

Micropropagazione di un portinnesto di melo (*Malus sylvestris*)

Elektra Papakosta*

Centro di Trasferimento di Tecnologie Agricole di Valona, Novosele, Albania

Micropropagation of an apple rootstock (*Malus sylvestris*)

Abstract. Apart from the vegetative rootstocks M-9, MM¹⁰⁶, M-26, M-27, M¹¹ etc, also wild rootstocks, with a potent growth and relevant longevity, can be used for the apple propagation. The purpose of this study is the micropropagation of the autochthon wild rootstock Mollçin. As primary explants for the *in vitro* culture were used 1.5-2 cm stems with the apical bud, deriving from the seedlings of the wild rootstock. The explants were sterilized with sodium hypochlorite 1% for 20 minutes and then rinsed three times with distilled water. The explants were inoculated in universal medium MS (Murashige & Skoog, 1962) with different concentration of BAP mg l⁻¹ (1; 1.5; 2; 2.5; 3) and 0.1 mg l⁻¹ IBA. After 40 days of inoculation, the highest rate of explant survival 83.6%, resulted in MS medium with BAP (1.5 mg l⁻¹) and IBA 0.1 mg l⁻¹, and the lowest rate of survival 41%, resulted in the medium containing 3 mg l⁻¹ BAP. After two subcultures the highest mean number of shoots per plants 5.8, resulted in medium containing BAP (2 mg l⁻¹), with mean length of the shoots 2.5cm. In rooting phase with different concentration of IBA mg l⁻¹ (0.5; 1; 1.5; 2) the highest mean number of roots was 3.74 with mean length of the roots 3.21cm that were obtained in IBA (1 mg l⁻¹). The acclimatization resulted in 68% *ex vivo* survival.

Key words: proliferation, Mollçin, MS- medium, auxine, rooting.

Introduzione

La coltivazione degli alberi da frutto in Albania è un'antica tradizione favorita dalle condizioni pedoclimatiche adatte per la crescita e la produzione di frutti di qualità. Inoltre, il numero di varietà autoctone in tutto il paese è elevato. Il portinnesto autoctono

(Mollçin) viene utilizzato nella preparazione delle piantine di melo. Le cultivar innestate su questo portinnesto, producono piante con una chioma alta e sviluppata, con radici profonde e ramificate, crescono in terreni collinari con pendenze moderate, tollerano condizioni di siccità e terreni difficili. I portinnesti svolgono un ruolo importante nella produzione del melo, poiché influenzano nel ciclo produttivo, la qualità del frutto, la resistenza alle malattie, il miglioramento dei metodi per combattere i parassiti, l'adattamento etc. La tecnica di micropropagazione *in vitro* per diversi portinnesti fornirà materiale vegetativo di valore commerciale per i coltivatori.

Nella moltiplicazione *in vitro* di portinnesti del melo, la concentrazione di citochinine e il tipo di mezzo di coltura sono importanti per ottenere buoni risultati. Diversi mezzi di coltura, tra cui il mezzo universale MS, hanno mostrato buoni risultati per diverse specie. La coltura di tessuti *in vitro* di diverse specie da frutto, inclusa quella per il melo, è stata messa a punto da diversi autori (Boxus, 1974; Zuccherelli, 1979; Magyar-Táborik *et al.*, 2011). Un aspetto importante per aver successo nella micropropagazione riguarda al tipo e alla concentrazione di citochinine (Dalal *et al.*, 2006; Damiano *et al.*, 2002).

Scopo del presente lavoro è stato quello di stabilire il migliore mezzo di coltura e la più idonea concentrazione dei fitoregolatori (BAP, IBA) per la moltiplicazione e la radicazione di portinnesto del melo.

Materiali e metodi

L'esperimento è stato condotto presso il Laboratorio di Colture di Tessuti del Centro di Trasferimento di Tecnologie Agricole in Valona, Albania.

Allestimento delle colture sterili

Gli espianti iniziali erano costituiti da porzioni di germoglio con gemme apicali (1.5-2 cm) di portinnesti del melo Mollçine, prelevate da piante adulte

* elektrakrist@yahoo.com

coltivate in pieno campo provenienti da seme. Per tutte le prove è stata seguita la seguente iniziale: immersione in alcol etilico al 70% per 1 minuto; risciacquo con acqua distillata sterile. Gli espianti sono stati sterilizzati con ipoclorito di sodio 1% per 20 minuti e poi risciacquati tre volte con acqua distillata, sterilizzata, e successivamente inoculati in terreno MS (Murashige e Skoog, 1962) con combinazione di macro-microsali MS, FeEDTA, inositolo 100 mg l⁻¹, tiamine 0.1mg l⁻¹, piridossina 0.5 mg l⁻¹, acido nicotnico 0.5 mg l⁻¹, glicina 2 mg l⁻¹, fitormoni GA3, IBA (0.1mg l⁻¹), citochinina BAP (1; 1.5; 2; 2.5; 3) mg l⁻¹, agar 0.7%, saccarosio 3%. Il pH dei mezzi di coltura è stato aggiustato a 5,7. La sterilizzazione è stata effettuata a 120°C per 20'.

