

## Indagine sulla micropropagazione in Italia tra ricerca e produzione

Maurizio Lambardi<sup>1\*</sup> e Alberto Previati<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CNR-IVALSA, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Sesto Fiorentino (FI)

<sup>2</sup> Veneto Agricoltura, Legnaro (PD)

### A survey on micropropagation in Italy between research and production

**Abstract.** The paper reports of a survey, carried out in the year 2011, on several aspects of micropropagation in Italy, such as the number, the characteristics and the production of commercial laboratories, the research activity and the funding of public laboratories. Twenty-three commercial laboratories and 46 research laboratories, distributed throughout the country, joined the survey. The total number of commercial laboratories (25) is yearly increasing, with 6 new laboratories established in the last six years. The 2/3 are small-medium laboratories, with a maximum of 10 working places in sterile flow hoods and 100 m<sup>2</sup> of surface for the glass jars in the climatic chamber. Two are very large laboratories, with over 30 working places in flow hoods and over 1000 m<sup>2</sup> of surface for the glass jars. Almost 29 millions of micropropagated plants have been produced in the 2010 by such laboratories, with an average increase of one million of plants per year. In comparison with the past, a general increase in the supply of plant species and cultivars has been recently recorded. However, over 70% of such production concerns the fruit plants, mainly rootstocks of peach, apricot, cherry, apple and plum; however, an increase in the production of berry fruits has been observed. On the contrary, in comparison with the previous survey (2006), the production of ornamental plants decreased from 6,7 to 4,6 millions of plants, due to the decline of the production of micropropagated cut flowers. As for the vegetables, the micropropagation of artichoke had a marked boost in recent years, reaching the production of over 3,5 millions of plants. The research activity of Italian public laboratories working in *in vitro* culture is mainly directed towards the development of micropropagation protocols, the optimization of culture media and the *in vitro* recover of plants free from viruses, bacteria and phytoplasma, with particular attention to fruit species. Great efforts are also reserved to the development of other *in vitro* technologies, such as the *in vitro* conservation of germplasm, the genetic transformation of plants and the production of synthetic seeds. With few

exceptions, this important research activity is carried out by public laboratories with a limited amount of money, mainly coming from national projects.

**Key words:** *in vitro* culture, fruit plants, *in vitro* propagation, ornamentals, vegetables.

### Introduzione

Una precedente descrizione dei laboratori operanti sul territorio italiano risale ad un'indagine di oltre dieci anni fa (1999). In tale occasione, peraltro, molti degli intervistati fornirono informazioni incomplete sulle dimensioni e l'organizzazione dei loro laboratori, non permettendo così di pervenire ad una visione complessiva del settore. Si evidenziava, comunque, come fossero pochi i laboratori caratterizzati da una dimensione importante: tre soli, infatti, dichiaravano oltre 20 posti cappa; inoltre, soltanto una tra le 19 aziende che risposero all'indagine aveva un numero di addetti superiore alle 30 unità tra operatori di laboratorio e di serra di acclimatazione (De Paoli *et al.*, 2000). In tale occasione, non fu censita la produzione di piante da micropropagazione, oggetto invece di un'indagine di alcuni anni dopo (2006) che evidenziò una rimarchevole vitalità del settore, con 18 laboratori artefici di una produzione importante di piante di qualità (circa 25 milioni), per oltre il 70% relative al comparto frutticolo (prevalentemente portinnesti). Fu anche posto in risalto, peraltro, come il solo portinnesto del pesco 'GF677' rappresentasse oltre il 40% dell'intera produzione *in vitro* (Damiano *et al.*, 2007).

In occasione del recente censimento, condotto nei mesi di settembre-ottobre 2011, si è cercato di sensibilizzare i responsabili dei laboratori commerciali operanti sul territorio a fornire informazioni, per quanto possibile, rispondenti alla loro effettiva realtà, sia in termini di caratteristiche operative, sia di produttività. E' stato inoltre introdotto un ulteriore oggetto d'indagine: la valutazione del contributo degli Istituti di ricerca allo sviluppo del settore della micropropagazione e, in senso più ampio, della coltura *in vitro*. Questa seconda parte dell'indagine è partita da due considerazioni, fortemente connesse tra loro: da

\* lambardi@ivalsa.cnr.it

una parte, la crescente concorrenza da parte di Paesi dell'est europeo che si sta di recente evidenziando con la realizzazione di nuovi laboratori commerciali, cosa che impone alle nostre aziende, oggi più che mai, di investire in "ricerca e sviluppo", puntando su efficienza produttiva in laboratorio, su una maggiore diversificazione dell'offerta, su un'elevatissima qualità del prodotto-pianta; dall'altra, la constatazione di una certa "distanza" registrata nell'ultimo ventennio tra gli studi condotti nei laboratori di ricerca di coltura *in vitro*, nazionali ed internazionali, e le effettive necessità di innovazione tecnico-pratica dei laboratori commerciali (Lambardi, 2009).

Le informazioni ricavate da questa recente indagine e qui sintetizzate riteniamo possano risultare di utilità e interesse per tutti coloro che operano in micropropagazione, sia appartenenti al settore produttivo, sia a quello della ricerca.

### Laboratori commerciali: caratteristiche e produzione

#### Descrizione del modulo di indagine

Il modulo utilizzato per l'indagine tra i laboratori commerciali si componeva di tre parti: una di informazioni generali (denominazione, indirizzo e titolare dell'azienda, responsabile di laboratorio, anno di costituzione e principali finalità produttive del laboratorio, conduzione o meno di attività di ricerca), una parte di "descrizione sintetica del laboratorio" e una sulla relativa "produzione". La parte descrittiva del laboratorio si articolava sui seguenti quesiti: numerosità degli addetti alla micropropagazione (ripartiti tra laboratorio e serre di acclimatazione), dei posti cappa e delle celle fredde per lo stoccaggio delle colture, descrizione dei contenitori e dei principali substrati impiegati in coltura, sistema di preparazione dei substrati e di acclimatazione *ex vitro* (in azienda, per conto terzi oppure con vendita delle colture ancora *in vitro*). La parte relativa alla produzione 2010 (o 2011, nel caso dei laboratori di recentissima costituzione) chiedeva di quantificare il numero di piante prodotte, ripartito per specie e, relativamente ai fruttiferi, anche per varietà e/o portinnesti. Delle 25 aziende dotate di laboratorio di micropropagazione, individuate su tutto il territorio italiano, ben 23 hanno risposto al censimento: Albani e Ruggieri di Civitavecchia (Roma), Alberto Biancheri di Camporosso Mare (IM), Apice Piante di Ripa Teatina (CH), Bella Davide Bartolomeo di Rivoli (TO), Bindi Sirio di Pescia (PT), Brea Manuela di Imperia, Depaoli Claudio di Taio (TN), Exoticplant Vivaio di Cisterna di Latina, Floramiata di Piancastagnaio (SI), Giannoccaro Pietro

di San Michele di Bari (BA), Lazzeri di Merano (BZ), Meristema di Cascine di Buti (PI), Meristema Piana del Sele di Eboli (SA), Microplant di Diegaro di Cesena (FC), Pacini Maurizio di Rigoli (PI), Romeo Esterina di Siderno (RC), Venturi di Cesena (FC), Vita Stefano di Montegiorgio (FM), Vitiello Maria di Torre del Greco (NA), Vitro Flor di Stresa (VB), Vitroplant di Cesena, Vivai Battistini dr. Giuseppe di Martorano di Cesena (FC) e Vivai Piante Battistini di Martorano di Cesena (FC).

#### Numero, collocazione, età e finalità produttive dei laboratori

I laboratori di micropropagazione operanti in Italia risultano 25, in costante aumento a partire dal 1996 (fig. 1). Sono ripartiti un po' su tutto il territorio, ma con una concentrazione importante nel comune di Cesena ove si collocano 5 laboratori ed una produzione pari a circa il 70% dell'intero contesto nazionale. D'altra parte, sette regioni (Valle d'Aosta, Lombardia, Veneto, Umbria, Molise, Basilicata e Sardegna) ancora non presentano nessuna realtà produttiva in micropropagazione. Dieci dei 23 laboratori che hanno risposto al censimento sono da considerare "storici", essendo stati realizzati prima del 1990 (fig. 2), negli anni, cioè, di affermazione della micropropagazione commerciale in Italia. E' peraltro da rilevare il *trend* fortemente positivo, con ben 6 nuovi laboratori costituiti negli ultimi 6 anni, cosa che, dopo alcuni anni di contrazione, ne ha riportato il numero totale al livello massimo che ancora si registrava agli inizi degli anni '90. Relativamente alle finalità produttive, metà dei laboratori censiti dichiarano di produrre sia piante madri che piante finite, mentre soltanto due limitano l'uso della micropropagazione alla costitu-

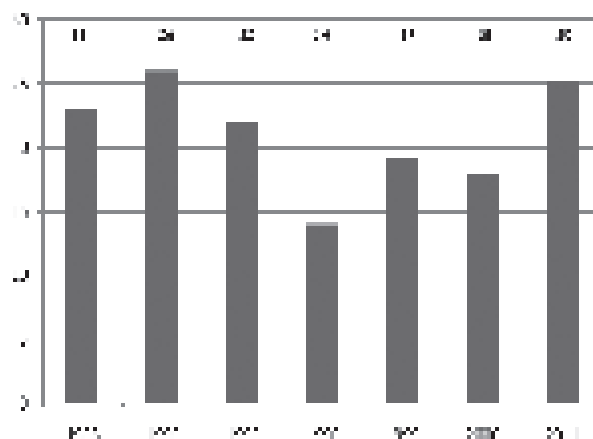


Fig. 1 - Consistenza numerica dei laboratori commerciali di micropropagazione in Italia dal 1998 al 2011.

Fig. 1 - Number of commercial micropropagation laboratories in Italy from 1998 to 2011.

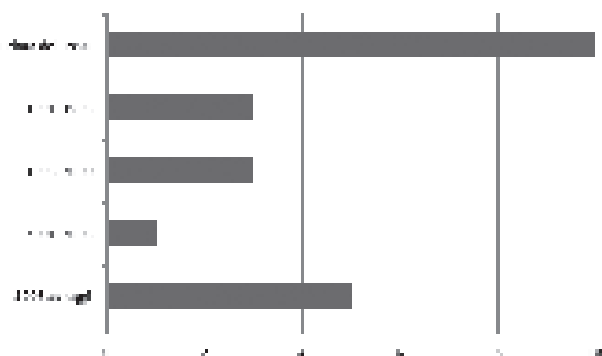


Fig. 2 - Laboratori commerciali di micropropagazione in Italia, ripartiti per anno di costituzione.  
 Fig. 2 - Commercial micropropagation laboratories in Italy, broken down by year of establishment.

zione di piante madri, da impiegare poi per fornire materiale selezionato alle tecniche tradizionali di propagazione. E' infine interessante notare come tutti i laboratori abbiano dichiarato di condurre anche attività sperimentale, aspetto questo che forse doveva essere meglio circostanziato nel modulo d'indagine: si tratta di vera sperimentazione o, in taluni casi, è stata considerata "sperimentazione" anche il solo adattamento dei substrati alle specifiche produzioni del laboratorio?

*Caratteristiche dei laboratori commerciali*

Circa 2/3 dei laboratori che hanno risposto al censimento possono collocarsi nella medio-piccola dimensione (tab. 1), come evidenziato dal personale totale impiegato in micropropagazione e dal numero di posti cappa (in entrambi i casi  $\leq 10$ ) e dalla superficie scaffalature a disposizione per i vasi di coltura ( $\leq 100 \text{ m}^2$ ). All'opposto, due soli laboratori evidenziano una dimensione paragonabile ai grandi laboratori del nord Europa, con oltre  $1.000 \text{ m}^2$  di scaffalature per i vasi. Di questi, uno impiega oltre 50 operatori tra laboratorio e serre di acclimatazione. L'impiego di

Tab. 1 - Dotazione dei laboratori commerciali italiani di micropropagazione in personale, posti cappa e superficie a disposizione dei vasi di coltura in cella climatica.

Tab. 1 - Staff and equipment (as places in the flow hoods and surface for the glass jars in the climatic chamber) of commercial micropropagation laboratories in Italy.

Caratteristiche laboratorio	Dotazione				
	$\leq 5$	6-10	11-30	31-50	$> 50$
Personale operante	13	3	3	3	1
<i>In laboratorio</i>	14	4	3	2	--
<i>In serra acclimatazione</i>	18	1	2	--	1
Posti cappa	11	6	3	3	--
$\text{m}^2$	$\leq 50$	51-100	101-200	201-400	$\geq 1.000$
Superficie scaffalature	8	6	3	4	2

celle per la conservazione a bassa temperatura delle colture è un indicatore di quanto ampia è l'offerta del laboratorio in termini di specie e varietà: 9 dei 22 laboratori ne impiegano una, mentre altri 6 ne hanno due o più.

Riguardo all'organizzazione produttiva, i tradizionali vasi in vetro da 500 cc e il substrato di coltura MS (Murashige e Skoog, 1962) continuano ad essere, di gran lunga, i più impiegati nell'uso *routinario* dei nostri laboratori commerciali. Peraltro, i contenitori in plastica monouso, già molto diffusi nei laboratori di micropropagazione del nord Europa (Germania, Olanda, Belgio), iniziano a costituire un'alternativa importante anche nei laboratori italiani (Lambardi, 2009): risultano, infatti, impiegati, insieme ai vasi in vetro, in 7 laboratori, mentre 2 laboratori di recente costituzione li usano come unico contenitore di coltura. Relativamente ai substrati, infine, oltre all'MS, si segnala un uso diffuso di DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), B5 (Gamborg et al., 1968) e WPM (Lloyd e McCown, 1980).

*Produzione di piante micropropagate*

L'attuale produzione italiana, risultante dai 23 laboratori censiti, sfiora i 29 milioni di piante micropropagate, con un progressivo incremento negli ultimi 4 anni, stimato in oltre un milione di piante per anno (fig. 3). L'incremento ha riguardato i fruttiferi (oltre 3 milioni di piante in più nell'ultimo quadriennio) e, soprattutto, le orticole che hanno registrato la notevole affermazione della micropropagazione del carciofo, balzato ad oltre 3,5 milioni di piante prodotte.

Era già stata evidenziato come i laboratori commerciali di micropropagazione avessero, in anni recenti, prodotto uno sforzo importante di diversificazione delle produzioni, con particolare riguardo a specie, varietà e portinnesti da frutto (Lambardi e Ozudogru, 2010). I dati dell'indagine hanno confermato questa tendenza, evidenziando in particolare,

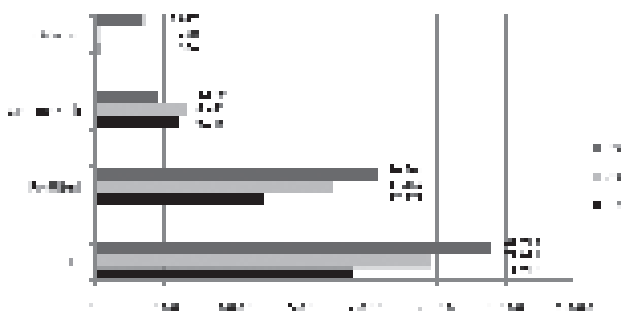


Fig. 3 - Confronto tra le produzioni di piante micropropagate in Italia negli anni 1998, 2006 e 2010.

Fig. 3 - Comparison among the productions of micropropagated plants in Italy in the years 1998, 2006 and 2010.

rispetto al rilievo del 2006, un importante aumento nell'offerta di portinnesti di albicocco e melo, di varietà di pero, olivo e, soprattutto, di piccoli frutti che si stanno a grandi passi avvicinando al milione di piante prodotte per anno, con un'incidenza di oltre il 4,5% sul totale dei fruttiferi (tab. 2). Praticamente stabile, invece, la produzione di portinnesti di pesco, actinidia e susino, mentre in leggera contrazione risulta quella di portinnesti di ciliegio, passati da oltre 2 milioni di unità nel 2006 agli attuali 1,5 milioni. E' inoltre da rilevare che, se l'incidenza dei fruttiferi rispetto alla produzione totale (72%) è rimasta prati-

Tab. 2 - Produzione di piante da frutto (portinnesti e cultivar) da micropropagazione (anno 2010).

*Tab. 2 - Italian production of fruit plants (rootstocks and cultivars) from micropropagation in the year 2010.*

Fruttiferi	Quantità (x 1.000)	% sul totale
Portinnesti		
<b>Pesco</b>	11.645	56,1
GF677	8.380	40,4
Cadaman	671	3,2
Isthara	281	1,3
Altri	2.313	11,2
<b>Albicocco</b>	2192	10,6
M29C	1.569	7,6
Altri	623	3,0
<b>Ciliegio</b>	1.559	7,5
Gisela	806	3,9
Altri	753	3,6
<b>Melo</b>	1.005	4,8
<b>Susino</b>	488	2,4
Marianna	181	0,9
Altri	307	1,5
<b>Pero</b>	262	1,3
<b>Actinidia</b>	218	1,0
<b>Vite</b>	100	0,5
Cultivar		
<b>Actinidia</b>	1.593	7,7
Maschi	385	1,9
Femmine	1.208	5,8
<b>Piccoli Frutti</b>	938	4,6
Lampone	388	1,9
Mirtillo	318	1,5
More	119	0,6
Altri	113	0,6
<b>Olivo</b>	324	1,6
Varietà italiane	15	-
Varietà estero	309	1,6
<b>Pero</b>	305	1,5
<b>Fico</b>	107	0,5
<b>Nocciolo</b>	13	-
<b>Altre</b>	11	-
<b>Totale</b>	<b>20761</b>	<b>100,0</b>

camente inalterata rispetto al 2006, quella del portinnesto 'GF677' è consistentemente diminuita (dal 40% al 29% dell'intera produzione nazionale di piante micropropagate), altro indicatore questo dell'aumentata diversificazione dell'offerta.

A differenza dei fruttiferi e del carciofo, il comparto delle piante ornamentali ha registrato, nel suo complesso, una chiara contrazione della produzione, passando da oltre 6,7 milioni di piante micropropagate (2006) a poco più di 4,5 (2010). Tale diminuzione è tutta da imputare al comparto dei fiori recisi dove l'attuale produzione (2,5 milioni di piante) (tab. 3) risulta pari a circa il 50% di quella che si registrava nel 2006. Una tendenza opposta è invece mostrata dalle ornamentali da interno, passate da meno di 600.000 piante nel 2006 ad oltre 1,2 milioni nel 2010, con sphythphyllum e orchidee che accostano per quasi il 50% di questa produzione. Stabile la produzione di ornamentali da esterno (oltre 800.000 piante).

Tab. 3 - Produzione di piante ornamentali (fiore reciso, specie da interno ed esterno) da micropropagazione (anno 2010).

*Tab. 3 - Italian production of ornamental plants (cut flowers, indoor and outdoor species) from micropropagation in the year 2010.*

Specie Ornamentali	Quantità (x 1.000)	% sul totale
Fiore reciso		
Gypsophila	400	15,9
Ranuncolo	260	10,3
Limonium	127	5,0
Gerbera	112	4,5
Crisantemo	103	4,1
Zantedeschia	9	0,4
Dianthus	2	0,1
Altre	1500	59,7
<b>Totale</b>	<b>2513</b>	<b>100,0</b>
Da interno		
Spathyphyllum	306	25,0
Orchidee	300	24,4
Euphorbia	50	4,1
Cordyline	15	1,2
Syngonium	5	0,4
Altre	551	44,9
<b>Totale</b>	<b>1227</b>	<b>100,0</b>
Da esterno		
Photinia	254	30,6
Liriope	92	11,1
Nandina	52	6,3
<i>P. laurocerasus</i>	40	4,8
Viburno	36	4,3
Yucca	20	2,4
Petunia	20	2,4
Altre	316	38,1
<b>Totale</b>	<b>830</b>	<b>100,0</b>

## Laboratori per la ricerca e la sperimentazione nella coltura *in vitro*

### Descrizione del modulo di indagine (laboratori di ricerca)

Il modulo distribuito per questa parte dell'indagine, oltre a richiedere informazioni di carattere istituzionale (denominazione e indirizzo dell'Ente/Università/Azienda, denominazione e responsabile del laboratorio, consistenza numerica del personale operante), chiedeva di fornire indicazioni sulle finalità primarie del laboratorio nell'ambito delle tecnologie *in vitro*, i principali indirizzi dell'attività di ricerca svolta nel settore specifico della micropiegazione, le specie sulle quali si indaga e le fonti di finanziamento percepite. All'indagine hanno aderito un totale di 46 istituzioni di ricerca, omogeneamente distribuite sul territorio nazionale e così ripartite per Ente di appartenenza: 20 laboratori universitari, 7 del CRA, 6 del CNR, 5 di Enti regionali e altri 8 ripartiti tra ENEA, Fondazioni, Scuole Medie Superiori, Corpo Forestale dello Stato e privati.

### Attività condotta nell'ambito della coltura *in vitro* e della micropiegazione

Nei laboratori di ricerca di coltura *in vitro* gli studi di micropiegazione hanno una posizione di preminenza. Ben 43 dei 46 laboratori che hanno risposto al censimento (pari al 93%) segnalano infatti di condurre studi connessi con la micropiegazione (fig. 4). Tra le altre tecnologie *in vitro* è interessante evidenziare gli studi di conservazione del germoplasma, segnalati da 22 laboratori. Questo fatto è riconducibile, in larga parte, allo sviluppo che hanno di recente avuto le tecniche di crioconservazione di specie vegetali (Lambardi e De Carlo, 2009). Rilevante anche

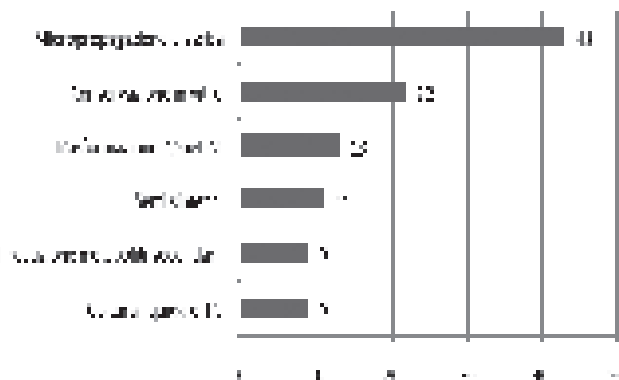


Fig. 4 - Attività di ricerca svolta in Italia dai laboratori pubblici di coltura *in vitro*, ripartita per tecnologia.

Fig. 4 - Research activity carried out in Italy from the public laboratories of *in vitro* culture, broken down by the different technologies.

l'attività condotta nell'ambito dei semi sintetici, della produzione di metaboliti secondari, della coltura liquida (prevalentemente con la tecnica dell'immersione temporanea) e della trasformazione genetica, attività questa ancora "viva" in 13 dei laboratori censiti, nonostante la moratoria che ancora interessa il settore degli organismi geneticamente modificati. Più sporadiche, ma comunque di grande interesse, risultano alcune applicazioni innovative, quali quelle alla genomica funzionale, alla fitodepurazione, alla rigenerazione di aploidi e diploaploidi. Da rilevare, all'opposto, la forte riduzione dell'interesse per studi un tempo tipici di molti laboratori di coltura *in vitro*, quali quelli relativi alla variabilità somaclonale e all'embriogenesi somatica.

Entrando nello specifico delle attività di ricerca condotte nell'ambito della micropiegazione (fig. 5), larga parte dei laboratori dichiara di condurre investigazioni classiche inerenti lo sviluppo di nuovi protocolli (il 93% di quelli che si occupano di micropiegazione) e la messa a punto di substrati e combinazioni ormonali (70%). Di notevole interesse applicativo sono poi gli studi di risanamento *in vitro* da virus, batteriosi e fitoplasmi, segnalati dal 47% dei laboratori che si dedicano alla micropiegazione. Una buona partecipazione è segnalata anche relativamente agli studi sulla rispondenza genetica, sulle diverse fasi del ciclo di coltura e sulle vitro-patologie. Limitata, invece, risulta l'attività investigativa sulla conservazione in crescita rallentata, il microinnesto e l'analisi dei costi di produzione, nonostante l'indubbio interesse pratico-applicativo che rivestono ciascuno di tali settori di studio. L'analisi dei costi di produzione di piante micropiegate, in particolare, è un aspetto sul

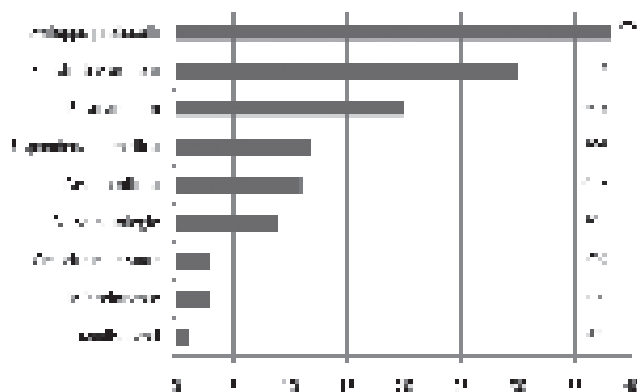


Fig. 5 - Attività di ricerca dei laboratori pubblici, ripartita tra i diversi settori della micropiegazione (le percentuali in parentesi si riferiscono al totale dei laboratori che si occupano di micropiegazione).

Fig. 5 - Research activity carried out in Italy from the public laboratories, broken down by the different sectors of micropropagation (percentage values refer to the total number of laboratories dealing with micropropagation).

quale è auspicabile una maggiore collaborazione tra produttori e ricercatori, in considerazione dell'importanza pratica dell'argomento, recentemente evidenziata da De Paoli e Masini (1999), anche per un utile confronto con le realtà produttive dei laboratori di altri Paesi.

Riguardo ai diversi raggruppamenti di specie verso i quali è indirizzata questa attività di ricerca, è importante sottolineare la buona ripartizione evidenziata dall'indagine (fig. 6). In conformità con i dati di produzione di piante micropropagate, i laboratori di ricerca risultano prevalentemente dedicarsi al settore dei fruttiferi (segnalato da 26 laboratori su 46). A seguire, ben ripartita è l'attività relativa ai settori delle piante ornamentali, delle forestali e da legno, delle specie medicinali/endemiche/naturali e delle orticole, con ciascun gruppo di piante indicato da 14-15 laboratori. Da rilevare, infine, come il comparto dei fiori recisi, già indicato in calo di produzione di piante micropropagate, sia anche quello che registra il più basso numero di laboratori di ricerca ad esso dedicati (6).

#### Finanziamenti alla ricerca in micropropagazione

Le informazioni ottenute relativamente ai finanziamenti percepiti dai laboratori di ricerca per sviluppare attività di micropropagazione evidenziano i seguenti aspetti:

- l'attività di ricerca è in larga parte condotta grazie a finanziamenti esterni, riconducibili a progetti di ricerca a carattere nazionale dei quali, negli ultimi 5 anni, hanno beneficiato il 67% dei laboratori censiti;
- pochi (solo il 40%) sono i laboratori che ricevono fondi specifici per la micropropagazione direttamente dai loro enti di appartenenza;
- il 36% dei laboratori dichiara di condurre ricerca in collaborazione con aziende private, ma solo il

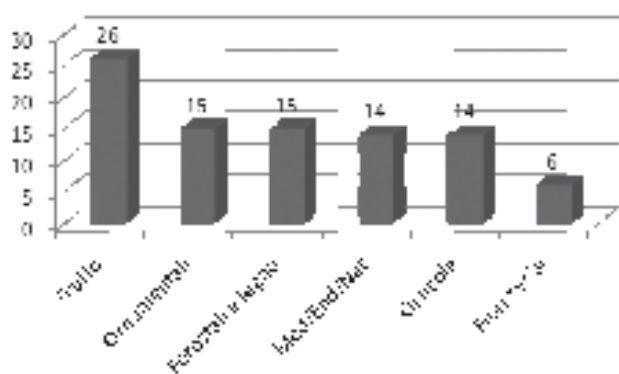


Fig. 6 - Attività di ricerca in micropropagazione dei laboratori pubblici, ripartita per gruppi di specie investigate.

Fig. 6 - Research activity in micropropagation, carried out in Italy from the public laboratories, broken down by the different groups of investigated species.

16% ne riceve anche un contributo finanziario;

- veramente pochi (13%) i laboratori che sono riusciti ad attingere finanziamenti da progetti internazionali nell'arco degli ultimi 5 anni.

Entrando nel dettaglio dei finanziamenti percepiti relativamente all'anno 2010, ben 10 laboratori hanno dichiarato di aver condotto la loro attività di ricerca in micropropagazione senza aver percepito alcun finanziamento specifico, servendosi, presumibilmente, di fondi provenienti da altri settori di ricerca. Per 16 laboratori, i fondi percepiti non hanno superato i 10.000 Euro, mentre altri 16 si collocano in una fascia "medio-ricca", cioè con fondi utilizzati compresi tra 10.000 e 50.000 Euro. Solo 4 laboratori, infine, hanno usufruito di fondi superiori ai 50.000 Euro per studi concernenti il settore della micropropagazione.

#### Conclusioni

Il censimento condotto evidenzia inequivocabilmente come, negli ultimi anni, si sia registrato un importante sforzo da parte dei maggiori ("storici") laboratori commerciali di micropropagazione, teso ad introdurre nel ciclo produttivo nuovi portinnesti e varietà di un'ampia gamma di specie da frutto (melo, pesco, kiwi, pero, susino, ciliegio, fico, mirtillo ed altri piccoli frutti), nonché specie ornamentali di rilevante valore commerciale. Inoltre, la produzione totale è in crescita costante (oltre un milione di piante in più prodotte ogni anno), nuovi laboratori sono sorti (ben 6 negli ultimi sei anni, seppure in genere di piccole dimensioni) e nuove realtà produttive (carciofo) sono state proposte con successo ed affermate. Evidenzia, inoltre, come la ricerca in Italia nel settore della micropropagazione e, più in generale, in quello della coltura *in vitro* sia ancora molto attiva: sono numerosi, infatti, i gruppi di ricerca impegnati in studi sia di base, sia di indirizzo pratico-applicativo. Anzi, si può a ragione affermare che, in Italia, il numero di laboratori di ricerca che si dedicano alla micropropagazione sia il più elevato d'Europa. Tale aspetto non fa altro che confermare quanto già emerge dalla partecipazione a convegni e simposi internazionali di settore (Lambardi, 2009), dove quella italiana risulta sempre importante e portatrice di proposte qualificate e, spesso, ad accentuato carattere innovativo.

D'altra parte, i fondi alla ricerca scarseggiano sempre di più: sono molti i laboratori che hanno "idee" ma fondi limitati (o nulli!) per attuarle, la coltura *in vitro* non attrae più (da tempo) adeguati finanziamenti da progetti internazionali, le aziende di micropropagazione investono tuttora poco in ricerca e sviluppo. Ma non mancano, anche per questi aspetti,

segnali positivi: il “2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione” (Sanremo, 7-9 novembre 2011) ha registrato una straordinaria partecipazione tra ricercatori, studenti, addetti di laboratori commerciali e aziende fornitrici di prodotti e strumentazione; inoltre, il Gruppo di Lavoro SOI “Micropropagazione e tecnologie *in vitro*” si sta a grandi passi avviando a superare i 150 iscritti. Insomma, sembra proprio che si siano gettate buone basi per favorire, sempre di più, il confronto e la collaborazione tra gruppi di ricerca e laboratori commerciali. Con obiettivi, certamente condivisi, di mantenere alta sia la produzione commerciale di piante di elevata qualità, sia la reputazione della ricerca italiana nel settore della micropropagazione e delle tecnologie *in vitro*.

### Ringraziamento

E' doveroso da parte degli Autori ringraziare le aziende, sopra menzionate, e i laboratori di ricerca che hanno fattivamente collaborato alla realizzazione del censimento 2011 sulla micropropagazione in Italia. In particolare si ringraziano i responsabili dei laboratori commerciali, Sig./Dott.: Domenico Albanese, Miriana Albani, Marco Bella, Maurizio Bindi, Mauro Biraghi, Manuela Brea, Cristina Cartei, Luigi Catalano, Gerardina D'Agosto, Claudio Depaoli, Roberto Di Primio, Giuliano Dradi, Mauro Masini, Massimiliano Meneghini, Oriano Navacchi, Johannes Nebelmeir, Dimitre Pashkoulov, PierLuigi Pasqualetto, Mario Rabaglio, Romano Roncasaglia, Girolamo Sorrentino, Eduard Subirà Berini, Vincenzo Venturi, Stefano Vita. Relativamente ai laboratori di ricerca, si ringraziano i Dott./Prof.: Andrea Allavena, Loretta Bacchetta, Marina Barba, Carla Benelli, Andrea Bennici, Silvia Biondini, Stefano Biricolti, Alessandro Bisignano, Federica Blando, Giovanna Bottalico, Emilia Caboni, Maria Cadinu, Maurizio Capuana, Francesco Carimi, Valeria Cavallaro, Paola Maria Chiavazza, Anna Maria Ciccotti, Massimo Confalonieri, Anna De Carlo, Anna De Rogatis, Tiziano Gardi, Edoardo Gatti, Maria Antonietta Germanà, Michele Giannini, Annalisa Giovannini, Antonio Giovino, Mauro Gramaccia, Ivana Gribaudo, Giovanni Iapichino, Mariella Lucchesini, Grazia Marino, Paolo Marra, Anna Mensuali, Anna Merciai, Antonio Mercuri, Bruno Mezzetti, Maurizio Micheli, Maria Antonietta Milanese, Stefano Morini, Rosario Muleo, Loretta Pace, Alessandra Panattoni, Maria Claudia Piagnani, Stefano Predieri, Santo Recupero, Ada Ricci, Barbara Ruffoni, Eddo Rugini, Giuseppe Russo, Claudia Ruta, Antonia Saponari, Elisabetta Sgarbi, Raffaella Tavazza, Marisa Terreri, Chiara Volpi.

