

# Prove di crescita rallentata per incapsulazione in alginato in albicocco, cv Pisana

Simona Monticelli<sup>\*</sup>, Cinzia Forni<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CREA-OFA, Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Sede di Roma

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

## Slow growth experiments by alginate encapsulation in apricot cv. Pisana

**Abstract.** The storage of micropropagated plants by the low temperature, called slow growth, has the main aim to reduce the frequency of periodic subculturing, without affecting the regrowth ability of the shoots. The most commonly used conditions include low temperatures, dark or reduced light, the supply of osmotically active substances, such as sucrose. Also encapsulation technology has been used for short and medium term storage of plant propagules. The experiment described below was designed to evaluate the mid-term storability, at 4°C in dark, of the apricot cv. Pisana, by alginate encapsulation. Shoots were multiplied in presence of equimolar amount of sucrose or sorbitol, as carbon source, and benziladenine or meta-Topolin, as cytokinin. Nodal segments from shoots were maintained in the dark at 4°C for 24 weeks, corresponding to 8 subcultures (168 days). They were cultivated 'naked' or encapsulated, on media supplied of 3%, 4.5% or 6% sucrose. Each 21 days 5-10 nodal segments from each treatment were transferred in standard growth conditions (light 37.5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  with photoperiod 16h, 24°C), and after 21 days data about regrowth were recorded, as number of nodal segments developing shoots. After only 21 days in dark at 4°C the regrowth of explants multiplied on sucrose/benziladenine was significantly lower than control, while for those multiplied on sorbitol/meta-Topolin the regrowth reduction was significant only for encapsulation treatments and for the higher sucrose concentrations. The alginate encapsulation had a detrimental effect on the regrowth. The regrowth ability decreased linearly with the time for all treatments, in a statistically significant way. The sucrose concentration didn't seem affect the regrowth. The develop-

ment of shoots from nodal segments was influenced by the multiplication medium, however after the 63<sup>th</sup> day of maintenance in dark at 4°C, the reduction of regrowth ability was limiting for the purposes of the mid-term storage of cv. Pisana. The cultural conditions applied to cv. Pisana have turned out to be inadequate to ensure the viability and the regrowth of explants after maintenance at low temperature and darkness. Considering that the effects are evident as early as 21 days of treatment, for the future both temperature and light intensity will be differently modulate and/or different osmotically active compounds will be considered.

**Key words:** mid-term storage, nodal segments *Prunus armeniaca* L.

## Introduzione

La conservazione di germoplasma micropropagato a bassa temperatura, nota come crescita rallentata o *slow growth*, ha come obiettivo principale l'estensione dell'intervallo che intercorre tra una subcoltura e l'altra. Le condizioni più frequentemente adottate allo scopo comprendono, appunto, le basse temperature, ma anche la riduzione o l'assenza di luce e/o la somministrazione di sostanze osmoticamente attive, come il saccarosio (Lambardi e Ozudogru, 2013). Anche la tecnologia dell'incapsulazione in alginato di propaguli vegetali è stata utilizzata per la conservazione a breve e medio termine. Ad esempio, segmenti nodali del portinnesto di vite 'Kober 5BB', sono stati mantenuti incapsulati al buio a 4°C, con ripresa vegetativa di poco più del 60 % e intorno al 50% dopo rispettivamente 6 e 9 mesi di conservazione (Benelli, 2016). L'esperimento qui descritto è stato disegnato per valutare la conservabilità a medio termine della varietà di albicocco Pisana mediante incapsulazione.

\* simona.monticelli@crea.gov.it

Si è voluto pertanto determinare l'effetto della bassa temperatura (4°C) e dell'assenza di luce sulla capacità di ripresa vegetativa di segmenti nodali di albicocco cv. Pisana, moltiplicato *in vitro* su due diversi terreni nutritivi, in presenza di diverse concentrazioni di saccarosio (3%, 4,5% e 6%), e dell'inclusione o meno in perle di alginato, per un periodo massimo di 24 settimane (corrispondenti a 168 giorni di coltura o 8 subcolture di 3 settimane).

