

Conservazione *in vitro* del pero mediante crescita rallentata: effetto del ritardante di crescita ancymidol e della concentrazione del saccarosio

Adele Gentile¹, Federica Piombino^{1,2}, Gaia Urbinati¹, Maria Arias¹, Andrea Frattarelli¹, Cinzia Forni², Emilia Caboni^{1*}

¹ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), Roma

² Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma

***In vitro* storage of pear in slow growth: effect of growth retardant ancymidol and of sucrose concentration**

Abstract. Slow growth storage of *in vitro* shoot culture in darkness at low temperature is an important tool for medium term conservation of germplasm. These conditions decrease the metabolic activities, thereby reducing the growth of the plants. Usually, the most suitable storage temperature for temperate species is between 4 and 8°C. Use of increased concentrations of sucrose, in respect to the multiplication medium, gave interesting results in some species. Other applied strategy is the use of growth retardants, such as ancymidol, an inhibitor of gibberellin biosynthesis. The choice of growth inhibitors depends upon the species and the suitable concentration has to be accurately selected. In this work we studied the effect of increasing the sucrose concentration in the culture medium (45 g/L), in respect to the control (30 g/L), and the application of the growth retardant ancymidol (10 µM or 15 µM) on *in vitro* storage of the pear rootstock "Pyrodwarf" (*Pyrus communis* L.) shoot culture in slow growth at 4°C, in darkness. After 12 months of conservation 100% of shoots survived with all the treatments. Shoots stored with both concentrations of sucrose were elongated, with apices in good conditions, while shoots conserved on ancymidol supplied media were very short and partially hyperhydric and necrotic. After one subculture in standard conditions, higher multiplication rate (6) was found in shoots stored on 15 µM ancymidol, in respect to the other treatments (3), however, the new formed shoots were still very short and partially hyperhydric. After 42 months in slow growth, 81% and 78% of shoots, although showing necroses, survived after storage

with 30 or 45 g/L sucrose, respectively, while shoots stored with ancymidol supplied media were completely necrotic. In conclusion, pear rootstock "Pyrodwarf" shoot cultures could be preserved for 42 months at 4°C in darkness in the standard multiplication medium containing 30 g/L sucrose with no significant difference observed when sucrose concentration was increased to 45 g/L. The growth retardant ancymidol, although was previously shown to be efficient in promoting medium term conservation of shoot cultures in other species, had detrimental effect on the conservation of pear leading to the loss of all the explants after 42 months. These results can represent a step toward the definition of a protocol to be used for slow growth storage of old Italian pear cultivars.

Key words: agrobiodiversity, *in vitro* conservation, carbohydrate concentration, growth retardant, *Pyrus communis* L.

Introduzione

Le varietà antiche di fruttiferi negli ultimi 30-40 anni sono state lentamente sostituite da varietà più moderne, altamente produttive e più richieste dall'agricoltura industriale. Per quanto riguarda il pero, delle numerose varietà coltivate all'inizio degli anni '90, poche sono rimaste, e l'80% della produzione di pero è rappresentata da sei cultivar (Biscotti *et al.*, 2010). Tuttavia, la conservazione delle varietà antiche è importante per il recupero di un'agricoltura più sostenibile e per il miglioramento genetico ad essa finalizzato (Fideghelli e Engel, 2011). Queste varietà, infatti, pur essendo in alcuni casi meno produttive, possono avere una più elevata resistenza agli stress ambientali e ai patogeni, una maggiore serbevolezza e qualità organolettica dei frutti e una efficienza supe-

