

***Embryo rescue* e germinazione assistita: sviluppo di tecniche *in vitro* a supporto del miglioramento genetico in *Hydrangea* spp.**

Sara Lazzereschi¹, Beatrice Nesi^{1*}, Gianluca Burchi¹, Andrea Mansuino²

¹ CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, sede di Pescia (PT)

² Azienda Mansuino, Sanremo (IM)

Embryo rescue and assisted germination: development of *in vitro* techniques for genetic improvement in *Hydrangea* spp.

Abstract. *Hydrangea* is a genus of ornamental plants used as pot plant and for landscaping and gardening, and recently also as fresh and dried cut flower. To expand its market, new hybrids and cultivars should be developed. In order to increase genetic variability in ornamental plants, intra- and inter-specific hybridization breeding strategies have been widely used. Breeding is a long process and premature death of developing embryos due to incompatibility and delayed germination, caused by seed dormancy, are the main causes. In order to increase the hybridization efficiency and provide new genetic material suitable for cultivation as cut flower in *Hydrangea*, some techniques to support the genetic improvement have been developed. These techniques included: i) *in vitro* sowing and assisted germination: comparison between two *in vitro* germination medium to overcome the post-zygotic barriers, which, due to degeneration of endosperm, inhibit the development of the zygotic mature embryo. ii) *in vitro* culture of immature ovaries, harvested in three different times after pollination, with the aim of identifying the best period able to provide the highest percentage of immature zygotic germination. *In vitro* germination techniques allowed to obtain a number of new individuals with interesting ornamental traits. Currently this material is under selection, providing the basis for the further development of the *Hydrangea* breeding program.

Key words: Breeding, *in vitro* germination, ovary culture, hortense.

Introduzione

Le specie del genere *Hydrangea* L. si distinguono per la loro versatilità di impiego: arbusto fiorito da

giardino, pianta in vaso e fiore reciso fresco ed essiccato, il quale sta riscuotendo molto interesse sul mercato. Il principale obiettivo del miglioramento genetico delle specie ornamentali è incrementare la variabilità genetica, e a tal fine, l'ibridazione intra- ed inter-specifica viene ampiamente utilizzata nei programmi di *breeding*. Fattori limitanti per il successo dell'ibridazione sono l'aborto prematuro degli embrioni e la disomogeneità/bassa percentuale di germinazione dei semi (Mohapatra e Rout, 2005). Alcune tecniche di coltura *in vitro* possono essere utilizzate per superare questi limiti, aumentando così il numero di semenzali su cui effettuare la selezione. Tra queste, l'*embryo rescue* è stata impiegata nel genere *Hydrangea* come supporto per ottenere ibridi interspecifici tra *H. macrophylla* (Thunb.) Ser. x *H. paniculata* Sieb., (Reed, 2004) e per favorire il recupero di ibridi interspecifici tra *H. macrophylla* (Thunb.) Ser. x *H. arborescens* L. (Reed, 2000). La tecnica prevede di allevare *in vitro* ovari giovani per indurre la germinazione precoce degli embrioni immaturi in essi contenuti ed è una tecnica comunemente impiegata per superare eventuali barriere di incompatibilità nella produzione di ibridi prima che, a causa della degenerazione dell'endosperma, lo sviluppo dell'embrione all'interno del seme venga bloccato (Eeckhaut *et al.*, 2006). Per quanto riguarda invece l'aumento dell'efficienza della germinazione di semi maturi, Greer e Rinehart (2010) hanno sviluppato un protocollo *in vitro* per aumentare la percentuale di germinazione di semi ottenuti da incroci di *H. macrophylla* (Thunb.) Ser. x *H. paniculata* Sieb., basato sulla sterilizzazione dei semi con trichloro-s-triazinettrione (Trichlor) e la germinazione su substrato solido.