### Materiali e Metodi

I germogli di cv. Pisana sono stati allevati su due terreni di moltiplicazione (Damiano *et al.*, 2009), diversi per fonte di carbonio e citochinina (tab. 1). Segmenti nodali di 3-4 mm dei germogli provenienti dai due substrati sono stati mantenuti, 'nudi' o incapsulati in alginato di sodio, al buio a 4°C per un periodo di 24 settimane (circa 6 mesi, 168 giorni), su terreno agarizzato MA, in presenza di tre concentrazioni di saccarosio (30, 45, 60 gL<sup>-1</sup>), in piastre Petri. Ogni 21 gg, per ogni trattamento, 5-10 segmenti nodali per tre repliche, sono stati trasferiti su terreno MA in condizioni standard (CS) ambientali di crescita, vale a dire alla luce, con un fotoperiodo 16 h, ad una intensità luminosa pari a 37.5 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura di 24±2°C. Dopo 21 gg dal trasferimento in CS è stata misurata la ripresa vegetativa, in termini di percentuale di nodi formanti germogli ascellari. I dati raccolti sono stati analizzati con il software per l'analisi statistica PAST versione 2.17c (Hammer *et al.*, 2001; <http://folk.uio.no/ohammer/past>), effettuando analisi della varianza tramite test di Kruskal-Wallis, seguita dal test di Mann-Whitney per la verifica della significatività delle differenze tra le mediane per p≤0,05.

### Risultati

La ripresa vegetativa in condizioni standard dei segmenti nodali mantenuti al buio a 4°C, già

Tab. 1. Composizione in fonte di carbonio e citochinina dei terreni di moltiplicazione MA e MB.

Tab. 1. Source of carbon and cytokinin used in the multiplication media MA and MB.

|                   | Molarità | mgL <sup>-1</sup> | MA | MB |
|-------------------|----------|-------------------|----|----|
| Fonte di carbonio |          |                   |    |    |
| Saccarosio        | 87 mM    | 30.000            | +  | -  |
| Sorbitolo         | 87 mM    | 16.000            | -  | +  |
| Citochinina       |          |                   |    |    |
| BA                | 1,78 μM  | 0.4               | +  | -  |
| Meta-Topolin      | 1,65 μM  | 0.4               | -  | +  |

dopo 21 gg di conservazione è significativamente inferiore al controllo per i nodi provenienti da terreno MA (fig. 1), a prescindere dal trattamento, mentre per i nodi provenienti da MB (fig. 2) tale riduzione è significativa, rispetto al controllo, solo per quelli incapsulati e alle concentrazioni di saccarosio più alte. L'inclusione in alginato ha un effetto negativo

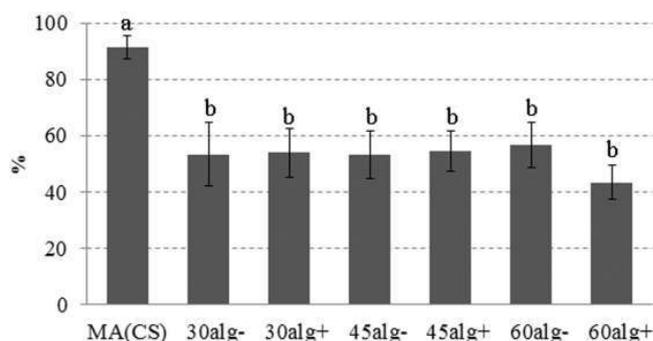


Fig. 1. Ripresa vegetativa in CS (21 gg alla luce, 24°C), dopo 21gg di conservazione al buio a 4°C, dei segmenti nodali provenienti da terreno MA. MA(CS): segmenti nodali coltivati su MA in CS per 21gg; alg-: segmenti nodali 'nudi'; alg+: segmenti nodali incapsulati; 30, 45, 60: concentrazione del saccarosio corrispondente a 30, 45, 60 gL<sup>-1</sup>; Lettere differenti indicano percentuali significativamente differenti per p≤0,05 (test di Mann-Whitney).

Fig. 1. Regrowth in CS (21 days in light, 24°C) of nodal segment from multiplication medium MA, after 21 days of conservation (dark, 4°C). MA(CS): nodal segment grown on MA in standard condition for 21 days; alg-: 'naked' nodal segment; alg+: encapsulated nodal segment; 30, 45, 60: sucrose concentration corresponding to 30, 45, 60 gL<sup>-1</sup>. Different letters indicate percentages significantly different at p≤0,05 (Mann-Whitney test).

