

Messa a punto di un protocollo per l'introduzione *in vitro* di *Pelargonium graveolens*, un'importante specie tropicale per la produzione di olio essenziale

Chiara Grassi*, Enrico Palchetti, Luisa Andrenelli

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze

An efficient protocol for the *in vitro* cultivation of *Pelargonium graveolens*, an important tropical species for the essential oil production

Abstract. *Pelargonium graveolens*, cv. Bourbon, a plant native to South Africa, is widely cultivated in many area of the world because of its essential oil with rose-scented aroma obtained by steam distillation of leaves and green stems. *P. graveolens*, a sterile hybrid, is propagated by stem cuttings but this technique requires a wide area for the cultivation of the cuts. *In vitro* culture reduces the storage area and the cost of propagation. The purpose of this communication is to show a rapid and economic protocol for direct shoot regeneration and maintenance *in vitro* plants of *Pelargonium graveolens*. Young stems containing one node, were collected from mother's plant, washed under running tap water and treated first with a fungicide and then with a solution of Tween 20. Finally, the explants were sterilized with a solution of ethanol and then with a solution of sodium hypochlorite. The sterile explants were placed on a substrate containing Murashige & Skoog medium supplemented with sucrose, agar and 6-Benzylaminopurine for the induction and regeneration of new shoots. After 4-5 months, first regenerated plants were transferred in a substrate without growth regulators for the rooting. The young plants were then maintained in *in vitro* culture for the conservation, or used as further explants source, or addressed to acclimation. The plants successfully acclimatized were transferred to glasshouse. The present protocol is a valid and economic alternative to vegetative propagation of *Pelargonium*.

Key words: micropropagation, BAP, rooting, acclimation.

Introduzione

Il *Pelargonium graveolens* (L'Hér.), cv Bourbon, è una specie appartenente alla famiglia delle Geraniaceae originaria dell'area di Cape Town in Sud Africa che è oggi ampiamente diffusa e coltivata in Francia, Belgio, Spagna, Marocco Madagascar, Egitto, Cina, India etc. (Benazir *et al.*, 2013). È una specie di grande importanza commerciale nel settore delle piante aromatiche, poiché da essa si ottiene, per distillazione in corrente di vapore delle foglie e dei giovani germogli verdi, un olio essenziale che per fragranza e composizione aromatica è molto richiesto dall'industria profumiera, farmaceutica e della cosmesi (Benazir *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2007). *P. graveolens* è un ibrido sterile proveniente dall'incrocio *P. capitatum* x *P. radens* ed è quindi propagata per via agamica tramite taleggio, tecnica che tuttavia richiede tempo e spazio, non sempre a disposizione, e che rischia di diffondere virus e malattie tra le piante propagate (Mithila *et al.*, 2001). La coltura e il mantenimento *in vitro* del germoplasma di *P. graveolens* rappresentano quindi una valida alternativa alla propagazione convenzionale per talea, permettendo di conservare e propagare, in uno spazio ridotto, materiale sano disponibile sia per la propagazione massale, qualora richiesto per la messa a coltura della specie, sia per lo studio, l'analisi e produzione dei metaboliti secondari, di cui questa specie è ricca. Diventa quindi fondamentale l'ottimizzazione e la standardizzazione di un rapido ed economico protocollo per l'introduzione, la rigenerazione ed il mantenimento *in vitro* di *P. graveolens*.

Materiali e metodi

Materiale vegetale e sterilizzazione degli espianti

Il materiale vegetale, impiegato per l'introduzione *in vitro*, proviene da piante madri di *Pelargonium*

* chiara.grassi@unifi.it

graveolens prelevate in Madagascar e conservate presso il DISPAA (Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente) dell'Università degli Studi Firenze.

Germogli delle ramificazioni dell'anno, contenenti almeno 3-4 nodi, sono stati prelevati dalle piante madri e, dopo la rimozione delle foglie, sono stati lavati sotto acqua corrente, quindi sottoposti a un trattamento fungicida di 5 minuti a base di Bavastin® (BASF) allo 0,2% e poi sciacquati in acqua distillata. Successivamente il materiale vegetale è stato immerso in una soluzione di Tween 20 allo 0,5% per 5 minuti in costante agitazione ed infine risciacquato con acqua distillata. Tutte le operazioni di sterilizzazione effettuate a partire da questo momento sono state eseguite in ambiente sterile sotto cappa a flusso laminare. Gli espianti sono stati dapprima immersi in una soluzione di etanolo al 70% per 30 secondi, immediatamente dopo in una soluzione di ipoclorito di sodio al 3% per 15 minuti, ed infine sciacquati per 4 volte con acqua distillata sterile.