Obiettivi del lavoro sono identificare dei parametri ripetibili per ottenere una buona efficienza di germinazione di semi ibridi di *Hydrangea* e verificare la possibilità di aumentare la percentuale di recupero di embrioni, ottenuti da incroci intra ed interspecifici all'interno di un ampio programma di *breeding*, per la costituzione di nuovo materiale adatto alla coltivazione per il fiore reciso. Al fine di incrementare l'effi-

* beatrice.nesi@crea.gov.it

cienza di ibridazione e la percentuale di germinazione di semi ottenuti da un programma di incroci tra diverse varietà di *Hydrangea* spp., presso il CREA-OF di Pescia, è stato sviluppato un programma di miglioramento genetico, mediante il ricorso a incroci intra- ed interspecifici e a tecniche *in vitro*, con l'obiettivo di costituire nuovo materiale adatto alla coltivazione per il fiore reciso.

Materiali e metodi

Le varietà impiegate nel programma di miglioramento genetico sono mantenute in collezione presso un'azienda del sanremese e sono riportate in tabella 1.

Semina *in vitro*

Semi contenuti all'interno di capsule mature, ottenute da un programma di incroci e raccolte 180 giorni dopo l'impollinazione (D.A.P.), sono stati utilizzati in prove di germinazione *in vitro*. Aliquote di 0,025 g di seme sono state racchiuse in sacchetti di Tessuto non Tessuto (TNT) e lavate in una soluzione di H₂O e detergente per 10 min.; successivamente sono stati immersi in Et-OH al 70%, per 30 sec. e sterilizzati in una soluzione 1:2 v/v contenente 5% di cloro attivo, con aggiunta di 2 µl/100 ml di Tween 20®, per 10 min. Infine sono stati sciacquati in H₂O distillata steri-

Tab. 2 - Composizione dei mezzi di coltura per la germinazione *in vitro* dei semi di *Hydrangea* spp.

Tab. 2 - Culture media for *in vitro* germination of *Hydrangea* spp.

	Terreno A3	Terreno B
Gamborg B5 Medium	1,6 g/L	-
Murashige & Skoog	-	2,2 g/L
Ac. naftalenacetico	-	1 mg/L
Saccarosio	30 g/L	30 g/L
Plant Preservative Mixture	2 ml/L	4 ml/L
Agar	7 g/L	7 g/L
pH	5,7-5,8	5,7-5,8

le per 2 volte di 10 min. ciascuna. Per la semina sono stati testati due differenti substrati di germinazione (tab. 2) utili per facilitare lo sviluppo dell'embrione all'interno del seme (fig. 1). Le piastre sono state conservate in cella climatica a T=23±1°C, al buio per due settimane, e successivamente poste alla luce a 35 µmol m⁻² s⁻¹, con fotoperiodo di 16 h. Dopo 15 giorni è stata valutata la percentuale di germinazione.

Coltura *in vitro* di ovari immaturi

Alla fine dell'autunno (circa 180 D.A.P) le infiorescenze essiccate sono allo stadio ideale per ottenere semi maturi. Per incrementare la percentuale di sviluppo di embrioni presenti all'interno delle capsule, ovari immaturi, ottenuti da un programma di incroci

Tab 1. - Germoplasma vegetale utilizzato nel programma di *breeding* in *Hydrangea* spp.

Tab 1. - Genetic material used in the breeding program of *Hydrangea* spp.

Specie	Cultivars
<i>H. macrophylla</i> ssp. <i>Macrophylla</i>	'Alberta', 'Ayesha', 'Bela', 'Berlin', 'Blue', 'Bianca Ceriana', 'Bianco', 'Dienemann', 'Early Blue', 'Elbatal', 'Endless Summer', 'Europa', 'First Red', 'Grattino', 'Green Shadow', 'Harlequin', 'Inspire', 'Intermezzo', 'Jumbo Purple', 'Lake San Markos', 'Leuchtfleur', 'Light Purple', 'Magical Coral', 'Magical Garnet', 'Magical Jade', 'Magical Noblesse', 'Masja', 'Mirai', 'Nikko', 'Nympe', 'Padula Rosa', 'Paris', 'Rathen', 'Red Ace', 'Red Beauty', 'Renate Wate', 'Rodeo', 'Sage Green', 'San Baronto', 'Schnball', 'Semperflorens', 'School Scacherbat', 'Seour Therese', 'Shoking Blue', 'Sibilla', 'Sonnestein', 'Sweet Fantasy', 'Tivoli', 'Vendetta', 'Verena', 'White', 'White First', 'Zorro', 'Kardinal'
<i>H. macrophylla</i> ssp. <i>Serrata</i>	'Miranda'
<i>H. arborescens</i>	'Annabelle', 'Incredibile' Invincibelle'
<i>H. quercifolia</i>	'Snow Queen'