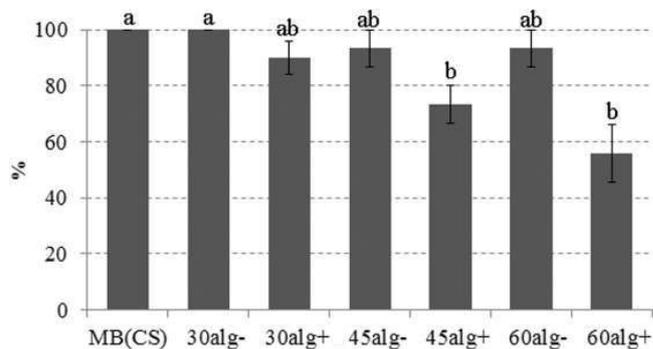


Fig. 2 - Ripresa vegetativa in CS (21 gg alla luce, 24°C), dopo 21gg di conservazione al buio a 4°C, dei segmenti nodali provenienti da terreno MB. MB(CS): segmenti nodali coltivati su MA in CS per 21gg; alg-: segmenti nodali 'nudi'; alg+: segmenti nodali incapsulati; 30, 45, 60: concentrazione del saccarosio corrispondente a 30, 45, 60 gL<sup>-1</sup>; Lettere differenti indicano percentuali significativamente differenti per p≤0,05 (test di Mann-Whitney). Fig. 2 - Regrowth in CS (21 days in light, 24°C) of nodal segment from multiplication medium MB, after 21 days of conservation (dark, 4°C). MB(CS): nodal segment grown on MA in standard condition for 21 days; alg-: 'naked' nodal segment; alg+: encapsulated nodal segment; 30, 45, 60: sucrose concentration corresponding to 30, 45, 60 gL<sup>-1</sup>. Different letters indicate percentages significantly different at p≤0,05 (Mann-Whitney test).

sulla ripresa vegetativa, a prescindere dal terreno di moltiplicazione di provenienza (fig. 3). La concentrazione del saccarosio non sembra avere un ruolo nella conservazione a bassa temperatura (fig. 4). La capacità di sviluppo dei germogli ascellari diminuisce linearmente in modo statisticamente significativo (dati non mostrati) con il tempo di conservazione, in tutti i trattamenti (fig. 4). L'incapsulazione ha effetto negativo anche nel tempo. Il terreno di provenienza degli espianti sembra influenzare la capacità di ripresa vegetativa dei segmenti nodali, ciò vale specialmente per quelli non incapsulati. Al 63° giorno di crescita al buio a bassa temperatura la ripresa vegetativa risulta pressoché dimezzata rispetto al 21° giorno, ma sempre maggiore negli espianti provenienti dal terreno MB. Solo in presenza di saccarosio al 3%, la percentuale si mantiene costante anche dopo 84 giorni di trattamento per i segmenti non incapsulati provenienti dal terreno MB (fig. 4A).

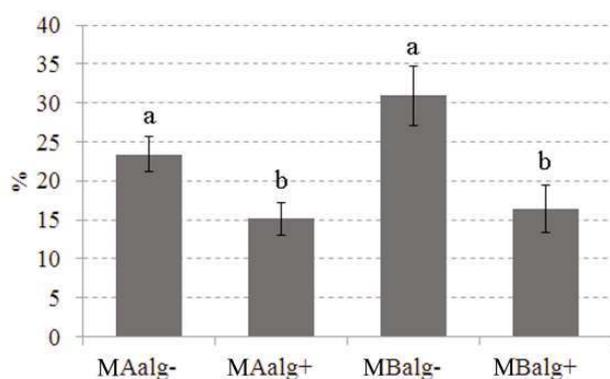


Fig. 3. Ripresa vegetativa dei segmenti nodali 'nudi' (alg-) e incapsulati (alg+), provenienti dai terreni di moltiplicazione MA e MB. Lettere differenti indicano percentuali significativamente differenti per  $p \leq 0,05$  (test di Mann-Whitney).

Fig. 3. Regrowth of 'naked' (alg-) and encapsulated (alg+) nodal segments. A: nodal segments from multiplication medium MA; B: nodal segments from multiplication medium MB. Different letters indicate percentages significantly different at  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney test).