Substrato di coltura e condizioni di crescita

Il terreno di coltura di base era così costituito: 4,4 g/l di MS (Murashige e Skoog, 1962), 25 g/l di saccarosio, 8 g/l di agar. Per l'induzione di nuovi germogli a questo substrato è stato aggiunto l'ormone Benzilammina-purina in dose 1,9 g/l (Rashmi et al., 2010), mentre per le fasi di allungamento, radicazione e mantenimento *in vitro* dei nuovi individui, il terreno di coltura era privo di ormoni. Il pH del substrato è stato sempre aggiustato a $5,7 \pm 1$ ed autoclavato a 120°C per 20 minuti prima di essere dispensato.

Induzione di nuovi germogli

Il materiale vegetale sterilizzato, suddiviso in porzioni di 1-1,5 cm di lunghezza contenenti un nodo, è stato posizionato verticalmente nel substrato di induzione e i germogli formati sono stati sistemati in un terreno di coltura privo di ormoni per l'allungamento e la radicazione. Le condizioni di crescita impostate nella cella climatica sono state di 16 h di fotoperiodo e 25° C, con rinnovo periodico del substrato

Mantenimento in vitro e in vivo degli individui

Le giovani piante radicate sono mantenute in coltura *in vitro* su substrato privo di ormoni o utilizzate per ulteriori moltiplicazioni, suddividendo lo stelo in porzioni contenenti almeno un nodo e successivamente posizionati su terreno di coltura contenente il fitoregolatore per l'induzione.

Le piante destinate alla fase di acclimatazione sono state rimosse dal contenitore sterile, le radici lavate

con acqua per allontanare eventuali residui di substrato e posizionate in contenitori tipo Magenta, contenenti un substrato di vermiculite inumidita. Per i primi 10 giorni i contenitori restano chiusi e solo successivamente, se la pianta non mostra segni di sofferenza, il coperchio viene gradualmente aperto fino alla sua completa rimozione. I contenitori con le piante sono posti in cella climatica impostata a 16 h di fotoperiodo e 25° C di temperatura. Dopo circa un mese le piante possono essere posizionate in vaso contenente terriccio e sabbia e lasciate per 15 giorni in camera di accrescimento. Successivamente i vasi sono stati trasferiti in serra.

Risultati

Già dopo pochi giorni dal posizionamento degli espianti sterilizzati nel terreno di coltura, questi hanno mostrato i primi segni della formazione di nuovi individui in assenza di callo (fig. 1a), questa prima fase di induzione ha una durata di 2-3 mesi circa. Dopo 4-5 mesi è stato possibile isolare e rimuovere i primi germogli di circa 2-3 cm (fig. 1b) per posizionarli su substrato privo di ormoni per l'allun-

