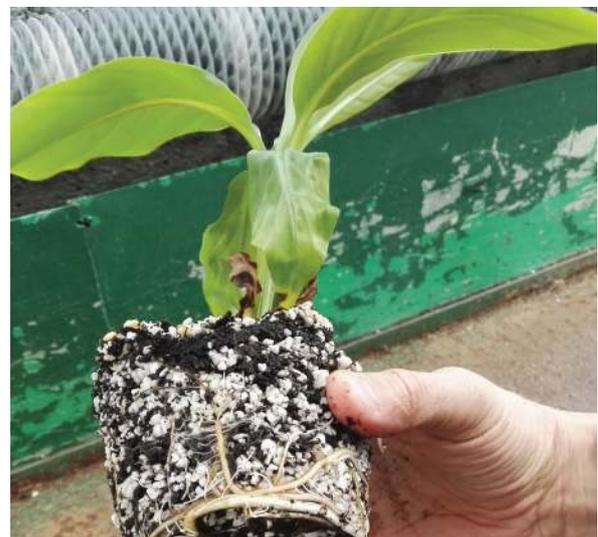


Fig. 6 - Fase di ambientamento in serra: piantina coltivata in vaso contenente substrato commerciale : perlite (30:70 v/v) a 30 giorni dal trapianto.

Fig. 6 - Acclimatization phase in greenhouse: Plant cultivated in pot containing commercial substrate : perlite (30:70 v/v) after 30 days from transplantation.

Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti con questo lavoro confermano l'elevata presenza di batteri endogeni in accordo con Iqbal e collaboratori (2013), che portano alla necessità di utilizzare un antibiotico a largo spettro d'azione come il Cefotaxime per controllarne la diffusione *in vitro*. Come riportato in letteratura, la parte basale degli espianti *in vitro* si annerisce (Aish *et al.*, 2004); questa secrezione di composti fenolici talvolta può impedire la moltiplicazione o comunque rallentarla. Per limitarne la produzione è stato messo a confronto l'effetto di un pretrattamento di immersione per 24 ore in acido acetil-salicilico (1 g/L) prima della fase vera e propria di sterilizzazione in ipoclorito di sodio al 2,5%. Tale pretrattamento non ha evitato la formazione dell'imbrunimento alla base degli espianti, nonostante questo l'esposizione all'ipoclorito di sodio al 2,5% per 10' o 20' permette di ottenere espianti vitali e sterili (tab. 1). Uno studio recente (Safwat *et al.*, 2015) ha valutato l'efficacia di altre sostanze antiossidanti quali acido ascorbico, acido citrico e carbone attivo in grado di ridurre l'ossidazione dei tessuti quando usate simultaneamente. Diversi studi hanno evidenziato la necessità di trovare la giusta combinazione di ormoni per migliorare il livello di propagazione *in vitro* dei diversi genotipi di banano (Al-Min *et al.*, 2009; Quamar *et al.*, 2015). I migliori tassi di moltiplicazione sono stati ottenuti con luce bianca (fluorescente) utilizzando sali MS addizionati con BA 5 mg/L + IAA 0,5 mg/L (3,3x) oppure sotto la luce LED utilizzando sali WPM addizionati con BA 5 mg/L + IAA 0,5 mg/L (4,9x). In uno studio recente (Waman *et al.*, 2016), è stata valutata la proliferazione di una varietà di banano coltivato *in vitro* in risposta alla luce LED (bianca o monocromatica). I risultati hanno rivelato che la luce bianca ha promosso la moltiplicazione e la crescita dei fusti su substrato contenente MS + BA 3 mg/L + IAA 1 mg/L + adenina solfato 70 mg/L, rispetto alle altre luci studiate. La luce LED aumenta il contenuto delle clorofille e il numero di stomi in piante micropropagate di *Musa acuminata* (do Nascimento Viera *et al.*, 2015). Gli autori però non riportano dati sull'influenza della fonte luminosa sullo sviluppo e il grado di moltiplicazione durante la coltura *in vitro*. Le piante di *M. basjoo* vengono utilizzate come piante ornamentali, ma alcuni studi hanno evidenziato le proprietà anti-infiammatorie e antimicrobiche delle radici (Xu *et al.*, 2012) e le proprietà antiossidanti dei fiori (Tai *et al.*, 2014). Tali risultati aprono nuove potenziali applicazioni industriali, mediche e nutrizionali di questa specie e aumentano l'esigenza di trovare le migliori condizioni di moltiplicazione *in vitro* per questa varietà.