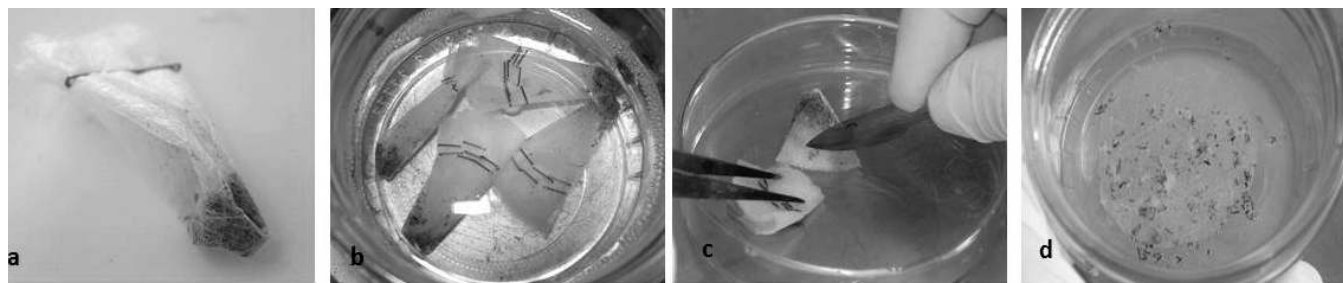


Fig. 1 - Sterilizzazione di semi ottenuti da incroci intra- ed interspecifici in *Hydrangea* spp.: semi pesati e racchiuse in sacchetti di TNT (a); lavaggio e sterilizzazione dei semi (b); apertura dei sacchetti e allestimento coltura *in vitro* (c - d).

Fig. 1- Sterilization of seeds obtained from intra and interspecific crosses in *Hydrangea* spp.: seeds weighed and enclosed in TNT bags (a); washing and sterilization of seeds (b); opening of TNT bags and *in vitro* germination of seeds (c - d).

intra- ed interspecifici, sono stati raccolti in tre epoche differenti (90, 120, e 150 D.A.P.). Per ogni incrocio valutato, sono state testate tre repliche, cioè sono stati messi *in vitro* tre ovari per ogni epoca di raccolta, per un totale di nove ovari per ogni combinazione di incrocio. Gli ovari sono stati sterilizzati testando due differenti protocolli, al fine di garantire una maggiore percentuale di asepsi del materiale messo in coltura.

Il primo metodo di sterilizzazione (St1) ha previsto un lavaggio in una soluzione di H₂O e detergente per 20 min., seguito da un lavaggio di 20 min. in una soluzione 1:2 v/v con 5% di cloro attivo e l'aggiunta di 1 ml/L di PPM™, e 3 lavaggi finali di 10 min. ciascuno in H₂O distillata sterile. Il secondo metodo (St2) invece, ha previsto un primo lavaggio in una soluzione di H₂O e detergente per 5 min., e un secondo lavaggio di 10 min. in H₂O sterile; è seguita una sterilizzazione in Et-OH al 70%, per 1 min., e un lavaggio in una soluzione 1:2 v/v con 5% di cloro attivo con aggiunta di 2 µl/100 ml di Tween 20®, per 15 min. Infine un lavaggio di 20 min. in una soluzione 1:1 v/v di H₂O sterile e PPM™, pH 2.8-3.2.

Al fine di facilitare lo sviluppo dell'embrione e l'emissione della plantula, gli ovari dopo esser stati privati della porzione apicale, sono stati sottoposti ad un taglio longitudinale di circa 1 mm e coltivati su un substrato di crescita riportato in tabella 3. Gli ovari sono stati incubati a T = 23±1 °C, al buio per 2 settimane, e successivamente posti alla luce (35 µmol m⁻² s⁻¹) con fotoperiodo di 16 h.