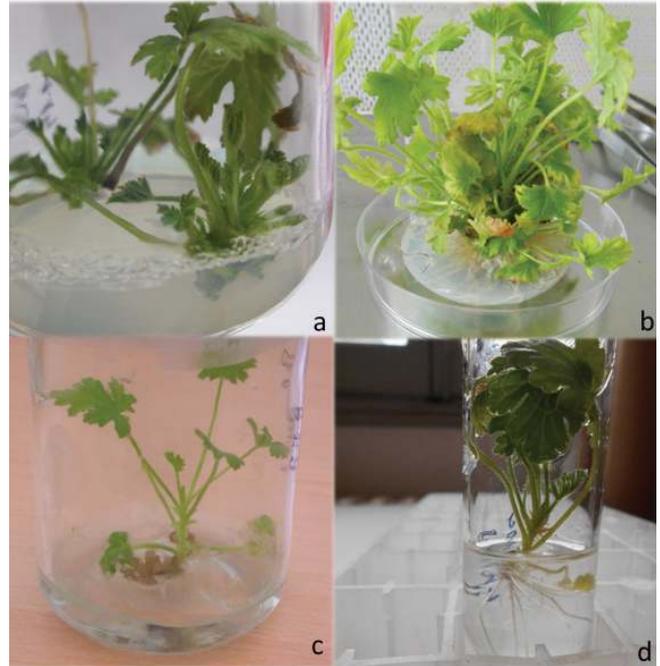


Fig. 1 - Induzione e rigenerazione di nuovi individui da stelo, con nodo, di *Pelargonium graveolens*. a) Fase iniziale di induzione di nuovi germogli in substrato contenente BAP; b) proliferazione di germogli; c) Allungamento dell'espianto in terreno privo di ormoni; d) Piante *in vitro* radicate su substrato privo di ormoni.

Fig. 1 - Shoots induction and regeneration of new plant from stem with node of *Pelargonium graveolens*. a) Shoot induction in medium supplemented with BAP; b) Proliferation of shoot; c) Elongation of shoot in medium free from hormones; d) Rooted plant cultured in substrate free from hormone.

gamento (fig. 1c) e la radicazione (fig. 1d). Su questa tipologia di terreno le giovani piante non hanno mostrato problemi di accrescimento e dopo circa 30-45 giorni, hanno raggiunto uno sviluppo della parte aerea ed un apparato radicale sufficienti per essere avviate con esito positivo alla fase di acclimatazione (fig. 2a), e posizionate successivamente in vaso (fig. 2b), o mantenute in coltura *in vitro*.

Discussione e conclusioni

Il protocollo sviluppato per l'introduzione e mantenimento *in vitro* di piante di *Pelargonium graveolens* ha evidenziato come la Benzil-ammino-purina,



Fig. 2 - Fasi di acclimatazione delle piante radicate *in vitro*. a) Piante poste in vermiculite per l'acclimatazione in cella climatica; b) Piante di *Pelargonium graveolens* acclimatate in vaso.

Fig. 2 - Acclimation phase of plants rooted *in vitro*. a) Rooted plants in vermiculite for the acclimation; b) Acclimatized plants of *Pelargonium graveolens*.

nelle quantità riportate, risulti essere un regolatore di crescita adatto alla produzione di nuovi individui e che nelle fasi successive di accrescimento dei germogli, non è necessaria la presenza di ormoni nel substrato. Inoltre, nonostante la fase iniziale di induzione risulti richiedere molto tempo, le fasi successive, con l'avvio della generazione in continuo di nuovi individui, consentono di avere in poco più di un mese piante disponibili per la loro conservazione *in vitro* o per la loro acclimatazione e messa a coltura in vaso.

Riassunto

Tra le specie di rilievo nel settore della produzione di oli essenziali, il *Pelargonium graveolens* riveste una particolare rilevanza, specialmente nel campo dell'industria profumiera e della cosmesi. Ne deriva l'importanza di ottimizzare l'introduzione e conservazione del germoplasma *in vitro*.

Il materiale vegetale proveniente dalle piante madri, viene sterilizzato ed infine posizionato su substrato contenente il fitoregolarore Benzil-ammino-purina per la rigenerazione di nuovi germogli, poi trasferiti su substrato privo di ormoni per l'allungamento e la radicazione. Gli espianti di *Pelargonium graveolens* hanno dimostrato in breve tempo elevate capacità rigenerative, di sviluppo e di sopravvivenza sia *in vivo* che *in vitro*.

Parole chiave: micropropagazione, BAP, radicazione, indurimento.

Bibliografia

- BENAZIR J.F., SUGANTHI R., CHANHDRIKA P., MATHITHUMILAN B., 2013. *In vitro* regeneration and transformation studies on *Pelargonium graveolens* (geranium) – an important medicinal and aromatic plant. *Journal of Medicinal Plant Research*, 7(38):2815-2822.
- SAXENA G., RAHMAN L., VEMA P. C., BANERJEE S., KUMA S., 2007. Field performance of somatocloned rose scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her Ex Ait.) for evaluation of their essential oil yield and composition. *Industrial Crops and products*, 27 (1) 86-90.
- MURASHIGE T., SKOOG F.A., 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol* 15: 473-479.
- RASHMI P., MANJUSHRI A. D., 2010. Clonal propagation of different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L'Heitz.) viz., Reunion, Bourbon and Egyptian. *Biotechnology*, 9 (4): 492498.