* emilia.caboni@crea.gov.it

riore nell'utilizzare ridotte quantità di fertilizzanti, rispetto alle cultivar commerciali, e possono consentire, con la loro rusticità, una coltivazione con minor impatto ambientale, rappresentando anche una risorsa per i programmi di miglioramento genetico (Biscotti *et al.*, 2010). La conservazione *in vitro* di germogli in crescita rallentata costituisce un importante approccio per la conservazione della biodiversità (Reed e Chang, 1997) e per l'ottimizzazione della filiera dei laboratori commerciali (Roncasaglia *et al.*, 2009). In genere la conservazione è effettuata a bassa temperatura (4-8°C per le specie temperate) e al buio o a bassa intensità luminosa (Lambardi e Ozudogru, 2013; Reed e Chang, 1997). Oltre che sulla temperatura e sull'intensità luminosa, per ottimizzare le condizioni di conservazione a medio termine *in vitro* delle risorse genetiche in crescita rallentata si può agire anche su altri fattori quali la composizione del terreno di coltura e, in particolare, si può variare il contenuto di zuccheri nel terreno o applicare composti osmoticamente attivi, quali il mannitolo, e i ritardanti della crescita, come l'ancymidol (Cha-um e Kirdmanne, 2007; Rajasekharan e Sahijram, 2015). Nel pero (*Pyrus communis* L.) alcuni precedenti lavori hanno mostrato che una prolungata conservazione di colture di germogli in crescita rallentata può essere ottenuta a 4°C in condizioni di buio (Ahmed *et al.*, 2010; Bell e Reed, 2002 e referenze incluse; Kovalchuk *et al.*, 2014; Reed e Denoma, 2016).

In questo studio è stato valutato l'effetto della concentrazione del saccarosio e del ritardante di crescita ancymidol sulla conservazione *in vitro*, in crescita rallentata a 4°C al buio, di germogli del portinnesto di pero "Pyrodwarf" (*Pyrus communis* L.), per definire un protocollo da estendere successivamente a varietà antiche di *P. communis*.

Materiali e metodi

Le prove sono state condotte utilizzando colture *in vitro* di germogli di pero (*Pyrus communis* L.), portinnesto "Pyrodwarf", allestite da gemma ascellare e moltiplicate su un terreno di coltura (TC) contenente sali Quoirin e Lepoivre (1977), vitamine come riportato in Caboni *et al.* (1999), 0,4 mg/L di benziladenina, 0,05 mg/L di acido indolbutirrico (IBA) e 5,7 g/L di agar (B&V, Italia). Al TC, per la fase di allestimento e moltiplicazione, sono stati aggiunti 30 g/L di saccarosio (SA30). Il pH è stato portato a 5,7. Le colture sono state mantenute in condizioni standard (CS), a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, con fotoperiodo di 16h e intensità luminosa $37,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e trasferite su terreno fresco ogni 3 settimane. Per la conservazione in crescita rallentata i

germogli sono stati trasferiti su SA30 o TC contenente 45 g/L di saccarosio (SA45) o su SA30 con ancymidol (α -cyclopropyl- α [4-methoxyphenyl]-5-pyrimidinemethanol, Sigma, Italia), 10 μM (ANC10) o 15 μM (ANC15). Per ogni trattamento sono stati utilizzati 3 contenitori Magenta (Sigma) contenenti 15 germogli ciascuno. Le colture, dopo un periodo di stabilizzazione di 7 giorni nel terreno fresco in CS, sono state trasferite a 4°C e al buio. Dopo 12 e 42 mesi è stata calcolata la percentuale di germogli sopravvissuti e l'intensità del danno (estensione di clorosi e necrosi nei germogli), applicando l'indice di Mckinney (MK, Mckinney, 1923). I germogli con apici vitali sono stati trasferiti su SA30 in CS di coltura per valutare la capacità di ripresa proliferativa, calcolando il tasso di moltiplicazione (rapporto tra numero finale e iniziale di germogli) dopo una subcoltura di 3 settimane. Germogli provenienti dalla fase di moltiplicazione su SA30 in CS e subcolturati ogni 3 settimane sono stati utilizzati come controllo non conservato in crescita rallentata (CNC).

Alla fine della subcoltura i germogli provenienti dalla conservazione per 12 mesi e i germogli CNC sono stati indotti a radicare su un terreno basale MS (Murashige e Skoog, 1962) con macroelementi a concentrazione dimezzata, 2 mg/L IBA, 20 g/L saccarosio, 5,2 g/L agar (B&V), con pH 5,7, in CS di coltura. Per questa prova sono stati utilizzati 3 Magenta, contenenti 15 germogli ciascuno. Per l'analisi statistica sui dati di sopravvivenza e moltiplicazione è stato utilizzato il programma Past applicando il test di Kruskal-Wallis e il *post hoc* test di Mann-Whitney.