### Riassunto

L'articolo riporta le risultanze di un'indagine, condotta nel 2011, su vari aspetti della micropropagazione in Italia, quali consistenza, caratteristiche e produzione dei laboratori commerciali, attività di ricerca e finanziamenti percepiti dai laboratori pubblici. All'indagine hanno aderito 23 laboratori commerciali e 46 laboratori di ricerca, ripartiti su tutto il territorio nazionale. I principali aspetti emersi riguardano il graduale aumento, in anni recenti, sia del numero di laboratori commerciali, sia della relativa produzione, arrivata a quasi 29 milioni di piante micropropagate. Si è confermata la prevalente produzione di fruttiferi (varietà e portinnesti), ma si è evidenziata anche una maggiore diversificazione dell'offerta rispetto al passato. L'attività di ricerca è tuttora molto attiva, sebbene debba fronteggiare una forte contrazione dei fondi a disposizione per il settore della coltura *in vitro*.

**Parole chiave:** coltura *in vitro*, fruttiferi, ornamentali, orticole, propagazione *in vitro*.

### Bibliografia

- DAMIANO C., DE PAOLI G., LAMBARDI M., 2007. *The new challenges of large-scale micropopagation in Italy*. Abstracts “3<sup>rd</sup> Int. Symp. on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants”. Faro, Portugal, 12-15 September, p. 81.
- DE PAOLI G., DAMIANO C., LAMBARDI M., 2000. *La micropropagazione in Italia: situazione e prospettive*. Atti delle “V Giornate Scientifiche S.O.I.”, Volume II. Sirmione, 28-30/3/2000, pp. 591-592.
- DE PAOLI G., MASINI M., 2009. *Il laboratorio di micropropagazione commerciale: organizzazione e tecnica per contenere i costi di produzione*. *Italus Hortus* 16(2): 84-88.
- DRIVER J.A., KUNIYUKI A.H., 1984. *In vitro propagation of Paradox walnut rootstock*. *Hortic. Sci.* 19: 507-509.
- GAMBORG O., MILLER R., OJIMA K., 1968. *Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells*. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- LAMBARDI M., 2009. *La ricerca in micropropagazione produce innovazione?* *Italus Hortus* 16(2): 25-31.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., 2009. *Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale*. *Italus Hortus* 16(1): 79-98.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU A.E., 2010. *La propagazione “in vitro” dei portinnesti e delle specie da frutto*. *Frutticoltura* 12: 18-25.
- LLOYD G., MCCOWN B., 1980. *Commercially feasible micropropagation of mauntain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot tip culture*. *Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., 1977. *Etude de millieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus*. *Acta Hortic.* 78: 437-442.

## Scaling-up in micropropagation: research and transfer of innovation

Alain Rival\*, Estelle Jaligot, Thierry Beule, Frédérique Aberlenc-Bertossi, Pascal Ilbert, Frédérique Richaud e James Tregear

Palm Developmental Biology Group, UMR DIADE, Montpellier (Francia)

### Introduction

A range of biotechnological approaches, from somatic embryogenesis to biomolecular research, play an increasingly important role in breeding strategies for oil palm (Rival and Parveez, 2004). They are fully integrated into programmes aimed at the development, multiplication and dissemination of genetically improved material to planters.

Biotechnological approaches applied to oil palm breeding are having a major impact on micropropagation, marker-assisted breeding, and more generally, in physiological and molecular studies of the expression of genes of paramount agronomic value (flowering, abscission, disease resistance, oil quality, etc.).

Recent results in somatic embryo development from embryogenic suspensions pave the way for the use of strategies based higher multiplication rates. Studies on DNA methylation have provided a first glimpse of the molecular changes associated with the *mantled* abnormality which are consistent with the epigenetic characters observed in the fields, including reversion (Jaligot *et al.*, 2011).

### Developing an efficient process for somatic embryogenesis

Oil palm cannot be vegetatively propagated by conventional means, despite attempts to reverse floral bud differentiation and manipulation of vivipary (Rival and Parveez, 2005). Constraints of classical oil palm breeding have stimulated development of a fairly reliable *in vitro* regeneration protocol which would allow: i) the exploitation of the variability among *tenera* hybrids by cloning elite individuals (Noiret, 1981); ii) an improved production of high quality seeds by cloning the best male parents (*pisifera*), since pollen production can be a limiting factor (Hartley, 1988; Krikorian, 1989); iii) the exploitation of *E. guineensis* x *E. oleifera* interspecific hybrids, a limited number of which are fertile, but which can show tolerance of pests and diseases (Meunier, 1975); iv) the

production of biclonal seeds from somatic embryogenesis-derived parents (Hartley, 1988) and v) the regeneration of genetically-engineered material bearing useful agronomic traits (Rival and Parveez, 2004).

Somatic embryogenesis has been developed for micropropagating elite oil palm selections and for genetic manipulation using somatic cell genetic approaches. Studies were initiated by Unilever Plantations (UK), Harrison and Crossfields Plantations group (Malaysia) (Smith and Jones, 1970; Corley *et al.*, 1977) and IRHO/ORSTOM in France and Côte d'Ivoire (Rabéchault *et al.*, 1970; Pannetier *et al.*, 1981), and were intended to complement in-house breeding strategies for multiplying elite germplasm for commercial use. Due to the important commercial applications of the results, only limited technical information was published (Krikorian, 1989; Blake, 1990). Later, in Malaysia, several teams developed large scale research programmes, notably PORIM (Palm Oil Research Institute of Malaysia now MPOB Malaysian Palm Oil Board) (Paranjothy and Othman, 1982). Wooi (1990) estimated that there have been as many as 10 commercial laboratories for micropropagating oil palm. Many elite selections have been regenerated, including *E. guineensis* x *E. oleifera* interspecific hybrids (Duval *et al.*, 1997).

Rival (2000) reviewed regeneration protocols for oil palm of different genetic origins. The frequency at which proliferating embryogenic cultures, i.e. proembryonal masses (PEMs), are obtained, enabling mass production, is ca. 40%, and is currently the major stumbling block for large-scale ramet production for many selected ortets. The regeneration of oil palm by somatic embryogenesis comprises 4 steps: induction, embryogenesis, shoot development and rooting. *In vitro* culture of this plant is characterized by extended delays of up to two years between sampling of the primary explants and acclimatisation of the regenerated plantlets, low efficiency of some steps of the process and production of polyphenols, whose influence on regeneration is poorly understood.

With adult palms, induction of cultures involves immature leaves (Pannetier *et al.*, 1981), roots and possibly young inflorescences (Wooi *et al.*, 1990). Despite the limited information available, it is recog-

\* alain.rival@cirad.fr



nized that induction occurs in the presence of auxins on full or half strength Murashige and Skoog (1962) derived basal medium (MS) and is supplemented with vitamins, 0.5 to 1 mg l<sup>-1</sup> casein hydrolysate and 20 to 30 g l<sup>-1</sup> sucrose or glucose. Various auxins are employed, naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and less frequently, trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) or trichlorophenoxypropionic acid (2,4,5-TP) at 10<sup>-6</sup> and 10<sup>-4</sup>M. The highest auxin concentrations are always used in the presence of activated charcoal, which adsorbs up to 99% of the growth regulators present in the medium (Ebert and Taylor, 1990). Cytokinins, including kinetin, benzylaminopurine (BAP), isopentenyladenine (2-iP), are sometimes added at very low concentrations. Activated charcoal limits the diffusion of phenolic compounds and the darkening of both media and explants during induction, although browning is not a negative factor with oil palm (Wooi *et al.*, 1990). The cultures are generally maintained in darkness at 25-30 °C and the time necessary for the appearance of calluses is 8 and 16 weeks, depending on the type of explants and the genetic origin of the material.

Somatic embryogenesis is always indirect, with an intermediary callus phase. The calluses are transferred to a medium for embryogenesis, generally under light (45 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>). Auxin concentration is generally lower than that used during induction: 2.5 10<sup>-6</sup> and 2.10<sup>-4</sup>M of either 2,4-D or NAA. Cytokinins (BAP, kinetin, 2-iP) can be added to the medium at low concentrations (10<sup>-7</sup> to 0.5 10<sup>-5</sup>M) (Wooi, 1990). Somatic embryos appear with almost all clones, but generally at low frequency. Experiments at the La Mé Research Station (Ivory Coast) showed that after 50 months in culture, 95% of the cultures have produced at least one embryo and 50% of them have are PEM cultures, which can be used for mass production of plantlets.

The establishment of embryogenic suspensions has been reported (de Touchet *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995) for mass production of somatic embryos (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999). Embryogenic suspensions are established from friable, embryogenic cultures, which are isolated from nodular compact calluses. Suspensions are prepared by inoculating embryogenic cultures in liquid medium, and by selection of meristematic nodules that proliferate in the presence of 2,4-D. Between 10 and 12 mg.l<sup>-1</sup> of PEMs are inoculated into medium containing 100 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 mg.l<sup>-1</sup> activated charcoal. To date, embryogenic suspensions have been successfully isolated for >50 different clonal lines. The optimum concentration is ca 10<sup>5</sup> PEMs per litre with a multiplication factor of 4x per month. Sondahl (1991) reported the successful

growth of suspension cultures in bioreactors. However, the implementation of production strategies based on the large scale use of embryogenic suspensions is still severely hampered by the critical problem of somaclonal variation.

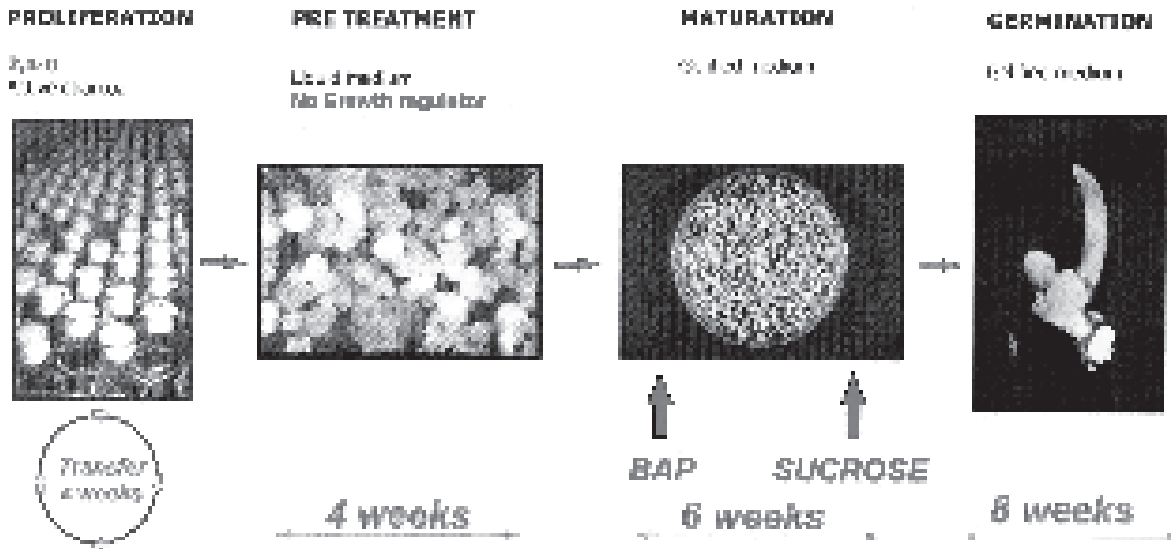
Embryo development is achieved following the transfer of cell clusters onto a plant growth regulator-free liquid medium containing the basal medium supplemented with 30 g l<sup>-1</sup> sucrose and 0.5 g l<sup>-1</sup> casein hydrolysate. The development of somatic embryos occurred after sieving (mesh size = 1 mm) and plating onto a semi solid medium of the same composition. The smallest PEM fraction, which is capable of developing into individual plantlets, is transferred into growth regulator-free liquid medium. Embryo maturation is achieved by spreading the small PEM fraction onto semi solid medium, at a rate of 0.05ml PCV (Packed Cell Volume) per Petri dish, resulting in differentiation of ca. 300 somatic embryos per dish. Cultures are grown under 12h light at 45 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, at 27°C. PEMs differentiate as proembryos, i.e., globular embryos with a protoderm after 4 weeks. The differentiation of both shoot and root meristems occurs after 6 weeks, although only root development is commonly observed. The addition of 5µM BAP to maturation medium can result in significantly greater shoot development, with a concomitant halt in root development. The production scheme currently involves four distinct stages (fig. 1).

### Tackling somaclonal variation

Approximately 5% of somatic embryo-derived oil palms are abnormal with respect to floral development, involving an apparent feminization of male parts in flowers of both sexes, i.e., the *mantled* phenotype (Corley *et al.*, 1986; Rival & Jaligot, 2010, 2011; Jaligot *et al.*, 2011). This may result in partial or complete flower sterility, thus directly affecting oil production. Several potential biochemical markers of the *mantled* abnormality in oil palm have been investigated, including polypeptide patterns (Marmey *et al.*, 1991) and endogenous cytokinins (Besse *et al.*, 1992); however, the usefulness of such markers on a large scale is questionable, due to lack of reproducibility and high cost.

Reversion to a normal floral phenotype can occur in the field over time, leading to a complete recovery of the normal phenotype for 100% of slightly *mantled* individuals, and for 50% of severely *mantled* ones after 9 years in the field (Rival, 2000). Although the *mantled* abnormality is strongly associated with tissue culture, only a weak non-Mendelian transmission

Fig. 1 - Diagramma di micropropagazione mediante sospensione embriogenica (protocollo Cirad/Ird).  
 Fig. 1 - Diagram of oil palm micropropagation through embryogenic suspensions (Cirad/Ird protocol).



occurs via seeds (Rao and Donough, 1990). Alterations in genomic DNA structure that could be linked with the *mantled* phenotype have not been identified (Rival *et al.*, 1998). Flow cytometric analyses have demonstrated a uniform 2C ploidy level (Rival *et al.*, 1997S) in normal and variant plant material. The *in vitro* cycle can affect the level of DNA methylation and can result in phenotypic alterations, i.e., somaclonal variation (Larkin and Scowcroft, 1981). Changes in DNA methylation on deoxycytidine (dC) residues are involved in the regulation of gene expression at the transcriptional level (Finnegan *et al.*, 2000), particularly during the differentiation /dedifferentiation and as a response to environmental stresses (Steward *et al.*, 2000).

The occurrence of significant genomic hypomethylation in abnormal calluses (-4.5%;  $p < 10^{-5}$ ) and leaves (-1.2%;  $p < 10^{-5}$ ) from *mantled* regenerants has been demonstrated compared with their normal counterparts. The same patterns were observed in immature inflorescences (Jaligot *et al.*, 2000). Global DNA hypomethylation associated with local genetic or epigenetic defects has been documented in several cases of developmental abnormalities (Finnegan *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 2000).

DNA sequences which, when misregulated, could potentially account for the *mantled* phenotype or could be used as markers for early detection of DNA methylation perturbation in the regeneration process have been investigated, i.e., methylation-sensitive RFLP and AFLP studies involving isoschizomeric enzymes *MspI* and *HpaII* (Matthes *et al.*, 2001;

Jaligot *et al.*, 2002; Jaligot *et al.*, 2004). Depending on the pre-existence or absence of candidate markers, either selected or anonymous sequences, respectively, were examined for the occurrence of methylation polymorphisms with isoschizomeric methylation-sensitive enzyme pairs. Overall, at the single-sequence level both increases and decreases in DNA methylation were observed in relationship with the *mantled* somaclonal variation. Similarly to the whole-genome analysis, most of the differences that were found were imputable to genotype-dependent variation in DNA methylation, independently of the phenotype.

Likewise, potential transcriptional markers or either "true-to-typeness" or "mantledness" were searched by comparing tissues from either normal or abnormal palms or tissue cultures. The differential display technique was first implemented and generated a number of candidate markers (Tregear *et al.*, 2002; Morcillo *et al.*, 2007). The search for expression markers was taken to a higher level with the democratization of systematic sequencing campaigns aimed at building multi-purpose molecular resources for non-model organisms. Numerous Expressed Sequence Tags (ESTs) libraries from various adult or *in vitro* tissues of oil palm were then constructed (Jouannic *et al.*, 2005; Mayes *et al.*, 2008).

We identified in the oil palm genome members of the three DNA-methyltransferase gene families that have been characterized in plants: the Dnmt1/MET1 family, the chromomethylase (CMT) family and the Domain-Rearranged Methyltransferase (DRM) family (Finnegan and Kovac, 2000). A dysfunction of any of

these three enzyme families would be likely to cause a genomic hypomethylation such as the one occurring in *mantled* oil palm tissues. The prominent member of each of the three gene families was identified in the oil palm genome and its transcription level was assessed through real-time PCR quantitation (Rival *et al.*, 2008). Surprisingly, a slight but significant increase in transcript accumulation was observed for both maintenance DNA-methyltransferases at the embryogenic callus stage (FGC vs. NCC). This apparent inconsistency between the variations in DNA-methyltransferase gene expression and the changes in DNA methylation rates is comparable to what has been found in tumoral tissues, in which genome-wide hypomethylation and local hypermethylation of tumor-suppressor genes can be paradoxically coupled to the overexpression of DNA-methyltransferases (McCabe *et al.*, 2009).

The *mantled* abnormality involves a characteristic homeotic modification of oil palm floral architecture, which implies that the activity of a specific subset of genes has been altered, at least within the flower and fruit tissues. Floral homeotic genes of the “MADS box” transcription factor family might be affected by the chain of events resulting in the *mantled* abnormality. Of particular interest for the study of the *mantled* phenotype of oil palm are the plants that are defective in B-type functions: their petals and stamens are replaced by supernumerary sepals and carpels, respectively (Coen and Meyerowitz, 1991). Considering that the oil palm flowers have tepals instead of both sepals and petals, the B-type mutant phenotype is very simi-

lar to the sexual organ conversion seen in the *mantled* flowers. Actually, Adam *et al.* (2005ab) demonstrated at the histological level that both the residual stamens or staminodes of the female flowers and the stamens of the male flowers were transformed in carpelloids and carpels, respectively, in the *mantled* oil palm regenerants.

A decrease in the mRNA levels of both the *EgDEF1* and *EgGLO2* genes has been demonstrated in male and female inflorescences displaying the *mantled* phenotype compared to those from true-to-type palms (Adam *et al.*, 2007ab). However this decrease has not been detected consistently throughout the development of the inflorescences so this preliminary work clearly needs to be continued.

### Innovation follows iterative loops more than linear models

Our experience gained on oil palm biotechnology for more than 40 years fits rather well with the model of iterative loops of innovation (fig. 2) which has been developed for many industrial schemes. Indeed the transition from the original idea to the prototype, then to the final product deliverable to end-users very rarely fits with a simple linear model. Indeed, innovation process must integrate unexpected events and/or transitions which more often generate changes in strategy. The initiation of a second loop of innovation requires reconfiguration of competencies, budget, personnel and partnership; thus it can be considered as a new research project *per se*.

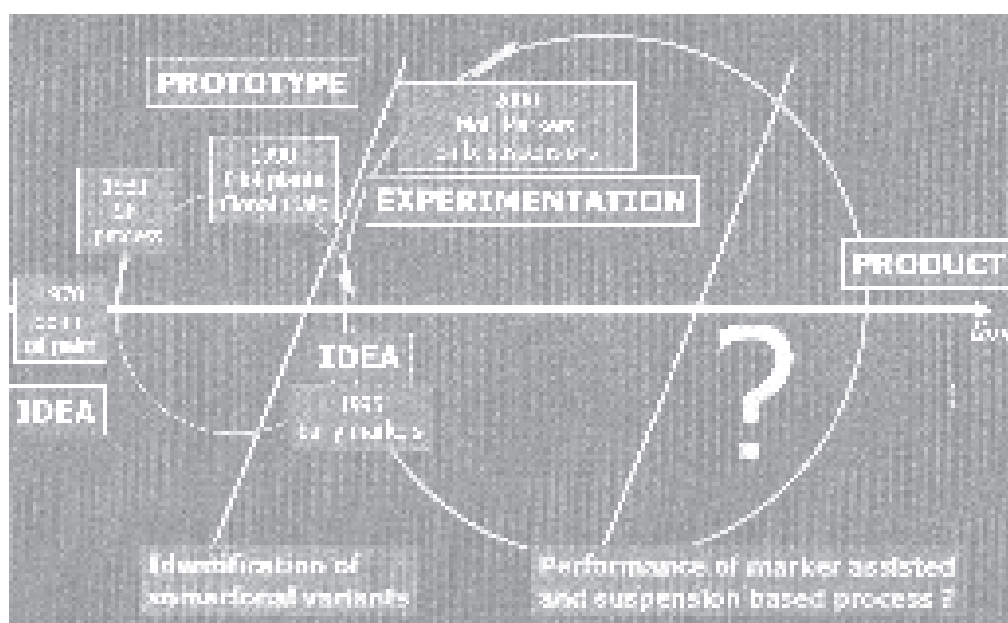


Fig. 2 - Diagramma delle innovazioni applicate al processo di micropropagazione  
Fig. 2 - Iterative loops of innovation applied to oil palm micropropagation process.

In the case of oil palm biotechnology, the first unexpected event was the occurrence of somaclonal variants in clonal populations. Such an event has generated a sudden change in our research strategy, as our group and its partners had to move from tissue culture to molecular biology in order to tackle a complex epigenetic problem.

Since 2000, another loop of innovation is ongoing, which will deliver a 2<sup>nd</sup> generation process for oil palm micropropagation, based on the exploitation of embryogenic suspensions and the use of early molecular markers of clonal fidelity.

## Bibliografia

- ABERLENC-BERTOSSI F., NOIROT M., DUVAL Y. 1999. *BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 56 (1) 53-57.
- ADAM H, JOUANNIC S, ESCOUTE J, DUVAL Y, VERDEIL JL, TREGAR JW. 2005a. *Reproductive developmental complexity in the African oil palm (Elaeis guineensis, Areaceae)*. American Journal of Botany, 92: 1836-1836.
- ADAM H, JOUANNIC S, MORCILLO F, RICHAUD F, DUVAL Y, TREGAR JW. 2005b. *MADS Box Genes in Oil Palm (Elaeis guineensis): Patterns in the Evolution of the SQUAMOSA, DEFICIENS, GLOBOSA, AGAMOUS, and SEPALLATA Subfamilies*. Journal of Molecular Evolution, 62: 15-31.
- ADAM H, JOUANNIC S, MORCILLO F, VERDEIL JL, DUVAL Y, TREGAR JW. 2007a. *Determination of Flower Structure in Elaeis guineensis: Do Palms use the Same Homeotic Genes as Other Species?* Annals of botany, 100: 1-12.
- ADAM H, JOUANNIC S, ORIEUX Y, 2007b. *Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure*. J. Exp. Bot., 58: 1245-1259.
- BESSE I, VERDEIL J.L., DUVAL Y., SOTTA B., MALDINEY R., MIGINIAC E. 1992. *Oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures*. J. Exp. Bot. 43, 983-989.
- BLAKE J. 1990. *Coconut (Cocos nucifera L.) Micropropagation*. in: Bajaj Y.P.S. (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oil Seed Crops, vol. 10, 538-554.
- COEN ES, MEYEROWITZ EM. 1991. *The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development*. Nature, 353: 31-37.
- CORLEY R.H.V., BARRETT J.N., JONES L.H. 1977. *Vegetative propagation of oil palm via tissue culture*. Oil Palm News, 22: 2-8.
- CORLEY R.H.V., LEE C.H., LAW L.H., WONG C.Y. 1986. *Abnormal flower development in oil palm clones*. Planter, Kuala Lumpur. 62: 233-240.
- DUVAL Y., AMBLARD P., RIVAL A., KONAN E., GOGOR S., DURAND-GASSELIN T., 1997. *Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Côte d'Ivoire*. Planters (Kuala Lumpur) 291-307.
- FINNEGAN E.J., PEACOCK W.J., DENNIS E.S., 2000. *DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes*. Curr Opin Genet Dev. 10: 217-223.
- FINNEGAN EJ, KOVAC KA. 2000. *Plant DNA methyltransferases*. Plant Molecular Biology, 43: 189-201.
- HARTLEY C.W.S., 1988. *The Oil Palm Tropical Agriculture Series*, Longman London, 761 p.
- JALIGOT E, BEULÉ T, RIVAL A., 2002. *Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism*. TAG Theoretical and Applied Genetics, 104: 1263-1269.
- JALIGOT E, BEULÉ T, BAURENS FC, BILLOTTE N, RIVAL A., 2004. *Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. Genome, 47: 224-228.
- JALIGOT E., RIVAL E., BEULÉ T., DUSSERT S., VERDEIL J.-L., 2000. *Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) : the DNA methylation hypothesis*. Plant Cell Rep. 19: 684-690.
- JALIGOT E., ADLER S., DEBLADIS E., BEULÉ T., RICHAUD F., ILBERT P., FINNEGAN E.J., RIVAL A., 2011. *Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of oil palm*. Annals of Botany 108, 1453-1462.
- JOUANNIC S., ARGOUT X., LECHAUVE F., 2005. *Analysis of expressed sequence tags from oil palm (Elaeis guineensis)*. FEBS letters, 579: 2709-2714.
- KRIKORIAN A.D., 1989. *The context and strategies for tissue culture of date, african oil and coconut palms*. In: Vibha Dhawan (ed.), Applications of biotechnology in Forestry and Horticulture, Plenum Press New-York: 119-144.
- LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R., 1981. *Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement*. Theor Appl Genet, 60: 197-214.
- MARMEY P., BESSE I., VERDEIL J.-L., 1991. *Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciel deux types de cals issus de même clones chez le palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.)*. C. R. Acad. Sci. Paris, t 313, série III, 333-338.
- MATTHES M., SINGH R., CHEAH S.C., KARP A., 2001. *Variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes*. Theoretical and Applied Genetics, 102: 971-979.
- MAYES S, HAFEZ F, PRICE Z, MACDONALD D, BILLOTTE N, ROBERTS J. 2008. *Molecular Research in Oil Palm, the Key Oil Crop for the Future*. Genomics of Tropical Crop Plants: 371-404.
- MCCABE M.T., BRANDES J.C., VERTINO P.M., 2009. *Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications*. Clinical Cancer Research, 15: 3927-3937.
- MEUNIER J., 1975. *Le palmier à huile américain*. Elaeis melanococca, Oléagineux 30 (2): 51-61.
- MORCILLO F., GALLARD A., PILLOT M., 2007. *EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm*. Planta, 226: 1353-1362.
- NAKANO Y., STEWARD N., SEKINE M., KUSANO T., SANO H., 2000. *A tobacco NtMET1 cDNA encoding a DNA methyltransferase : molecular characterization and abnormal phenotypes of transgenic tobacco plants*. Plant Cell Physiol 41: 448-457.
- NOIRET J.M., 1981. *Application de la culture in vitro à l'amélioration et à la production de matériel clonal chez le palmier à huile*. Oléagineux, 36: 123-126.
- PANNETIER C., ARTHUIS P., LIEVOUX D., 1981. *Néoformation de jeunes plantes d'Elaeis guineensis à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro*. Oléagineux, 36: 119-122.
- PARANJOTHY K., OTHMAN R., 1982. *In vitro propagation of oil palm*. 5<sup>th</sup> Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, Tokyo. Abstracts: 755-756.
- RABÉCHAULT H., AHÉE J., GUÉNING G., 1970. *Colonies cellulaires et formes d'embryoïdes obtenues in vitro à partir de cultures d'embryons de palmiers à huile (Elaeis guineensis Jacq. var. dura Becc.)*. C.R.A.S. Série D. 270: 3067-3070.
- RAO V., DONOUGH C. R., 1990. *Preliminary evidence of a genetic cause for the floral abnormalities in some oil palm ramets*. Elaeis, 2:199-207.
- RIVAL A., BERTRAND L., BEULÉ T., TROUSLOT P., LASHERMES P., 1998. *Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. Plant Breeding, 117(1): 73-76.
- RIVAL A., 2000. *Somatic embryogenesis in Oil Palm*. In : Somatic

- Embryogenesis in Woody Plants, vol. 6, chap. 8. Jain S.M., P.K. Gupta & R.J. Newton (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands, pp 249-290.
- RIVAL A., PARVEEZ G.K.A., 2005. *4.2 Elaeis guineensis Oil Palm*. In: Litz FH ed. *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI Publishing
- RIVAL A., JALIGOT E., BEULE T., FINNEGAN E.J., 2008. *Isolation and expression analysis of genes encoding MET, CMT, and DRM methyltransferases in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in relation to the 'mantled' somaclonal variation*. J. Exp. Bot., 59: 3271-3281.
- RIVAL A., JALIGOT E. 2010. *Oil palm biotechnologies are definitely out of infancy*. Oleagineux, Corps gras, Lipides 17(6): 368-374.
- RIVAL A., JALIGOT E., 2011. *Epigenetics and Plant Breeding*. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources: 6, No. 048
- SMITH W.K., JONES L.H., 1970. *Plant propagation through cell culture*. Chem. & Ind. 44, 1399-1401
- SONDAHL M., 1991. *Tissue culture of cacao, coffee and oil palm*. in: Proc. 4<sup>th</sup> Conf. Int. Plant Biotechnology Network San José, Costa Rica, 14-18 Jan.: 98-99.
- STEWART N., KUSANO T., SANO H., 2000. *Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells*. Nucl Acids Res 28: 3250-3259.
- TEIXEIRA J.B., SÖNDHAL N.R., NAKAMURA T., KIRBY E.G., 1995. *Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40: 105-111.
- TOUCHET (DE) B., DUVAL Y., PANNETIER C., 1991. *Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. Plant Cell Reports 10: 529-532.
- TREGEAR J.W., MORCILLO F., RICHAUD F., 2002. *Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events*. J. Exp. Bot., 53: 1387-1396.
- WOOI K.C., 1990. *Oil Palm (Elaeis guineensis Jacq.) : Tissue Culture and Micropropagation*. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oilseed Crops I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 10, 569-592.

## Effetto di derivati ureidici di neosintesi in radicazione avventizia ed embriogenesi somatica

Ada Ricci\*

Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma

### Effect of neosynthesized urea derivatives in adventitious rooting and somatic embryogenesis

**Abstract.** Some symmetric urea derivatives can act either as adventitious rooting adjuvants or as somatic embryogenesis adjuvants. These physiological processes are under the control of growth regulators, auxins and cytokinins mostly, that affect the transcript level of genes involved in both the processes. The symmetric urea derivatives do not show any biological activity *per se*, rather it seems that they magnify the response to the growth regulator stimulus of naturally competent-to-root or -to-form-somatic-embryos cell niches. Their mode of action is still unknown.

**Key words:** adjuvant compounds; cytokinin-like activity; endogenous auxin; exogenous auxin

### Introduzione

Nel 1955 Shantz e Steward, analizzando i componenti del latte di cocco, indicarono la N,N'-difetilurea (DPU) come il composto responsabile della divisione cellulare in cellule di floema di carota coltivate *in vitro*. In questo modo attribuirono a questo derivato ureidico di sintesi un'azione citochinino-simile, dando così origine ad un filone di ricerca parallelo a quello che porterà all'individuazione delle citochinine naturali (Mok e Mok, 2001). Solo successivamente verrà dimostrato che la DPU ha un'attività citochinino-simile molto debole (Bottomley *et al.*, 1963) e che quella identificazione era frutto di una contaminazione (Amasino, 2005). Nel frattempo, furono sintetizzati nuovi derivati ureidici, con strutture chimiche variamente sostituite, allo scopo di verificare l'esistenza di regole strutturali connesse all'attività biologica. Venne così definita la necessità della presenza:

- del ponte NHCONH integro;
- di un anello fenilico non sostituito in posizione N;
- di un anello fenilico sostituito in posizione N';
- di un anello eterociclico in posizione N' (Bruce e Zwar, 1966).