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il programma COSTAT, l'analisi della varianza è stata effettuata a p ≤ 0,05 e le medie sono state confrontate con il test *Student Newman Keuls* (SNK)

Risultati

Nel presente studio, sono emerse differenze statisticamente significative per quanto riguarda i due substrati impiegati per la germinazione *in vitro* dei semi: il substrato A, contenente il mezzo di coltura di

Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968), senza ormoni, ha assicurato un tasso di germinazione più elevato (80%), contro il 20 % del substrato B, a base di sali MS (Murashige & Skoog, 1962) e acido naftalenacetico (figg. 2 e 3). Il substrato A sembra quindi il più appropriato per la messa a punto della tecnica di germinazione *in vitro* di semi di *Hydrangea*. Le nuove plantule germinate, dopo essersi sviluppate ed aver raggiunto un'altezza di circa 3 cm, sono state progressivamente acclimatate in cella climatica prima ad una T=19±1°C per circa 2 settimane, e successivamente ad una T=17±1°C, mantenendo lo stesso fotoperiodo di 16 h. Dopo circa 2 mesi, le piante sono state trasferite in ambiente esterno, sotto rete nera, con un ombreggiamento pari al 70 %, presso le strutture del CREA-OF sede di Pescia. Le piante sono risultate di ottima qualità, caratterizzate da una buona uniformità, senza presentare anomalie nella crescita.

Riguardo al superamento di eventuali barriere di incompatibilità nella produzione di ibridi, si è ricorso alla coltura *in vitro* di ovari immaturi. Per individuare l'epoca più idonea per il prelievo degli ovari immaturi ottenuti dal programma di incroci, sono state valutate tre epoche di raccolta, a 90, 120 e 150 D.A.P. In figura 4 si può osservare come all'aumentare del numero di giorni che intercorrono dal momento dell'impolli-

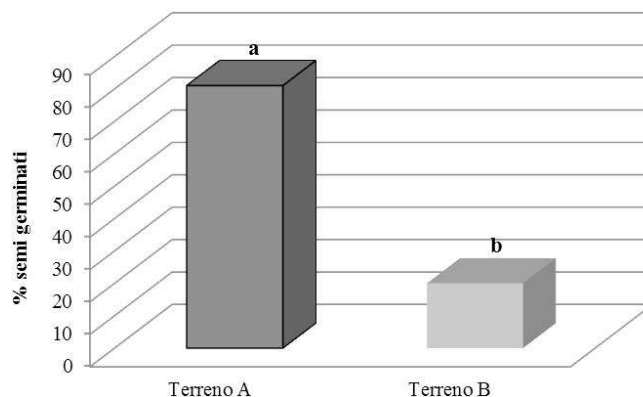


Fig. 2 - % di germinazione *in vitro* di semi di *Hydrangea* spp. su due differenti terreni di coltura.

Fig. 2 - Percentage of *in vitro* germination of *Hydrangea* seeds on two different medium.

Tab. 3 - Composizione del substrato per la coltura *in vitro* di ovari immaturi di *Hydrangea* spp.

Tab. 3 - Culture media for *in vitro* culture of immature ovaries in *Hydrangea* spp.

	Terreno coltura ovari
Murashige & Skoog	4,4 g/L
Saccarosio	30 g/L
Plant Preservative Mixture	1 ml/L
Agar	7 g/L
Active charcoal	2 g/L

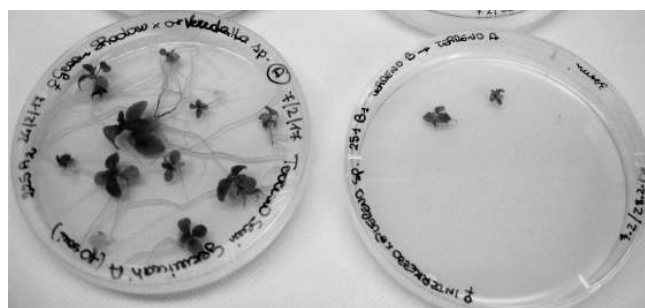


Fig. 3 - Germinazione *in vitro* di semi di *Hydrangea* spp.
Fig. 3 - *In vitro* germination of *Hydrangea* seeds.