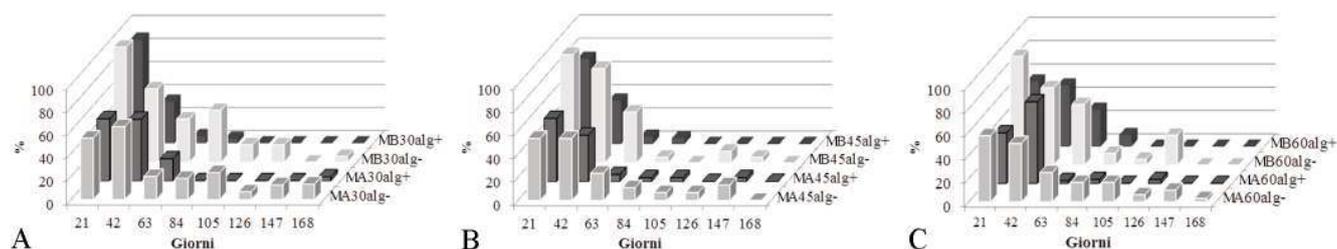


Fig. 4 - Ripresa vegetativa dopo 21, 42, 63, 84, 105, 126, 147, 168 gg al buio a 4°C, dei segmenti nodali 'nudi' (alg-) e incapsulati (alg+), provenienti dai terreni di moltiplicazione MA e MB, coltivati in presenza di A: saccarosio 30 gL<sup>-1</sup>; B: saccarosio 45 gL<sup>-1</sup>; C: saccarosio 60 gL<sup>-1</sup>.

Fig. 4 - Regrowth of 'naked' (alg-) and encapsulated (alg+) nodal segments coming from multiplication media MA and MB, after 21, 42, 63, 84, 105, 126, 147, 168 days in darkness at 4°C, in presence of A: sucrose 30 gL<sup>-1</sup>; B: sucrose 45 gL<sup>-1</sup>; C: sucrose 60 gL<sup>-1</sup>.

## Discussione e conclusioni

Le condizioni colturali cui sono stati sottoposti i segmenti nodali sono risultate inadatte al fine di una conservazione a medio termine a bassa temperatura di espianti della cv. Pisana. Complessivamente, dopo il 63° giorno di mantenimento degli espianti al buio a 4°C, la riduzione della capacità di ripresa vegetativa nelle condizioni di luce diviene limitante ai fini della conservazione. Nel portinnesto di vite 'Kober 5BB' la ripresa vegetativa di segmenti nodali, dopo sei mesi di conservazione, è significativamente inferiore negli espianti nudi rispetto agli incapsulati (Benelli, 2016). Esattamente il contrario avviene negli esperimenti qui riportati, in cui l'incapsulazione ha un effetto negativo in tutti i trattamenti. Tuttavia, anche la consistenza delle perle di alginato può influire sulla capacità e sui tempi di ricrescita (Benelli, 2016). Inoltre, in termini qualitativi, la scelta dei segmenti nodali potrebbe non essere la migliore, dal momento che gli apici vegetativi hanno una capacità di ripresa maggiore dei segmenti nodali (Benelli, 2016), anche se lo è in termini quantitativi, visto che in un germoglio c'è un solo apice ma più nodi. La conservazione a medio termine, con una sopravvivenza del 100% dopo 24 settimane e una produzione di nuovi germogli di circa tre per espianto, è riportata per germogli di albicocco della cv. Helena, conservati al buio a 3°C (Pérez-Torneo *et al.*, 1999). Nel terreno di coltura è stata usata una concentrazione del saccarosio pari al 3%. Una concentrazione inferiore, pari al 2%, è stata usata per la conservazione di apici vegetativi di cv. San Castrese e Boreale, conservati al buio a 5°C per 7 mesi, che hanno mostrato un tasso di sopravvivenza intorno all'80% e una produttività di 3,2 nuovi germogli per apice sopravvissuto nella cv. San Castrese e 1,9 per la cv. Boreale (Marino *et al.*, 2010). Tuttavia i risultati migliori per queste varietà sono stati ottenuti usando saccarosio e mannitolo in concentrazioni equimolari (58.4 mM). Se da un lato questi risultati sem-

brerebbero confermare che una concentrazione di saccarosio pari o addirittura inferiore al 3% può garantire una buona sopravvivenza degli espianti alle basse temperature, dall'altro suggeriscono l'efficacia di altri composti osmoticamente attivi, come il mannitolo. Negli esperimenti qui descritti concentrazioni di saccarosio superiori a 30 gL<sup>-1</sup> non hanno influito sulla ripresa vegetativa dei segmenti nodali.