Seguendo queste regole strutturali venne sintetizzata la N-fenil-N'-(2-cloro-4-piridil)urea (forchlofenuron, CPPU) (Takahashi *et al.*, 1978) e venne riconosciuta l'attività citochinino-simile del N-fenil-N'-(1,2,3-thiadiazol-5-il)urea (thiadiazuron, TDZ) (Mok *et al.*, 1982), precedentemente sintetizzato come defogliante del cotone (Arndt, 1976). Entrambe queste molecole vengono tuttora utilizzate per indurre diversi processi differenziativi *in vitro* (Huetteman e Preece 1993; Christianson e Hornbuckle, 1999; Murch e Saxena, 2001; Yu *et al.*, 2001; Fiore *et al.*, 2002). E' quindi ampiamente accettata dalla comunità scientifica internazionale l'esistenza di 2 classi di composti ad attività citochinica: quella dei composti naturali di derivazione adeninica e quella dei composti di sintesi di derivazione ureidica. I componenti di entrambe le classi sono coinvolti negli stessi processi fisiologici, quali divisione cellulare, senescenza, mobilitazione dei nutrienti, sintesi della clorofilla, pur avendo struttura chimica notevolmente differente. A questo proposito è stato dapprima dimostrato che i composti ureidici di sintesi esercitano la propria azione tramite un meccanismo indiretto, in quanto inibiscono l'attività della citochinina ossidasi, enzima che degrada le citochinine naturali endogene, modificandone quindi l'omeostasi (Victor *et al.*, 1999; Mok e Mok, 2001 e riferimenti all'interno). In un secondo tempo è stato riportato che il TDZ si lega allo stesso recettore citochinico, esercitando così anche un'azione diretta (Yamada *et al.* 2001; Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006).

Da alcuni anni il nostro gruppo di ricerca studia il rapporto struttura chimica-attività biologica esistente per una serie di derivati di neosintesi dell'urea. Vengono qui riportati i dati sperimentali relativi all'effetto di 4 composti simmetrici, la N,N'-bis-(2,3-metilenediossifenil)urea (2,3-MDPU), la N,N'-bis-(3,4-metilenediossifenil)urea (3,4-MDPU), la 1,3-di(benzo[d]ossazol-5-il)urea (5-BDPU) e la 1,3-di(benzo[d]ossazol-6-il)urea (6-BDPU) (fig. 1), sui processi di radicazione avventizia e di embriogenesi somatica.

\* ada.ricci@unipr.it

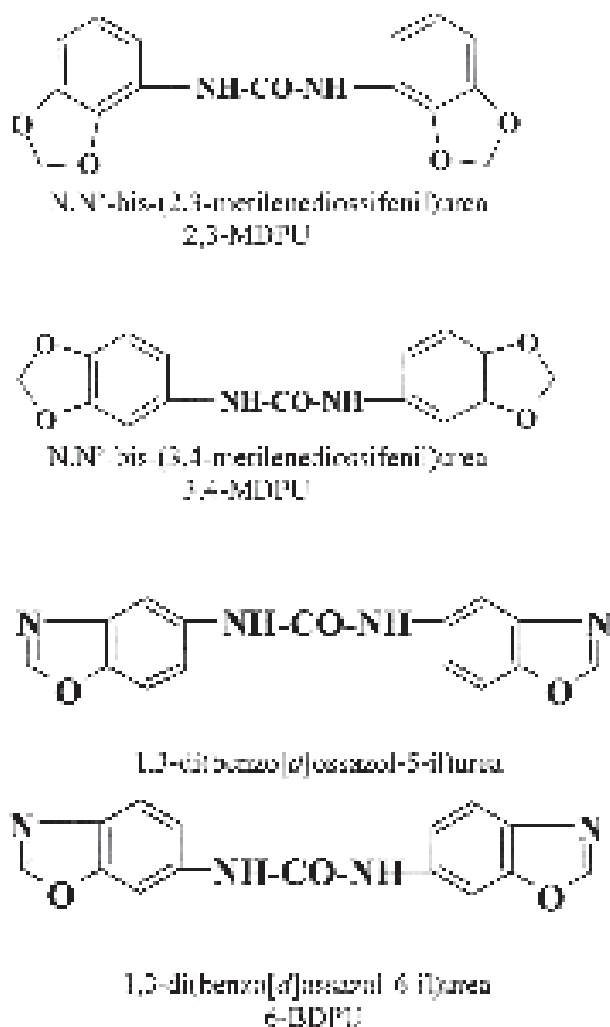


Fig. 1 - Struttura chimica dei 4 derivati ureidici simmetrici utilizzati in questo lavoro.

Fig. 1 - Chemical structure of the 4 symmetric urea derivatives.

## Materiali e metodi

La N,N'-bis-(2,3-metilenediossifenil)urea (2,3-MDPU), la N,N'-bis-(3,4-metilenediossifenil)urea (3,4-MDPU), la 1,3-di(benzo[d]ossazol-5-il)urea (5-BDPU) e la 1,3-di(benzo[d]ossazol-6-il)urea (6-BDPU) sono state sciolte in dimetilsolfossido (DMSO) e la concentrazione finale del DMSO nel terreno di coltura non superava lo 0,2% (Schmitz e Skoog, 1970). I due composti sono stati sintetizzati dal Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Parma ed erano di grado analitico. Per il dettaglio di materiali e metodi della parte sperimentale si rimanda agli articoli che verranno di seguito citati.

## Risultati e discussione

La 2,3-MDPU, la 3,4-MDPU, la 5-BDPU e la 6-BDPU, derivati ureidici simmetrici, sono stati testati

in qualità di composti ad ipotetica attività citochinica in diversi saggi biologici, ma i risultati ottenuti sono stati sempre negativi. Si deve quindi desumere che i 4 composti non esercitano alcuna attività citochinino-simile. Al contrario è stato dimostrato che la 2,3-MDPU e la 3,4-MDPU, somministrate da sole alla concentrazione di 1  $\mu$ M, sono in grado di migliorare la radicazione avventizia di *microcuttings* di melo M26 coltivati *in vitro*, in termini di percentuale di *microcuttings* radicate. Le radici emergono dalla superficie di taglio alla base dei *microcuttings*, in assenza di massa callosa. Inoltre, i composti sono in grado di migliorare la percentuale di fette di fusto di melo M26 radicate e il numero medio di radici prodotte, quando somministrate in contemporanea presenza con auxina esogena (Ricci *et al.*, 2001; 2003). In modo analogo si comportano la 5-BDPU e la 6-BDPU, quando somministrate secondo le stesse modalità a *microcuttings* [anche in questo caso il callo è assente (fig. 2)] o a fette di fusto di melo M26, anche se le concentrazioni di questi composti utilizzate per ottenere lo stesso tipo di risultato sono più elevate (Ricci *et al.*, 2006). E' stato peraltro dimostrato che la 2,3-MDPU, la 3,4-MDPU, la 5-BDPU e la 6-BDPU non mostrano neppure attività auxino-simile e quest'ultimo dato fa presupporre che questi composti siano in qualche modo in grado di migliorare l'attività radicante propria dell'auxina, sia essa endogena, nel caso dei *microcuttings* di melo, che esogena, nel caso delle fette di fusto. Recentemente, è stato dimostrato che la 2,3-MDPU e la 3,4-MDPU migliorano la radicazione avventizia di cuttings di ipocotili di 21 giorni di *Pinus radiata* (specie filogeneticamente distante da melo), se somministrate in contemporanea presenza con auxina esogena (acido indol-3-butirrico, IBA). Dopo 24 ore di somministrazione della miscela

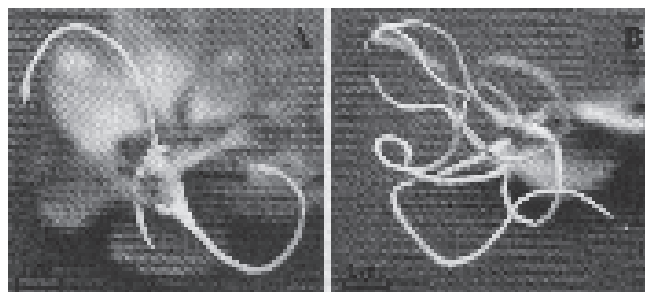


Fig. 2 - A) Esempio di *microcutting* di melo radicata in terreno agarizzato in presenza di 1  $\mu$ M IBA; B) esempio di *microcutting* di melo radicata in terreno contenente 8  $\mu$ M di 1,3-di(benzo[d]ossazol-5-il)urea. Le fotografie sono state effettuate a 4 settimane dall'inizio dell'esperimento.

Fig. 2 - A) Apple microcutting rooted in presence of 1  $\mu$ M IBA; B) apple microcutting rooted in the presence of 8  $\mu$ M 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea. Pictures were taken after 4 weeks of culture.

composta da 1  $\mu\text{M}$  2,3-MDPU e 1  $\mu\text{M}$  IBA, il gene *SCARECROW-LIKE (PrSCL1)*, tipicamente espresso durante le prime fasi del processo di radicazione avventizia in risposta allo stimolo auxinico, è espresso in misura significativamente più alta rispetto a quanto di verifica in presenza della stessa dose di IBA ed in modo non dissimile da quanto avviene in presenza di una dose di IBA 10 volte maggiore. I composti in esame non sono invece in grado di indurre la radicazione in *cuttings* di epicotili di 60 giorni di *P. radiata*, non competenti alla radicazione (Ricci *et al.*, 2008). Risulta quindi evidente che questi derivati ureidici migliorano la radicazione avventizia solo in *cuttings* che naturalmente presentano nicchie di cellule che mantengono un'intrinseca competenza a formare radici avventizie in risposta allo stimolo auxinico. Il coinvolgimento di geni omologhi a *A. thaliana SCR* nell'induzione dell'embriogenesi somatica in *Picea glauca* (Moench) Voss (Stasolla *et al.*, 2003) e *Pinus taeda* L. (Cairney *et al.*, 2006), ha aperto una nuova linea di ricerca riguardante lo studio dell'effetto di questi derivati ureidici nel processo di embriogenesi somatica. A questo proposito è stato dimostrato che la 2,3-MDPU e la 3,4-MDPU stimolano l'induzione dell'embriogenesi somatica in alcune specie di *Citrus*, a partire da espianti di stili di fiori immaturi. I composti mostrano una performance embriogenica più elevata rispetto a quella che si ottiene nelle stesse condizioni sperimentali in presenza sia di 6-benzilaminopurina (BAP) che di *N*-fenil-*N'*-(2-cloro-4-piridil)urea (CPPU), rispettivamente citochinina adeninica e ureidica di riferimento (Carra *et al.*, 2006).

## Conclusione

Da quanto riportato si può dedurre che i derivati ureidici simmetrici presi in esame, cioè la 2,3-MDPU, la 3,4-MDPU, la 5-BDPU e la 6-BDPU, si comportano come coadiuvanti la radicazione avventizia, interagendo con auxina endogena o esogena tramite un meccanismo ancora sconosciuto. Si potrebbe ipotizzare che questi composti rendano più sensibili all'auxina, cellule che naturalmente siano già competenti a rispondere al suo stimolo rizogeno. Questa proprietà sembra essere aspecifica, in quanto viene esercitata a carico di organismi filogeneticamente distanti, quali melo e *P. radiata*. Inoltre la 2,3-MDPU e la 3,4-MDPU sono in grado di migliorare il livello di embriogenesi somatica in *Citrus*, lasciando presagire un coinvolgimento di questi composti in pathways simili che possono però dare origine ad eventi morfologici diversi.

## Riassunto

Alcuni derivati simmetrici dell'urea, pur privi di qualsiasi attività ormono-simile *per se*, sono in grado di stimolare specifici processi fisiologici, quali radicazione avventizia ed embriogenesi somatica. In entrambi questi processi, la presenza di regolatori di crescita (auxine e/o citochinine) in opportune combinazioni di concentrazioni, può regolare la cascata di traduzione del segnale in modo da riprogrammare l'espressione di determinati geni, portando ad una stimolazione della radicazione avventizia o dell'embriogenesi somatica. Questi derivati ureidici grazie ad un meccanismo ancora sconosciuto, possono essere considerati composti coadiuvanti l'azione dei regolatori di crescita che giocano un ruolo fondamentale nella determinazione di entrambi i processi.

**Parole chiave:** attività citochinino-simile; auxina endogena; auxina esogena; composti coadiuvanti

## Bibliografia

- AMASINO R., 2005. 1955: *Kinetin arrives. The 50<sup>th</sup> anniversary of a new plant hormone*. Plant Physiol. 138: 1177-1184.
- ARNDT F., RUSCH R., STILFRIED H.V., 1976. *SN 49537, a new cotton defoliant*. Plant Physiol. 57(Suppl.): 99.
- BOTTOMLEY W., KEFFORD N.P., ZWAR J.A., GOLDACRE P.L., 1963. *Kinin activity from plant extracts*. Aust. J. Biol. Sci. 16: 395-409.
- BRUCE M.I., ZWAR J.A., 1966. *Cytokinin activity of some substituted ureas and thioureas*. Proceedings of the Royal Society of London (Series B) 165: 245-265.
- CAIRNEY J., ZHENG L., COWELS A., HSIAO J., ZISMANN V., LIU J., OUYANG S., THIBAUD-NISSEN F., HAMILTON J., CHILDS K., PULLMAN G.S., ZHANG Y., OH T., BUELL C.R., 2006. *Expressed Sequence Tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis*. Plant Mol. Biol. 62: 485-501.
- CARRA A., DE PASQUALE F., RICCI A., CARIMI F., 2006. *Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in Citrus*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 87: 41-48.
- CHRISTIANSON M.L., HORNBUCKLE J.S., 1999. *Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss Funaria hygrometrica*. American Journal of Botany 86: 1645-1648.
- FIORE S., DE PASQUALE F., CARIMI F., SAJEVA M., 2002. *Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of Citrus*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 68: 57-63.
- HUETTEMAN, C.A., PREECE, J.E., 1993. *Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 33: 105-119.
- MOK D.W., MOK M.C., 2001. *Cytokinin metabolism and action*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 89-118.
- MOK M.C., MOK D.W.S., ARMSTRONG D.J., SHUDO K., ISOGAI Y., OKAMOTO T., 1982. *Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron)*. Phytochem. 21: 1509-1511.
- MURCH S.J., SAXENA P.K., 2001. *Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of Pelargonium x hortorum Bailey*. Pl. Growth Reg. 35: 269-275.



- RICCI A., CARRA A., ROLLI E., BERTOLETTI C., BRANCA C., 2003. *N,N'*-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and *N,N'*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea cooperate with auxin in enhancing root formation of M26 apple (*Malus pumila* Mill.) stem slices. *Plant Growth Regul.* 40: 207-212.
- RICCI A., CARRA A., TORELLI A., MAGGIALI C.A., MORINI G., BRANCA C., 2001. Cytokinin-like activity of *N,N'*-diphenylureas. *N,N'*-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and *N,N'*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Sci.* 160: 1055-1065.
- RICCI A., INCERTI M., ROLLI E., VICINI P., MORINI G., COMINI M., BRANCA C., 2006. Diheteroarylurea derivatives as adventitious rooting adjuvants in mung bean shoots and M26 apple rootstock. *Plant Growth Regul.* 50: 201-209.
- RICCI A., ROLLI E., DRAMIS L., DIAZ-SALA C., 2008. *N,N'*-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and *N,N'*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious rooting in *Pinus radiata* and affect expression of genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin. *Plant Sci.* 175: 356-363.
- ROMANOV G.A., LOMIN S.N., SCHMÜLLING T., 2006. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor *AHK3* compared to *CRE1/AHK4* as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* 57: 4051-4058.
- SCHMITZ R.Y., SKOOG F., 1970. The use of dimethylsulfoxide as a solvent in the tobacco bioassay for cytokinins. *Plant Physiol.* 45: 537-538.
- SHANTZ E.M., STEWARD F.C., 1955. The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 6351-6353.
- SPÍČHAL L., RAKOVA N.Y., RIEFLER M., MIZUNO T., ROMANOV G.A., STRNAD M., SCHMÜLLING T., 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, *CRE1/AHK4* and *AHK3*, differ in ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* 45: 1299-1305.
- STASOLLA C., VAN ZYL L., EGERTSDOTTER U., CRAIG D., LIU W., SEDEROFF R.R., 2003. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiol.* 131: 49-60.
- TAKAHASHI S., SHUDO K., OKAMOTO T., YAMADA K., ISOGAI Y., 1978. Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-(4-pyridyl)urea derivatives. *Phytochemistry* 17: 1201-1207.
- VICTOR J.M.R., MURTHY B.N.S., MURCH S.J., KRISHNARAJ S., SAXENA P.K., 1999. Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul.* 28: 41-47.
- YAMADA H., SUZUKI T., TERADA K., TAKEI K., ISHIKAWA K., MIWA K., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2001. The *Arabidopsis* *AHK4* histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 42: 1017-1023.
- YU J.Q., LI Y., QIAN Y.R., ZHU Z.J., 2001. Cell division and cell enlargement in fruit of *Lagenaria leucantha* as influenced by pollination and plant growth substances. *Plant Growth Regul.* 33: 117-122.

## Esperienze di moltiplicazione *in vitro* di *Aloe barbadensis*

Daniela Borgognone, Giuseppe Colla, Carolina Maria Cardona Suárez, Elvira Rea e Mariateresa Cardarelli\*

Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste e l'Energia, Università della Tuscia

### Experiences of micropropagation of *Aloe barbadensis*

**Abstract.** *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* is a fast way to obtain a large amount of plants to satisfied the needs of growers that produce this plant for cosmetic and pharmaceutical industry for the extraction of active compounds. The objective of the work was to improve the multiplication rate of *A. barbadensis* shoots by testing different explant types (mature or juvenile shoots) and incubation periods (30, 60 and 90 days). Longer incubation periods and mature explants significantly improved the multiplication rate. The proliferation of mature explants increased over sequential subcultures of 60 days each.

**Key words:** *Aloe vera*, explant maturity, incubation period, *in vitro* propagation.

### Introduzione

*Aloe barbadensis* (Mill.) è una pianta medicinale comunemente impiegata dall'industria farmaceutica e cosmetica per le sue proprietà salutistico-curative ed è anche molto apprezzata dai florovivaisti per il suo valore ornamentale. La micropropagazione consente di moltiplicare con rapidità e su larga scala piante con caratteristiche costanti ed uniformi, rispondendo così alla crescente richiesta da parte del mercato. Alcuni protocolli di micropropagazione sono stati testati in *A. barbadensis* con lo scopo di individuare la tipologia di espianto più produttiva (Singh et al., 2009; Singh e Sood, 2009) e la combinazione ottimale di citochinine ed auxine nel substrato di moltiplicazione (Hashemabadi e Kaviani, 2008; Thind et al., 2008). Tuttavia, l'andamento dei coefficienti di moltiplicazione nel corso di successive subcolture e la risposta degli espianti di *A. barbadensis* a tempi diversi di incubazione non sono stati presi in considerazione come variabile nei protocolli di micropropagazione.

Obiettivo del lavoro è stato quello di individuare la lunghezza in giorni della subcoltura e la maturità dell'espianto ottimali rispetto alla capacità di moltiplicazione *in vitro* dei germogli.

### Materiale e metodi

Il materiale vegetale utilizzato nella sperimentazione è stato ottenuto per moltiplicazione da germogli di *A. barbadensis* mantenuti in coltura su substrato contenente sali MS (Murashige e Skoog, 1962), saccarosio 3%, BA 1 mg l<sup>-1</sup>, IAA 0,2 mg l<sup>-1</sup> ed agar 0,7% (pH 5,7). I trattamenti prevedevano tre tempi di subcoltura (30, 60 e 90 giorni) messi a confronto in combinazione fattoriale con due tipologie di espianto indicate come espianti giovani ed espianti maturi; gli espianti giovani erano costituiti dai germogli prodotti lateralmente al germoglio principale durante una subcoltura mentre gli espianti maturi erano rappresentati dal germoglio principale che nella subcoltura precedente aveva dato origine ad un certo numero di germogli giovani. Tutti i substrati della sperimentazione sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti. Le condizioni di coltura sono state 25±1 °C di temperatura ed un fotoperiodo di 16 ore di luce a 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> di radiazione fotosinteticamente attiva. I rilievi, condotti al termine di ciascuna subcoltura *in vitro*, hanno previsto la misura del coefficiente di moltiplicazione, dell'altezza e del peso fresco dei nuovi germogli prodotti da ogni espianto. Per ciascun trattamento sono state condotte 4 repliche; ogni replica era costituita da un barattolo di coltura contenete 5 espianti su 200 ml di substrato.

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e le medie delle variabili risultate significative sono state confrontate con il test di Duncan (p = 0,05) o con il test della Media Differenza Significativa (p = 0,05).

### Risultati

La lunghezza della prima subcoltura ha influenzato la risposta da parte degli espianti inducendo un coefficiente di moltiplicazione più elevato in corrispondenza di un tempo di incubazione di 90 giorni (tab. 1). Anche la produzione di biomassa (peso fresco) dell'espianto è risultata direttamente proporzionale al tempo di incubazione. Tale andamento è stato tuttavia indipendente rispetto alla tipologia di espianto ed inoltre non sono stati osservati risultati statisticamente diversi tra espianti giovani ed espianti maturi

\* tcardare@unitus.it

Tab. 1 - Effetto della durata della subcoltura e della maturità dell'espianto sulla proliferazione di *Aloe barbadensis* al termine della prima subcoltura.

Tab. 1 - Effect of duration of subculture and of the explant maturity on the proliferation of *Aloe barbadensis* at the end of the first subculture.

Trattamento	Coefficiente di moltiplicazione (n germogli espianto <sup>-1</sup> )	Altezza media germoglio (cm)	Peso fresco germoglio (g)
Tempo di incubazione (giorni)			
30	8,4 b	1,73	6,1 b
60	10,3 b	2,82	12,1 ab
90	22,1 a	2,19	14,7 a
Espianto			
Giovane	11,8	2,08	9,7
Maturo	15,4	2,42	12,2
Significatività			
Subcoltura (S)	**	NS	*
Espianto (E)	NS	NS	NS
S x E	NS	NS	NS

\*, \*\*, \*\*\* indicano effetti significativi rispettivamente per  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,001$ ; NS indica effetti non significativi.

Le medie nella stessa colonna seguite da lettere differenti sono significativamente diverse per  $P = 0,05$  secondo il test di Duncan.

sebbene il coefficiente di moltiplicazione, l'altezza media dei nuovi germogli ed il peso fresco degli stessi siano stati comunque superiori per l'espianto maturo (tab. 1). Nella seconda subcoltura il tempo di incubazione e la maturità dell'espianto hanno significativamente influenzato l'indice di proliferazione; il coefficiente più elevato è stato infatti ottenuto dopo 90 giorni di incubazione, seguito dai trattamenti di 60 e 30 giorni (tab. 2). Tutti i parametri osservati sono risultati significativamente maggiori per l'espianto maturo (tab. 2). Le *performance* degli espianti sono state monitorate anche nel lungo periodo: in tabella 3 sono infatti riportati i risultati ottenuti nel corso di 7 suc-

cessive subcolture di 30 giorni ciascuna. I valori del coefficiente di moltiplicazione, dell'altezza media dei germogli prodotti e del peso fresco dei germogli sono risultati costanti nel corso delle subcolture, seppur sia stato osservato un leggero declino produttivo in corrispondenza della terza e della quarta subcoltura. Per quanto riguarda invece la produttività osservata *in vitro* nel caso di subcolture da 60 giorni è stato evidenziato un maggior numero di nuovi germogli nella seconda e terza subcoltura rispetto alla prima (tab. 4). La produttività degli espianti maturi è risultata sempre statisticamente superiore, sia per 30 che per 60 giorni di incubazione (tabb. 3 e 4).

Tab. 2 - Effetto della durata della subcoltura e della maturità dell'espianto sulla proliferazione di *Aloe barbadensis* al termine della seconda subcoltura.

Tab. 2 - Effect of duration of subculture and of the explant maturity on the proliferation of *Aloe barbadensis* at the end of the second subculture.

Trattamento	Coefficiente di moltiplicazione (n germogli espianto <sup>-1</sup> )	Altezza media germoglio (cm)	Peso fresco germoglio (g)
Tempo di incubazione (giorni)			
30	10,8 c	2,11	6,5
60	17,9 b	1,88	9,7
90	24,3 a	2,12	18,3
Espianto			
Giovane	11,4	1,80	6,2
Maturo	23,9	2,27	16,8
Significatività			
Subcoltura (S)	**	NS	NS
Espianto (E)	***	*	*
S x E	NS	NS	NS

\*, \*\*, \*\*\* indicano effetti significativi rispettivamente per  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,001$ ; NS indica effetti non significativi.

Le medie nella stessa colonna seguite da lettere differenti sono significativamente diverse per  $P = 0,05$  secondo il test di Duncan.

Tab. 3 - Performance di espianti di *Aloe barbadensis* nel corso di 7 subcolture consecutive di 30 giorni ciascuna.  
 Tab. 3 - Performance of *Aloe barbadensis* explants in the course of 7 consecutive subcultures of 30 days each.

Trattamento	Coefficiente di moltiplicazione (n germogli espianto <sup>-1</sup> )	Altezza media germoglio (cm)	Peso fresco germoglio (g)
Subcoltura			
I	8,4	1,73	6,1
II	10,8	2,11	6,5
III	5,4	2,18	4,5
IV	6,5	1,48	4,1
V	7,8	2,10	5,7
VI	8,0	1,82	5,1
VII	9,6	1,55	7,7
Espianto			
giovane	4,9	1,52	2,7
matturo	11,1	2,18	8,7
Significatività			
Subcoltura (S)	NS	NS	NS
Espianto (E)	***	*	***
S x E	NS	NS	NS

\*, \*\*, \*\*\* indicano effetti significativi rispettivamente per  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,001$ ; NS indica effetti non significativi.  
 Le medie nella stessa colonna seguite da lettere differenti sono significativamente diverse per  $P = 0,05$  secondo il test di Duncan.

Tab. 4 - Performance di espianti di *Aloe barbadensis* nel corso di 3 subcolture consecutive di 60 giorni ciascuna.  
 Tab. 4 - Performance of *Aloe barbadensis* explants in the course of 3 consecutive subcultures of 60 days each.

Trattamento	Coefficiente di moltiplicazione (n germogli espianto <sup>-1</sup> )	Altezza media germoglio (cm)	Peso fresco germoglio (g)
Subcoltura			
I	10,4 c	2,69 a	13,0
II	17,9 a	1,88 b	9,7
III	15,5 ab	1,81 b	8,6
Espianto			
Giovane	11,1	1,74	6,3
Matturo	18,1	2,52	14,5
Significatività			
Subcoltura (S)	*	***	NS
Espianto (E)	**	***	**
S x E	*	NS	NS

\*, \*\*, \*\*\* indicano effetti significativi rispettivamente per  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,001$ ; NS indica effetti non significativi.  
 Le medie nella stessa colonna seguite da lettere differenti sono significativamente diverse per  $P = 0,05$  secondo il test di Duncan.

## Discussione

La durata del periodo di incubazione degli espianti e l'andamento della proliferazione nel corso delle subcolture hanno finora ricevuto scarsa attenzione negli studi di micropropagazione. Per poter programmare la produzione, i propagatori necessitano di conoscere con esattezza i tempi di incubazione ed il numero di subcolture prima che gli indici di proliferazione decrescano (Hamad e Taha, 2008). I risultati mostrano come il tempo di incubazione e la maturità dell'espianto siano due fattori fortemente condizionanti la micropropagazione dell'*A. barbadensis*. A tempi di

incubazione più lunghi corrisponde una più elevata produzione di nuovi germogli, come anche dimostrato in *Ananas comosus* (Hamad e Taha, 2008). Gli espianti maturi hanno mostrato una capacità di proliferazione superiore rispetto ai giovani espianti. I due risultati potrebbero essere tra loro correlati dal momento che l'espianto maturo può differenziare e sviluppare un maggior numero di germogli avventizi avendo a disposizione un più lungo tempo di incubazione su substrato di moltiplicazione. Inoltre gli espianti maturi, essendo di dimensioni maggiori rispetto ai giovani espianti, potrebbero possedere un più elevato numero di gemme ascellari preesistenti. Il

coefficiente di moltiplicazione subisce un declino nel corso della terza e quarta subcoltura di 30 giorni ciascuna mentre aumenta nella seconda e terza subcoltura di 60 giorni. Inoltre la proliferazione degli espianti giovani rimane pressoché costante nel corso delle tre subcolture di 60 giorni mentre quella degli espianti maturi aumenta durante la seconda e la terza subcoltura. Effettuare subcolture frequenti con tempi di incubazione ridotti e con espianti di giovane età significherebbe quindi interrompere la differenziazione di nuove gemme con una conseguente riduzione della moltiplicazione. Proliferazioni elevate con tempi di incubazione superiori e produzioni costanti nel corso di successive subcolture sono state attribuite infatti alla nuova formazione di gemme ascellari in *Paeonia suffruticosa* (Harris e Mantell, 1990) e *Chaenomeles japonica* (Norton e Norton, 1986). E' da considerare che nelle produzioni su larga scala ad un incremento dei tempi di permanenza dei germogli sullo stesso substrato corrisponde una riduzione dei costi di manodopera. Sulla base dei risultati osservati si suggerisce un protocollo produttivo in cui i nuovi germogli prodotti in subcoltura vengono spostati in radicazione ed ambientamento mentre quelli maturi continuano ad essere utilizzati per la moltiplicazione.

### Riassunto

Obiettivo del lavoro è stato la messa a punto di un protocollo di micropropagazione ad alta efficienza per *Aloe barbadensis*, valutando la risposta di espianti giovani e maturi ed anche considerando tempi diversi di incubazione su substrato di moltiplicazione ed osservando l'andamento della proliferazione nel corso di successive subcolture. I coefficienti di moltiplica-

zione più elevati sono stati ottenuti in risposta ai tempi di incubazione più lunghi (60 e 90 giorni) rispetto ad un periodo di 30 giorni ed all'uso di espianti maturi.

**Parole chiave:** *Aloe vera*, maturità dell'espianto, propagazione *in vitro*, tempo di incubazione.

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto 'Produzione vivaistica dell'aloè ad uso ornamentale e nutraceutico' finanziato dalla Regione Lazio (Determinazione n. C2196 del 29-09-2008) e coordinato dall'Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura del Lazio (ARSIAL).

### Bibliografia

- HAMAD A.M., TAHA R.M., 2008. *Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) over different incubation periods.* Sci. Hort. 117: 329-334.
- HARRIS R.A., MANTELL H., 1991. *Effect of stage II subculture duration on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree paeony (Paeonia suffruticosa Andr.)* J. Hort. Sci. 66: 95-102
- HASHMABADI D., KAVIANI B., 2008. *Rapid micro-propagation of Aloe vera L. via shoot multiplication.* Africa J. Biotech. 7: 1899-1902.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures.* Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NORTON M.E., NORTON C.R., 1986. *Changes in shoot proliferation with repeated in vitro subculture of shoot of woody species of Rosaceae.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5: 187-197.
- SINGH B., SOOD N., 2009. *Significance of explant preparation and sizing in Aloe vera L. A highly efficient method for in vitro multiple shoot induction.* Sci. Hort. 122: 146-151.
- SINGH M., RATHORE M.S., PANWAR J., RATJORE J.S., DAGLA H.R., SHEKHAWAT N.S., 2009. *Micropropagation of selected genotype of Aloe vera-An ancient plant for modern industry.* J. Suist. For. 28: 935-950.
- THIND S.K., JAIN N., GOSAL S.S., 2008. *Micropropagation of Aloe vera L. and estimation of potentially active secondary constituents.* Phytomorphology 58: 65-71.

## Qualità vivaistica di piante di fragola (*Fragaria x Ananassa* Duch.) provenienti da propagazione *in vitro* e *in vivo*

Franco Capocasa<sup>1\*</sup>, Danilo Bernardini<sup>2</sup>, Oriano Navacchi<sup>3</sup> e Bruno Mezzetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche

<sup>2</sup> New Fruits, Strawberry Breeding Company, Cesena (FC)

<sup>3</sup> Vitroplant Italia srl, Cesena (FC)

### Evaluation of nursery plants production from strawberry mother plants propagated *in vitro* or *in vivo*

**Abstract.** Following the EU rules of strawberry propagation system micropropagation can be used only for the production of stock virus free plant but not in further steps of the nursery production. With the aim to evaluate the possibility to adopt *in vitro* culture for the production of nursery mother plants, nursery plots were prepared by comparing mother plants of Alba, a well know commercial variety in EU, propagated with standard *in vitro* or *in vivo* (frigo plants) protocols.

**Key words:** micropropagation, nursery, mother plants.

### Introduzione

Attualmente la tecnica della micropropagazione in fragola, secondo la regolamentazione del processo di certificazione italiano (Lucchi *et al.*, 2009), può essere utilizzata solo per la produzione di materiale utilizzabile alla costituzione del materiale “prebase” e “base 1” e non è prevista in altre fasi della produzione vivaistica, quindi è utilizzata principalmente per il risanamento da virus.