Risultati

Dopo la conservazione in crescita rallentata per 12 mesi la sopravvivenza è stata del 100% con tutti i trattamenti. I germogli conservati su SA30 e SA45 risultavano allungati e presentavano apici in buone condizioni, mentre quelli trattati con ANC10 e ANC15 erano raccorciati, iperidrici e in parte necrotici (fig. 1). I tassi di moltiplicazione, dopo la prima subcoltura, sono risultati superiori con ANC15 (6) rispetto agli altri trattamenti e al controllo (3). Tuttavia, i germogli trattati con l'ancymidol sono rimasti molto raccorciati e solo il 30% di essi è risultato utilizzabile per la radicazione. ANC10 e ANC15 hanno anche ridotto la capacità rizogena degli espianati (57% e 38%, rispettivamente), in confronto agli altri trattamenti (SA30 = 98% e SA45 = 100%) e al CNC (100%).

Dopo 42 mesi (figg. 2 e 3), i germogli da SA30 e SA45, pur presentando necrosi fogliari (MK =



Fig. 1 - Germogli conservati *in vitro* in crescita rallentata, per 12 mesi a 4°C al buio su 30 g/L di saccarosio (sinistra) o con 30 g/L di saccarosio e 10 μM ancymidol.

Fig. 1 - Shoots after slow growth *in vitro* storage for 12 months, at 4°C in darkness, on 30 g/L sucrose (left) or on 30 g/L sucrose and 10 μM ancymidol.

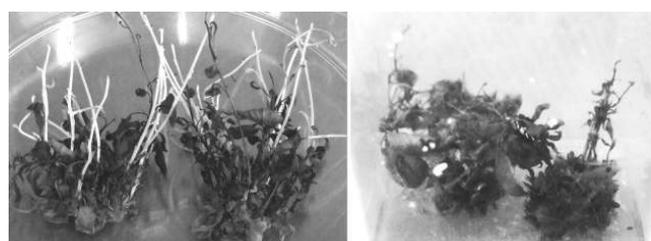


Fig. 2 - Germogli conservati *in vitro* in crescita rallentata, per 42 mesi a 4°C al buio su 30 g/L di saccarosio (sinistra) o con 30 g/L di saccarosio e 10 μM ancymidol.

Fig. 2 - *In vitro* shoots after slow growth *in vitro* storage for 42 months, at 4°C in darkness, on 30 g/L sucrose (left) or on 30 g/L sucrose and 10 μM ancymidol.

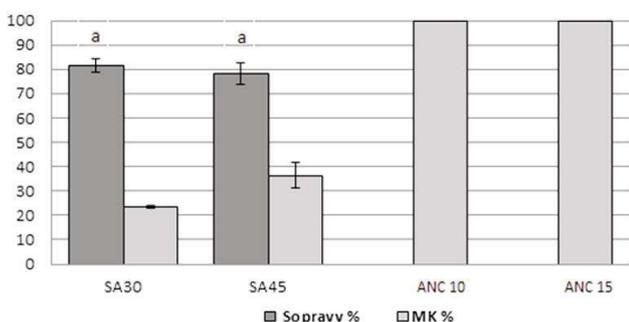


Fig. 3 - Sopravvivenza dei germogli conservati su 30 g/L (SA30) o 45 g/L (SA45) di saccarosio o su 30 g/L saccarosio con 10 μM (ANC10) o 15 μM (ANC15) ancymidol per 42 mesi.

Fig. 3 - Survival of shoots maintained in slow growth *in vitro* storage for 42 months on 30 g/L (SA30) or 45 g/L (SA45) sucrose or on 30 g/L sucrose and 10 μM (ANC10) or 15 μM (ANC15) ancymidol.

67,19% e 72,91%, rispettivamente), hanno mantenuto gli apici vitali e la sopravvivenza è stata dell'81% con SA30 e del 78% con SA45, senza differenza significativa tra i due trattamenti, mentre i germogli da ANC10 e ANC15 sono risultati tutti completamente necrotici (MK = 100%). Infine, dopo la prima subcoltura, il tasso di moltiplicazione dei germogli da SA30 è risultato significativamente superiore rispetto a quello dei germogli conservati su SA45 (fig. 4).