Moltiplicazione dei germogli

Dopo 40 giorni in camera di crescita, gli espianti che non mostravano inquinamento dopo lo sviluppo dell'apice sono stati subcolturali in mezzo di moltiplicazione MS costituito dei mezzi di coltura utilizzato per la fase precedente. Sono state valutate le combinazioni di fitoregolatori con diverse concentrazioni di BAP mg l⁻¹ (1; 1.5; 2; 2.5 ;3) e 0.1mg l⁻¹ IBA. Durante la fase di proliferazione sono stati effettuati tre trasferimenti su mezzo fresco, a intervalli di 18 giorni.

Radicazione

Il mezzo di radicazione era composto da MS con diverse concentrazione di IBA (0.5; 1; 1.5; 2 mg l⁻¹).

Condizioni di coltura

Gli espianti, in tutte le prove, sono stati mantenuti in camera di crescita con un fotoperiodo 16 ore di luce, temperatura 24±1°C, intensità luminosa 3000 lux.

Il disegno sperimentale era a blocchi randomizzati con 5 repliche e ogni unità sperimentale era costituito da un vaso con sei espianti. Le variabili analizzate sono state: numero e lunghezza dei germogli; numero e lunghezza delle radici. Le analisi statistiche sono state eseguite con un programma JMP Version 13.0; e hanno riguardato l'analisi della varianza (ANOVA) (P < 0.05) e il test Tukey- Kramer.

Risultati e discussione

Allestimento delle colture

Fra i mezzi basali utilizzati per l'allestimento delle culture dopo 40 giorni di inoculazione, la sopravvivenza più alta (83.6%), si è verificata nel mezzo MS con BAP 1.5 mg l⁻¹ e IBA 0.1 mg l⁻¹, e la sopravviven-

za più bassa (41%), si è verificata nel terreno MS con BAP 3 mg l⁻¹ (fig. 1).

Moltiplicazione dei germogli

Le piantine cresciute per due subculture su terreno MS con diverse concentrazioni di BAP hanno mostrato che il miglior risultato i numero di germogli per espianto e qualità dei germogli si raggiunge alla concentrazione 1.5-2 mg l⁻¹ di BAP. Dopo due subculture il più alto numero medio di germogli (5.8) si è verificato nel terreno con hormoni BAP 2 mg l⁻¹ e IBA 0.1 mg l⁻¹, con lunghezza media del germoglio pari a 2.5cm. Le piante allevate su questo terreno si moltiplicavano molto bene ed apparivano nelle migliori condizioni: crescita attiva, foglie grandi, nuovi germogli ben sviluppati, assenza di necrosi (fig. 2A, B, C).

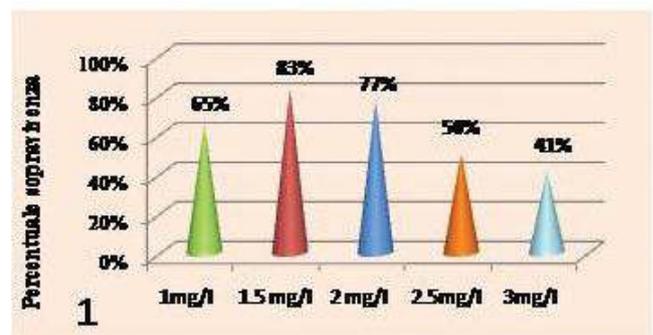


Fig. 1 - Percentuale di sopravvivenza dei espianti (diverse concentrazioni di BAP)

Fig. 1 - Percentage of survival of explants (different concentrations of BAP).

Tab. 1 - Effetto della concentrazione di BAP sul numero e lunghezza media dei germogli

Tab. 1 - Effect of BAP concentration in the mean number and length of sprouts.

BAP (mg/l)	Media Numero germogli/espianto	Media Lunghezza germogli/espianto
1	4,63 ± 0,90 ^{bc}	1,72 ± 0,42 ^{cd}
1,5	5,13 ± 1,08 ^{ab}	2,24 ± 0,48 ^{ab}
2	5,81 ± 1,86 ^a	2,56 ± 0,48 ^a
2,5	4,9 ± 1,19 ^{ab}	1,91 ± 0,34 ^{bc}
3	3,77 ± 1,07 ^c	1,46 ± 0,41 ^d

Tab. 2 - Effetto della concentrazione di IBA sul numero e lunghezza medio dei radici

Tab. 2 - Effect of IBA concentration on the mean number and length of roots.