Il precedente utilizzo vivaistico di piante micropropagate direttamente per la produzione di frutti ( $V_0$ ) è risultato fallimentare perché sono stati rilevati alcuni problemi legati alla variabilità (fisiologica e somatica) riscontrata all'interno della medesima cultivar in rapporto alla metodologia eseguita *in vitro* (Swarz, 1981) e problemi legati a fruttificazione eccessiva (Sansavini e Gherardi, 1980), insufficiente o con eccessiva produzione di frutti malformati (Lemaitre, 1981).

La causa di alcune variazioni somatiche può essere l'eccessivo utilizzo di citochinine nella fase di proliferazione che provocano alcune alterazioni fisiologiche ed epigenetiche, che, associate a specifici fattori genetici, possono essere evidenti anche nella 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> gene-

razione vegetativa ( $V_1$  e  $V_2$ ) (Sansavini, 1991).

Per questi problemi è stato suggerito di far uso della tecnica della propagazione *in vitro* per la sola produzione di piante madri di élite risanate che poi per almeno due generazioni ( $V_1$  e  $V_2$ ) saranno moltiplicate in campo prima di giungere agli agricoltori (Sansavini *et al.*, 1991).

Il rinnovato interesse nell'utilizzo delle piante di fragola ottenute da micropropagazione in ambito vivaistico è motivato da diversi aspetti:

- nuove conoscenze che possono permettere di ridurre la variabilità;
- nuova tipologia del mercato vivaistico della fragola con elevata richiesta anche di piante fresche che possono essere prodotte anche da *in vitro*;
- l'aumento dell'incidenza delle malattie patologiche in vivaio che possono aumentare nelle fasi di propagazione previste dall'attuale normativa che vede il *in vitro* come fase iniziale a cui devono seguire almeno tre cicli di propagazione *in vivo* prima di arrivare all'agricoltore. Anche la sola la produzione di piante micro propagate per i vivai commerciali, quindi con un solo passaggio *in vivo*, potrebbe ampiamente ridurre questo problema;
- infine, forse di non poca importanza, è il crescente interesse nella produzione di piante per il settore hobbistico a cui vanno destinate piante anche di varietà non di interesse rilevante per il mercato tradizionale e con esigenze specifiche sia di confezionamento che di programmazione.

E' quindi importante sviluppare nuovi studi sulle tecniche che permettono di ridurre la variabilità considerata negativa, protocolli specifici per le singole varietà (alcune varietà si differenziano per una maggiore attitudine al *in vitro*), tecniche ed efficienze produttive utili per abbattere i costi così da rendere le piante micro propagate competitive almeno per la produzione di piante per i vivai commerciali o a confronto con i costi di produzione delle piante fresche per la produzione di piante programmate. Come anche l'individuazione di varietà e tecniche programmate

\* f.capocasa@univpm.it

utile a creare nuovi prodotti per l'hobbistica.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di confermare l'interesse per la tecnica della micropropagazione nella produzione vivaistica di piante madri di fragola, valutando la possibilità di impiego nei centri di premoltiplicazione (CP2) o direttamente nei centri di moltiplicazione (vivaio), confrontando quindi l'efficienza delle piante ottenute da *vitro* in termini quantitativi e qualitativi con quelle utilizzate comunemente in vivaio.

## Materiali e metodi

Con lo scopo di valutare la possibilità di adottare la tecnica *in vitro* per la produzione vivaistica di piante di fragola di elevata qualità fito-sanitaria, è stata avviata una prova sperimentale confrontando l'efficienza produttiva di piante madri della cultivar 'Alba', varietà commerciale diffusa in UE, propagate con protocolli standard *in vitro* e *in vivo* (piante frigo-conservate).

### *Propagazione in vitro e in vivo delle piante madri*

Dalle piante madri coltivate in vaso sono stati prelevati apici vegetativi da stoloni in attiva crescita, lavati e sterilizzati superficialmente con una soluzione di acqua e ipoclorito di sodio (cloro attivo 1%) e successivamente risciacquati per tre volte in acqua sterile. I germogli sono stati immessi in tubi di coltura con substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato 0,35 mg/l di BA, 30 g/l saccarosio e 6 g/l di agar. La moltiplicazione dei germogli è stata ottenuta sul medesimo substrato effettuando subcolture ogni 3 settimane, per un totale di 3 subcolture. La distensione e radicazione dei germogli è stata ottenuta riducendo nel substrato la quantità di BA a 0,025 mg/l. Dopo quattro settimane i germogli sono stati trasferiti in serra su un substrato costituito da una miscela di torba e perlite al 20% in contenitori alveolari da 60 fori con un volume unitario di 100 ml. Dopo 40 giorni in serra di ambientamento le piantine erano pronte per il trasferimento in vivaio presso il centro di moltiplicazione.

Le piante madri di fragola da propagazione *in vivo* sono state ottenute l'anno precedente previa stolonatura in campo di piante frigo-conservate, gli stoloni

radicati sono stati raccolti nel dicembre 2009 sono stati posti in cella frigorifera a -2 °C e frigo-conservati fino al momento della piantagione.

### *Prova in vivaio*

Sono state poste a confronto piante di fragola della cultivar 'Alba' ottenute da micropropagazione con piante frigo-conservate di Categoria A.

L'impianto del vivaio con le due tipologie di piante è avvenuto nella seconda decade di maggio 2010 presso il vivaio New Fruits di Savarna (RA) (43,31 °N; 12,06 °E). Le piante sono state poste in file singole alla distanza di 0,5 m (lungo la fila) x 1,60 m (tra le file), su prode rialzate, con una densità di piantagione di 12.500 piante/ha, ed irrigate per aspersione con impianto fisso sopra-chioma. È stato adottato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con parcelle di 15 piante ripetute tre volte. Le piante sono state lasciate stolonare liberamente per tutta la stagione vegetativa.

I rilievi sulle piante madri sono stati effettuati in prossimità della fine della stagione vegetativa (fine ottobre 2010) ed hanno riguardato:

- numero di germogli per pianta;
- numero di foglie per pianta;
- lunghezza di picciolo e foglia mediana (cm).

Al momento dell'estirpazione e raccolta delle piante stolonate (metà gennaio 2011) sono stati effettuati rilievi sui seguenti parametri:

- numero di catene stolonifere;
- numero di stoloni per parcella;
- diametro degli stoloni (mm),
- lunghezza delle radici degli stoloni (cm).

## Risultati e discussione

### *Sviluppo vegetativo durante la stolonatura*

Durante il periodo vegetativo (tab. 1) le piante madri frigo-conservate si sono differenziate in modo significativo da quelle ottenute da micropropagazione per un maggior numero di germogli e per il maggior numero di foglie per pianta. Stesse differenze, anche se non significative, sono state rilevate per la maggior

Tab. 1 - Risultati vegetativi delle piante madri al termine della stagione vegetativa. Valori indicati con lettere diverse (nella colonna) differiscono statisticamente per  $p \leq 0,05$  (Test SNK).

Tab. 1 - Results of vegetative mother plants at the end of the vegetative season. Different letters (column) means different values for  $p \leq 0,05$  (Test SNK).

Tipo pianta	Germogli/pianta (n)	Foglie/pianta (n)	Lunghezza picciolo (cm)	Lunghezza foglia mediana (cm)	Larghezza foglia mediana (cm)
Frigo	2,5 a	27,9 a	13,9 a	8,8 n.s.	7,4 a
Vitro	1,9 b	19,4 b	12,1 b	8,3 n.s.	6,5 b

lunghezza del picciolo fogliare e la larghezza della foglia mediana. Queste differenze indicano, in questa fase del ciclo di produzione in vivaio, un maggiore vigore vegetativo delle piante ottenute con tecniche in vivo rispetto a quelle da micropropagazione. Queste differenze possono essere derivate da una diversa dimensione e vigore esistente tra le due tipologie di piante al momento del trapianto. Queste possibili differenze iniziali potrebbero derivare da un ridotto tempo di coltura delle piante da micropropagazione dopo l'ambientamento. Al fine di migliorare le caratteristiche iniziali delle piante da vitro potrebbe semplicemente essere utile allungare il tempo di coltura in ombraio o ambiente esterno al termine del periodo di ambientamento.

**Risultati vivaistici produttivi**

L'analisi dei risultati vivaistici produttivi (tab. 2) mettono in evidenza come le piante frigo-conservate presentano un numero di catene stolonifere per pianta significativamente maggiore rispetto alle piante ottenute da micropropagazione ma evidenziando un numero di stoloni prodotti per parcella simile alle piante madri da micropropagazione. Alla fine del ciclo produttivo le piante madri frigo-conservate hanno prodotto più catene stolonifere con un numero di stoloni inferiore per catena stolonifera rispetto alle piante da micropropagazione.

Ciò può essere spiegato dalla diversa risposta al trapianto delle due differenti tipi di pianta. Infatti le piante frigo-conservate una volta messe a dimora devono ricostituire sia l'apparato aereo che quello radicale ed iniziano a formare catene stolonifere dopo circa un mese dalla piantagione. Le piante micropropagate invece al momento della piantagione presentano sia un buon apparato radicale che aereo (fogliare) ed iniziano subito la produzione di catene stolonifere dovuta ad una accentuata attività delle gemme ascellari stimolata dalla somministrazione di BA al substrato *in vitro* (Swarz *et al.*, 1987).

**Risultati vivaistici qualitativi**

Il materiale vivaistico di piante di fragola da avviare alla frigoconservazione viene suddiviso in classi di

diametro. Le piante con classi di diametro più elevato sono qualitativamente migliori e possono essere utilizzate per particolari produzioni programmate (Classe A<sup>+</sup> e A<sup>++</sup>), mentre le piante che vengono utilizzate normalmente negli impianti sono piante di Classe A. Le piante di diametro inferiore A<sup>-</sup> in genere vengono utilizzate per ricostituire vivai o altri tipologie di piante ingrossate (*Tray plant* o *Waiting beg plant*).

Nel nostro caso, la suddivisione degli stoloni in classi di diametro (fig. 1) ha evidenziato che non ci sono differenze statistiche significative tra le percentuali delle diverse classi di piante ottenute da piante frigo-conservate e piante vitro. Anche in questo caso si mette in evidenza come l'utilizzo di piante madri ottenute da micropropagazione non influenza la qualità della produzione vivaistica.

L'ottenimento di materiale vivaistico di classe A<sup>++</sup>, A<sup>+</sup> e A è sicuramente un obiettivo ricercato dal vivaista ed anche le piante madri ottenute da micropropagazione possono raggiungere risultati vivaistici qualitativamente elevati.

Durante l'intero ciclo produttivo vivaistico sono stati condotti controlli visivi tra le due tipologie di piante e non sono state riscontrate differenze fenotipi-

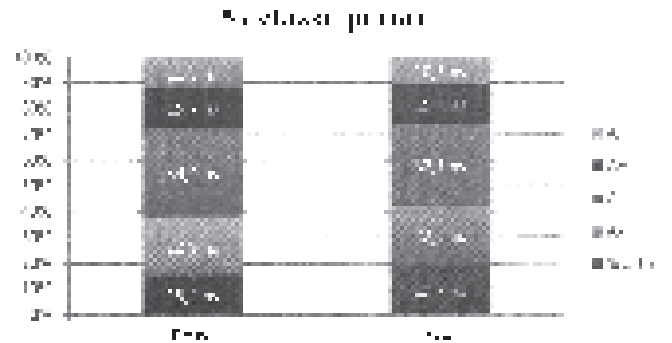


Fig. 1 - Qualità della produzione vivaistica espressa in percentuale di materiale vegetale ottenuto suddiviso in classi di diametro del colletto degli stoloni (Classe Scarto ≤ 5,9 mm; Classe A<sup>-</sup> ≥ 6 mm, ≤ 7,9 mm; Classe A ≥ 8 mm, ≤ 11,9 mm; Classe A<sup>+</sup> ≥ 12 mm, ≤ 14,9 mm; Classe A<sup>++</sup> ≥ 15 mm).

Fig. 1 - Quality of nursery production. (Class discard ≤ 5,9 mm; Class A<sup>-</sup> ≥ 6 mm, ≤ 7,9 mm; Class A ≥ 8 mm, ≤ 11,9 mm; Class A<sup>+</sup> ≥ 12 mm, ≤ 14,9 mm; Class A<sup>++</sup> ≥ 15 mm).

Tab. 2 - Risultati produttivi e qualitativi delle piante madri al termine della stagione vegetativa. Valori indicati con lettere diverse (nella colonna) differiscono statisticamente per p≤0,05 (Test SNK).

Tab. 2 - Results of production and quality of mother plants at the end of the vegetative season. Different letters (column) means different values for p≤0,05 (Test SNK).

Tipo pianta	Catene Stolonifere / pianta (n)	Stoloni / parcella (n)	Stoloni / catena stolonifera (n)	Lunghezza media radice (cm)
Frigo	23,1 a	718 n.s.	31,2 b	13,0 ns
Vitro	14,8 b	699 n.s.	47,2 a	12,1 ns



che rilevanti in termini di forma della foglia mediana, variegature fogliari, nanismo o clorosi, il che presuppone una ridotta o assente variabilità fenotipica tra le piante in particolare quelle da vitro.

## Conclusioni

Dai risultati preliminari (un solo anno di sperimentazione) emerge che l'utilizzo delle piante madri ottenute da micropropagazione direttamente in vivaio può risultare interessante non solo da un punto di vista fitosanitario ma anche da quello produttivo e qualitativo.

I risultati hanno messo in evidenza che le piante madri propagate *in vitro* differiscono da quelle propagate *in vivo* solamente per il minor numero di germogli per pianta, il numero di foglie e il numero di catene stolonifere per pianta mentre, per tutti gli altri parametri (numero di stoloni per pianta, diametro degli stoloni e lunghezza media delle radici degli stoloni) non sono state osservate differenze significative tra le due tipologie di piante madri. Inoltre nelle piante madri ottenute da micropropagazione non sono state osservate differenze fenotipiche di rilievo; ciò può essere motivato dal fatto che sono state utilizzate durante la fase di proliferazione concentrazioni molto basse di citochinine per evitare l'insorgenza di variabilità fenotipica.

Quindi l'efficienza produttiva e qualitativa delle piante madri ottenute da micropropagazione è risultata comparabile a quella ottenuta con piante tradizionali, con il vantaggio di avere in vivaio piante madri garantite da un punto di vista fitosanitario ed ottenere piante figlie di elevata qualità attraverso una filiera di produzione vivaistica efficiente ed economicamente sostenibile.

Al fine di verificare anche la stabilità della risposta agronomica, le piante prodotte nel primo anno di produzione vivaistica sono state messe a dimora in un

campo sperimentale e alla prossima raccolta saranno valutati gli effetti delle piante madri in termini di stabilità, produttività e qualità dei frutti raccolti.

## Riassunto

Attualmente la tecnica della micropropagazione in fragola, secondo la regolamentazione UE, può essere utilizzata solo per la produzione di materiale esente virus e non è prevista in altre fasi della produzione vivaistica. Con lo scopo di valutare la possibilità di adottare la tecnica *in vitro* per la produzione vivaistica di piante madri di fragola, è stata avviata una prova sperimentale per confrontare piante madri di Alba, varietà commerciale diffusa in UE, propagate con protocolli standard *in vitro* e *in vivo* (piante frigo).

**Parole chiave:** micropropagazione, vivaio, piante madri.

## Bibliografia

- LEMAITRE R., 1981. *Le plants de Frasier, qu'utiliser?*. Le Fruit Belge 6: 313-316
- LUCCHI P., ZISA R., BENEDETTINI G., GUERMANDI M., BABINI A.R., MARTINI G., GIRARDI F., TURCI P., 2009. *Certificazione delle piante: stato dell'arte in Italia e in Europa*. Atti Convegno Nazionale "La Fragola Presente e Futuro" - Marsala (TP), 25-27 marzo.
- MURASHIGE T., SKOOG R., 1962. *A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Sansavini S., Gherardi G., 1980. *Selezione clonale e stabilità genetica di fragole micropropagate*. Frutticoltura 5: 36-49.
- SANSAVINI S., ROSATI P., GAGGIOLI D., TOSCHI M.F., 1991. *Ereditarietà e stabilità di variazioni somatiche in fragole micropropagate*. Frutticoltura 9: 85-91
- SWARZ H.J., GALLETTA G.J., ZIMMERMAN R.H., 1981. *Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 106: 613-667
- SWARZ H.J., LINDSTROM J.T., FIOLA J.A., 1987. *The use of tissue culture propagation of strawberry in the United States*. CEC, Biological Sciences, EUR, 10871: 79-100.

## Propagazione *in vitro* di alcune accessioni di *Hydrangea*

Ermanno Sacco<sup>1\*</sup>, Sara Lazzereschi<sup>2</sup>, Beatrice Nesi<sup>2</sup>, Marco Savona<sup>1</sup>, Simona Pecchioli<sup>2</sup>, Antonio Grassotti<sup>2</sup>, Barbara Ruffoni<sup>1</sup> e Pier Luigi Pasqualetto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CRA-FSO, Unità di Ricerca per la Floricoltura e le specie Ornamentali, Sanremo (IM)

<sup>2</sup> CRA-VIV, Unità di Ricerca per il Vivaismo e la Gestione del Verde Ambientale ed Ornamentale, Pescia (PT)

<sup>3</sup> Azienda Agricola Meristema, Loc. Riaccio, Cascine di Buti (PI)

### **In vitro propagation of several *Hydrangea* genotypes**

**Abstract.** *Hydrangea* has recently become a very popular ornamental plant for pot plant and garden decoration; some cultivars are commercialized also as cut flower. The aim of this research was to set up a protocol for *in vitro* culture of selected *Hydrangea* genotypes in order to increase the propagation potential. Explants taken from axillary and apical buds, sterilized in ethanol (70%) and in 5% NaOCl, showed sterilization percentages up to 100% depending on the genotype and the month of explant. For *H. quercifolia* 'Snow Queen', the substrates containing BA (0.25-0.5 or 1 mg/l) showed high multiplication rates (from 6.2 to 7.3 shoots/explants). The performances in liquid culture (TIS) were evaluated and compared with traditional agarised culture. 100% rooting was obtained in the presence of NAA 0.5 mg/l; after dipping treatment with K-IBA 5000 ppm of the vitro-shoots, 100% rooting was achieved directly in the greenhouse together with acclimatization.

**Key words:** *H. quercifolia* 'Snow Queen', *H. heteromalla* 'Snow Cap', *H. involucrata* 'Yoraku Tama', TIS, K-IBA.

### **Introduzione**

Il genere *Hydrangea*, è attualmente classificato fra le *Hydrangeaceae*, sia secondo Cronquist (1988) sia secondo i più recenti criteri della sistematica molecolare AGP. Comprende specie a portamento arbustivo eretto o rampicante, con foglie decidue o persistenti (McClintock, 1957) originarie di una vasta area temperata dell'Asia orientale (Giappone, Cina, Indonesia e regione Himalayana) e del continente americano (Stati Uniti occidentali e Sudamerica). Il genere è suddiviso in due sezioni: *Hydrangea*, con specie prin-

cipalmente originarie dei climi temperati, e *Cornidia*, la quale comprende specie generalmente rampicanti tipiche delle aree tropicali e sub-tropicali. *Hydrangea macrophylla* (comunemente nota come 'Ortensia') nativa del Giappone e introdotta in Europa intorno alla metà del XVII secolo, rappresenta una delle specie più popolari e più coltivate della sezione *Hydrangea*. La popolarità di questa specie è dovuta in parte alla sua versatilità sia come arbusto fiorito da giardino, sia per la produzione di fiori recisi freschi ed essiccati. Le piante del genere *Hydrangea* raggiungono dimensioni variabili, da 1 a 4 metri di altezza, ed hanno foglie opposte o verticillate (in numero di tre per ogni nodo), lobate o dentate; mentre i fiori, riuniti in infiorescenze dette corimbi o pannocchie, sono stellati, di piccole dimensioni e divisi in sterili (più grandi e appariscenti, che si trovano alla periferia dell'infiorescenza) e fertili (al centro dell'infiorescenza). Le infiorescenze variano dal bianco a diverse sfumature di rosso, rosa, azzurro e violetto. I colori sono in parte determinati dal patrimonio genetico della pianta ed in parte dipendono dal tipo di terreno su cui crescono: nei terreni a reazione acida assumono una colorazione azzurro-violetta, mentre nei terreni alcalini diventano rosa o lilla. Dal punto di vista propagativo, da quanto riportato in letteratura, la germinazione dei semi di *Hydrangea* spp. non è difficile (Dirr e Heuser, 1987; Young e Young, 1992; Hill e Hill, 1995), anche se può presentare variabilità e non sempre produce i caratteri desiderati (Hartmann *et al.*, 1997). Essa viene quindi riprodotta per talea ma esistono evidenze sperimentali incoraggianti circa la possibilità di incrementare la produzione con tecniche di colture *in vitro* (Ledbetter e Preece, 2004). Generalmente per la moltiplicazione di *Hydrangea* spp. si impiegano citochinine, tra cui benziladenina, isopenteniladenina (2iP) o zeatina (Sacco *et al.*, 2010). Per valutare le capacità micropropagative di genotipi selezionati presso il CRA-FSO di Sanremo (IM), in collaborazione con il CRA-VIV di Pescia (PT) è stato messo a punto un protocollo di micropropagazione su alcune accessioni

\* ermannotomnico.sacco@entecra.it

ritenute più promettenti tra quelle mantenute in collezione presso il CRA-VIV.

## Materiali e metodi

Presso il CRA-VIV di Pescia a partire dalla primavera 2010, è stata allestita una collezione comprendente specie botaniche asiatiche ed americane, ibridi e cultivar di *Hydrangea*. Le diverse accessioni sono state selezionate presso un'azienda di Pistoia specializzata in *Hydrangea*, la quale dispone di oltre 500 accessioni (fra specie botaniche, ibridi e cultivar, molte delle quali rare e/o note soltanto ai collezionisti), con la collaborazione dell'Azienda Agricola Meristema e di alcuni esperti dell'Associazione Amici delle Ortensie di Bolsena.

Le diverse accessioni, messe a dimora tra primavera e autunno 2010, sono state collocate inizialmente in un'area appositamente predisposta sotto tre diversi livelli di ombreggiamento (50, 70 e 90%), a seconda delle esigenze di luce riportate in letteratura, per ogni singola cultivar. Le piante sono state allevate per la maggior parte in vasi di diametro 18 cm e solo alcune in vasi di diametro maggiore (24 e 30 cm), su di un substrato a base di pomice (diametro 6/14) e terriccio universale in rapporto 1:1 (v/v), con l'aggiunta di Multicote 12 mesi, pH compreso tra 5,5 e 6,5. Riguardo all'irrigazione è stato predisposto un sistema a goccia con ugelli autocompensanti con portata di 2 l/h e l'acqua è stata distribuita con 3 irrigazioni giornaliere di 3 minuti ciascuna, nel corso della primavera. Per quanto riguarda il periodo estivo è stato predisposto un sistema aggiuntivo di irrigazione a pioggia con ugelli dinamici "Dan Verde", da utilizzare durante le ore più calde della giornata, con 2-3 cicli di irrigazione di 3 minuti ciascuna, così da abbassare la temperatura elevata.

### *Sterilizzazione degli espianti*

Gemme apicali e ascellari sono state prelevate in ottobre, aprile e maggio direttamente da piante coltivate in vaso in pien'aria. Sono stati considerati i seguenti genotipi: *H. heteromalla* 'Snow Cap', *H. petiolaris*, *H. macrophylla* 'Lemon Wave', *H. quercifolia* 'Snow Queen' e *H. involucrata* 'Yoraku Tama'.

Il materiale di partenza è stato sottoposto ad un pre-trattamento con immersione in etanolo (70%) per 30". Gli espianti sono poi stati trasferiti in una soluzione di NaOCl a diverse concentrazioni di cloro attivo (1,5-2,5 o 5%) con aggiunta di 2 gocce di Tween 20® saggiando diversi tempi di immersione (10, 15 o 20 minuti). Dopo la sterilizzazione, gli espianti sono stati sciacquati due volte in acqua sterile bidistillata.

Successivamente gli espianti sono stati posti su mezzo agarizzato contenente: sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), 3% di saccarosio e 0,3 mg/l di benziladenina (BA).

### *Moltiplicazione*

Gli espianti sterili di *H. quercifolia* 'Snow Queen' (SQ), usato come genotipo modello, sono stati moltiplicati su terreni di coltura contenente sali e vitamine MS addizionati di BA (0,25; 0,5 e 1 mg/l) e di chinetina (Kin) (1 o 2 mg/l) e confrontati con un controllo senza ormoni. Per ogni trattamento sono state effettuate 3 repliche con 7 espianti ciascuno. Dopo 30 giorni, è stato valutato il numero di germogli/espianto, la lunghezza e il peso dei germogli. Il materiale è stato allevato in cella climatica a temperatura di  $23 \pm 1$  °C, con 16 h di fotoperiodo, fornito da luci a fluorescenza bianca fredda a  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PPFD).

### *Radicazione in vitro*

I germogli di SQ in moltiplicazione sono stati trasferiti sui substrati di radicazione contenenti sali e vitamine MS e addizionati di acido indolacetico (IAA), acido indolbutirrico (IBA) o acido naftalenacetico (NAA) a 0,5 mg/l, alle stesse condizioni di crescita della precedente fase di moltiplicazione. Per ogni trattamento, sono state effettuate 3 repliche con 7 espianti ciascuno. Dopo 30 giorni, sono stati registrati il numero di radici/espianto, la lunghezza delle radici (cm), il peso degli espianti e la percentuale di radicazione.

### *Radicazione in vivo degli espianti ed ambientamento in serra*

120 espianti di SQ, provenienti dal mezzo moltiplicazione contenente BA (0,5 mg/l), sono stati immersi per 30" in soluzioni acquose di K-IBA (sale di potassio) a 5.000 o 10.000 ppm o in acqua distillata (controllo). Gli espianti sono stati quindi trasferiti in serra di ambientamento in contenitori alveolari di plastica riempiti con sabbia più torba sterile (1:1 v/v) sotto il sistema di nebulizzazione mist (10" di nebulizzazione ogni 30 minuti) che ha garantito un tasso di umidità relativa del 70%. Dopo 21 giorni sono state valutate la vitalità e la percentuale di radicazione degli espianti.

### *Temporary Immersion System*

La micropropagazione dei genotipi SQ, SC ed YT è stata valutata confrontando la tradizionale coltura in mezzo agarizzato (MA-8 g/l Agar) con BA (0 o 0,25 o 0,5 mg/l) con il sistema di coltura in terreno liquido ad immersione temporanea (TIS) alle stesse concentrazioni ormonali. Per il TIS sono stati utilizzati i contenitori RITA®, preparati con 160 ml di substrato liqui-

do e sono stati impostati tre minuti di gorgogliamento del liquido ogni tre ore. Per ogni trattamento sono state effettuate 3 ripetizioni con 12 espianti ciascuna e le colture sono state incubate a  $23\pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo di 16 ore di luce al giorno e un'intensità luminosa di  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PPFD). Dopo 30 giorni sono stati rilevati il tasso di moltiplicazione (numero di germogli per espianto per mese), il peso (g) e la lunghezza degli espianti (cm), la percentuale di radicazione, la lunghezza (cm) e il numero di radici per espianto.

#### Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma COSTAT statistica. L'analisi della varianza è stata effettuata a  $P \leq 0,05$  e le medie

sono state confrontate con il test Student Newman Keuls (SNK).

## Risultati e discussione

#### Collezione

La collezione costituita presso il CRA-VIV è composta da circa 400 piante, comprendenti 66 accessioni elencate in tabella 1 esse sono disponibili per prelievo di materiale per la coltura *in vitro* e anche per valutazioni da parte di privati.

#### Sterilizzazione

Il trattamento di sterilizzazione consistente in un lavaggio con etanolo (70%) per 30 secondi seguito da

Tab. 1 - Elenco delle accessioni di *Hydrangea* presenti nella collezione presso il CRA-VIV.  
Tab. 1 - List of accessions in the CRA-VIV collection of *Hydrangea*.

Specie	Varietà	Specie	Varietà	
<i>H. macrophylla</i> . (Hortensia Group)	Bela	<i>H. macrophylla</i> (Lacecap Group)	Libelle	
	Elbatal		Kardinal	
	Harlequin		Benxi	
	Alberta		Lanarth White	
	Dienemann		Lemon Wave	
	Europa		Hanaby	
	Lake S. Marcos		Zorro	
	Endless Summer		Minarayama-Yae	
	White First		Blaumaise	
	Schneebal		Tricolor	
	San Baronto		Etoile Violette	
	First Red		Grant's Choice	
	Ayesha		<i>H. paniculata</i>	Unique
	Masja			Phanthom
	Soeur Thérèse			Vanille Fraise
	Intermezzo			Limelight
	Merveille Sanguinea		<i>H. villosa</i>	Pink Diamond
	Green Shadow			Mauvette
	Paris	<i>H. quercifolia</i>	Alice	
	Ami Pasquier		Harmony	
Dolce Kiss	<i>H. anomala</i>	Snow Queen		
Dolce Gipsy		Petiolaris		
<i>H. serrata</i>	Blue Bird	<i>H. arborescens</i>	Annabelle	
	Stellata	<i>H. heteromalla</i>	Snow Cap	
	Warabe	<i>H. involucrata</i>	Miharayama Kokonoe Tama	
	Yae-no-amacha		Yoraku Tama	
	Yo Temari	<i>H. aspera</i>	Macrophylla	
	Akishimo temari		Longipes	
	Amacha yae		Rowallane	
	Mont Aso	<i>Schizophragma</i>	Hydrangeoides	
	Acuminata		Roseum	
	Japonica		Moonligh	
	Woodlander			
Preziosa				

immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio (al 5% di cloro attivo) più 2 gocce di Tween20®, per 15 minuti seguita da 2 risciacqui in acqua sterile bi distillata si è rivelato molto efficiente senza inibire la vitalità degli espianti. Le percentuali di sterilizzazione ottenute sono riportate in tabella 2. La percentuale di asepsi ottenibile dipende dal genotipo e dalle condizioni termofotoperiodiche e di sviluppo della pianta in relazione al periodo di prelievo durante l'anno.

**Moltiplicazione e radicazione del genotipo SQ**

Nella fase di moltiplicazione è stato osservato che per il genotipo modello *H. quercifolia* ‘Snow Queen’, BA a qualsiasi concentrazione (0,25; 0,5 o 1 mg/l) ha indotto un maggior tasso di moltiplicazione (più di 7 germogli per espianto per mese) rispetto al trattamento con chinetina. In presenza della maggiore concentrazione di BA risulta inoltre maggiore il peso degli espianti ma è stato anche osservato un aumento dell’iperidricità dei germogli. L’utilizzo di chinetina ha permesso di ottenere espianti di ottima qualità, ma il tasso di moltiplicazione è risultato molto basso (2,5 germogli per espianto per mese) (fig. 1). Per queste ragioni è stato deciso di utilizzare il terreno di coltura

base contenente BA 0,25 mg/l anche per gli altri genotipi, effettuando subcolture ogni 30 giorni, rilevando riscontri positivi (fig. 2).

Per quanto riguarda la radicazione dei germogli di *H. quercifolia* ‘Snow Queen’ ottenuti su substrato agarizzato, la migliore percentuale di emissione radicale è stata ottenuta in presenza di NAA alla concentrazione di 0,5 mg/l (100%) (fig. 3). NAA ha indotto anche un considerevole numero di radici per germoglio per mese (8).

Il trattamento di immersione breve (*dipping*) delle micro talee in K-IBA ha permesso di ottenere una elevata percentuale di radicazione direttamente in serra di ambientamento (fig. 4) unendo così le due fasi e permettendo di dare indicazioni pratiche sulla possibilità di risparmiare sul tempo di produzione.

**Confronto di crescita substrato liquido e solido**

Per tutti e tre i genotipi saggiati il TIS ha garantito la migliore qualità degli espianti, senza fenomeni di iperidricità dei tessuti ed un miglior tasso di moltiplicazione.

Tab. 2 - Sterilizzazione degli espianti: differente comportamento in base all’epoca di espianto.

Tab. 2 - Explants sterilization: different response related to the month of collection.

Varietà e sigla		% espianti asettici		
		Ottobre	Aprile	Maggio
<i>H. heteromalla</i> “Snow Cap”	SC	0	25	100
<i>H. petiolaris</i>	P	0	33	83
<i>H. macrophylla</i> “Lemon Wave”	LW	16,7	25	100
<i>H. quercifolia</i> “Snow Queen”	SQ	87,5	-	-
<i>H. involucrata</i> “Yoraku Tama”	YT	0	0	25



Fig. 5 - Moltiplicazione *in vitro* del genotipo SQ (MS+BA 0,25 mg/l).

Fig. 5 - In vitro multiplication of SQ genotype (MS+BA 0.25 mg/l).

