

Applicazione della tecnica del seme sintetico per la conservazione in vitro della varietà libanese di fico Houmairi

E. Yahyaoui¹, A.M. D'Onghia², N. Iacuzzi¹, D. Frasheri², M.A. Germanà^{1,3*}

¹Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF), Università di Palermo

²CIHEAM - Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari (IAMB), Valenzano (BA)

³IVALSA/Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Sesto Fiorentino (FI)

Synthetic seed technology applied to in vitro conservation of Lebanon fig variety Houmairi

Abstract. In this study, the effect of two plant growth regulators: 6-benzilaminopurine (BAP) and meta-topoline (MT), was evaluated on viability, regrowth, conversion, shoot and root length, of encapsulated uninodal segments of the Lebanon variety Houmairi of *Ficus carica* L.. The results confirmed the practical applicability of encapsulation technology for propagation of this species. Although the conversion rates were not high, plantlet production for treatment with cold storage (4 °C for 45 days) and the addition of meta-topoline to endosperm, provided a satisfactory conversion rate (23%). To our knowledge, this is the first report of rooting achievement in a single step of medium-term storage of encapsulated *Ficus carica*, cv. Houmairi nodal segments.

Key words: cytokinins, *Ficus carica*, encapsulation, micropropagation.

Introduzione

Il genere *Ficus* appartiene alla famiglia delle *Moraceae* e comprende circa 800 specie diffuse dai Tropici ai Paesi temperati. La specie più conosciuta e coltivata nel bacino del Mediterraneo è *Ficus carica* L., di cui si coltivano circa 364.108 ettari in tutto il mondo (FAOSTAT, 2014). La specie è originaria dell'Asia occidentale e del Mediterraneo e si è diffusa nel tempo nella fascia temperata e subtropicale di tutto il mondo. Il siconio può essere consumato fresco od essiccato. Nel panorama della frutticoltura italiana

il fico è oggi una specie minore. Inoltre, il fico soffre di una scarsa innovazione nei metodi di propagazione e di una crescente diffusione di patologie, virali e non, che condizionano la produzione. Tra i metodi di propagazione impiegati per il fico, senza dubbio, quelli vegetativi, rivestono maggiore importanza. Questi metodi, però, contribuiscono significativamente alla diffusione di patogeni, che abbattano il potenziale produttivo delle varietà.

Tra i metodi innovativi di propagazione, i semi sintetici o semi artificiali, sono in grado di coniugare i vantaggi della micropropagazione con la facilità di manipolazione, la possibilità di stoccaggio e la facilità di trasporto dei semi gamici (Redenbaugh, 1993). Da alcuni decenni, diversi studi hanno consentito l'individuazione di idonei protocolli di incapsulamento, sia con propaguli unipolari (microtalee), che con embrioni somatici (Germanà *et al.*, 2010). Per quanto riguarda *Ficus carica* L., è stato eseguito uno studio da Sharma *et al.* nel 2015, nel quale viene descritto un efficiente sistema di rigenerazione e conservazione a breve termine di segmenti nodali incapsulati. Tale protocollo è stato migliorato da Yahyaoui *et al.* (2016), i quali sono riusciti ad ottenere la radicazione in una sola fase, invece che cambiando il mezzo di coltura.

Obiettivo del presente lavoro è la verifica della validità dell'incapsulamento in alginato di calcio per la conservazione a medio termine della varietà libanese di fico Houmairi. In particolare, sono state incapsulate talee uninodali derivanti dalla proliferazione *in vitro* di germogli, valutando l'influenza di due regolatori di crescita (PGR): 6-Benzilaminopurina (BAP) e Meta-Topolina (MT), aggiunti all'endosperma artificiale, e registrando i parametri di vitalità, ripresa vegetativa e conversione dei semi sintetici direttamente o dopo 45 giorni di conservazione a 4°C.