IBA (mg l ⁻¹)	Media Numero radici/espianto	Media Lunghezza radici/espianto
0,5	2,81 ± 0,73 ^{bc}	2,44 ± 0,58 ^b
1	3,72 ± 0,82 ^a	3,21 ± 0,60 ^a
1,5	3,22 ± 0,86 ^{ab}	3,55 ± 0,48 ^a
2	3,36 ± 0,72 ^c	2,71 ± 0,44 ^b

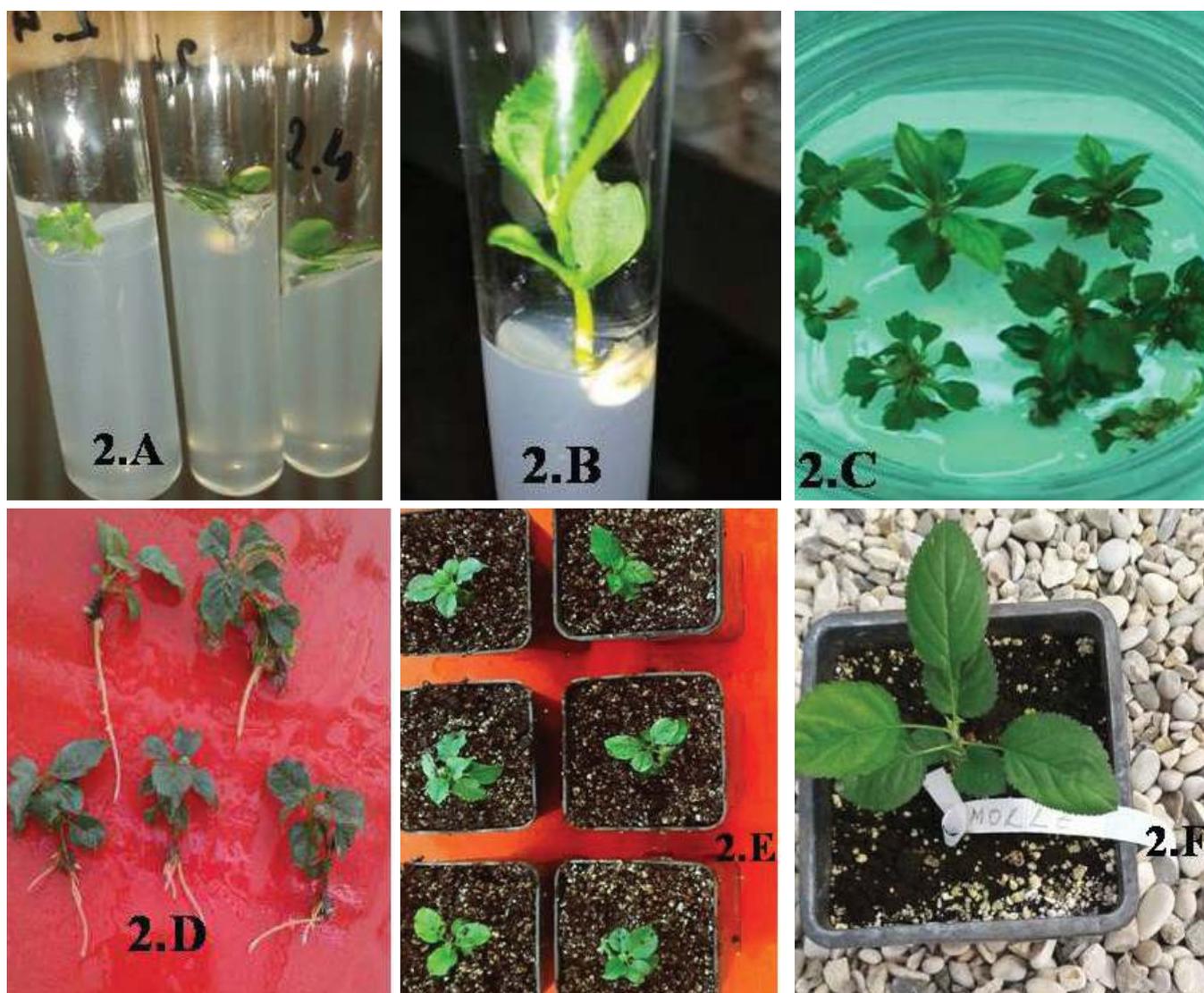


Fig. 2 - La clonazione *in vitro* di portinnesto del melo Mollçin: 2.A – 2.B. Espianti inoculati (BAP 1.5 mg l⁻¹). 2.C. Piante in moltiplicazione (BAP 2 mg l⁻¹); 2.D. Piante radicate (IBA 1mg l⁻¹); 2.E-2.F. Piante in vivo in ambientamento (IBA 1mg l⁻¹).
 Fig. 2 - In vitro cloning of Mollçine apple rootstock: 2.A – 2.B. Inoculated explants (BAP 1.5 mg l⁻¹); 2.C. Plants in multiplication (BAP 2 mg l⁻¹); 2.D. Rooted plants (IBA 1mg l⁻¹); 2.E-2.F. Plants in vivo in acclimatization (IBA 1mg l⁻¹).