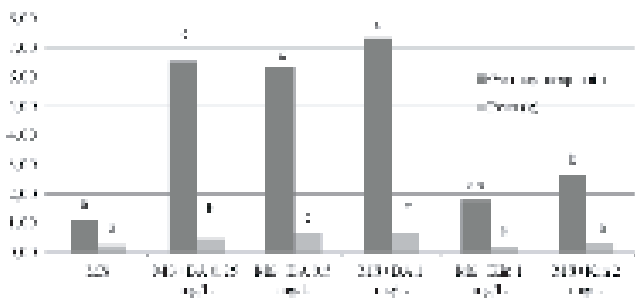


Fig. 1 - Effetto di differenti ormoni e di diverse concentrazioni sul tasso di moltiplicazione degli espianti del genotipo SQ.

Fig. 1 - Effect of different growth regulators at different concentrations on explants multiplication rate of genotype SQ.

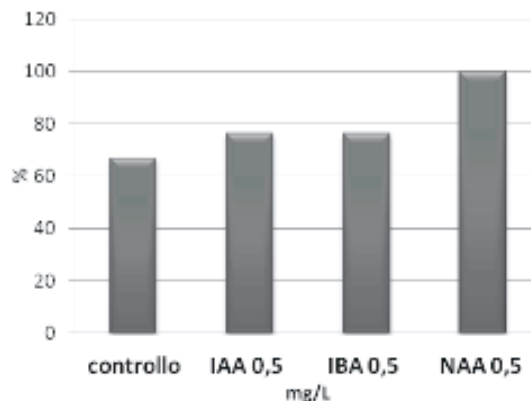


Fig. 3 - Radicazione di *H. quercifolia* ‘Snow Queen’ con diversi ormoni (IBA, IAA e NAA) alla stessa concentrazione di 0,5 mg/l.

Fig. 3 - In vitro rooting percentage related to the auxin type.

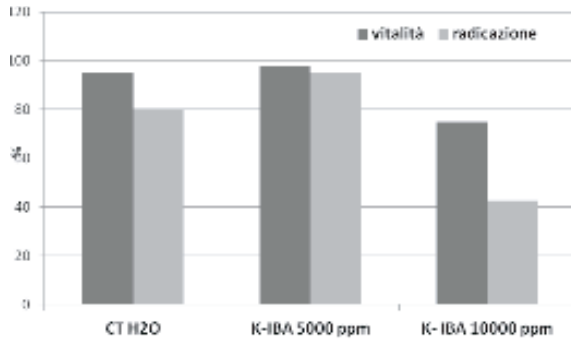


Fig. 4 - Radicazione mediante dipping e trasferimento immediato in serra degli espianti del genotipo SQ: % di radicazione e vitalità.  
 Fig. 4 - Direct rooting of explants SQ in the greenhouse: survival and rooting percentages.

cazione rispetto alla coltura su substrato agarizzato. Per i genotipi SQ ed SC l'analisi statistica dei dati di moltiplicazione ha messo in evidenza una differenza significativa, come previsto, tra la presenza e assenza di BA, le migliori performances ottenute in TIS e una omogeneità di risposta tra i genotipi (tab. 3). Il miglior tasso di moltiplicazione in assoluto è stato ottenuto per *H. heteromalla* 'Snow Cap' (9,14) allevata in TIS, con BA alla concentrazione di 0,25 mg/l (tab. 4). L'altezza dei germogli allevati su mezzo agarizzato non è influenzata dalla concentrazione della BA, mentre in TIS, per il genotipo SC, essa diminuisce all'aumentare della concentrazione della BA e viceversa per SQ; per entrambi i genotipi, inoltre, la coltura in immersione temporanea a bassi livelli di benziladenina (0,25 mg/l) ha fornito espianti con il peso più elevato (fig. 5).

Un'alta percentuale di radicazione (100%) è stata ottenuta per il genotipo SC con entrambi i sistemi di coltura in assenza di fitoregolatori, mentre gli espianti del genotipo SQ sono radicati in TIS anche in presenza della BA (dati non mostrati).

Tab. 3 - Tasso di moltiplicazione nei due sistemi colturali (MA= Mezzo Agarizzato e TIS= Temporary Immersion System), ANOVA a tre vie in relazione alla concentrazione del fitoregolatore (BA), al genotipo (SQ o SC) ed al sistema colturale. Lettere differenti indicano valori che differiscono a  $p \leq 0,05$  (SNK test).

Tab. 3 - Hydrangea multiplication rate through MA (Agar) or TIS (liquid), three-ways ANOVA related to BA concentration, genotype and culture system. Different letters indicate values which differ at  $p \leq 0.05$  (SNK test).

Fattori	BA (mg/l)			Genotipi		Sistema colturale	
	0	0,25	0,5	SQ	SC	TIS	MA
Media	1,24 a	5,98 b	6,31 b	4,50 a	4,52 a	5,79 b	3,23 a

Tab. 4 - *H. quercifolia* "Snow Queen" (SQ), *H. heteromalla* "Snow Cap" (SC) e *H. involucrata* "Yoraku Tama" (YT) : confronto dell'efficienza della micropropogazione in TIS o in MA.

Tab. 4 - *H. quercifolia* "Snow Queen" (SQ), *H. heteromalla* "Snow Cap" (SC) and *H. involucrata* "Yoraku Tama" (YT): comparison of the efficiency of the micropropagation in TIS or in AM.

BA mg/l	Tasso di moltiplicazione (N. germogli per espianto)					
	SQ TIS	SQ MA	SC TIS	SC MA	YT TIS	YT AM
0	1,69	1,28	1	1	3,8	2,4
0,25	6,67	4	9,14	4,11	7,1	3,2
0,5	7,42	5,94	8,81	3,07	3,2	5,7

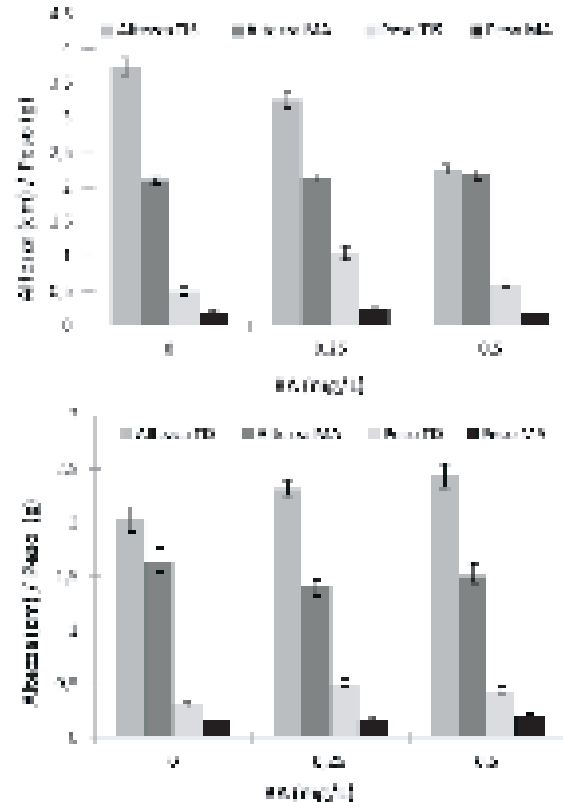


Fig. 5 - Altezza (cm) e peso fresco (g) degli espianti allevati in TIS o MA in relazione a differenti livelli di BA. A: *H. heteromalla* "Snow Cap" (SC); B: *H. quercifolia* "Snow Queen" (SQ).  
 Fig. 5 - Explants height (cm) and fresh weight (g) cultured in TIS or AM related to BA concentrations. A: *H. heteromalla* "Snow Cap" (SC); B: *H. quercifolia* "Snow Queen" (SQ).

### Conclusioni

E' stato messo a punto di un protocollo di micropropagazione per alcune accessioni originali di *Hydrangea*; in tale protocollo vi sono indicazioni precise per poter produrre *in vitro* elevati numeri di mate-

riale propagato. I tassi di moltiplicazione e radicazione sono maggiori rispetto a quelli descritti in letteratura per altre specie di *Hydrangea* (*H. macrophylla*, Abu Dahab, 2007; *H. quercifolia*, Sebastian e Heurser, 1987). Inoltre è stato possibile coniugare radicazione ed ambientamento (radicazione diretta *in vivo*) permettendo di ottenere piantine acclimatate in 21 giorni; tale accorgimento è particolarmente utile a fini commerciali poiché è possibile risparmiare sui tempi di produzione. La coltura in mezzo liquido (TIS) garantisce evidenti benefici qualitativi (es: allungamento degli internodi, ingrossamento delle foglie ed accrescimento radicale) rispetto alla crescita in mezzo agarizzato.

### Riassunto

Le specie del genere *Hydrangea* hanno elevato valore ornamentale sia come arbusto fiorito da giardino, sia per la produzione di fiori recisi freschi ed essiccati. Per incrementare l'offerta di nuovi prodotti ornamentali è stata effettuata una raccolta di genotipi promettenti e, per alcuni di loro, è stato messo a punto un protocollo di micropropagazione. Gemme apicali e ascellari sono state sterilizzate in una soluzione di NaOCl al 5%; è stato notato che la percentuale di sterilizzazione ottenibile dipende dall'effetto combinato di genotipo e periodo di prelievo. Per l'accessione studiata come modello, *H. quercifolia* 'Snow Queen', sono stati ottenuti buoni tassi di moltiplicazione (tra 6,2 e 7,3 germogli/espianto) in presenza di BA (0,25-0,5 o 1 mg/l) mentre 100% di radicazione è stato ottenuto con NAA (0,5 mg/l). Il *dipping* in K-IBA è stato adottato per la radicazione *in vivo* dei germogli micropropagati con ottimi risultati di ambientamento. Per tre genotipi viene riportato e discusso un confronto

quali-quantitativo di crescita tra il sistema su mezzo agarizzato e coltura in immersione temporanea (TIS).

**Parole chiave:** *H. quercifolia* 'Snow Queen', *H. heteromalla* 'Snow Cap', *H. involucrata* 'Yoraku Tama', TIS, K-IBA.

Ricerca finanziata dal MiPAAF, Bando Imprese Florovivaistiche, D.M. 186/2007, Progetto *Hydrangea*.

### Bibliografia

- ABOU DAHAB T.A.M., 2007. *In vitro* propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. Arab J. Biotech. 10: 161-178.
- CRONQUIST A., 1988. *The evaluation and classification of flowering plants*. Bronx, New York Botanical Garden.
- DIRR, M.A., HEUSER JR. C.W., 1987. *The Reference Manual of Woody Plant Propagation: From seed to Tissue Culture*. Varsity Press., Athens, Georgia.
- DOIL A., ZHANG R., SCHUM A., SEREK M., WINKELMANN T., 2008. *In vitro* regeneration and propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. 'Nachtgall' Propagation of Ornamental Plants, 8(3): 151-153.
- HARTMANN H.T., KESTER D., DAVIES F., GENEVE R., 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. 6<sup>th</sup> ed., Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J.
- HILL L., HILL N., 1995. *Hydrangea*. Country J. July/Aug.: 70-71.
- LEDBETTER D.I., PREECE J.E., 2004. *Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from Hydrangea quercifolia* Bartr. leaf explants. Sci. Hort. 101: 121-126.
- MCCLINTOCK E., 1957. *A monograph of the genus Hydrangea*. Proc. Calif. Acad. Sci., 29:147-255.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- SACCO E., SAVONA M., ANTONETTI M., GRASSOTTI A., PASQUALETTO P.L., RUFFONI B., 2010. *In Vitro Propagation and Regeneration of Several Hydrangea Genotypes*. Acta Hort. (in press).
- SEBASTIAN T.K., HEURSER C.W., 1987. *In vitro* propagation of *Hydrangea quercifolia* Bartr. Sci. Hort. 31: 303-309.
- YOUNG J., YOUNG C., 1992. *Seed of Woody Plants in North America*. Revised and Enlarged Edition, Dioscorides Press, Portland, Oregon.

## Micropropagazione di 'Sunflower', varietà americana di *Asimina triloba* (L.) Dunal

Giuseppe Zuccherelli<sup>1\*</sup>, Katuscia Zuccherelli<sup>1</sup> e Florin Stanica<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Vitroplant Italia S.r.l. Società Agricola, Cesena (FC)

<sup>2</sup> Faculty of Horticulture, Florin Stanica University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, Bucarest (Romania)

### Micropropagation of Sunflower, an American variety of *Asimina triloba* (L.) Dunal

**Abstract.** *Asimina triloba* is propagated exclusively by agamic methods such as grafting. The high demand for plants, mainly in the markets of North-East Europe suggested to enhance the research aimed to the development of an efficacious technique for large scale *in vitro* propagation, taking into account the existence of some difficulties particularly in the rooting phase. In our case, shoot apexes of the autofertile cv. Sunflower were introduced *in vitro*. For the proliferation phase, the DKW formulation gave the best results, with the inclusion of a high dose of BAP (3 mg L<sup>-1</sup>). For rooting, the best performances were obtained with the MSK formulation at half strength of macroelements and the presence of NAA (6 mg L<sup>-1</sup>) in the induction phase and IBA (6 mg L<sup>-1</sup>) plus activated charcoal (500 mg L<sup>-1</sup>) during the root expression.

**Key words:** culture media, *in vitro*, propagation, rooting.

#### Introduzione

L'*Asimina triloba* è una specie della famiglia delle Annonaceae, che contempla molte importanti specie caratterizzate dalla produzione di frutti tra i più squisiti: *A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. muricata*. Anche per l'*Asimina triloba*, come per molte altre specie di questa famiglia, è stata rilevata la produzione di composti secondari del frutto e della pianta con attività biologiche importanti e conseguenti prospettive per un'utilizzazione in campo farmaceutico ed alimentare (Rupprecht *et al.*, 1990).

I frutti prodotti dall'*Asimina* sono particolarmente apprezzati dalle popolazioni nordiche e dagli amanti dei gusti esotici; a partire da ciò, appare utile promuovere il consumo del prodotto fresco anche in altre aree

e testare le varie possibili utilizzazioni in ambito industriale. Allo stato attuale la ridotta shelf-life del frutto condiziona la possibilità di realizzare impianti industriali e relega l'*Asimina* ad uno sfruttamento essenzialmente come pianta ornamentale (Bellini e Montanari, 2000). Sarebbe pertanto opportuno avviare un'attività finalizzata al miglioramento genetico per alcuni aspetti qualitativi, con particolare attenzione alla shelf-life del frutto.

L'*Asimina* è propagata esclusivamente per via agamica con il metodo dell'innesto (Stănică *et al.*, 2004). L'ottenimento di portinnesti per via gamica è facile, infatti è sufficiente stratificare i semi in substrati organico-minerali umidi e conservarli in frigorifero a 0-3 °C, per 2-3 mesi per il superamento della dormienza; i semi vengono poi sottoposti a temperature alterne tra 0 e 25 °C per 20-30 giorni. Viceversa, il lento accrescimento dei portinnesti da seme, la loro disforme crescita vegetativa, la difficoltà di reperire personale specializzato nell'esecuzione degli innesti e la crescente richiesta di piantine, ci ha spinto a verificare la possibilità di disporre di un efficiente sistema di propagazione *in vitro* dell'*Asimina triloba*.

L'analisi della bibliografia esistente ha evidenziato la mancanza di lavori che riportino protocolli completi sulla micropropagazione di questa specie, in particolare per quanto riguarda le fasi di radicazione ed ambientamento (Finneseth *et al.*, 2000; Geneve *et al.*, 2007).

La nostra indagine aveva quindi lo scopo di mettere a punto una tecnica efficace di propagazione *in vitro* della varietà Sunflower di *Asimina triloba*, garantendo un prodotto vivaistico uniforme ed a rapida crescita, con particolare attenzione alle fasi di radicazione e di acclimatamento delle piantine per un suo eventuale sfruttamento industriale.

#### Materiali e metodi

Durante la ripresa vegetativa sono stati prelevati germogli da un esemplare selezionato di 15 anni di età di *Asinina triloba* var. Sunflower, una della poche

\* zuccherelli@vitroplant.it, \*\* florin.stanica@usamv.ro



varietà autofertili di questa specie. Gli apici vegetativi sono stati lavati con cura attraverso trattamenti con alcool etilico al 90% e con Rely+On™ Vircon (Antec™ International, gruppo DuPont™) al 3% per 30 minuti e successivamente con ipoclorito di sodio all'1% per 25 minuti. Dopo 3 risciacqui con acqua sterile, i singoli germogli sono stati immessi in tubi di coltura contenenti differenti tipi di substrati: WPM (*Woody Plant Medium*) (Lloyd e McCown, 1980), MSK (Murashige e Skoog, 1962), QL (Quorin e Lepoivre, 1977), DKW (Driver e Kuniyuki, 1984). Per l'adattamento alle condizioni del vitro degli espanti sono stati modificati i substrati MSK, QL, DKW e WPM nella loro componente ormonale con aggiunta di BAP a 3 mg l<sup>-1</sup>, NAA 0,1 mg l<sup>-1</sup> e IAA 0,5 mg l<sup>-1</sup> (fig. 2).

I substrati sono stati quindi valutati in base alla qualità del materiale vegetativo ottenuto al 3° trapianto (fig. 1). Il materiale è stato incubato in cella di crescita con fotoperiodo di 16 ore, luminosità di 4.000 lux e temperatura costante di 22 °C.

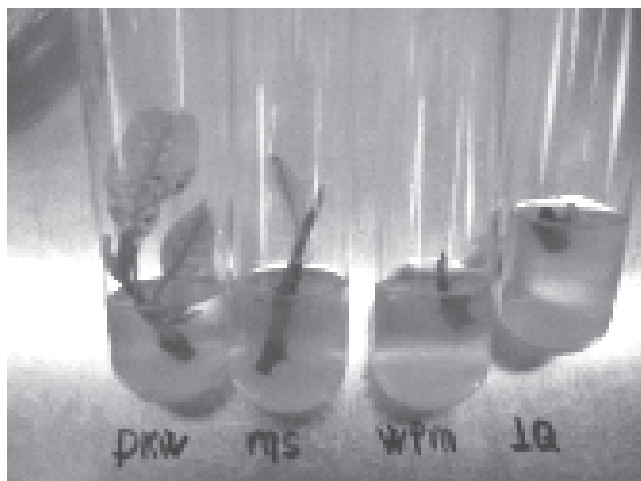


Fig. 1 - Espanti di *Asinina triloba* cv Sunflower ottenuti nei diversi substrati, osservati dopo la terza subcoltura.

Fig. 1 - *Asinina triloba* cv Sunflower explants obtained with different substrates after the third culture.



Fig. 2 - Germogli ottenuti con il mezzo DKW modificato contenente BAP 3 mg l<sup>-1</sup>; da notare l'elevata qualità del materiale.  
Fig. 2 - Shoots obtained with DKW medium, modified with BAP 3 mg l<sup>-1</sup>.

I due mezzi di coltura migliori nella fase di moltiplicazione (DKW, MSK) sono stati valutati in parallelo nei test per l'attitudine alla radicazione, utilizzando i due mezzi a concentrazione ridotta alla metà per i macroelementi (DKW<sup>1/2</sup>, MSK<sup>1/2</sup>) e testando i sistemi di radicazione in due fasi: di induzione ed espressione su un totale di 1.000 microtalee per quattro differenti livelli ormonali nella fase di induzione al buio poi passate alla fase di espressione. Prima abbiamo effettuato l'induzione al buio per 8 giorni e con differenti dosi di NAA (0-3-6-9 mg l<sup>-1</sup>) e poi successivamente l'espressione alla luce con mezzi contenenti acido indol-butirrico (IBA, a 0-3-6-9 mg l<sup>-1</sup>). E' stato anche aggiunto in questa fase, carbone attivo (CA) alla concentrazione di 500 mg l<sup>-1</sup>. La fase di espressione è stata svolta alla luce, con intensità luminosa di 5000 Lux e alla temperatura di 25 °C.

## Risultati

Sono state rilevate iniziali difficoltà di stabilizzazione *in vitro* delle colture, dovute essenzialmente a fenomeni di ossidazione; ciò ha reso necessario un aumento della frequenza dei trapianti, portando la permanenza degli espanti in uno stesso substrato ad un massimo di 20 giorni.

### Proliferazione

Il mezzo DKW è risultato il migliore per la fase proliferativa; gli altri substrati testati, infatti, utilizzati tutti a concentrazioni intere con la finalità di scegliere il migliore, hanno determinato eccessi di ossidazione, vitrescenza ed una insufficiente qualità finale dei germogli da avviare alla successiva fase di radicazione (tab. 1). Relativamente al tasso di proliferazione è necessario sottolineare che nelle prime subcolture

Tab. 1 - Sopravvivenza e qualità del materiale al 3° trapianto; dati relativi a 50 espanti per ogni substrato testato; i substrati presentavano lo stesso contenuto ormonale (BAP 3 mg L<sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg L<sup>-1</sup> + IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Per "germoglio integro" si intende un germoglio in attiva crescita e in buon assetto fisiologico senza segni degenerativi e vitrescenza.

Tab. 1 - Survival and quality of the material at the 3° transplant; data are referred to 50 explants per each medium tested; each substrate had the same hormone content (BAP 3 mg L<sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg L<sup>-1</sup> + IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup>). To "germoglio integro" (intact shoot) means an actively growing bud, in good order, with no signs of degenerative physiological and vitrification.

Mezzi di coltura	% sopravvivenza al 3° trapianto	Lungh. media germogli (mm)	N° germogli integri
WPM	5	0,4	0
MSK	15	1,5	10
QL	25	0,5	5
DKW	35	2,1	15

dell'Asimina esso è praticamente assente, infatti i germogli non proliferano fino alla 5/6° subcoltura e non esiste tasso di proliferazione. Sono stati pertanto scelti i substrati che permettevano di ottenere un germoglio in attiva crescita e in assetto fisiologico discreto senza segni degenerativi e vitescenza (tab. 1).

E' stato necessario utilizzare livelli alti di citochinina (BAP a 3 mg l<sup>-1</sup>) per ottenere elevati tassi di moltiplicazione; a concentrazioni inferiori, infatti, il materiale tendeva a sviluppare in lunghezza senza emissione di gemme laterali.

### Radicazione

Le micro talee utilizzate nel presente lavoro sono state ottenute direttamente dal terreno di moltiplicazione (BAP a 3 mg l<sup>-1</sup>) (fig. 2). Per ottenere piante più resistenti allo stress indotto dalla radicazione opportuno può essere conveniente utilizzare un terreno di distensione (fig. 3).

Dai dati emersi sui test e riassunti in tabella 2, è emerso che i migliori risultati sono stati ottenuti con l'utilizzo del substrato MSK con componente minerale ridotta a metà (MSK<sup>1/2</sup>) e la presenza di NAA (6 mg l<sup>-1</sup>), eziolamento per 8 giorni ed espressione in substrato MSK arricchito di carbone attivo (500 mg l<sup>-1</sup>) e 6 mg l<sup>-1</sup> di IBA. Nelle condizioni descritte è stata raggiunta una percentuale dell'85% di radicazione delle microtalee con MSK<sup>1/2</sup> (fig. 4) contro il 55% con l'utilizzo del DKW<sup>1/2</sup>. Nel nostro caso, quindi, i migliori risultati sono stati conseguiti con l'aggiunta di auxine nella fase di espressione radicale e contrariamente a quanto è riportato in bibliografia (Driver e Kuniyuki, 1984). Normalmente, per la produzione di piante da frutto, non si osservano nella fase successiva al vitro difficoltà nella velocità di crescita; l'Asimina, invece, nella fase di acclimatazione e nello sviluppo successivo, ha fatto registrare, come per la magnolia ed il noce, ritmi di accrescimento alquanto lenti.



Fig. 3 - Microcuttings after elongation phase with 1 mg l<sup>-1</sup> of BAP.  
Fig. 3 - Microcuttings after elongation phase with 1 mg l<sup>-1</sup> of BAP

Tab. 2 - Percentuale di radicazione delle microtalee. Sono stati considerati radicati gli espianti che presentavano anche solo un abbozzo radicale.

Tab. 2 - Rooting percentage of microshoots. Explants were considered rooted when presenting one radical sketch at least.

Induzione al buio		
Livelli di NAA (mg l <sup>-1</sup> )	% microtalee radicate (MSK <sup>1/2</sup> )	% microtalee radicate (DKW <sup>1/2</sup> )
3	0	0
6	6	5
9	2	1
0	0	0
Espressione alla luce		
Livelli di IBA (mg l <sup>-1</sup> )	% Microtalee radicate (MSK 1/2 + CA 500 mg l <sup>-1</sup> )	% Microtalee radicate (DKW + CA 500 mg l <sup>-1</sup> )
3	45	10
6	85	55
9	72	45
0	0	0



Fig. 4 - Sunflower nella fase di moltiplicazione.  
Fig. 4 - Sunflower in propagation.

Le fasi di crescita successive al vitro richiedono probabilmente ulteriori indagini finalizzate all'ottenimento di ritmi di crescita più rapidi.

### Conclusioni

Le diverse difficoltà che si incontrano nella moltiplicazione *in vitro* tra specie diverse, sono spesso riscontrabili anche tra le varietà di una stessa specie (Zuccherelli *et al.* 2000). Con il presente lavoro sono state ottenute ottime piante auto-radicate di *Asimina triloba* della cv. Sunflower, ma i risultati conseguiti con questa varietà potrebbero non essere pienamente trasferibili ad altre.

Le piante di difficile adattamento alle condizioni imposte dal *in vitro*, come l'Asimina, fanno emergere le prime difficoltà già nelle fasi iniziali della coltura: nel nostro caso, tempi brevi di subcoltura e l'uso di substrati idonei a prevenire un eccesso di ossidazione rappresentano una prima utile indicazione. È necessario poi ottenere piante perfette sotto il profilo fisiologico per permettere alle microtalee di affrontare gli stress causati dall'eziolamento e dall'uso di elevate concentrazioni di auxine in fase di radicazione. I mezzi utilizzati, i substrati e le tecniche impiegate e descritte nel presente lavoro hanno permesso l'ottenimento di buone percentuali di radicazione; è auspicabile, quindi, che queste ricerche possano estendersi ad altre varietà di particolare interesse commerciale.

### Riassunto

L'*Asimina triloba* è propagata per via agamica solo per innesto. La forte richiesta di piantine, soprattutto nei mercati del Nord-Est dell'Europa, ha suggerito di approfondire le ricerche sulla possibilità di ottenere una tecnica efficiente di propagazione industriale attraverso la coltura *in vitro*, avendo rilevato l'esistenza di difficoltà nella fase di radicazione. Nel nostro caso sono stati introdotti *in vitro* germogli dalla varietà autofertile Sunflower. Il substrato che ha dato i migliori risultati nella fase di proliferazione è stato il DKW alla presenza di dosi consistenti di BAP (3 mg l<sup>-1</sup>), mentre per la radicazione i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando la formulazione MSK con

metà concentrazione di macroelementi e l'aggiunta di 6 mg l<sup>-1</sup> di NAA nella fase di induzione e di 6 mg l<sup>-1</sup> di IBA e 500 mg l<sup>-1</sup> di carbone attivo nella fase di espressione radicale.

**Parole chiave:** *in vitro*, propagazione, radicazione, substrato.

### Bibliografia

- BELLINI E., MONTANARI D., 2000. *L'Asimina triloba, una realtà per la frutticoltura amatoriale italiana*. Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura, 62: 54-61.
- DRIVER, J.A., KUNUYUKI, A.H., 1984. *In vitro propagation of Pradox walnut rootstock*. HortScience, 19(4): 507-509.
- FINNESETH C.L.H., GENEVE R.L., LAYNE D.R., 2000. *Establishment of North American pawpaw shoots in vitro from mature or juvenile explants*. Acta Hort., 520: 97-102.
- GENEVE R., KESTER S., POMPER K., 2007. *Autonomous shoot production in pawpaw on plant growth regulator free media*. Propagation of Ornamental Plants.7: 51-56.
- LLOYD G., McCOWN B.H., 1980. *Commercially feasible micropropagation of mountain laurel Kalmia latifolia by use of shoot-tip culture*. Comb. Proc. Int. Plant Propagation Soc., 30: 421-427.
- MURASHIGE T., SKOOG F.A., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE F., 1977. *Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus*. Acta Horti., 78 : 437-442.
- RUPPRECHT J.K., HUI J.H., McLAUGHLIN J.L., 1990. *Annonaceous acetogenins: A Review*. J. Natural Products 53(2): 237-278.
- STĂNICĂ FL., GHENA N., DĂNĂILĂ-G.S., COTRUȚ R., 2004. *Preliminary results regarding the propagation by grafting of Northern banana [Asimina triloba (L.) Dunal]*. In: Lucrări Științifice UȘAMV.
- ZUCCHERELLI G., ZUCCHERELLI S., 2000. *In vitro propagation of fifty olive cultivars*. Acta Hort. 586: 931-934.

## Valutazione *in vitro* di nuove selezioni di portinnesti di pero in fase di allungamento

Sara Serra<sup>1\*</sup>, Cláudia Simone Madruga Lima<sup>2</sup>, Romano Roncasaglia<sup>3</sup> e Stefano Musacchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna

<sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brasile)

<sup>3</sup> Vivai Piante Battistini, Martorano di Cesena (FC)

### Evaluation of new pear rootstocks selections during the *in vitro* elongation stage

**Abstract.** Micropropagation is a very important technique to propagate fruit cultivars and rootstocks. Nowadays, several pear rootstocks are multiplied *in vitro* due to some difficulties in conventional propagation. The aim of this work is to evaluate, in the elongation phase, the behavior of new selections of pear characterized by reduced vigor and/or compact *habitus*. Five different genotypes have been explanted (e.g. shoot tips) from the field, sterilized and placed in different *in vitro* media to optimize shoots production. In the elongation phase, for all the selections in trial, three BAP doses have been tested: 0,2- 0,5 - 1,0 mg/L under standard initial growth conditions (number of shoots per jar, media volume, photoperiod in the growth chamber). After three weeks of culture some vegetative parameters have been evaluated such as: final height of the main shoot, number of leaves, number of internodes, number of new lateral shoots and presence of callus. The average internode length of genotype 26 resulted the highest among all the selections and this provided a possible indication about the vigor that has been reported as the less compact, confirming field observations on the mother plants. Genotype 16 showed a good adaptability to *in vitro* propagation.

**Key words:** *Pyrus communis*, elongation, rootstocks breeding.

### Introduzione

La micropropagazione è un'efficace tecnica per ottenere una grande quantità di piante *in vitro* esenti da malattia e geneticamente uniformi (cloni) a partire

da un singolo individuo, in maniera svincolata dai cicli vegetativi stagionali (Razdan, 2003). Questa tecnica ha avuto un grande sviluppo negli anni '80 favorendo lo sviluppo dell'industria vivaistica. Le applicazioni di questa tecnica sono molteplici e possono essere un valido supporto alla propagazione e al miglioramento delle piante da frutto (Zimmerman, 1981).

In Italia, è stato recentemente stimato che circa 25 milioni di piante sono prodotte con questa tecnica e che, in particolare, il 70% di esse riguardano il settore frutticolo. Nel mercato sono sempre più numerose le cultivar e i portinnesti propagati con questo metodo (Lambardi e Ozudogru, 2010).

Attualmente, esistono alcuni programmi di miglioramento genetico nel mondo, che mirano a selezionare portinnesti di pero (*Pyrus communis*) idonei per la moderna coltura del pero. Fra questi, va ricordato il programma di miglioramento genetico del Dipartimento di Colture Arboree dell'Università di Bologna, in corso già da diversi anni, che ha portato nel 1996 al licenziamento di due portinnesti clonali di pero denominati Fox 11 e Fox 16 caratterizzati da medio vigore (Quartieri *et al.*, 2008a) e più recentemente del Fox 9 (Quartieri *et al.*, 2008b).

Nel nostro paese, circa il 98% dei frutteti di Abate Fétel, la varietà più coltivata in Italia, sono innestati su cotogni (Musacchi, 2009). L'utilizzo di questi portinnesti presenta numerosi vantaggi agronomici fra i quali ricordiamo: la precoce entrata in produzione, la facilità di propagazione, una buona qualità dei frutti e il controllo del vigore che permette sia una migliore gestione dell'albero, sia un aumento della densità di piantagione (Musacchi, 2007). I cotogni, d'altra parte, presentano alcuni limiti individuabili principalmente nella sensibilità alla clorosi ferrica e nella disaffinità di innesto con varie cultivar che può causare una precoce senescenza dell'albero (Tagliavini e Rombolà, 2001).

Nuovi portinnesti di pero nanizzanti e con un positivo effetto sulla qualità del frutto potrebbero rappre-

\* sserra@agrsci.unibo.it

sentare un'interessante alternativa ai cotogni; attualmente i portinnesti clonali di pero sono moltiplicati *in vitro* sia per ridurre i tempi di ottenimento delle piante, sia per superare eventuali difficoltà di radicazione tipiche della propagazione convenzionale (Rugini *et al.*, 2009).