* mariaantonietta.germana@unipa.it

Materiali e metodi

Materiali vegetale e Sterilizzazione

Il materiale vegetale utilizzato è costituito dalla cultivar Houmairi di *Ficus carica* L. proveniente dalla collezione dell'Istituto Agronomico Mediterraneo, (IAM-Bari), Puglia. I propaguli utilizzati per la realizzazione del seme sintetico sono stati prelevati da germogli moltiplicati *in vitro* ed ottenuti per proliferazione di gemme dormienti apicali e laterali. Gli espianti, prelevati dalla pianta madre nel mese di Dicembre, sono stati sottoposti a sterilizzazione prima di essere messi in coltura, seguendo il protocollo di Yahyaoui *et al.* (2016).

Moltiplicazione

Le gemme sterilizzate di *Ficus carica* L. sono state poste su un mezzo di stabilizzazione e moltiplicazione agarizzato composto da sali e vitamine MS (Murashige and Skoog 1962), addizionato con 30 g/L di saccarosio, 4 mg/L di BAP e 0,4 mg/L di NAA (Kumar *et al.*, 1998) e solidificato con 6,5 g/L di agar.

Incapsulamento

Microtalee (3-4 mm di lunghezza) senza foglie e con una gemma ascellare, sono state prelevate da germogli in proliferazione e sottoposti alla tecnologia dell'incapsulamento, secondo quanto riportato da Yahyaoui *et al.*, (2016). Sono stati utilizzati come endosperma artificiale, due differenti mezzi composti da sali e vitamine MS (Murashige e Skoog 1962), addizionati con 30 g/L di saccarosio, 0,4 mg/L di NAA, 0,7 mg/L di GA3 e solidificati con 6,5 gr/L di agar, e ciascuno contenete 0,5 mg/L di un regolatore di crescita diverso: BAP o MT (Yahyaoui *et al.*, 2016). In ogni scatola Petri, sono state poste 5 capsule e per ogni trattamento ne sono state utilizzate 30 (fig. 1).

Il presente studio ha previsto, inoltre, due trattamenti (T):

- la coltura diretta delle talee incapsulate in armadi di crescita ad una temperatura di 25 ± 1 °C, con fotoperiodo luce/buio di 16/8 ore e luce bianca fornita da lampade a fluorescenza (TMN 30W/84; Philips, Surenses, Francia), alla densità di flusso fotonico fotosintetico (PPFD) di $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- la conservazione dei semi sintetici prima a 4 °C di temperatura per quarantacinque giorni e poi la coltura in armadi di crescita con le stesse condizioni di temperatura e luminosità della tesi precedente.

Dati registrati e Analisi statistica

Dopo 45 giorni sono stati registrati i seguenti parametri: vitalità (% di espianti di aspetto verde, senza



Fig. 1 - Microtalee incapsulate del genotipo libanese di fico Houmairi.

Fig. 1 - Encapsulated microcuttings of the Lebanon fig genotype Houmairi.

necrosi o ingiallimenti), ripresa vegetativa (% di microtalee incapsulate che producono germogli di lunghezza superiore a 4 mm) e conversione (% di emergenza di germogli e radici lunghi almeno 4 mm delle microtalee incapsulate). I dati sono stati analizzati mediante il test ANOVA a due vie, usando la versione 17 SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), seguito dal test di Tukey, per $P \leq 5\%$. I fattori considerati sono stati: (T), tipo di test (semi conservati a 4 °C per 45 giorni o seminati direttamente) e (P), differenti regolatori di crescita: BAP o MT.

Risultati

Vitalità

I semi sintetici hanno presentato una vitalità media dell'85,5%. Relativamente al contenuto di ormoni, il BAP ha mostrato una vitalità media maggiore (83%), rispetto alla MT (63%) per quanto riguarda la conservazione a freddo (C-S), mentre, i semi non conservati (N-C-S) hanno mostrato, dopo 45 giorni dalla semina, una vitalità del 100% quando veniva aggiunto BAP, rispetto al 97% di vitalità quando veniva aggiunto MT all'endosperma artificiale. Tali differenze però, non sono risultate statisticamente significative ($P=0,068$) (tab. 1).