Riassunto

Nel presente lavoro viene proposto un protocollo di micropropagazione di *Musa basjoo*. Questa specie viene coltivata a scopo ornamentale per la capacità di sopportare -15°C. Sono stati ottenuti espianti sterili e vitali partendo da gemme, usando composti antiossidanti e ipoclorito di sodio. I migliori tassi di moltiplicazione sono stati ottenuti con luce bianca (lampade fluorescenti) utilizzando sali MS addizionati con BA e IAA (3,3) oppure sotto la luce LED utilizzando sali WPM addizionati con BA e IAA (4,9). Le plantule ottenute *in vitro* hanno mostrato ottime percentuali di radicazione ed ambientamento.

Parole chiave: banano, sterilizzazione, moltiplicazione.

Bibliografia

- AISH M., IQBAL H., SAQLAN NAQVI S.M., RASHID H., 2004. *Banana plantlet production through tissue culture*. Pakistan Journal of Botany, 36(3): 617-620.
- AL-AMIN M.D., KARIM M.R., AMIR M.R., RAHMAN S., MANUM A.N.M., 2009. *In vitro micropropagation of banana (Musa spp.)*. Bangladesh Journal of Agricultural Research. 34(4):645-659.
- CRONAUER S.S., KROKORIAN A.D., 1984. *Multiplication of Musa from excised stem tips*. Annals of Botany, 53:321-328.
- DO NASCIMENTO VIEIRA L., DE FREITAS FRAGA H.P., DOS ANJOS K.G., PUTTKAMMER C.C., SCHERE R.F., DA SILVA D.A., GUERRA M.P., 2015. *Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in Musa acuminata (AAA) 'Nanicão Corupá' in vitro plantlets*. Theoretical and Experimental Plant Physiology 27(2):91-98.
- IQBAL M.M., AISH M., IQBAL H., BILAL H., 2013. *Optimization of in vitro micropropagation protocol for Banana (Musa Sapientum L.) under different hormonal concentrations and growth media*. Int. J. Agr. Innovations Res., 2 (1):2319-1473.
- LLOYD G., MCCOWN B.H., 1980. *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. Proceeding. International Plant Propagation Society 30:421-426.
- MURASHIGE, SKOOG, 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- QUAMAR M., QURESHI S.T., KHAN I.A., RAZA S., 2015. *Optimization of in vitro multiplication for exotic banana (Musa sp.) in Pakistan*. African Journal of Biotechnology 14(24):1989-1995.
- SAFWAT G., ABDUL-RAHMAN F., EL SHARBASY S., 2015. *The effect of some antioxidants on blackening and growth of in vitro culture of banana (Musa spp.cv. Grand Naine)*. Egyptian Journal of Genetic and Cytology, 44:47-59.
- TAI Z., CHEN A., QIN B., CAI L., XU Y., 2014. *Chemical constituents on antioxidant activity of the Musa basjoo flower*. European Food Research and Technology. 239:501-508.
- WAMAN A.A., BOHRA P., SATHYANARAYANA B.N., UMESHA K., GOWDA B., ASHOK T.H., 2016. *In vitro shoot multiplication and root induction in Silk banana variety Nanjanagud Rasabale as influenced by monochromatic light spectra*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 86(3):577-584.
- XU F., WU H.M., YANG Y., WU I.L., HAO J.J., WANG X.P., 2012. *Advances in Musa basjoo research*. Zhong guo ming zu yi yao za zhi 7:56-58.