Obiettivo della prova era valutare le risposte di alcuni genotipi di pero, caratterizzati da ridotto vigore e da *habitus* compatto, nella fase di allungamento *in vitro* per poterli sperimentare come potenziali nuovi portinnesti per le varietà coltivate.

## Materiali e metodi

Il materiale vegetale di partenza per questo esperimento era costituito da una selezione di semenzali pero ottenuti per incrocio tra genotipi standard e ad *habitus* compatto, allevata presso la stazione sperimentale di Cadriano (Dipartimento di Colture Arboree dell'Università di Bologna). Da tali alberi sono stati espianati germogli primaverili (fig. 1a) ancora erbacei, sani e con un attivo apice meristematico (fig. 1b). I genotipi in prova sono stati identificati con un numero corrispondente alla pianta: 9, 12, 16, 22, 26. Alla fase di espianto *ex vitro* sono susseguiti vari passaggi di preparazione del materiale alla sterilizzazione, fra i quali la rimozione delle foglie dai migliori germogli scelti e il frazionamento di essi in porzioni uni-nodali di 1-1,5 cm (con forbici sterilizzate) (fig. 1 c-d). Gli internodi hanno subito un primo breve lavaggio in etanolo 70% per poi essere immersi in una soluzione 1% NaClO per 1 ora, agitando periodicamente. Da precedenti prove si era riscontrato che periodi di immersione degli internodi più brevi in tale soluzione non garantivano il raggiungimento della sterilità del materiale. Al termine di questo passaggio, si è potuto osservare una diversa risposta dei genotipi in prova al trattamento con ipoclorito di sodio; alcuni hanno riportato visibili necrosi alle estremità recise dell'internodo, ma, in media, tale durata si è dimostra-



Fig. 1 - Materiale vegetale di partenza da campo di semenzali di pero (a, b) e successivi step preparativi alla sterilizzazione (c, d).  
Fig. 1 - Original plant material from the field: a) one tree selection; b) detail of the shoot for explants; c-d) pre-sterilization step.

ta efficace per la sterilizzazione del materiale proveniente da campo. Successivamente, sono stati effettuati tre lavaggi in acqua sterile e l'asciugatura delle porzioni uni-nodali per 10 min in flusso d'aria sterile su carta assorbente. Gli espianati sterilizzati sono stati poi messi a dimora in tubi batteriologici contenenti un mezzo solido iniziale con Sali Quoirin Lepoivre (QL), citochinine (0,2 mg/l BAP) e giberelline (0,1 mg/l GA<sub>3</sub>) le quali favoriscono l'induzione al germogliamento della gemma ascellare (Baldini, 1986) presente nella porzione uni-nodale (fig. 2 a-b). Una volta ottenuti nuovi germogli dagli espianati di origine, essi sono stati ripuliti dalla porzione di internodo in eccesso e posizionati in un nuovo mezzo adatto alla moltiplicazione (fig. 2c). Tale mezzo era composto da: Sali QL 3,6 g/l, saccarosio 30 g/l, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·x4H<sub>2</sub>O 300 mg/l, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 200 mg/l, MgSO<sub>4</sub>·x7H<sub>2</sub>O 180 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 135 mg/l, BAP 0,5 mg/l, vitamine (Mioinositolo 100 mg/l, Piridossina 1 mg/l, Acido Nicotinico 1 mg/l, Tiamina 0,8 mg/l, Glicina 4 mg/l) con 7,5 g/l di Agar; il pH è stato aggiustato a 5,7.

Dopo una opportuna fase di moltiplicazione, durata il numero di subcolture necessarie ad ottenere un

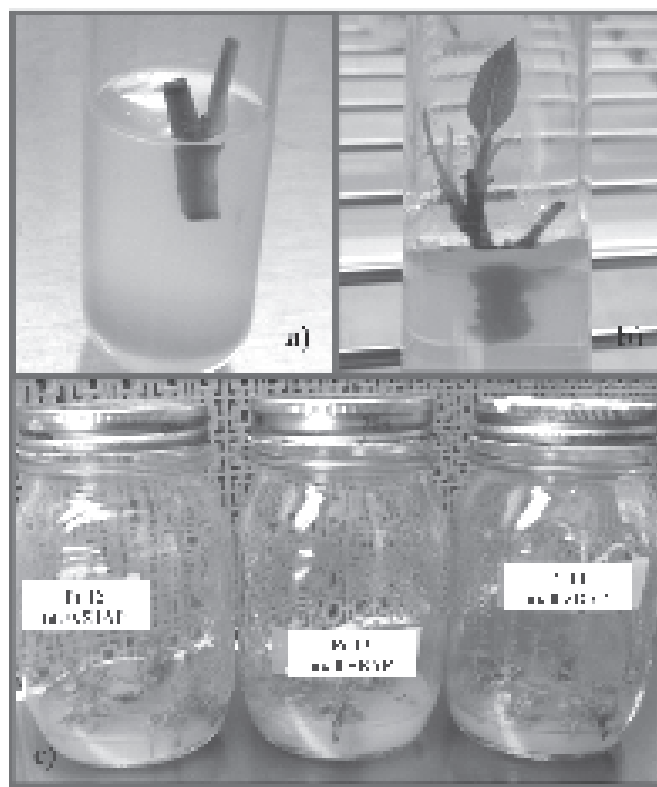


Fig. 2 - a) internodo appena sterilizzato con gemma ascellare chiusa posto in substrato di partenza con BAP+GA<sub>3</sub>, b) risposta dell'internodo dopo circa 10 gg, c) fase di moltiplicazione dei germogli del genotipo 12.

Fig. 2 - a) a sterilized explant (internode) with closed bud in the starting media with BAP+GA<sub>3</sub>, b) internode response after 10 days, c) multiplication phase of shoots (genotype 12).

numero idoneo di germogli, si è passati alla fase di allungamento. Tale passaggio chiave della micropropagazione di piante *in vitro* è stato oggetto di una sperimentazione allo scopo di valutare le migliori condizioni di allungamento per ciascun genotipo variando la concentrazione della citochinina nel mezzo. Il disegno sperimentale scelto è stato uno schema completamente randomizzato con 5 repliche per ciascuna dose di BAP (3 dosi testate) e per ciascun genotipo (5 genotipi studiati), ogni replica era rappresentata da un vaso con 5 germogli omogenei. Il mezzo di allungamento era simile a quello di moltiplicazione, variava solamente la concentrazione di BAP; le dosi testate sono state: 0,2, 0,5, 1,0 mg/l BAP. Al momento dell'installazione dei 5 germogli nel vaso è stato opportuno standardizzare la tipologia di germoglio da impiantare e il volume del mezzo. I criteri scelti sono stati: altezza iniziale del germoglio pari a 0,5 cm con 4 foglie e 30 ml di mezzo per vaso. Ogni germoglio è stato numerato per seguirne la crescita. Le condizioni colturali nel fitotrone sono state  $22 \pm 2$  °C con fotoperiodo 16 h di luce e 8 di buio.

Dopo circa 3 settimane, sono stati effettuati diversi rilievi quali l'altezza finale del germoglio principale (cm), il numero di foglie, il numero di internodi, il numero di nuovi germogli laterali e presenza/assenza di callo alla base del germoglio o nella parte aerea. Grazie a queste misurazioni è stato possibile ricavare la lunghezza media dell'internodo (cm) e calcolare l'accrescimento giornaliero (cm) di ciascun germoglio. I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente

secondo un disegno sperimentale a randomizzazione completa, mediate il software SAS (SAS Institute, Cary NC) per l'analisi della varianza e la successiva separazione delle medie (test SNK con  $\alpha = 0,05$ ).

## Risultati e discussione

Il genotipo che si è maggiormente accresciuto in fase di allungamento (a parità di altezza iniziale) è stato il 16, mentre il 22 ha riportato la minor crescita fra i 5 genotipi a confronto (tab. 1). In generale, le selezioni in prova hanno mostrato un aumento dell'altezza del germoglio principale all'aumentare della concentrazione di BAP, fino alla dose massima di 1 mg/L. Il genotipo 22 è risultato, in media, quello con il numero minore di germogli laterali (tab. 1). Il genotipo 16 si è distinto per i valori più elevati di: altezza media (finale) del germoglio principale, accrescimento giornaliero, numero medio di internodi e numero di germogli laterali (tab. 1). I genotipi 22, 9 e 26 hanno riportato i valori più bassi di accrescimento giornaliero (cm) (tab. 1). La lunghezza media dell'internodo è risultata più elevata nel genotipo 26. I genotipi 12 e 16 hanno registrato i valori più bassi di lunghezza internodi e simili fra loro (tab. 1). Per la maggior parte dei parametri analizzati e riportati in tabella 1, è emersa una elevata significatività dell'interazione genotipo x dose BAP che è stata esplicitata per singolo genotipo nelle figure 3 e 4, rispettivamente per l'accrescimento giornaliero e per la lunghezza media dell'internodo (per i restanti parametri non si è ritenuto

Tab. 1 - Misure effettuate in fase di allungamento dopo 3 settimane di coltura sui germogli (germ.) dei 5 genotipi in prova allevati con 3 diverse dosi di citochinina (BAP).

Tab. 1 - *Elongation phase measurements, after 3 weeks of culture, carried out on all shoots of the 5 genotypes grown on 3 different BAP concentrations.*

Genotipo	Altezza germ. princ. (cm)	Accrescimento /gg (cm)	N foglie su germ. princ.	N internodi su germ. princ.	N nuovi germ. laterali	Lunghezza media internodo (cm)
9	2,33 c	0,08 c	14,37 b	4,12 c	0,93 b	0,58 bc
12	2,62 b	0,10 b	15,97 a	4,89 b	1,19 b	0,54 c
16	2,97 a	0,11 a	11,17 c	5,87 a	1,59 a	0,52 c
22	2,06 d	0,07 c	11,92 c	3,48 d	0,44 c	0,64 b
26	2,44 bc	0,09 c	11,97 c	2,85 e	0,72 bc	0,88 a
Signif. genotipo	***	***	***	***	***	***
BAP dose mg/l	Altezza germ. princ. (cm)	Accrescimento /gg (cm)	N foglie su germ. princ.	N internodi su germ. princ.	N nuovi germ. laterali	Lunghezza media internodo (cm)
0,2	2,20 c	0,08 c	11,92 c	3,42 c	0,09 c	0,69 a
0,5	2,40 b	0,09 b	14,45 a	3,90 b	0,78 b	0,65 a
1,0	2,78 a	0,10 a	12,88 b	5,41 a	2,06 a	0,56 b
Signif. BAP	***	***	***	***	***	***
Signif. Gen X BAP	**	***	***	***	*	NS (5,5%)

All'interno di ogni colonna, i valori medi seguiti dalla stessa lettera minuscola non differiscono statisticamente fra loro secondo il test SNK ( $p=0,05$ ). Significatività: \*= $p<0,05$ , \*\*= $p<0,01$ , \*\*\*= $p<0,001$ , NS= non significativo.

to necessario mostrare i dettagli dell'interazione). Dall'interazione genotipo x dose BAP, è emerso che tutti i genotipi, ad eccezione del 12, hanno registrato un accrescimento giornaliero (cm) maggiore nel substrato con dose 1,0 mg/l BAP (fig. 3). Il confronto fra le dosi, in termini di lunghezza media dell'internodo, ha mostrato che in generale la concentrazione di 1,0 mg/l BAP ha comportato un significativo accorciamento dell'internodo per i genotipi 9, 12 e 16, mentre per il 22 e il 26 non sono state riscontrate differenze significative fra le dosi (fig. 4). Inoltre, la selezione 12 ha mostrato, durante il periodo di allungamento, la tendenza a produrre callo alla base del germoglio in misura significativamente maggiore rispetto agli altri genotipi a confronto (dati non riportati). In generale, si è osservato, che l'aumento di concentrazione di BAP porta ad una maggiore incidenza nella formazio-

ne di callo (dallo 0 al 7% passando da 0,2 a 1,0 mg/l BAP), come già sottolineato da Damiano *et al.* (2007). Skirvin (1984) ha riportato come la formazione di callo sia antagonista della proliferazione dei germogli.

### Conclusioni

Il parametro lunghezza media dell'internodo ha fornito una possibile indicazione, da verificare in campo, sul potenziale vigore del genotipo 26 che è risultato quello meno compatto, confermando le osservazioni fatte sulla pianta madre (dati non riportati). Il numero di germogli basali è risultato molto elevato per il genotipo 16 che presenta quindi una buona capacità di moltiplicazione *in vitro*. Questa attitudine lo rende un potenziale portinnesto per il pero, specialmente se le caratteristiche agronomiche del materiale innestato dovessero risultare positive. I dati sopra discussi costituiscono dei risultati preliminari che, comunque, hanno consentito di proseguire le ricerche con le successive fasi di radicazione e ambientamento, attualmente in corso e che proseguiranno con la valutazione in campo dei vari genotipi.

### Riassunto

Questo studio è finalizzato alla moltiplicazione di genotipi di pero, caratterizzati da un ridotto vigore e da un habitus compatto, da poter utilizzare come nuovi portinnesti per le varietà coltivate. Il comportamento *in vitro* di nuovi genotipi di pero (denominati 9, 12, 16, 22, 26), è stato valutato in fase di allungamento. Gli internodi, espuntati dagli alberi più interessanti, sono stati sterilizzati e messi in coltura. Dopo una prima fase di moltiplicazione, i germogli sono stati trapiantati su mezzi di allungamento con 3 differenti concentrazioni di citochinina (0,2 - 0,5 - 1,0 mg/L BAP). Il genotipo 16 ha mostrato una buona attitudine alla moltiplicazione *in vitro* e il 26 un elevato valore di lunghezza media dell'internodo.

**Parole chiave:** *Pyrus communis*, elongazione, miglioramento genetico.

Ricerca *in vitro* parzialmente finanziata dall'ente di istruzione superiore in Brasile (CAPES) con programma all'estero EDITAL DRI/CGBE n.13/2009.

### Bibliografia

BALDINI E., 1986. *Arboricoltura generale*. Editrice CLUEB (Bologna), pp. 1-402.  
 DAMIANO C., LUCCHESI B., FRATTARELLI A., 2007. *Propagazione e conservazione in vitro di cultivar di vite (Vitis vinifera L.)*

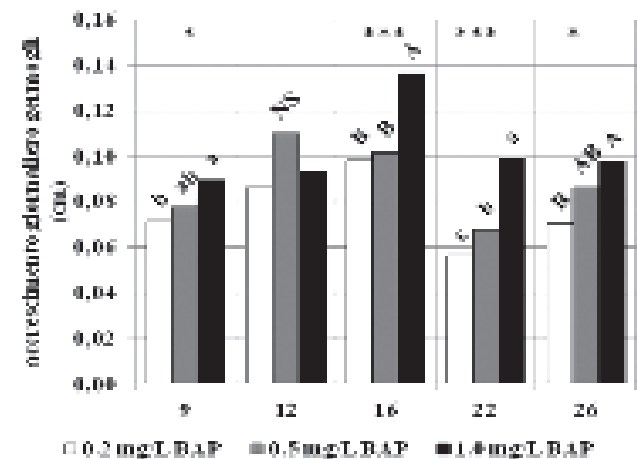


Fig. 3 - Accrescimento giornaliero dei germogli (cm): confronto fra le concentrazioni di BAP per ogni genotipo.  
 Fig. 3 - Shoots growth/day (cm): comparison among BAP concentrations for each genotype.

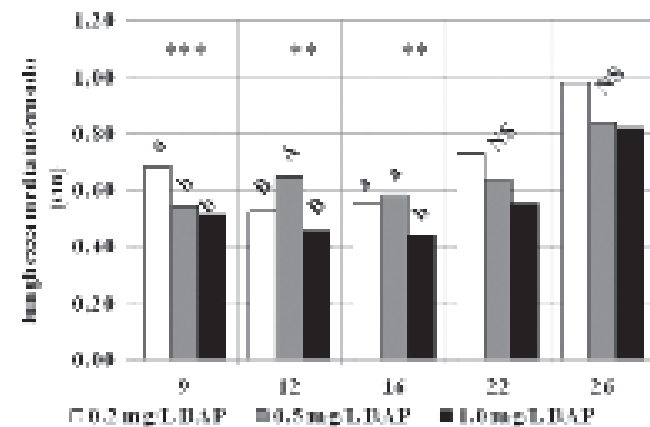


Fig. 4 - Lunghezza media internodo dopo 3 settimane: confronto fra le concentrazioni di BAP per ogni genotipo.  
 Fig. 4 - Average internode length after 3 weeks: comparison among BAP concentrations for each genotype.

- autoctone al fine di allestire una collezione di materiale.* Rivista di viticoltura e di enologia, 4: 144-154.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU A.E., 2010. *La propagazione in vitro dei portinnesti e delle specie da frutto.* Rivista di frutticoltura e ortofloricoltura, 12: 18-25.
- MUSACCHI S., 2007. *Le scelte dell'agricoltore per l'impianto del pero.* L'informatore agrario, 43: 37-40.
- MUSACCHI S., 2009. *Training systems & orchard management for Southern European pear orchards.* The Compact Fruit Tree, 42(3): 16-19.
- QUARTIERI M., SCHIOVON L., TAGLIAVINI M., BASSI D., MARANGONI B., 2008a. *Nuove selezioni di portinnesti clonali di pero.* Italus Hortus, 15(6): 27-35.
- QUARTIERI M., MARANGONI B., TAGLIAVINI M., BASSI D., SCHIAVON L., GIANNINI M., PREVIATI A., 2008b. *Fox 9, nuovo portinnesto per il pero europeo.* Frutticoltura, 10: 52-54.
- RAZDAN M.K., 2003. *Introduction of Plant Tissue Culture.* Science Publisher, Inc., Enfield, NH, (USA), pp.1-252.
- RUGINI E., GUTIÉRREZ PESCE P., CRISTOFORI V., 2009. *La micro-propagazione di specie da frutto: stato attuale e prospettive.* Italus Hortus, 16(2): 15-20.
- SKIRVIN R.M., 1984. *Stone fruit.* In: Hand book of Plant Cell Culture v. III, Macmillia Publishing Company NY, pp.402-452.
- TAGLIAVINI M., ROMBOLÀ A.D., 2001. *Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems.* Eur. J. Agron., 15:71-92.
- ZIMMERMAN, R.H., 1981. *Micropropagation of Fruit Plants.* Acta Hort. 120: 217-222.



## Effetto di derivati dell'urea sulla radicazione avventizia *in vitro* di micro-talee micropropagate di corbezzolo

Federica Brunoni<sup>1\*</sup>, Enrico Rolli<sup>1</sup>, Matteo Incerti<sup>2</sup>, Barbara Ruffoni<sup>3</sup> e Ada Ricci<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma

<sup>2</sup> Dipartimento Farmaceutico, Università di Parma

<sup>3</sup> CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

### Effect of urea derivatives on the *in vitro* adventitious rooting of strawberry tree microcuttings

**Abstract.** Adventitious roots are post-embryonic roots which arise from non-pericycle tissue in stem and leaves. Adventitious rooting is a key step in vegetative propagation of plants, as it is a prerequisite for the successful production of viable clones. Many environmental and endogenous factors, such as temperature, light conditions, hormones and tissue maturity, may affect adventitious root formation. Auxin has been shown to be intimately involved in the process of adventitious rooting. In fact, exogenous auxin application may stimulate this process in those cuttings in which it does not occur naturally. But, sometimes, auxin alone cannot reduce the woody plant recalcitrance and does not allow to achieve a high quality root system. Many efforts have been made to enhance rooting, investigating the effect of other natural or synthetic molecules. Two urea derivatives, the N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl) urea and the 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl) urea, that do not show any biological activity *per se*, can act as adventitious rooting adjuvants in several rooting systems. Here we report the effect of these compounds in recalcitrant strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) microcuttings. Our results confirm the activity of these two compounds as enhancers of *in vitro* adventitious rooting process, in the simultaneously presence of exogenous auxin.

**Key words:** auxin, micropropagation, *Arbutus unedo*.

### Introduzione

La propagazione vegetativa è ampiamente usata in frutticoltura, orticoltura, nel settore delle ornamentali e in silvicoltura per la moltiplicazione di piante

selezionate da popolazioni naturali o ottenute per mezzo di programmi di *breeding*. La formazione di radici avventizie è un passaggio fondamentale per la propagazione vegetativa di specie di interesse sia *in vivo* che *in vitro*. La capacità di formare spontaneamente radici avventizie varia considerevolmente tra le specie vegetali, infatti vengono distinte piante facilmente radicanti e piante difficili da radicare. Generalmente le specie legnose presentano maggiori difficoltà nella produzione di radici avventizie rispetto a quelle erbacee (Hackett, 1988). Le radici avventizie possono originare da fusto e foglie naturalmente o sotto condizioni di stress ambientale (Li *et al.*, 2009). Esistono almeno due modi con cui le radici avventizie possono formarsi: per mezzo di una organogenesi diretta (ad esempio, a partire da cellule del cambio) oppure da tessuto calloso che si forma a seguito di un danno meccanico. La temperatura, la luce, i regolatori di crescita, il livello di maturità del tessuto sono solo alcuni dei molteplici fattori ambientali ed endogeni che inducono e regolano questo processo. I regolatori di crescita possono agire direttamente sulla pianta oppure indirettamente, interagendo tra loro o con molecole di tipo diverso (Pop *et al.*, 2011). Tra i regolatori di crescita, le auxine giocano un ruolo essenziale nel processo di radicazione avventizia. Il solo trattamento con auxine, però, non è sempre in grado di stimolare la formazione di un apparato radicale funzionale negli espianti così trattati. Infatti, pur variandone il tipo, la concentrazione e i tempi di somministrazione, è possibile osservare una crescita anomala delle radici oppure la produzione di un numero di radici così ridotto da non permettere un adeguato sviluppo dell'organismo micropropagato. Risulta quindi di particolare interesse la ricerca e lo studio di composti in grado di coadiuvare l'auxina nella formazione di radici avventizie.

Da alcuni anni il nostro gruppo di ricerca ha identificato alcune molecole ureidiche che, pur non manifestando né un'attività auxino-simile né citochinino-

\* federica.brunoni@nemo.unipr.it

simile propria, sono in grado di favorire la formazione di radici avventizie quando somministrate in presenza di auxina, anche in piante filogeneticamente distanti (Ricci *et al.*, 2006; 2008). In questo lavoro si è voluto saggiare l'effetto di due derivati simmetrici della urea, la N,N'-bis-(2,3-metilenediossifenil)urea (2,3-MDPU) e la 1,3-di(benzo[*d*]ossazol-5-il)urea (5-BDPU) (fig. 1) in presenza di auxina esogena, sulla radicazione avventizia *in vitro* di microtalee di corbezzolo.

Il corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) è una specie sclerofilla sempreverde appartenente alla famiglia delle *Ericaceae*, nativa del bacino mediterraneo e diffusa fino alle coste meridionali d'Irlanda. È particolarmente apprezzata per scopi alimentari (miele e confetture) e per scopi medicinali (i tannini delle foglie hanno proprietà astringenti e diuretiche, i composti fenolici delle foglie e dei frutti ne permettono un impiego come antisettico urinario). Questa specie ha inoltre un alto valore ornamentale e viene spesso inclusa nei programmi di rimboschimento, grazie alla sua capacità di reazione agli incendi e al suo contributo nel consolidamento di terreni scoscesi. La propagazione di piante di corbezzolo selezionate, perciò, risulta essere di particolare importanza. Per il mantenimento delle caratteristiche selezionate si preferisce la propagazione vegetativa a quella via seme. La propagazione vegetativa è possibile mediante la radicazione di talee o per mezzo della micropropagazione (Gomes e Canhoto, 2009) ma la frequenza di radicazione dei cuttings rimane piuttosto bassa (Mereti *et al.*, 2002).

## Materiali e metodi

I due composti, la N,N'-bis-(2,3-metilenediossifenil)urea (2,3-MDPU) e la 1,3-di(benzo[*d*]ossazol-5-il)urea (5-BDPU)

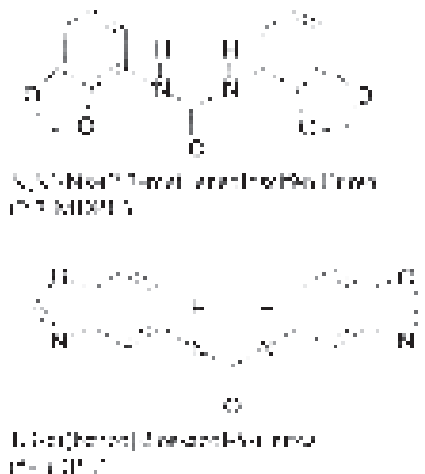


Fig. 1 - Struttura chimica dei derivati dell'urea utilizzati.  
Fig. 1 - Molecular structure of the urea derivatives used.

il)urea (5-BDPU) sono stati sintetizzati dal Dipartimento Farmaceutico dell'Università degli Studi di Parma (Ricci *et al.*, 2001; 2006) ed erano di grado analitico. I due composti sono stati disciolti in dimetilsolfossido (DMSO). La quantità di solvente presente nel terreno di coltura utilizzato nelle prove di radicazione, non supera lo 0,2% del volume totale, quindi non risulta essere tossico per i tessuti vegetali (Schmitz e Skoog, 1970). L'acido indol-3-butirrico (IBA) è stato disciolto in acqua e la soluzione così ottenuta è stata successivamente sterilizzata per filtrazione impiegando filtri monouso con pori di 0,22  $\mu\text{m}$ , mentre la zeatina riboside (ZR) è stata disciolta in 70% etanolo.

Le colture asettiche di corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) sono state fornite gentilmente dall'Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali, CRA-FSO di Sanremo (Mascarello *et al.*, 2009). Gli espianti *in vitro* privati dell'apice e di due foglie basali sono stati propagati ogni sei settimane in terreno di micropropagazione (MP), composto da sali MS (Murashige e Skoog, 1962), 2 mg l<sup>-1</sup> glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> myo-inositolo, 0,5 mg l<sup>-1</sup> acido nicotinico, 0,5 mg l<sup>-1</sup> piridossina HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> tiamina HCl, 30 g l<sup>-1</sup> saccarosio, 0,8 % Phyto Agar (Duchefa) a 5,8 pH, sterilizzato in autoclave a 121 °C per 21 minuti. Una volta sterilizzato il terreno MP era addizionato con 2,88  $\mu\text{M}$  ZR. Trascorse le sei settimane di coltura i germogli più sviluppati, privati di due foglie basali e del callo, sono stati utilizzati per due set di esperimenti di radicazione. Per il primo set di esperimenti, gli espianti sono stati collocati singolarmente in provettoni di vetro sterili contenenti 15 ml ciascuno di terreno MP, in presenza di 10  $\mu\text{M}$  IBA oppure di miscele di 10  $\mu\text{M}$  IBA e 1  $\mu\text{M}$  2,3-MDPU o 10  $\mu\text{M}$  IBA e 10  $\mu\text{M}$  5-BDPU per 3 giorni al buio. Successivamente sono stati trasferiti in provettoni sterili contenenti terreno MP privo di regolatori di crescita, alla luce (vedi condizioni di illuminazione sotto indicate), fino alla fine dell'esperimento. Per il secondo set di esperimenti, gli espianti sono stati trattati con 10  $\mu\text{M}$  IBA oppure con la miscela 10  $\mu\text{M}$  IBA e 10  $\mu\text{M}$  5-BDPU per 7 giorni al buio; successivamente sono stati trasferiti in provettoni contenenti terreno MP privo di regolatori di crescita, alla luce (vedi condizioni di illuminazione sotto indicate), fino alla fine dell'esperimento. L'effetto sullo sviluppo di radici avventizie di microtalee di corbezzolo dei soli composti oggetto di studio è stato verificato addizionando al terreno MP 1  $\mu\text{M}$  2,3-MDPU per 3 giorni o 10  $\mu\text{M}$  5-BDPU per 3 e 7 giorni al buio. Successivamente le microtalee sono state trasferite in provettoni sterili contenenti terreno MP privo di regolatori di crescita, alla luce (vedi con-

dizioni di illuminazione sotto indicate), fino alla fine dell'esperimento. Le condizioni della cella climatica durante le fasi di micropropagazione e di radicazione degli espianti sono state impostate a  $24 \pm 1$  °C e 16 ore di fotoperiodo con irradiazione di  $27 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Per le fasi di induzione alla radicazione di 3 e 7 giorni i provettoni contenenti gli espianti sono stati incubati in cella climatica alle stesse condizioni sopra descritte ma al buio. Il primo set di esperimenti è stato svolto in cinque repliche per un totale di 45 piantine utilizzate per ciascun trattamento. Per il secondo set di esperimenti sono state allestite cinque repliche utilizzando complessivamente 50 piantine per trattamento. Il differente numero di espianti utilizzati per i due set di esperimenti è da attribuire a una variabilità nel numero di espianti micropropagati disponibili per gli esperimenti al termine delle sei settimane di subcoltura.

La capacità della 2,3-MDPU e della 5-BDPU di migliorare la radicazione avventizia in miscela con IBA è stata valutata dopo 4 settimane dall'inizio degli esperimenti, sotto forma di (i) percentuale di espianti radicati e (ii) numero medio di radici avventizie per espianto radicato. I valori così ottenuti sono stati analizzati statisticamente con il test non parametrico di Mann-Whitney utilizzando il programma SPSS statistics 17.0.

## Risultati e discussione

La produzione di radici di microcuttings di *Arbutus unedo* L. può essere ottenuta sia con IBA che con acido indol-3-acetico (IAA) (Mereti *et al.*, 2002; Gomes e Canhoto, 2009). Pur avendo una struttura chimica analoga, IBA, generalmente, è preferito nell'indurre la radicazione di molte specie rispetto a IAA

e la sua applicazione alle talee risulta essere più efficace. Si ipotizza che ciò sia attribuibile al fatto che IBA mostra una maggiore stabilità al catabolismo rispetto ad IAA (Bartel *et al.*, 2001). Gli espianti di corbezzolo utilizzati per le prove di radicazione, in assenza di auxina esogena non sono in grado di sviluppare alcuna radice. Risultati analoghi sono stati ottenuti trattando gli espianti con i composti in esame da soli (dati non mostrati). Presumibilmente il quantitativo di auxina endogena contenuto nelle microtalee di corbezzolo non è sufficiente per interagire con i composti oggetto di studio al fine di dirigere la formazione di radici avventizie. La 2,3-MDPU e la 5-BDPU infatti non mostrano alcun tipo di attività auxino-simile *per se* ma possono cooperare nella formazione di radici avventizie sia con auxina endogena che esogena (Ricci e Bertolotti, 2009).

Nel presente studio, perciò, è stato verificato l'effetto dei composti in esame somministrandoli in simultanea presenza di IBA. La 2,3-MDPU e la 5-BDPU sono state saggiate alle concentrazioni di  $1 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$ , rispettivamente. Le due molecole infatti presentano una diversa "forza" nel coadiuvare l'auxina durante la formazione di radici avventizie (Ricci *et al.*, 2003; 2006). Espianti trattati con solo IBA alla concentrazione di  $10 \mu\text{M}$  sono stati utilizzati come condizione di controllo. In un primo set di esperimenti espianti di corbezzolo micropropagati *in vitro* sono stati posti a contatto con una miscela costituita da  $10 \mu\text{M}$  IBA e i composti in esame per 3 giorni. A seguito del trattamento con  $10 \mu\text{M}$  IBA e  $1 \mu\text{M}$  2,3-MDPU è stato possibile ottenere il 79,48 % di espianti radicati (tab. 1). Questo valore è risultato significativamente diverso rispetto alla percentuale di espianti radicati ottenuta in presenza di solo IBA (53,52 %). Il numero

Tab. 1 - Effetto di miscele di  $10 \mu\text{M}$  acido indol-3-butirrico (IBA) +  $1 \mu\text{M}$  N,N'-bis-(2,3-metilenediossifenil)urea (2,3-MDPU) e  $10 \mu\text{M}$  IBA +  $10 \mu\text{M}$  1,3-di(benzo[d]ossazol-5-il)urea (5-BDPU) sulla radicazione avventizia di espianti micropropagati di corbezzolo per tempi di trattamento diversi. Espianti trattati con  $10 \mu\text{M}$  IBA da solo per 3 o 7 giorni rispettivamente sono stati utilizzati come controllo. I risultati sono espressi in termini di percentuale di espianti radicati e di numero medio di radici prodotte per espianto radicato  $\pm$  errore standard (n=5). \* Differenza significativa stimata con test di Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Tab. 1 - Effect of the mixtures made by  $1 \mu\text{M}$  N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea (2,3-MDPU) or  $10 \mu\text{M}$  1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea (5-BDPU) plus  $10 \mu\text{M}$  indole-3-butyric acid (IBA) on adventitious rooting of strawberry tree microcuttings for 3 or 7 days. Microcuttings cultured in the presence of only  $10 \mu\text{M}$  IBA for 3 or 7 days respectively were used as control. Results are expressed as percentage of rooted microcuttings and average number of adventitious roots per rooted cutting  $\pm$  standard error (n=5). \* Significantly different from the control (Mann-Whitney test) ( $p < 0.05$ ).