Ripresa vegetativa

La ripresa vegetativa media delle microtalee incapsulate è risultata del 60%. In particolare, le talee incapsulate con il BAP hanno presentato una ripresa vegetativa del 65% (fig. 2) e quelle incapsulate con la

Tab. 1 - Percentuali di vitalità, ricrescita e conversione in base al trattamento (conservati e no) e ai PGR utilizzati.
 Tab. 1 - Viability, regrowth and conversion rates, according to the type of test (conserved or not) and PGRs used.

PGR (P)	Vitalità (%)			Ripresa vegetativa (%)			Conversione (%)		
	BAP	MT	TOT	BAP	MT	TOT	BAP	MT	TOT
Trattamento (T)									
Conservati C-S	83	63	73	43	50	47	3	23	13
Non conservati N-C-S	100	97	98	87	60	73	3	10	7
Significatività									
P	0,068			0,245			0,014		
T	<0,001			0,002			0,216		
P x T	0,16			0,054			0,216		

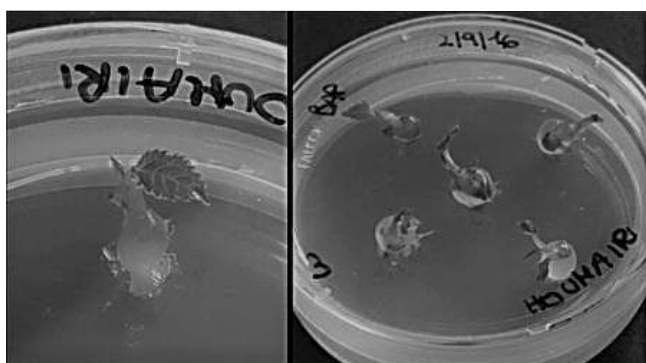


Fig. 2 - Ripresa vegetativa della capsula, conservata a 4 °C, dopo 2 settimane dalla semina, BAP come regolatore di crescita.

Fig. 2 - Regrowth of encapsulated nodal segment, stored at 4 °C, after 2 weeks from sowing, using BAP as PGR.

MT del 55%. Tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($P=0,245$). Per quanto riguarda il confronto dei semi non conservati e conservati a 4 °C per 45 giorni prima della semina, la ripresa vegetativa dei primi è risultata nettamente superiore (73% vs 47%). Nel dettaglio, i semi non conservati hanno presentato una ripresa vegetativa maggiore quando all'endosperma artificiale veniva aggiunto il BAP: 87% vs 60%. Tale differenza è risultata statisticamente significativa ($P=0,019$).

Per i semi conservati, invece, il comportamento è stato superiore per le microtalee incapsulate con endosperma artificiale contenente MT (50 % vs 43%). La lunghezza media del germoglio prodotto dai semi sintetici non conservati, è stata di 0,88 cm, statisticamente superiore ($P=0,009$) nei semi contenenti BAP (1,09 cm) rispetto a quelli contenenti MT (0,67 cm) (dati non mostrati). La lunghezza dei germogli registrata dopo 45 giorni dalla semina nei semi conservati è risultata di 0,55 cm, e statisticamente non differente ($P=0,743$) è stato il comportamento dei semi contenente MT e BAP (0,58 cm vs 0,53 cm) (dati non mostrati).

Conversione

La conversione è il dato più interessante da rilevare, in quanto indica le microtalee che hanno germogliato ed emesso la radice. È stato registrato un valore percentuale di conversione statisticamente differente ($P=0,015$) tra i semi contenenti MT (17%) e quelli contenenti BAP (3%) (fig. 3). Relativamente al paragone tra i trattamenti tra i semi non conservati e conservati a 4 °C per 45 giorni prima della semina, i primi hanno fatto registrare una conversione del 7%, nettamente inferiore a quella rilevata nei semi conservati (13%). I semi non conservati, hanno mostrato, una conversione superiore quando l'endosperma era addizionato con MT (10%) rispetto a quando era addizionato con BAP (3%). Analogamente, nei semi conservati, per 45 giorni a 4 °C, la MT ha indotto una conversione molto superiore (23%) rispetto al 3% del BAP e la differenza è risultata statisticamente significativa ($P=0,023$) (tab. 1). Per quanto riguarda la lunghezza delle radici prodotte dopo 45 giorni dalla semina dalle microtalee incapsulate, è stato registrato un valore medio equivalente dei semi non conservati e



Fig. 3 - Conversione della capsula conservata a 4 °C, dopo 6 settimane dalla semina, BAP come regolatore di crescita.