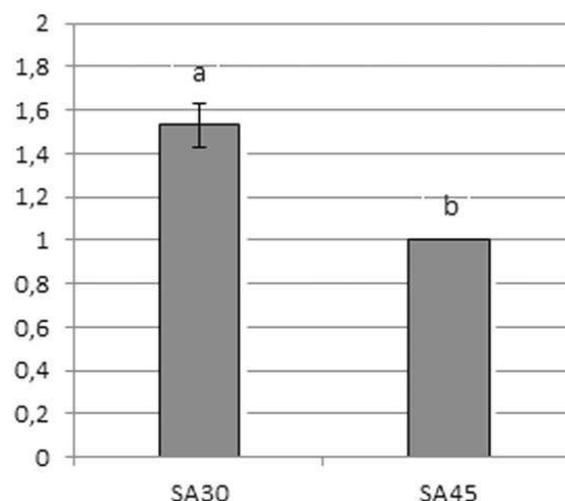


Fig. 4 - Tasso di moltiplicazione dopo la prima subcoltura dei germogli conservati su 30 g/L (SA30) o 45 g/L (SA45) per 42 mesi.

Fig. 4 - Multiplication rates after 1 subculture of shoots previously maintained in slow growth *in vitro* storage for 42 months on 30 g/L (SA30) or 45 g/L (SA45) sucrose.

Discussione e conclusioni

Negli ultimi decenni, numerosi studi sono stati realizzati con l'obiettivo di mettere a punto tecniche, facilmente realizzabili, in grado di permettere una conservazione *in vitro* delle risorse genetiche. Nel medio termine l'obiettivo principale è quello di diminuire la frequenza delle subcolture e quindi anche i rischi di contaminazione del materiale vegetale e i costi che la sua manipolazione comporta, attraverso una diminuzione della crescita. Questo stato di crescita rallentata può essere indotto mediante cambiamenti dei parametri fisico/chimici, quali l'abbassamento della temperatura e dell'intensità luminosa, la modificazione nel terreno di coltura della concentrazione degli zuccheri e l'uso di ritardanti della crescita, come l'ancymidol (Cha-um e Kirdmanne, 2007; Rajasekharan e Sahijram, 2015).

A seconda della specie, questi fattori possono avere un ruolo più o meno importante per il prolungamento del tempo di conservazione dei germogli, i quali devono necessariamente mantenere la capacità di ricrescita e moltiplicazione una volta reintrodotti per la propagazione in condizioni standard (Lambardi e Ozudogru, 2013).

L'utilizzo delle basse temperature è il metodo più usato per ottenere una conservazione nel breve e medio termine in quanto esse non solo riducono il rischio di insorgenza di variazioni somaclonali, ma determinano anche una diminuzione dei processi metabolici, favorendo il rallentamento della crescita e dello sviluppo delle piante. La nostra scelta di appli-

care una temperatura di 4°C e la condizione di buio è suggerita da vari lavori presenti in letteratura, che indicano questa combinazione come adatta per specie frutticole di climi temperati, incluso il pero (Kovalchuk *et al.*, 2009; Lambardi e Ozudogru, 2013; Reed e Chang, 1997; Reed e Denoma, 2016).

Per rendere maggiormente efficiente la conservazione degli espianti alle basse temperature, si ricorre anche alla modulazione della concentrazione dei carboidrati nel terreno di crescita (Lambardi e Ozudogru, 2013). Roncasaglia *et al.* (2009), ad esempio, hanno osservato che la presenza di una maggiore concentrazione di saccarosio, rispetto alle condizioni standard, favorisce la conservazione a medio termine dei germogli in varie specie tra le quali i *Prunus spp* (portinnesti di fruttiferi Gisela 5 e Mirabolano 29C) e *Actinidia deliciosa* (cv. Hayward); i risultati del nostro studio, tuttavia, hanno mostrato che la presenza di una maggiore concentrazione di saccarosio, rispetto a quella standard, non migliora la conservazione a medio termine dei germogli di pero, sia per quanto riguarda il tasso di sopravvivenza sia la ripresa vegetativa, come anche osservato da Roncasaglia *et al.* (2009) per il portinnesto di pesco GF677 (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*), confermando che la risposta al trattamento con gli zuccheri dipende dalla specie.