Condizione	Percentuale degli espianti radicati	N. medio di radici per espianto radicato
3 giorni di trattamento		
10 $\mu\text{M}$ IBA	53,52	$4,68 \pm 0,77$
10 $\mu\text{M}$ IBA + 1 $\mu\text{M}$ 2,3-MDPU	79,48*	$4,73 \pm 0,63$
10 $\mu\text{M}$ IBA + 10 $\mu\text{M}$ 5-BDPU	60,35	$3,72 \pm 0,62$
7 giorni di trattamento		
10 $\mu\text{M}$ IBA	60,73	$3,10 \pm 0,69$
10 $\mu\text{M}$ IBA + 10 $\mu\text{M}$ 5-BDPU	59,73	$4,23 \pm 1,15$

medio di radici per espianto ottenuto con questa miscela non si differenzia da quello del controllo (tab. 1). Il valore di percentuale di espianti radicati e il numero medio di radici avventizie ottenuti somministrando alle microtalee la miscela costituita da 10  $\mu$ M IBA e 10  $\mu$ M 5-BDPU per 3 giorni non risultano essere differenti rispetto al controllo con solo IBA (tab. 1). Dal momento che il trattamento con la miscela 10  $\mu$ M IBA e 10  $\mu$ M 5-BDPU per 3 giorni non ha mostrato l'effetto migliorativo atteso, è stato allestito un secondo set di esperimenti solo con questo trattamento con il quale si è voluto verificare l'azione della 5-BDPU in presenza di 10  $\mu$ M IBA aumentando il tempo di trattamento a 7 giorni. Anche a 7 giorni la percentuale di espianti radicati ottenuta con la miscela è simile a quella ottenuta dal controllo con il solo IBA e il numero medio di radici prodotte, seppur più elevato, non è risultato significativamente diverso da quello ottenuto a seguito del trattamento controllo con solo IBA (tab. 1).

## Conclusioni

I dati riportati dimostrano che nelle nostre condizioni sperimentali, in simultanea presenza con IBA, la 2,3-MDPU migliora la radicazione avventizia di microcuttings di corbezzolo, senza sostituirsi all'auxina nell'indurre la radicazione avventizia, al contrario potenziandone l'attività radicante. Relativamente a questo aspetto, la 2,3-MDPU potrebbe favorire una distribuzione dell'auxina localizzata a livello di quelle cellule naturalmente sensibili all'auxina, oppure potrebbe aumentare la sensibilità di queste stesse cellule alla sua azione rizogena. Sono in corso studi per ottenere dati sperimentali a supporto di una di queste ipotesi. Al contrario, diversamente da quanto precedentemente pubblicato (Ricci *et al.*, 2006), non è stato possibile dimostrare un simile effetto migliorativo della radicazione avventizia da parte dell'altro derivato ureidico utilizzato, la 5-BDPU. Al momento sono in corso ulteriori prove sperimentali al fine di individuare, ove possibile, le concentrazioni e i tempi di somministrazione della miscela costituita da 5-BDPU e IBA, adeguati al miglioramento della radicazione avventizia di microcuttings di corbezzolo.

## Riassunto

La radicazione avventizia è un passaggio chiave della propagazione vegetativa di specie di interesse forestale, frutticolo, orticolo e ornamentale. Questo processo può essere stimolato mediante l'applicazione esogena di auxina ma il solo trattamento con auxine

non è sempre in grado di stimolare la formazione di un apparato radicale funzionale. In questo lavoro è stato indagato l'effetto sulla radicazione di due derivati ureidici di sintesi, coadiuvanti la radicazione avventizia, *N,N'*-bis-(2,3-metilenediossifenil)urea e 1,3-di(benzo[*d*]ossazol-5-il)urea, in microtalee recalcitranti di *Arbutus unedo* L.

**Parole chiave:** auxina, micropropagazione, *Arbutus unedo*.

## Bibliografia

- BARTEL B., LECLERE S., MAGIDIN M., ZOLMAN B., 2001. *Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation*. J. Plant Growth Regulation, 20: 198-216.
- GOMES F., CANHOTO J. M., 2009. *Micropropagation of strawberry tree (Arbutus unedo L.)*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 45:72-82.
- HACKETT W.P., 1988. *Donor plant maturation and adventitious root formation*. In: Davies, Haissig, Sankhla eds., *Adventitious Root Formation in Cuttings*, Dioscorides (Portland): 11-28.
- LI S. W., XUE L., XU S., FENG H., AN L., 2009. *Mediators, Genes and Signalling in Adventitious Rooting*. Bot. Rev., 75: 230-247.
- MASCARELLO C., SACCO E., DI SILVESTRO D., RUFFONI B., 2009. *La micropropagazione del corbezzolo*. Atti IV convegno nazionale piante mediterranee. Nova Siri Marina (MT), 7-10 ottobre 2009: 322-327.
- MERETI M., GRIGORIADOU K., NANOS G. D., 2002. *Micropropagation of the strawberry tree, Arbutus unedo L.* Scientia Horticulturae, 93: 143-148.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant, 15: 473-497.
- POP T. I., PAMFIL D., BELLINI C., 2011. *Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots*. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj., 39(1): 307-316.
- RICCI A., BERTOLETTI C., 2009. *Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure*. Plant Biology, 11: 262-272.
- RICCI A., CARRA A., ROLLI E., BERTOLETTI C., BRANCA C., 2003. **N,N'*-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and *N,N'*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea interact with auxin in enhancing root formation of M26 apple (Malus pumila Mill.) stem slices*. Plant Growth Regul., 40: 207-212.
- RICCI A., CARRA A., TORELLI A., MAGGIALI A. C., MORINI G., BRANCA C., 2001. *Cytokinin-like activity of *N,N'*-diphenylureas. *N,N'*-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and *N,N'*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (Malus pumila Mill.)*. Plant Science, 160: 1055-1065.
- RICCI A., INCERTI M., ROLLI E., VICINI P., MORINI G., COMINI M., BRANCA C., 2006. *Diheteroarylurea derivatives as adventitious rooting adjuvants in mung bean shoots and M26 apple rootstock*. Plant Growth Regul., 50: 201-209.
- RICCI A., ROLLI E., DRAMIS L., DIAZ-SALA C., 2008. **N,N'*-bis-(2,3-Methylenedioxyphenyl)urea and *N,N'*-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious rooting in Pinus radiata and affect expression genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin*. Plant Science, 175: 356-363.
- SCHMITZ R.Y., SKOOG F., 1970. *The use of dimethylsulfoxide as a solvent in the tobacco bioassay for cytokinins*. Plant Physiol., 45: 537-538.

## *Echinacea angustifolia* var. *angustifolia*. Ottenimento di piantine da *in vitro* partendo da radice

Alessandro Carlini\* e Fabrizio Scartezzini

CRA-MPF Unità di Ricerca per il Monitoraggio e la Pianificazione Forestale, Villazzano di Trento (TN)

### **In vitro shoots production from *Echinacea angustifolia* var. *angustifolia* root**

**Abstract.** This paper discusses the tests carried out to develop a protocol for quickly obtaining clones of *Echinacea angustifolia*, starting from roots of plants previously selected for a breeding program. To this aim root portions, 3-4 cm long, were carefully washed with distilled water having previously been placed in microbiological tubes in a climatic chamber (24 °C, 16 hours light) for 20 days. To sterilize the shoots two products were tested: sodium hypochlorite (1.3% v/v) and Virkon (1% w/v). The mean rate of the roots pieces with shoot was equal to 55% and the mean number of shoot per piece was 2.5. No significant differences was noticed between the disinfectants used.

**Key words:** adventitious shoots, micropropagation, narrow-leaved coneflower, sterilization.

### **Introduzione**

Il genere *Echinacea* (Asteraceae), il cui areale è nord americano, comprende nove specie e due varietà botaniche. Le specie utilizzate come piante medicinali sono: *E. purpurea* L. (Moench.), di cui è utilizzata la parte aerea ed in misura minore radici, *E. pallida* Nutt. (Nutt.) ed *E. angustifolia* DC. var. *angustifolia*, di cui sono utilizzate principalmente le radici (McGregor, 1968).

*Echinacea angustifolia* DC. var. *angustifolia* presenta apparato radicale fittonante e steli semplici o ramificati, alti 20-50 cm. Le foglie sono lineari-lanceolate, con margine intero, provvisti di peli ispidi, con 3-5 nervature (McGregor, 1968).

In virtù delle sue proprietà immunostimolanti, antiinfiammatorie, antivirali e antiossidanti le sue radici sono impiegate in vari preparati erboristi o fitoterapici, nella prevenzione delle malattie da raffreddamento e delle affezioni delle vie respiratorie superiori (Bauer, 1990).

Vari lavori di micropropagazione del genere *Echinacea* riportati in letteratura hanno utilizzato, come materiale di partenza per la coltura *in vitro*, sia parti epigee (steli, foglie, gemme ascellari, ecc.) sia semi (Harbage, 2001; Lakshmanan *et al.*, 2002). L'impiego di espunti da parti epigee si è rilevato non soddisfacente a causa delle difficoltà incontrate nell'ottenere colture aseptiche. L'inoculo del seme ha ovviato tale difficoltà, tuttavia, la variabilità del genotipo non permette la clonazione degli individui ricercati per le selezionate caratteristiche. In precedenti lavori condotti presso il nostro istituto è stata osservata la capacità di questa specie di emettere germogli avventizi da porzioni di radice (Scartezzini, com. per.). Pertanto con il presente lavoro, che costituisce parte integrante di un programma di miglioramento genetico in corso presso il nostro istituto su questa specie, si è voluto sfruttare questa capacità riproduttiva per sviluppare un efficiente protocollo di micropropagazione che possa mettere in grado di ottenere cloni da genotipi, selezionati per l'alto contenuto di echinacoside, ed utilizzabili in successivi programmi di miglioramento genetico finalizzati ad ottenere varietà ad elevato contenuto in principio attivo e con buone caratteristiche agronomiche.

### **Materiale e metodi**

#### *I<sup>a</sup> fase*

Il materiale di partenza è stato prelevato da due accessioni di origine canadese identificate con JA2 e JA9. In luglio 2011 sono state prelevate le radici di 5 piante madri al 5° anno di allevamento. Le piante madri sono state allevate in pieno campo, presso l'azienda sperimentale del CRA-MPF, ad un'altitudine di 360 m s.l.m., con sesto d'impianto di 0,30 m sulla fila e 0,5 m tra le file; il terreno di coltivazione è di tipo franco-limoso, con pH 7,9, calcareo con tracce di calcare attivo. Tali radici sono state sottoposte ad un lavaggio preliminare di 12 ore in acqua corrente e successivamente sezionate in pezzi di 3-4 cm. Poi ogni porzione è stata lavata ancora due volte con acqua distillata e posta in tubi microbiologici contenuti 2 ml di acqua distillata, per un tempo di 20 giorni. Il limite

\* alessandro.carlini@entecra.it

massimo di venti giorni è stato adottato per la presenza di contaminazioni fungine all'interno dei tubi microbiologici, riscontrata a partire dal diciannovesimo giorno di incubazione. Per la formazione dei germogli è stata effettuata una incubazione in camera di crescita a 24 °C, con un ciclo di luce di 16 ore e PAR 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Per questa prova sono stati confrontati, per ognuna delle 5 piante madri testate, 15 espianti posti singolarmente in tubi microbiologici. A partire dal settimo giorno di incubazione e fino al ventesimo, è stato rilevato il numero di porzioni radicali che avevano sviluppato germogli avventizi, il numero di germogli per porzione radicale e presenza di contaminazioni delle porzioni di radice. Al momento del prelievo dei germogli è stato rilevato il numero di germogli prodotti per ogni porzione radicale. Il prelievo dei germogli è stato effettuato sotto cappa a flusso laminare, con dimensione dei germogli compresa tra 0,5 e 1,5 cm. Le operazioni di espianto sono state eseguite separatamente per ogni porzione radicale, sterilizzando il piano di lavoro tramite raggi UV alla fine di ogni operazione in modo da evitare contaminazioni.

### 2<sup>a</sup> fase

La seconda parte della prova ha riguardato gli espianti testando due prodotti disinfettanti: Virkon (Antec International Ltd. p.a.): complesso potassio perossimonosolfato ( $2\text{KHSO}_5 \text{ KHSO}_4 \text{ K}_2\text{SO}_4$ : 49,8% p/p) all'1% (p/v) ed ipoclorito di sodio all'1,3% (v/v), più il testimone non disinfettato. Si è optato per la presenza del testimone di controllo per verificare l'effettivo stato di contaminazione del materiale vegetale da inoculare in vitro. La sterilizzazione è stata eseguita mediante immersione del germoglio per 12 minuti nella soluzione disinfettante, tenuta in agitazione, cui sono seguiti due lavaggi in acqua sterilizzata per 10 minuti. Per il test di confronto si è proceduto con i soli due lavaggi di 10 minuti in acqua sterile. Ogni germoglio è stato poi trasferito in tubi microbiologici contenenti substrato colturale di Murashige e Skoog (Murashige *et al.*, 1962; Murashige, 1974) con concentrazione degli ormoni pari a: 0,6 mg/l BAP; 0,06 mg/l  $\text{GA}_3$ ; 0,3 mg/l IAA, e preventivamente sterilizzato in autoclave alla temperatura di 121 °C per 20 minuti. Ciascun trattamento disinfettante e il test di controllo erano composti da 15 germogli, prelevati a random da tutte le porzioni di radice che avevano precedentemente prodotto germogli in fase di incubazione, ad esclusione delle porzioni di radice fortemente contaminate, posti separatamente in tubi microbiologici. Gli espianti trasferiti su substrato sono stati posizionati in cella climatica alle medesime condizioni indicate sopra. Su questi germogli è stato rilevato per

20 giorni il numero di germogli infetti e calcolata la percentuale degli stessi. I rilievi sono stati interrotti al ventesimo giorno in quanto al ventunesimo giorno è stato effettuato il trasferimento degli stessi su substrato fresco e questo comportava un'ulteriore possibilità di contaminazione del materiale non ascrivibile all'efficacia del trattamento disinfettante.

I dati ottenuti, essendo caratteri qualitativi di tipo presenza/assenza, sono stati confrontati mediante il test del chi-quadrato, utilizzando una tabella di contingenza (Cohen *et al.*, 1993).

### Risultati e discussione

Il numero e la percentuale di porzioni radicali con germogli ottenuti è variata dal 40% della pianta 1 al 73,3% della pianta 2. Non si sono però riscontrate differenze significative al test del chi-quadrato ( $X_4^2=3,98$ ). Il numero di germogli per porzione radicale è variato da 1 a 6, con una media di 2,5. Inoltre è stato osservato che porzioni con diametro maggiore tendono a produrre un più alto numero germogli (fino a 6), ma è stato riscontrato anche un maggior numero di porzioni contaminate da patogeni in fase di incubazione.

Nel confronto tra soluzioni disinfettanti è risultato che le differenze statistiche si riscontrano solo fra trattato (6,7% e 20% di germogli infetti rispettivamente con ipoclorito e Virkon) e non trattato (86,7%) ( $X_2^2=23,4$ ,  $P < 0,01$ ), e non fra le concentrazioni dei due tipi di disinfettante impiegati ( $X_7^2=0,29$ ).

Nei cicli successivi di micropropagazione non sono state riscontrate anomalie nello sviluppo dei germogli ottenuti da radice, né contaminazioni direttamente riconducibili alla disinfezione del materiale di partenza. Dopo 9 cicli di micropropagazione con durata di 20 giorni, viene mantenuto e moltiplicato un solo genotipo, in quanto dimostratosi realmente interessante.

### Conclusioni

Dalle prove condotte è emersa la possibilità di ottenere facilmente germogli di echinacea, partendo da porzioni di radice. Si è inoltre constatato che il prelievo delle piante in campo è maggiormente vantaggioso nel periodo giugno-agosto, in quanto in questo periodo si ha una minore contaminazione della radice da parte di batteri endofiti rispetto al periodo invernale e un minor inoculo fungino rispetto al momento della ripresa vegetativa. Il protocollo presentato in questo elaborato ha permesso di portare in vitro più di 20 fenotipi considerati interessanti e di conservarli durante l'analisi qualitativa delle radici.

Attualmente per mezzo di questa tecnica è stato costituito un campo di polycross.

### Riassunto

La prova condotta su radici di piante di *E. angustifolia* var. *angustifolia* di 5 anni di età ha dimostrato che è possibile produrre germogli da pezzi di radice di 3-4 cm di lunghezza. Nel caso in studio le porzioni radicali che hanno prodotto germogli sono variate dal 40% al 73% e sono stati ottenuti da 1 a 6 germogli per ogni pezzo di radice. Nella seconda fase della prova, riguardante l'impiego di due disinfettanti rispetto al testimone (risciacquo con sola acqua), i germogli infetti nella fase di messa in coltura sono risultati il 6,7% (ipoclorito all'1,3%) ed il 20% (Virkon all'1%).

**Parole chiave:** echinacea a foglie strette, micropropagazione, produzione di germogli avventizi, sterilizzazione.

### Bibliografia

- BAUER R., WAGNER H., 1990. *Echinacea Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler*. In: Bauer R., Wagner H., Pharmakologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart): 119-144.
- COHEN L., FOWLER J., 1993. Statistica per ornitologi e naturalisti. In: Pandolfi M., Franco Muzzio Editore (Padova): 79-94.
- HARBAGE J.F., 2001. *Micropropagation of Echinacea angustifolia, E. pallida, and E. purpurea from stem and seed explants*. Hort Science 36(2): 360-364.
- LAKSHMANAN P., DANECH M., TAJI A., 2002. *Production of four commercially cultivated Echinacea species by different methods of in vitro regeneration*. J. Hort. Sci. Biotech. 77(2): 158-163.
- MCGREGOR R.L., 1968. *The taxonomy of genus Echinacea (Compositae)*. The Univ. Kansas Sci. Bul. 48(4): 113-142.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- MURASHIGE T., 1974. *Plant propagation through tissue culture*. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.

## Micropropagazione di *Corylopsis*

Carlo Mascarello<sup>1\*</sup>, Ermanno Sacco<sup>1</sup>, Mark Roh<sup>2</sup> e Barbara Ruffoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CRA-FSO, Sanremo (IM)

<sup>2</sup> Floral and Nursery Plants Research Unit, U.S. Department of Agriculture, Beltsville (USA)

### **Corylopsis micropropagation**

**Abstract.** *Corylopsis* is a genus of the family *Hamamelidaceae* that includes 30 native species of eastern Asia. *Corylopsis* plants are often used in gardens for the explosive yellow early flowering and for cold resistance (up to -15 °C). In order to obtain rapidly propagated material the aptitude and the potentiality for *in vitro* propagation has been verified for 4 interesting species (*C. veitchiana* Bean, *C. sinensis* Hemsl., *C. pauciflora* Siebold & Zucc. e *C. spicata* Siebold & Zucc.). The *in vitro* culture started with the sterilization of axillary buds in active growth, picked up in April (67% asepsis). The highest *in vitro* proliferation response was obtained with BA with increasing multiplication rates at increasing BA concentrations which are however inversely related to the height of the explants. In rooting phase the best result was obtained with MS salts diluted with 50% distilled water added with IBA at 0.5 mg/l. It is shown, moreover, among species, a difference both in the rooting and in the quality of the explants in response to the same hormonal stimuli. The acclimatization under mist provided better results than the use of a tunnel covered with paper kept moist by overhanging mist. The presence of a good root apparatus is necessary to have the potential for further growth. The addition of a spray treatment on leaves with ALAR<sup>®</sup> just after transplant, allowed to increase the acclimatization percentage at good levels (over 70%).

**Key words:** acclimatization, ALAR, IBA, multiplication, rooting.

### **Introduzione**

*Corylopsis* è un genere della famiglia delle *Hamamelidaceae* che comprende 30 specie native dell'Asia orientale; la maggioranza di esse si trova in Cina, ma anche il Giappone e la Corea presentano specie di notevole interesse ornamentale. Il nome del genere deriva dal greco e indica la somiglianza delle foglie con il genere *Corylus*. Le piante sono arbusti o piccoli alberi decidui di altezza variabile tra il metro

e i 6 metri, con foglie ovate, alterne, con venature pronunciate di colore verde-blu che vira al giallo in autunno prima della caduta (AA.VV., 1999). Il carattere ornamentale è evidente nel tardo inverno quando si schiudono le gemme a fiore (che si aprono prima delle foglie) e che colorano di un vistoso giallo l'ambiente brullo circostante grazie a racemi penduli, lunghi da 3 a 9 cm, formati da 5-30 fiori (AA.VV., 1999). Le piante di *Corylopsis*, proprio per l'esplosiva fioritura precoce e per la resistenza al freddo (fino a -15 °C), sono spesso impiegate nei giardini. La propagazione avviene per talee semilegnose che vengono prelevate in primavera e vanno fatte radicare in un miscuglio di torba e sabbia in parti uguali. Le nuove piante vanno poi poste a dimora dopo almeno due anni. Vista la scarsa e lunga fase di moltiplicazione vegetativa, al fine di ottenere rapidamente materiali di propagazione clonati è stata verificata l'attitudine e la potenzialità della propagazione *in vitro* di 4 interessanti specie (*C. veitchiana* Bean, *C. sinensis* Hemsl., *C. pauciflora* Siebold & Zucc. e *C. spicata* Siebold & Zucc.).

### **Materiali e metodi**

Da piante madri allevate in vaso in pien'aria sono stati effettuati due prelievi: il primo a fine gennaio con gemme in procinto di aprirsi e il secondo in aprile prelevando le porzioni apicali dei germogli appena sviluppati dalle gemme. La sterilizzazione degli espianti è stata effettuata con un lavaggio in acqua tiepida con detergente e poi un'immersione in etanolo al 70% per 30 secondi. In seguito è stata utilizzata una soluzione di ipoclorito all'1,67% di cloro attivo addizionato con alcune gocce di TWEEN20<sup>®</sup> per 20 minuti seguito da due risciacqui in acqua distillata sterile. Il materiale è stato trasferito su terreno di coltura agarizzato composto da sali MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato con BA 0,3 mg/l e mantenuto in camera di coltura a 24±1 °C con fotoperiodo di 16 ore e una intensità luminosa di 30 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Ottenuto un adeguato numero di espianti sterili e vitali, sono state effettuate prove di moltiplicazione con 3 citochinine (BA, zeatina o 2iP) a diverse concentrazioni (0,5, 1, 2 mg/l). Dopo 30 giorni dall'impianto

\* carlo.mascarello@entecra.it



sono stati rilevati l'altezza degli espianti e il tasso di moltiplicazione (germogli/espianto).

Successivamente gli espianti delle 4 specie sono stati trasferiti su vari terreni di coltura con diversa composizione salina (sali MS, sali MS diluiti con il 50% di acqua distillata (MS ½), sali WPM (Lloyd e McCown, 1980) addizionati o meno con IBA alla concentrazione di 0,5 mg/l. Dopo 30 giorni dall'impianto, oltre alla percentuale di radicazione, sono stati rilevati il numero di radici per espianto, la lunghezza delle radici, l'altezza degli espianti, il peso e la qualità degli espianti (buona, sufficiente, scarsa).

In fase di ambientamento sono stati analizzati numerosi fattori per identificare il protocollo operativo migliore finalizzato a ottenere espianti in grado di superare lo shock dal passaggio *vitro-vivo*. In serra si è verificato l'effetto della piantagione degli espianti in contenitori alveolari da 60 fori contenenti terriccio per semine miscelato con perlite (30:70 v/v) direttamente sotto mist (con spruzzatura di 10 secondi ogni 30 minuti) oppure sotto tunnel di carta microcollata mantenuta umida dall'impianto mist sovrastante. Contemporaneamente è stata valutata la radicazione del materiale: metà degli espianti non radicati sono stati sottoposti a un trattamento di *dipping*, precedente alla piantagione, con IBA 5000 ppm per 30". E' stato poi valutato l'effetto del terreno di provenienza degli espianti sull'ambientamento, utilizzando espianti provenienti sia dal terreno di coltura direttamente dalla fase di moltiplicazione (sali MS+IBA 0,3 mg/l) sia dal terreno di radicazione (sali MS+IBA 0,5 mg/l). Si è tenuta, inoltre, in considerazione la qualità dell'espianto radicato sulla capacità di ambientamento. In ultimo, con il medesimo protocollo, si è provveduto, appena avvenuta la piantagione nei contenitori alveolari, all'irrorazione della parte aerea degli espianti con un brachizzante a base di daminozide (ALAR®) alla concentrazione di 2 g/l.

## Risultati e discussione

Le gemme ascellari in vegetazione prelevate in aprile (tab. 1) sono risultate essere il migliore espianto per tutti i genotipi; la percentuale media di steri-

lizzazione dei 4 genotipi è stata del 67% con un minimo (40%) per *C. pauciflora* ed un massimo (75%) per *C. veitchiana*.

In fase di moltiplicazione la BA ha fornito i risultati migliori con un incremento direttamente proporzionale del tasso di moltiplicazione rispetto alla concentrazione saggiata e un effetto inversamente proporzionale sull'altezza degli espianti (fig. 1). Sono emerse anche differenze tra i genotipi riguardo al tasso di moltiplicazione; il risultato migliore si è avuto in *C. sinensis* (clone 2: 2,8 espianti/mese) (tab. 1).

A seguito dell'allevamento degli espianti in condizioni di buio è stata ottenuta una buona risposta rizogena per tutti i genotipi ma il materiale, estremamente eziolato, nella fase seguente di ambientamento, non è stato in grado di sopravvivere. Si è evidenziata, inoltre, tra le specie, una differenza sia nell'emissione radicale (fig. 2), sia nella qualità degli espianti in risposta ai medesimi stimoli ormonali (tab. 2); da questi dati si può notare come il clone 1, pur avendo ottenuto percentuali di radicazione inferiori ad esempio al clone 2 e 3, presentava però espianti per la maggior parte di buona qualità tanto è vero che sono quelli che hanno supererato in percentuali maggiori lo shock dell'ambientamento. Il clone 2, pur presentando ottime percentuali di radicazione e numero di radici, ha manifestato una bassa qualità degli espianti.

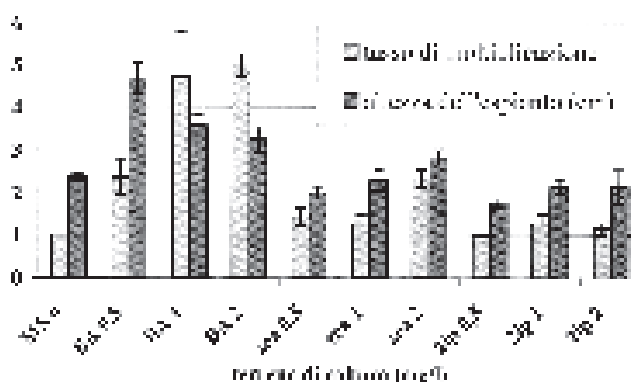


Fig. 1 - Effetto delle citochinine saggiate sul tasso di moltiplicazione (n. germogli per espianto per mese) e l'altezza degli espianti.  
Fig. 1 - Effect of cytokinins tested on multiplication rate (N. shoots per explant per month) and the height of explants.

Tab. 1 - Espianti ottenuti sterili e vitali (%) dopo il trattamento di sterilizzazione e tasso di moltiplicazione medio su MS+BA 0,3 mg/l.  
Tab. 1 - Sterile and viable explants (%) after the sterilization treatment n and average multiplication rate onto MS+BA 0.3 mg/l.

Specie	Codice assegnato (clone)	Prelievo in gennaio da gemme chiuse	Prelievo in aprile da gemme ascellari in vegetazione	Tasso medio di moltiplicazione (germogli/espianto/mese)
<i>C. veitchiana</i>	1	0	75	1,5
<i>C. sinensis</i>	2	0	50	2,8
<i>C. pauciflora</i>	3	0	40	1,2
<i>C. spicata</i>	4	0	43	2,2

Tab. 2 - Effetto della specie sulla radicazione in vitro degli espianti di *Corylopsis* (media  $\pm$  errore standard).  
 Tab. 2 - *Species effect on in vitro rooting of explants (average  $\pm$  S.E.).*

Clone	Radicazione (%)	Radici per espianto (n°)	Lunghezza radici (cm)	Altezza espianto (cm)	Peso dell'espianto (mg)	Espianti di qualità ottima (%)
1	77,8 $\pm$ 3,7	3,0 $\pm$ 0,20	1,1 $\pm$ 0,08	2,7 $\pm$ 0,09	120,0 $\pm$ 6,7	75,2
2	86,7 $\pm$ 4,1	3,7 $\pm$ 0,30	1,0 $\pm$ 0,07	2,0 $\pm$ 0,08	121,3 $\pm$ 10,6	55,0
3	90,0 $\pm$ 10,0	2,8 $\pm$ 0,39	1,0 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,21	97,5 $\pm$ 8,5	68,7
4	51,2 $\pm$ 5,8	3,0 $\pm$ 0,32	1,0 $\pm$ 0,14	2,3 $\pm$ 0,06	89,0 $\pm$ 5,1	72,6

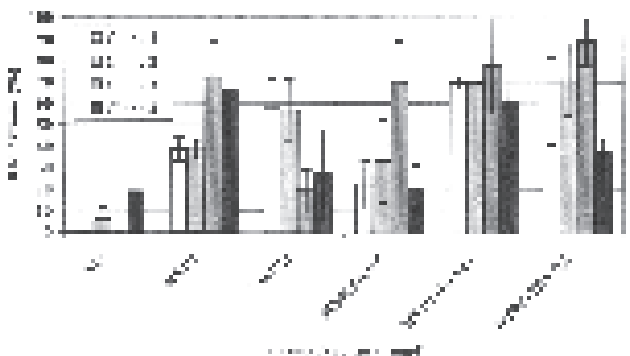


Fig. 2 - Effetto del terreno di coltura sulla radicazione degli espianti delle 4 specie di *Corylopsis*.  
 Fig. 2 - *Effect of culture medium on rooting of explants of 4 Corylopsis species.*

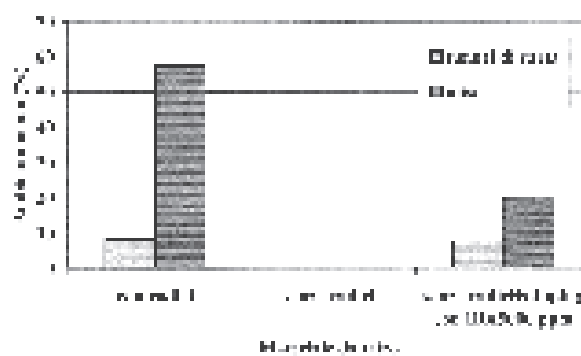


Fig. 3 - Effetto dei trattamenti effettuati e della presenza di radici sull'ambientamento delle plantule.  
 Fig. 3 - *Effect of treatments and the presence of roots of plantlets on the acclimatization (%)*.