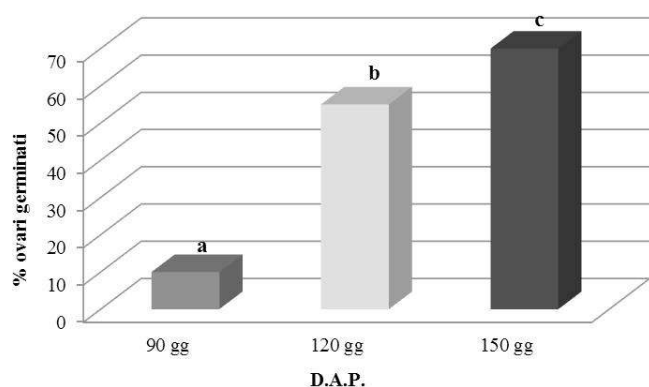


Fig. 4 - % ovari germinati *in vitro* in base all'epoca di raccolta.
Fig. 4 - Percentage of *in vitro* germination of immature ovaries in *Hydrangea* spp.

nazione all'epoca di raccolta, aumenti il numero di ovari in grado di produrre nuovi semi; ciò a conferma che nella prima epoca valutata l'embrione non risulta ancora completamente formato. La germinazione è cominciata dopo circa 2 mesi dalla messa in coltura e, combinando l'epoca di prelievo con il metodo di sterilizzazione degli ovari, è stato possibile raggiungere circa il 40% di germinazione. Le plantule ottenute, sono state quindi moltiplicate *in vitro* e successivamente acclimatate *in vivo*, su un substrato a base di torba e perlite, in rapporto 1:1, presso le strutture del CREA-OF sede di Pescia.

Discussione e conclusioni

I dati raccolti mettono in evidenza come la geminazione assistita, seguita da un'efficace protocollo di micropropagazione, si dimostri uno strumento valido a supporto del miglioramento genetico e permetta di ottenere nuovi ibridi fioriti di *Hydrangea*, con caratteri fenotipici interessanti sia per il mercato nazionale che estero, attualmente in fase di selezione.

Riassunto

Un programma di miglioramento genetico, mediante il ricorso a incroci intra- ed interspecifici e a tecniche *in vitro*, è stato sviluppato presso un'azienda del sanremese in collaborazione con il CREA-OF di Pescia, con l'obiettivo di costituire nuovo materiale genetico di *Hydrangea* spp. da destinare al mercato del fiore reciso. In questo modo è stato possibile ottenere nuovi ibridi fioriti di *Hydrangea*, con caratteri interessanti per il mercato, attualmente in fase di selezione.

Parole chiave: Ortensia, costituzione varietale, germinazione *in vitro*, coltura di ovari.

Bibliografia

- ECKHAUT T., VAN LAERE K., DE RIEK J., VAN HUYLENBROECK J., 2006. *Overcoming interspecific barriers in ornamental plant breeding*, pp. 540-551. - In: DA SILVA J.A.T. (ed.) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Vol. I. Global Science Books, UK, pp. 540-551.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K., 1968. *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. *Experimental Cell Research*. Vol. 50, Issue 1, Pages 151-158.
- GREER S.P., RINEHART T.A., 2010. *Dormancy and germination in vitro response of Hydrangea macrophylla and Hydrangea paniculata seed to light, cold-treatment and gibberellic acid*. *JEH*, 28(1): 41-47.
- MOHAPATRA A., ROUT G.R., 2005. *Study of embryo rescue in floribunda rose*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81:113-117.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- REED S.M., 2000. *Development of an in ovule embryo culture procedure for Hydrangea*. *J. Environ. Hort.*, 18(1): 34-39.
- REED S.M., 2004. *Floral characteristics of a Hydrangea macrophylla × H. paniculata hybrid*. *Proc. Southern Nursery Assn. Res. Conf.*, 49: 580-582.