Fig. 3 - Conversion of encapsulated nodal segment, stored at 4 °C, after 6 weeks from sowing, using BAP as PGR.

conservati (0,61 cm vs 0,61 cm). In particolare, sia nella tesi dei semi non conservati che conservati, la MT ha fatto registrare valori più elevati rispetto al BAP: 0,83 cm vs 0,40 cm nei semi non conservati e 0,73 cm vs 0,50 cm nei semi conservati.

Discussioni e conclusioni

I risultati del presente studio sull'incapsulamento di microtalee *vitro*-derivate della cultivar libanese Houmairi di *Ficus carica* L., ha confermato l'applicabilità di questa tecnologia di propagazione a questa specie. Sebbene le conversioni non siano state molto elevate, la tesi che ha previsto il trattamento di conservazione a freddo (4 °C per 45 giorni) e l'utilizzo del regolatore di crescita MT, ha raggiunto una percentuale di conversione adeguata (23%). Per la prima volta, questa tecnologia è stata applicata al genotipo libanese Houmairi di fico e la conversione dei semi sintetici di fico è stata ottenuta direttamente dopo la loro semina, confermando quanto ottenuto da Yahyaoui *et al.* (2016), senza cambio di mezzo, come invece era risultato necessario in precedenti studi (Sharma *et al.*, 2015). L'incapsulamento si presenta, pertanto, come un valido mezzo di moltiplicazione di *Ficus carica* L., affiancabile ai protocolli tradizionali di micropropagazione e potrà rappresentare se supportato da ulteriori ricerche finalizzate ad ottenere percentuali di conversione superiori, anche un valido supporto al vivaismo commerciale.

Riassunto

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di due differenti regolatori di crescita: 6-Benzilaminopurina e Meta-topolina, sulla vitalità,

ripresa, conversione, lunghezza dei germogli e delle radici, di segmenti nodali incapsulati della varietà libanese Houmairi di *Ficus carica* L. I risultati hanno confermato l'applicabilità della tecnologia a questa specie, che è risultata idonea per l'incapsulamento. Sebbene le percentuali di conversione non siano state elevate, l'ottenimento di plantule per la tesi che ha previsto il trattamento di conservazione a freddo (4 °C per 45 giorni) e l'utilizzo del regolatore di crescita Meta-topolina, ha raggiunto un soddisfacente livello di conversione (23%).

Parole chiave: citochinine, *Ficus carica*, incapsulamento, micropropagazione.

Bibliografia

- FAOSTAT database 2017. www.fao.org/faostat/en/#data/QC
- GERMANA' M.A., MICHELI M., STANDARDI A. 2010. *Il seme sintetico come innovazione nel settore vivaistico*. Frutticoltura Anno LXXII. 12: 38-40.
- KUMAR V., RADHA A., KUMAR CHITTA S., 1998. *In vitro plant regeneration of fig (Ficus carica L. cv. Gular) using apical buds from mature trees*. Plant Cells Reports: 717-720.
- MURASHIGE T. AND SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- RAI M. K., ASTHANA P., SINGH S. K., JAISWAL V., JAISWAL U., 2009. *The encapsulation technology in fruit plants-a review*. *Biotechnology advances*, 27(6): 671-679.
- REDENBAUGH K., 1993. *Introduction*. In: Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. K. Redenbaugh (Ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, Ca (USA): 3-7.
- SHARMA S., SHAHZAD A., MAHMOOD S., SAEED T., 2015. *High-frequency clonal propagation, encapsulation of nodal segments for short-term storage and germplasm exchange of Ficus carica L. Trees*, 29(2): 345-353.
- YAHYAOU I E., CASAMENTO D., FRASHERI D., D'ONGHIA A.M., GERMANA' M.A., 2016. *Encapsulation and evaluation of some growth regulator effects on in vitro-derived microcuttings of three Italian Ficus carica L. genotypes*. *Acta Horticulturae*. In press.