Tra i ritardanti di crescita l'ancymidol, un inibitore della sintesi delle gibberelline, ha mostrato un effetto positivo sulla conservazione in crescita rallentata di colture di germogli di *Solanum tuberosum* (Sarkar, 2001). Tuttavia, nel nostro lavoro la presenza di ancymidol nel terreno di coltura durante la conservazione ha fortemente pregiudicato la sopravvivenza dei germogli per un lungo periodo (42 mesi), con entrambe le concentrazioni applicate, indicando anche in questo caso, una risposta legata alla specie.

Riassunto

E' stato valutato l'effetto di 30 o 45 g/L di saccarosio e del ritardante di crescita ancymidol, 10 o 15 µM, sulla conservazione *in vitro*, per 12 e 42 mesi, in crescita rallentata, di germogli di pero (*Pyrus communis*), portinnesto "Pyrodwarf". Con tutti i trattamenti le percentuali di sopravvivenza dopo 12 mesi sono state del 100%, tuttavia, i germogli conservati su ancymidol erano molto raccorciati e in parte necrotici e tale aspetto si è mantenuto anche dopo la prima subcoltura in condizioni standard. Dopo 42 mesi, i germogli conservati con entrambe le concentrazioni di saccarosio hanno mantenuto gli apici vitali con

sopravvivenza di circa l'80%, mentre con ancymidol sono risultati tutti completamente necrotici.

Parole chiave: agrobiodiversità, conservazione, moltiplicazione, radicazione, ritardante di crescita.

Bibliografia

- AHMED M., ANJUM M.A., SHAH A.H., HAMID A., 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pakistan Journal of Botany, 42: 1639-1650.
- BELL R.L., REED B.M., 2002. *In vitro* tissue culture of pear: advances in technique for micropropagation and germplasm preservation. Acta Horticulturae, 596: 418-418.
- BISCOTTI N., GUIDI S., FORCONI V., PIOTTO B., 2010. *Frutti dimenticati e biodiversità recuperata*. Il germoplasma frutticolo e viticolo delle agricolture tradizionali italiane. ISPRA, Quaderni - Natura e Biodiversità, 1: 13-25.
- CABONI E., TONELLI M.G., LAURI P., D'ANGELI S., DAMIANO C., 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59(1): 1-7.
- CHA-UM S., KIRDMANNE C., 2007. *Minimal growth in vitro culture for preservation of plant species*. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, 1: 13-25.
- FIDEGHELLI C., ENGEL P., 2011. *L'attività di raccolta, caratterizzazione, valorizzazione e conservazione della biodiversità vegetale di interesse agricolo in Italia con particolare riguardo alle risorse genetiche frutticole*. Italus Hortus (Review n. 15), 18 (3): 33-45.
- KOVALCHUK I., ZHUMAGULOVA Z., TURDIEV T., REED B.M., 2014. *Growth medium alterations improve in vitro cold storage of pear germplasm*. CryoLetters, 35: 197-203.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2013. *Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature*. Acta Horticulturae, 988: 29-42.
- MCKINNEY H.H., 1923. *A new system of grading of plant diseases*. Journal of Agricultural Research, 26: 195-218.
- MURASCHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Plant physiology, 15: 473-497.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., BOXUS P., 1977. *Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux*. Compte Rendu des recherches. EJ Rapports de synthese. Station de cultures fruitières et maraichères, Gembloux, pp. 93-117.
- RAJASEKHARAN P.E., SAHIJRAM L., 2015. *In vitro* conservation of plant germplasm. In: B. Bahadur, M.V. Rajam, L. Sahijram, K.V. Krishnamurthy eds., Plant Biology and Biotechnology, Vol. II: Plant Genomics and Biotechnology. Springer Verlag (New York, USA): 417-443.
- REED B.M., CHANG Y., 1997. *Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops*. In: M.K. Razdan and E.C. Cocking eds., Conservation of Plant Genetic Resources *In Vitro*. Science Publishers, Inc. (Enfield, NH, USA): 67-105.
- REED B.M., DENOMA J., 2016. *Medium-Term in vitro storage of pear as a complementary germplasm preservation technique*. Acta Horticulturae, 1113: 251-256.
- RONCASAGLIA R., BENELLI C., DE CARLO A., DRADI G., LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2009. *Factors affecting slow growth storage of fruit species*. Italus Hortus, 16: 234-238.
- SARKAR D., CHAKRABARTI S., NAIK P.S., 2001. *Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro*. Euphytica, 117: 133-142.