Dai risultati ottenuti risulta evidente una iniziale diversità di risposta al trattamento buio/bassa temperatura in funzione del terreno di moltiplicazione di provenienza dei germogli da cui sono stati prelevati i segmenti nodali. Gli espianti provenienti dal terreno MB, contenente sorbitolo e meta-Topolin, dopo 21 giorni di trattamento, hanno una capacità di ricrescita analoga a quella del controllo allevato in condizioni standard. E' stato osservato che certe condizioni culturali presenti in fase di moltiplicazione, possono influire su altre fasi. Ad esempio, in albicocco, il sorbitolo migliora lo sviluppo e la proliferazione delle cv. San Castrese e cv. Portici e ne migliora la radicazione se, presente in moltiplicazione, è sostituito dal saccarosio in fase di radicazione (Marino *et al.*, 1993). Sebbene non esista un modello univoco di risposta delle specie vegetali alla somministrazione di meta-Topolin, tuttavia sono riportati in letteratura effetti positivi di questa citochinina per contrastare la necrosi dell'apice, la senescenza precoce e supportare la qualità del materiale propagato, più in generale (Aremu *et al.*, 2012). Pertanto è possibile che lo stato fisiologico dei germogli allevati su sorbitolo e meta-Topolin migliori la risposta a condizioni critiche di luce e temperatura dei segmenti nodali da questi derivati, rispetto ai germogli allevati su saccarosio e benziladenina. Infine, non si può escludere un effetto negativo della totale assenza di luce, che ha determinato la drastica riduzione della capacità di ripresa vegetativa dopo 63 giorni di trattamento per gli espianti provenienti dal terreno MB, e dopo solo 21 giorni per gli espianti provenienti dal terreno MA. Sebbene generalmente la conservazione a medio termine venga condotta al buio, in alcuni casi l'applicazione di una bassa intensità di luce può migliorare la sopravvivenza degli espianti (Oka e Niino, 1997).

In conclusione, non è stato qui possibile stabilire un efficiente protocollo di conservazione a basse temperature mediante incapsulazione di segmenti nodali di albicocco cv. Pisana. Sebbene una bassa percentuale di sopravvivenza può comunque essere sufficiente per ripristinare una coltura, incrementare la ripresa vegetativa anche per periodi di tempo superiori resta un obiettivo da raggiungere. Ulteriori indagini potranno

no tener conto della qualità dei germogli donatori di apici o nodi, del grado di polimerizzazione dell'alginato, di una diversa modulazione di luce e temperatura, dell'uso di altre sostanze osmoticamente attive o di sostanze capaci di rendere le cellule meno suscettibili al freddo.

## Riassunto

E' stato valutato l'effetto della bassa temperatura (4°C) e dell'assenza di luce sulla ripresa vegetativa di segmenti nodali di albicocco cv. Pisana, in presenza di concentrazioni di saccarosio del 3%, 4,5% e 6%, e dell'inclusione in alginato, per un periodo massimo di 24 settimane. L'incapsulazione ha avuto un effetto negativo sulla ripresa dei nodi. La capacità di sviluppo dei germogli ascellari diminuisce linearmente con il tempo di conservazione. La concentrazione del saccarosio non sembra avere un ruolo nella conservazione a bassa temperatura. Dopo 9 settimane, la riduzione della capacità di ripresa vegetativa diviene limitante ai fini di una conservazione a medio termine della cv. Pisana.

**Parole chiave:** *Prunus armeniaca* L., segmenti nodali, *slow growth*

## Bibliografia

- AREMU A.O., BAIRU M.W., DOLEŽAL K., FINNIE J.F., VAN STADEN J., 2012. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108:1-16.
- BENELLI C., 2016. Encapsulation of shoot tips and nodal segments for *in vitro* storage of "Kober 5BB" grapevine rootstock. *Horticulturae*, 2(3), 10; doi:10.3390/horticulturae2030010.
- DAMIANO C., MONTICELLI S., FRATTARELLI A., 2009. La micropropagazione dell'albicocco: recenti progressi e ricerche su nuovi terreni di coltura per un efficiente protocollo di propagazione. *Italus Hortus*, 16(2):113-115.
- HAMMER Ø., HARPER D.A.T., PAUL D.R., 2001. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4(1):1-9.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2013. Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature. *Acta Horticulturae*, 988:29-42.
- MARINO G., BERTAZZA G., MAGNANINI E., DORO ALTAN A., 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34:235-244.
- MARINO G., NEGRI P., CELLINI A., MASIA A., 2010. Effect of carbohydrates on *in vitro* low temperature storage of shoot cultures of apricot. *Scientia Horticulturae*, 126:434-440.
- OKA S., NIINO T., 1997. Long term storage of pear (*Pyrus* sp.) shoot cultures *in vitro* by minimal growth method. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 31:1-7.
- PÉREZ-TORNERO O., ORTÍN-PÁRRAGA F., EGEA J., BURGOS L., 1999. Medium-term storage of apricot shoot tips *in vitro* by minimal growth method. *HortScience*, 34(7):1277-1278.