La citochinina BAP é risultata determinante per indurre la proliferazione elevando il numero di germogli (Abbot e Whitely, 1976; Welander, 1985), mentre la dose maggiore di BAP (3 mg l⁻¹) ha un'influenza negativa sul tasso di proliferazione, con plantule troppo piccole e presenza dei componenti fenolici. Spesso le concentrazioni crescenti di citochinine inibiscono la crescita dei germogli (Caboni *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004).

L'analisi della varianza (ANOVA) sulla valutazione degli indicatori biometrici basati su prove ormonali, ha messo in evidenza differenze statistiche per $P=0.05$ mediante il test di Tukey-Kramer (tab. 1).

Radicazione

I migliori parametri di radicazione sono stati ottenuti nel mezzo con la concentrazione di IBA di (1mg l⁻¹),

con percentuale di radicazione pari al 72%, con un maggior numero medio di radici (3.74), e con la maggiore lunghezza della radice (3.21 cm). L'analisi fattoriale per concentrazioni diverse di IBA è riportata in (tab. 2). Risultati elevati di radicazione sono stati riportati da Sharma *et al.* (2007) e Zimmerman e Fordham (1985). Nel passaggio delle piante dalle condizioni *in vitro* a quelle *in vivo*, la sopravvivenza è stata pari al 68%.

Conclusioni

La micropropagazione di portinnesto del melo autoctono Mollçine basata su un protocollo di moltiplicazione MS combinando con ormoni BAP (2 mg l⁻¹) e IBA (0.1 mg l⁻¹) ha dato risultati soddisfacenti. Le

percentuali più elevate di radicazione e il numero maggiore di radici sono state ottenute con IBA alla concentrazione di (1mg^l⁻¹).

Riassunto

Lo scopo della ricerca è la micropropagazione di portainnesto del melo - autoctono Mollçin. Sono stati utilizzati espianti (1.5-2 cm) provenienti da semenzali di melo selvatico e inoculati in terreno MS, con diverse concentrazioni di BAP (1; 1.5; 2; 2.5; 3) e IBA (0.1 mg^l⁻¹). Dopo 40 giorni, la sopravvivenza più alta (83.6 %), si è verificata nel terreno MS con BAP (1.5 mg^l⁻¹). Dopo due subcolture il più alto numero medio di germogli (5.8), si è verificato nel substrato con la concentrazione pari a (2mg^l⁻¹) di BAP. Nella fase di radicazione a diverse concentrazioni di IBA il maggior numero medio di radici è risultato uguale a 3.74 con il trattamento IBA 1mg^l⁻¹.

Parole chiave: proliferazione, Mollçin, MS-medium, auxina, radicazione

Bibliografia

- ABBOT J.A., WHITELY E. 1976. *Cultures of Malus tissues in vitro. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices*. Scientia Hort. 4: 183-189.
- BOXUS P. 1974. *The production of strawberry plants by in vitro micro-propagation*. J.Hort. Sci. 49.
- CABONI E., et al. 2000. *in vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture*. Cell Biology and Morphogenesis. Plant Cell Reports. 19:755-760.
- DALAL A., et al. 2006. *in vitro cloning of apple (Malus domestica Borkh) employing forced shoot tip cultures on M9 rootstock*. Indian J. Biotechnol. 5:543-550.
- DAMIANO, C., et al. 2002. *in vitro propagation of Prunus cerasus l*. Italus Hortus 9(3):16-17.
- HARTMANN H. T., et al. 2004. *Plant Propagation: Principles and Practices*. 6th ed. Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi, India, pp. 770.
- MAGYAR -TÁBORIK., ET AL. 2011. *Effect of cytokinin content of the regeneration media on in vitro rooting ability of adventitious apple shoots*. Sci.Hort. 29: 910- 913.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue cultures*. Phsiol Plant., 15: 473-497
- SHARMA T., ET AL. 2007. *Factors affecting induction and development of in vitro rooting in apple rootstocks*. Indian J. Exp. Biol. 45:824-829.
- WELANDER M. 1985. *in vitro shoot and root formation in apple cultivar Akerö*. Ann.Bot. 55: 249-261.
- ZIMMERMAN R.H., FORDHAM I., 1985. *Simplified method for rooting apple cultivars in vitro*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 34-38.
- ZUCCHERELLI G. 1979. *Metodologie nella moltiplicazione industriale in vitro dei portinnesti clonali del pesco GF -677*, pp. 147-154