Anche per questo genere, come in molti altri casi in particolare per specie semilegnose e legnose, la fase di ambientamento si è rivelata la più critica di tutto il ciclo micropropagativo (Sacco *et al.*, 2010; Ruffoni e Mascarello, 2009; Ruffoni *et al.*, 2009) a causa degli importanti cambiamenti strutturali derivanti dal passaggio *vitro-vivo* (Pospisilova *et al.*, 1999). L'ambientamento sotto mist ha fornito risultati migliori rispetto all'impiego di un tunnel coperto con carta microcollata mantenuta umida dall'impianto mist sovrastante (fig. 3); tale tunnel, risultato utile per altre specie (Mascarello *et al.*, 2009), è stato utilizzato per evitare il contatto diretto dell'acqua sulle foglie in modo da mantenere un'elevata umidità dell'aria circostante le foglie ma non ha dato, per nessuna specie, risultati interessanti. Inoltre si è potuto evidenziare che, al contrario di specie come il corbezzolo o il mirto che sono in grado di sviluppare radici contemporaneamente all'ambientamento (Mascarello *et al.*, 2010; Ruffoni *et al.*, 2010), gli espianti di *Corylopsis* devono essere trasferiti in serra già dotati di radici perché in caso contrario non hanno la potenzialità di crearne di nuove (fig. 3); un'immersione per pochi secondi in IBA concentrato (*dipping*) ha consentito una minima risposta positiva ma non paragonabile ai risultati ottenuti con materiale già radicato. Si è potuto appurare, per conferma, che gli espianti di tutti i 4 genotipi provenienti da terreno di coltura con BA (e quindi privi di radici) non erano già più vitali dopo 30

giorni di allevamento in serra, mentre il materiale proveniente da terreno di coltura con sali MS  $\frac{1}{2}$  addizionato con IBA 0,5 mg/l ha fornito risultati discreti (fig. 4). L'aggiunta di un trattamento di spruzzatura con ALAR<sup>®</sup> alla concentrazione di 2 g/l sulle foglie, appena avvenuto il trapianto, ha permesso di incrementare la percentuale di ambientamento a buoni livelli (oltre il 70%) (tab. 3); ciò potrebbe essere dovuto all'azione brachizzante del composto che, inibendo lo sviluppo della parte aerea, potrebbe avere un effetto positivo di rafforzamento dell'apparato radicale. Tale risultato, inoltre, rafforza la tesi che alcune

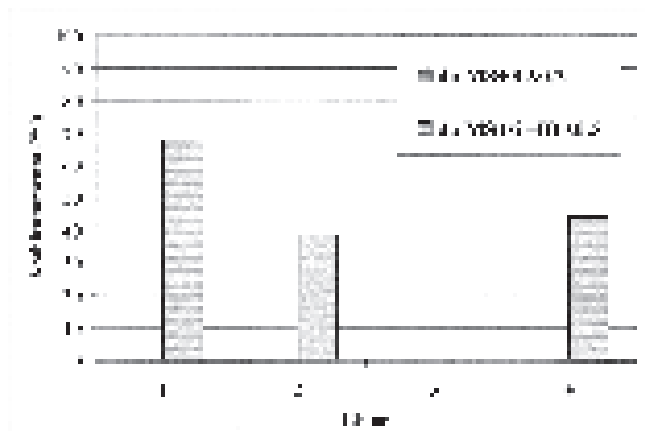


Fig. 4 - Effetto dei terreni di moltiplicazione e radicazione sull'ambientamento delle 4 specie (%).  
 Fig. 4 - *Effect of multiplication and rooting media on the acclimatization of the 4 species (%)*.

Tab. 3 - Effetto medio del pre-ambientamento + ALAR e della presenza di radici sull'ambientamento.

Tab.3 - Effect of pre-acclimatization + ALAR and the presence of roots on the acclimatization.

	Clone 1	Clone 2
Con radici	77,7	25,0
Senza radici	38,9	8,3

sostanze inibenti la formazione di acido gibberellico o sue antagoniste (in questo caso, ALAR®) favoriscano la radicazione degli espianti (Moncousin, 1991).

I risultati ottenuti, almeno per la specie con le performances migliori (*C. veitchiana*) e accettabili (*C. sinensis* e *C. spicata*), possono quindi fornire indicazioni immediatamente utilizzabili per aumentarne la produzione vivaistica.

### Riassunto

Il genere *Corylopsis* di origine asiatica comprende specie con un alto valore ornamentale soprattutto per parchi e giardini. In questo lavoro si sono considerate 4 specie: *C. veitchiana* Bean, *C. sinensis* Hemsl., *C. pauciflora* Siebold & Zucc. e *C. spicata* Siebold & Zucc. L'azione di sterilizzazione su gemme appena schiuse non ha presentato difficoltà (67% di espianti sterili). Per tutte e quattro le specie la BA ha indotto i migliori tassi di moltiplicazione. In fase di radicazione è stato possibile ottenere buoni risultati a seguito del dimezzamento dei sali e all'aggiunta di IBA (0,5 mg/l); questo substrato ha consentito la produzione di piantine di buona qualità, condizione indispensabile per ottenere un efficiente ambientamento. In quest'ultima fase si sono evidenziate le maggiori differenze genotipiche; oltre alla preparazione del materiale con radici ben formate e adeguata vegetazione, è risultato necessario effettuare un pre-ambientamento e una

irrorazione di ALAR® che sembra ridurre lo stress del passaggio dalle condizioni di *vitro* a quelle di serra.

**Parole chiave:** ALAR, ambientamento, IBA, moltiplicazione, radicazione, sterilizzazione.

### Bibliografia

- AA.VV., 1999. *Dictionary of gardening*. The new Royal Horticultural Society. Vol.1: 733.
- LLOYD G., MCCOWN B., 1980. *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. Plant prop. Soc. Proc., 30: 421-427.
- MASCARELLO C., MELIS R., MANTOVANI E., RUFFONI B., 2009. *Evaluation of the role of light intensity and hormonal treatments during in vitro rooting of Myrtus micropropagated plantlets related to acclimatization performances*. Acta Hort. 812: 379-386.
- MASCARELLO C., SACCO E., DI SILVESTRO D., RUFFONI B., 2010. *La micropropagazione del corbezzolo*. Atti IV convegno nazionale "Piante mediterranee: le potenzialità del territorio e dell'ambiente. Nova Siri Marina (MT) 7-10 ottobre: 322-327.
- MONCOUSIN C., 1991. *Rooting of microcuttings: unmanipulated factors*. Acta Hort., 289: 319-327.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- POSPISILOVA J., TICHA I., KADLECEK P., HASEL D., PLZAKOVA S., 1999. *Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions*. Biol. plant., 42(4): 481-497.
- RUFFONI B. E MASCARELLO C., 2009. *Tecniche per la propagazione in vitro degli arbusti mediterranei*. Floritecnica, 6: 49-57.
- RUFFONI B., MASCARELLO C., FASCELLA G., MANTOVANI E., 2009. *La propagazione del lentisco per uso ornamentale ed ambientale*. Floritecnica, 5: 49-57.
- RUFFONI B., MASCARELLO C., SAVONA M., 2010. *In vitro propagation of ornamental Myrtus (Myrtus communis)*. *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Springer protocols, methods in molecular biology 589, Human press, ed. By S. Mohan Jain and S. J. Ochatt. Chapter 24: 257-269.
- SACCO E., MASCARELLO C., CASSETTI A., RUFFONI B., 2010. *Radiazione avventizia in carrubo da talea e da materiale micro propagato*. Atti IV convegno nazionale "Piante mediterranee: le potenzialità del territorio e dell'ambiente. Nova Siri Marina (MT) 7-10 ottobre: 413-419.

# Produzione mediante coltura *in vitro* di piante di *Catharanthus roseus* da impiegare per lo studio dei meccanismi coinvolti nell'interazione pianta/fitoplasma

Luigi Miotti<sup>1,2\*</sup>, Elisa Angelini<sup>1</sup> e Massimo Gardiman<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CRA-VIT Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano (TV)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Udine

## ***In vitro* production of *Catharanthus roseus* plants for genetics studies of plant/phytoplasma interaction**

**Abstract.** Grapevine yellows (*Flavescence dorée* and *Bois noir*) are important diseases caused by phytoplasmas, pleiomorphic wall-less bacteria which colonize plant host sieve elements. Studies on pathogenetic mechanisms between plants and phytoplasmas are hindered by the impossibility to culture these bacteria in axenic conditions, which are therefore maintained in experimentally-infected *Catharanthus roseus* plants.

The development of molecular assay techniques such as microarray and real time PCR allowed to increase greatly the knowledge on plant pathology, but the high sensitivity of these tools makes it necessary to maintain as low as possible the individual and environment variability. Analysis of data obtained in the present work confirmed the validity of the protocol established for production of clonal population of *C. roseus* plants for gene expression studies on plant/phytoplasma interaction.

**Key words:** gene expression, periwinkle, *Mollicutes*, real time PCR.

## **Introduzione**

I giallumi della vite (Flavescenza dorata e Legno nero) sono importanti patologie causate da fitoplasmi, batteri pleiomorfici privi di parete cellulare appartenenti alla classe dei *Mollicutes* che colonizzano i tessuti floematici dell'ospite vegetale. Lo studio di tali patologie è ostacolato dall'impossibilità di coltivare *in vitro* tali batteri (Lee *et al.*, 2000).

Nell'ultimo decennio la messa a punto di tecniche di indagine molecolare quali *microarray* e *real time PCR* ha permesso un importante avanzamento delle

conoscenze nel campo della patologia vegetale, ma la loro elevata sensibilità rende necessari sistemi sperimentali che minimizzino la variabilità dovuta all'ambiente e al materiale vegetale impiegato.

Al fine di ottenere un sistema sperimentale *in vivo* per lo studio di tali malattie, è stato ottimizzato un protocollo per la produzione *in vitro* e il successivo ambientamento di popolazioni clonali di *Catharanthus roseus*. Su tale sistema è stata svolta un'analisi di espressione di geni sia costitutivi che legati alla difesa, al fine di valutare la ripetibilità dei dati ottenuti con tecniche di *real-time PCR*.

## **Materiali e metodi**

Semi di *Catharanthus roseus* G. Don (pervinca del Madagascar) delle varietà Vitesse Apricot Imp. (VA) e Peppermint Cooler (PC) sono stati sterilizzati immergendoli per 10 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% e risciacquati in tre successivi passaggi in acqua demineralizzata sterile; quindi i semi sono stati fatti germinare su carta bibula al buio con umidità 100% in ambiente asettico. Le piante allo stadio di due cotiledoni sono state trasferite su substrato Murashige e Skoog (Duchefa) a metà concentrazione (MS/2) con 20 g l<sup>-1</sup> di saccarosio e 8 g l<sup>-1</sup> di *plant agar* (Duchefa), in provette da 50 ml con 12 ml di substrato. Il pH del substrato è stato portato a 5,7 prima della sterilizzazione in autoclave. Le condizioni di coltura mantenute in tutte le fasi sono state le seguenti: 26 °C e fotoperiodo di 16 h di luce a 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Dopo 60 giorni i germogli sono stati trasferiti su mezzo di coltura MS/2 con BAP 0,75 mg l<sup>-1</sup> e IBA 0,1 mg l<sup>-1</sup> secondo Singh *et al.* (2007) modificato (MS/2+), in vasi di vetro da 500 ml con 100 ml di substrato per ulteriori 15 giorni, al fine di favorire la proliferazione di germogli. Tutte le seguenti subculture sono state effettuate ogni 90 giorni su substrato MS/2 privo di fitoregolatori, in vasi di vetro da 500 ml con 100 ml di substrato MS/2. In ogni vaso sono

\* luigi.miotti@uniud.it

stati posti circa 15 espianti. Ad ogni subcultura è stato contato il numero di nuovi germogli derivati da ogni precedente espianto. Le medie dei tassi di moltiplicazione delle due varietà sono state analizzate mediante test *t* di Student.

Per la fase di radicazione e ambientamento sono stati utilizzati germogli ascellari con 2-3 nodi (5-10 mm di lunghezza), prelevati dopo 30 giorni di coltura su MS/2 e trasferiti su *peat plug* (Jiffy-7<sup>®</sup>, Ø 41mm) autoclavati, trattati con *Switch*<sup>®</sup> (Syngenta) alla dose di 0,8 g l<sup>-1</sup> e quindi mantenuti dentro vasi di vetro da 500 ml coperti da una pellicola trasparente. Dopo un mese le piantine radicate su *peat plug* (fig. 1) sono state trapiantate su vasetti 80x80x85 mm in torba commerciale (Bluemenerde, Falken) e trasferite dopo 15 giorni in serra riscaldata a 26 °C.

Al fine di valutare se le piante così prodotte costituiscono un sistema sperimentale adatto per lo studio dell'interazione pianta-fitoplasma a livello molecolare, è stata svolta un'analisi di espressione genica mediante tecnica *real-time PCR* con chimica *Sybr Green* per quantificare la variabilità dell'espressione genica all'interno di gruppi di piante varietà VA sane e inoculate con il fitoplasma della Flavescenza dorata. A 160 giorni dal trasferimento in serra, un gruppo di tre piante è stato inoculato mediante innesto con marze provenienti da pervinche malate, mentre altre tre piante sono state innestate con marze non infette. Da ogni pianta sono stati raccolti singolarmente campioni fogliari dopo 15 e 120 giorni dall'inoculo (il primo prelievo è stato fatto quando le piante non manifestavano ancora i sintomi, mentre nel secondo quando questi erano ben evidenti). I campioni raccolti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C; l'estrazione dell'RNA e la

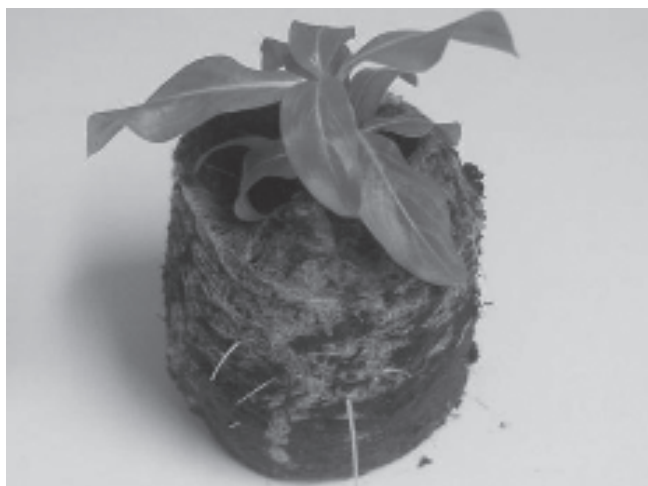


Fig. 1 - Pianta di *Catharanthus roseus* (cv Vitesse Apricot Imp.) dopo 30 giorni di radicazione/ambientamento su *peat plug*.  
Fig. 1 - *Catharanthus roseus* (cv Vitesse Apricot Imp.) plant after 30 days of rooting/acclimatization on *peat plug*.

retroscrittura sono state svolte secondo il protocollo MIQE per l'analisi di espressione (Bustin *et al.*, 2009). Sugli stessi campioni è stata svolta un'analisi mediante PCR *nested* con primer P1/P7 ed 16r758f/M23Sr (Angelini *et al.*, 2001) per valutare la presenza del fitoplasma nei tessuti analizzati; i prodotti di reazione sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% per valutare la presenza dell'amplificato specifico.

Per la normalizzazione dei dati di espressione genica sono stati valutati cinque geni *reference* (Wei, 2010) di *C. roseus*: il gene per la proteina ribosomica 40S-S9 (*RPS9*), per l'ubiquitina 11 (*UBQ11*), per la ciclofilina (*CYC*), per l'actina 7 (*ACT7*) e per il fattore di allungamento 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ). La valutazione dei geni più stabili per la normalizzazione è stata effettuata mediante analisi dei dati di *real time PCR* ottenuti dai campioni raccolti con programma *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002).

Come geni *target* legati alla difesa sono stati scelti i geni che codificano per la callosio sintasi (*CalS*) e per la proteina di patogenesi 1 (*PR1*). Primer specifici per tali geni sono stati costruiti mediante programma *Beacon designer* (Biorad) e saggiati per la loro sensibilità, specificità ed efficienza.

La variabilità dei dati è stata calcolata come percentuale della deviazione standard dei valori di Ct (ciclo soglia) grezzi ottenuti dalla analisi *real-time PCR* effettuata sui campioni prelevati.

## Risultati e discussione

Non sono stati riscontrati particolari problemi nelle prime fasi di produzione del materiale vegetale, con una germinazione di semi del 95% per entrambe le varietà. Le due varietà impiegate hanno dimostrato un differente tasso di moltiplicazione *in vitro* (fig. 2), significativamente maggiore ( $p < 0,01$ ) per VA (media 2,5) rispetto a PC (media 1,6). Il comportamento *in vitro* rispecchia l'*habitus* vegetativo delle due varietà: VA è caratterizzata da un abbondante sviluppo dei germogli ascellari, mentre in PC questi rimangono latenti, a meno di una capitozzatura dei principali assi vegetativi. Tale differenza ha portato in fase di micropropagazione ad una maggiore resa nella produzione di germogli da ambientare di VA rispetto a PC, pur partendo dalla stessa quantità di materiale di partenza. Un aumento della proliferazione dei germogli *in vitro* è stato ottenuto utilizzando il substrato MS/2+, che ha permesso valori medi del tasso di moltiplicazione pari a 2,97 per PC e 3,53 per VA; in tali condizioni non si è più notata una differenza significativa tra le due varietà. È stato riscontrato però

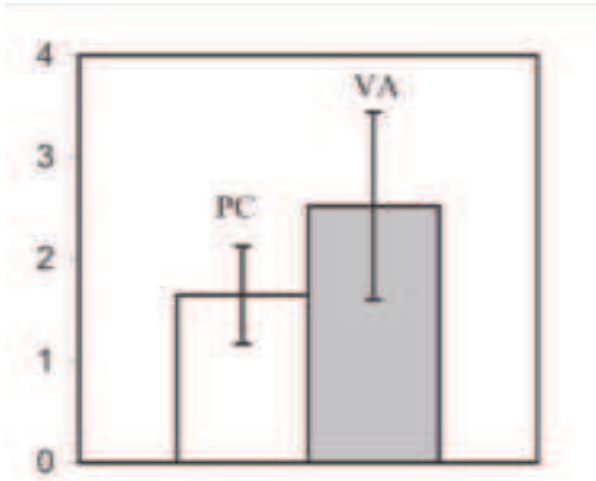


Fig. 2 - Tasso di moltiplicazione delle varietà Vitesse Apricot Imp. (VA) e Peppermint Cooler (PC) su substrato MS/2. Media di 20 subculture (le barre verticali indicano la deviazione standard rispetto alla media).

Fig. 2 - Multiplication rating of Vitesse Apricot Imp. (VA) and Peppermint Cooler (PC) varieties on MS/2 substrate. Average of 20 sub-cultures (vertical bars represent standard deviation).

che è preferibile limitare l'utilizzo di questo substrato per periodi non prolungati e alternandolo a cicli di subcultura su substrato privo di ormoni, per evitare l'insorgenza di fenomeni di vitescenza che diminuiscono la resa nella produzione di nuovi germogli (dati non riportati); inoltre per la varietà VA, è stato visto che tale trattamento può essere sotto certi aspetti controproducente, in quanto gli espunti in substrato privo di ormoni risultano già avere un buon tasso di moltiplicazione dovuto all'abbondante sviluppo di gemme laterali, e le gemme avventizie che si formano in presenza di IBA e BAP (le quali determinano rispetto alla coltura in MS/2 la maggiore produzione di espunti) risultano essere spesso piccole e difficili da maneggiare in fase di sub-culturazione. È stato constatato che la fase più critica per la produzione del materiale vegetale è quella di radicazione/ambientamento con il trasferimento dei germogli dalla coltura *in vitro* ai *peat plug*. Le due varietà hanno avuto comunque percentuali di sopravvivenza simili (72% VA, 66% PC), mentre nei passaggi successivi la percentuale di sopravvivenza è stata del 100% per entrambe. Le piante portate in serra si sono poi sviluppate in maniera uniforme.

L'analisi mediante PCR *nested* ha evidenziato l'assenza di fitoplasma a livello della chioma a 15 giorni dall'inoculo, durante le primissime fasi dell'infezione; è risultato invece diffuso a livello sistemico a 120 giorni dall'inoculo, quando i sintomi della malattia (ingiallimento delle foglie, necrosi delle nervature) erano ben evidenti in tutte le piante inoculate. La presenza del fitoplasma non è invece mai stata rilevata

nelle piante di controllo (dati non riportati).

L'analisi della stabilità dei geni *reference* ha individuato come geni adatti per la normalizzazione dei dati di espressione quelli codificanti per l'actina 7 (*ACT7*) e per il fattore di allungamento 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ). Ad ogni modo, anche gli altri geni presi in considerazione a questo fine hanno dimostrato una elevata stabilità nelle condizioni del sistema sperimentale messo a punto, essendo il valore di stabilità M risultato comunque al di sotto del limite di 0,15 (fig. 3) suggerito da Vandesompele *et al.* (2002).

L'analisi dei dati ottenuti mediante *real time* PCR ha rivelato una bassa variabilità dell'espressione genica tra individui all'interno di ogni tesi: la deviazione standard dei valori di Ct per i geni presi in considerazione è stata in media del 2% (tab. 1), e non differiva di molto né in base alla tesi considerata (sano/ malato), né in base al tempo trascorso dall'inoculo. Ciò denota un'elevata riproducibilità dei dati di espressione e dimostra che, grazie all'utilizzo di materiale clonale in ambiente controllato, la variabilità individuale è stata fortemente minimizzata.

## Conclusioni

Il protocollo seguito si è dimostrato adatto per la produzione *in vitro* e il successivo ambientamento di popolazioni clonali di *Catharanthus roseus* atte allo

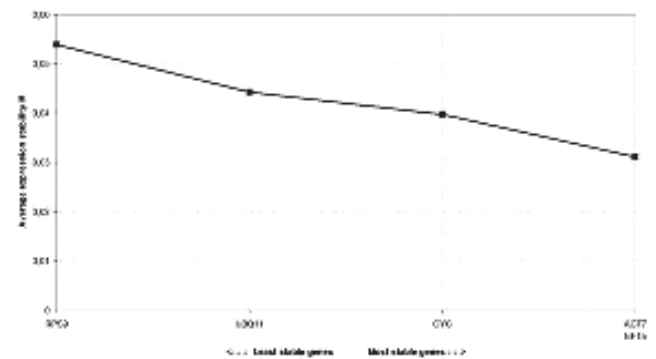


Fig. 3 - Output del programma geNorm per i cinque geni *reference* analizzati.

Fig. 3 - geNorm output for the five reference genes studied.

Tab. 1 - Deviazione standard (%) rispetto alla media dei valori di Ct dei geni *target* e *reference* considerati per l'espressione genica.

Tab. 1 - Standard deviations (%) from the average of Ct values for target and reference genes studied.

Deviazione standard rispetto alla media		<i>CalS</i>	<i>PR1</i>	<i>ACT7</i>	<i>EF1<math>\alpha</math></i>
15 giorni dall'inoculo	Sano	0,80	3,40	3,00	1,70
	Malato (FD)	1,20	1,30	4,60	2,50
4 mesi dall'inoculo	Sano	1,80	1,30	1,40	0,60
	Malato (FD)	2,30	2,80	1,90	1,50

scopo di indagare l'espressione dei geni di difesa che la pianta attiva in risposta all'infezione da parte del fitoplasma. Il sistema sperimentale potrà essere impiegato, oltre che per approfondire le conoscenze sul rapporto ospite/patogeno in questo particolare patosistema, anche per saggiare l'efficacia di possibili sistemi di controllo del fitoplasma in ambiente controllato.

### Riassunto

I giallumi della vite sono importanti patologie causate da fitoplasmi, batteri che colonizzano i tessuti floematici dei loro ospiti vegetale. Lo studio dei meccanismi di patogenesi tra pianta e fitoplasma è ostacolato dall'impossibilità di coltivare tali patogeni *in vitro*. L'evoluzione di tecniche di indagine molecolare ha permesso un notevole avanzamento delle conoscenze nel campo della patologia vegetale, ma l'elevata sensibilità di tali tecniche rende necessari sistemi sperimentali che minimizzino la variabilità dovuta all'ambiente e al materiale vegetale impiegato. L'analisi dei dati ottenuti nel presente lavoro ha confermato la validità del protocollo impiegato nella produzione di popolazioni clonali di *C. roseus* per studi di interazione pianta/fitoplasma.

**Parole chiave:** espressione genica, pervinca, *Mollicutes*, *real-time PCR*.

### Bibliografia

- ANGELINI E., CLAIR D., BORGO M., BERTACCINI A., BOUDON-PADIEU E., 2001. *Flavescence dorée in France and Italy – Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationship to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma*. *Vitis* 40 (2):79-86.
- BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J., WITTEWIT C.T., 2009. *The MIQE guidelines-minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clinical Chemistry*, 55 (4): 611-622.
- LEE I.M., DAVIS R.E., GUNDERSEN-RINDAL D.E., 2000. *Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.
- SINGH S.K., AMINUDDIN, SRIVASTAVA P., SINGH B.R., KHAN J.A., 2007. *Production of phytoplasma-free plants from yellow leaf diseased Catharanthus roseus L. (G.) Don*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114 (1): 2-5.
- VANDESOMPELE J., DE PRETER K., PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., DE PAEPE A., SPELEMAN F., 2002. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biology*, 3 (7): research0034-research0034.11.
- WEI S., 2010. *Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in Catharanthus roseus seedlings*. *Plant Growth Regulation*, 61: 243-251.

## Germinazione di semi e micropropagazione di *Adansonia digitata* L.

Enrico Rolli\*, Maria Veronica Bigliardi e Ada Ricci

Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma

### Micropropagation of *Adansonia digitata* L.

**Abstract.** The growing interest of *Adansonia digitata* L. (african baobab) extends to the African rural economy, as well as to European herbal industries. Due to the reduction of the local population in the last thirty years, conservation programs have been recently implemented. These are aimed to both natural preservation and fruit production for the food processing industry. This paper reports the preliminary results from *in vitro* culture of *Adansonia digitata* L. At first, aseptic cultures of *Adansonia digitata* L. were started from seeds. *In vitro* germination was performed with previous chemical or mechanical scarification of the seeds. Unfortunately, *in vitro* germination is particularly difficult due to seed physiology and seedling development. Hence, it was decided to perform plant tissue cultures starting from binodal segments, taken from seedlings grown in non-aseptical conditions and then sterilized for micropropagation on MS medium supplemented with various combinations of plant growth regulators (BAP, zeatin riboside, IBA).

**Key words:** Baobab, germination, scarification, two-node explant.

### Introduzione

Il baobab africano, *Adansonia digitata* L., è una pianta tropicale appartenente alla famiglia delle Bombacaceae (o Malvaceae secondo la classificazione APG) che comprende otto specie: una diffusa in Africa, una in Australia e sei endemiche del Madagascar (Baum, 1995).

Il baobab africano è un grande albero deciduo, alto fino a 20-25 metri, con tronco ingrossato, i cui tessuti interni, spugnosi, sono adatti ad accumulare liquidi durante la stagione delle piogge e a conservarla per la stagione secca (Osman, 2004). Le foglie sono semplici (fase giovanile) o digitate, costituite da 5-9 foglioline. I fiori sono bianchi, grandi, penduli, solitari. La fioritura inizia con la stagione delle piogge ed è temporalmente molto limitata (24 ore). Il frutto maturo si pre-

senta in forme variabili, da ovoidale a oblungo-cilindrico. È costituito da un epicarpo esterno legnoso e coriaceo e da un epicarpo interno formato da una polpa biancastra suddivisa in piccoli agglomerati farinosi che racchiudono molteplici semi di colore bruno-nerastro (Nour *et al.*, 1980). La composizione dei semi e della polpa del frutto del baobab evidenzia che il seme è una buona fonte di grassi, di proteine e di fibra grezza, mentre la polpa è un'ottima fonte di carboidrati, di acidi grassi essenziali e di minerali (Lockett *et al.*, 2000). Il frutto del baobab è inoltre noto per il suo elevato contenuto in acido ascorbico (vitamina C) e quantità apprezzabili di altre vitamine essenziali, come la tiamina (vitamina B1), la riboflavina (vitamina B2) e la niacina (vitamina PP o B3; Verturani *et al.*, 2002).

Il baobab (*A. digitata* L.) è una pianta quotidianamente utilizzata nella dieta delle comunità rurali dell'Africa occidentale, contribuisce a redditi agricoli e ha importanti usi alimentari e medicinali (Cuni Sanchez *et al.*, 2010). In seguito al crescente interesse verso questa specie, negli ultimi anni, vari gruppi di ricerca internazionali hanno posto le basi per un approccio multidisciplinare allo studio della biologia, della coltivazione e della variabilità del baobab (Svejgaard *et al.*, 2011; Cuni Sanchez *et al.*, 2011; Assogbadjo *et al.*, 2011). La micropropagazione può rappresentare una delle tecniche utili alla conservazione *ex-situ* della specie. La letteratura relativa alla coltura *in vitro* di *A. digitata* è estremamente ridotta (Katsuaki e Kambou, 2007). Con questo lavoro, ci si prefigge di stabilire le basi per la micropropagazione del baobab, individuando quali possano essere i problemi da affrontare e quali siano le condizioni ormonali ottimali per il successo.

### Materiali e metodi

#### Germinazione *in vitro*

I semi di *Adansonia digitata* L. sono stati gentilmente forniti da BFCS s.n.c. (Baobab Fruit Company Senegal). Al fine di rimuovere la dormienza fisica che caratterizza i tegumenti dei semi stessi, sono stati applicati due tipi di trattamenti. Con la scarificazione di tipo meccanico, il tegumento del seme è stato abraso mediante l'impiego di una lima, per una superficie di

\* enrico.rolli@unipr.it



circa 1 mm<sup>2</sup>, quindi i semi sono stati lasciati in acqua a 37 °C per 24 ore. Come sistema alternativo, i semi sono stati chimicamente scarificati mediante immersione in acido solforico concentrato (96%) per vari tempi (1; 2; 4 e 24 ore). Successivamente sono stati sciacquati in acqua deionizzata e l'eccesso di acido è stato neutralizzato mediante immersione in una soluzione di 100 mM di bicarbonato di sodio per 30 minuti. Al fine di migliorare la germinazione, i semi sono stati posti in acqua deionizzata per 24 ore a 37 °C.

I semi (scarificati sia meccanicamente sia chimicamente) sono stati successivamente sterilizzati mediante immersione in alcol etilico (70% v/v) per cinque minuti, quindi in ipoclorito di sodio al 2% per 20 minuti, applicando il vuoto. Sono seguiti tre lavaggi in acqua distillata sterile e si è provveduto alla semina in tubi di coltura contenenti 15 ml di terreno MS (Murashige e Skoog, 1962). Sono stati utilizzati dieci semi per condizione e ciascun esperimento è stato replicato tre volte. A 30 giorni dalla semina è stato rilevato il numero di piante sviluppate e le eventuali contaminazioni.

Parallelamente sono state condotte prove analoghe con la finalità di verificare se il peso dei semi avesse influenza sulla velocità di germinazione. Semi di *A. digitata* sono stati suddivisi in quattro categorie di peso: A: 200-299 mg; B: 300-399 mg; C: 400-499 mg; D: 500-599 mg. Tali semi sono stati chimicamente scarificati come descritto in precedenza (tempo di 24 ore) e sterilizzati mediante ipoclorito di sodio 2% per 20 minuti. Ai successivi tre lavaggi in acqua distillata sterile è seguita la semina in tubi di coltura contenenti 15 ml di terreno MS. Quotidianamente è stato rilevato il numero di semi germinati (emissione della radice), fino al sessantesimo giorno dall'inizio della prova. Per ogni esperimento sono stati impiegati 10 semi per categoria di peso, per complessive tre repliche.

#### *Semina in vivo*

Semi di *A. digitata* sono stati scarificati chimicamente come sopra descritto. Trascorso il periodo di imbibizione in acqua, la semina è avvenuta disponendo i semi su vermiculite inumidita e coprendo con uno strato di circa un centimetro con lo stesso substrato. I contenitori così preparati sono stati disposti in cella climatica a 22 ± 2 °C, fotoperiodo 16 ore, illuminazione di 27 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Germogli dell'età di 30 ± 3 giorni sono poi stati utilizzati come materiale da cui ottenere segmenti binodali impiegati nelle prove di micropropagazione.

#### *Sterilizzazione di segmenti binodali*

I segmenti sono stati sterilizzati mediante immersione

in alcol etilico (70% v/v) per 5 minuti, quindi in ipoclorito di sodio al 2% per 10 minuti. Sono seguiti tre lavaggi in acqua distillata sterile. A due settimane dalla sterilizzazione sono stati conteggiati gli espianti che presentavano contaminazioni.

#### *Condizioni colturali*

I segmenti binodali sterilizzati sono stati privati della foglia inferiore e posti in tubi di coltura contenenti 15 ml di terreno di MS privo di regolatori di crescita (HF) o addizionato con citochinine quali zeatina riboside (ZR) o 6-benzilaminopurina (BAP) alle concentrazioni di 0,1; 1 o 10 μM, da sole o in combinazione, per ciascuna concentrazione, con 1 μM dell'auxina acido 3-indolbutirrico (IBA). Per ogni condizione sono stati saggiati 10 segmenti binodali e ciascuna prova è stata replicata tre volte.

Trascorsi 60 giorni dall'inizio delle prove sono stati rilevati il numero di germogli, il numero di nodi prodotti e la lunghezza complessiva dei germogli sviluppati. La verifica di eventuali differenze tra il numero medio di nodi prodotti e la lunghezza dei germogli ottenuti nei vari trattamenti è stata eseguita mediante ANOVA (P≤0,05). Per identificare i gruppi che presentano differenze è stato applicato il test post hoc LSD di Fisher (P≤0,05).

## **Risultati e discussione**

La scarificazione è una pratica necessaria al fine di rimuovere la dormienza fisica che caratterizza i semi di *A. digitata*. Semi non trattati, infatti, posti su terreno per colture *in vitro*, dopo trenta giorni non sono in grado di germinare. Le diverse modalità di scarificazione influenzano le percentuali di germinazione: i semi abrasivi meccanicamente sono in grado di germinare (34,0%), tuttavia tale valore viene migliorato mediante immersione, fino a 24 ore, in acido solforico concentrato. Infatti il più elevato valore di germinazione ottenuto in seguito a questo trattamento si attesta a 73,3% (fig. 1). Sebbene tutti i semi siano stati sottoposti a sterilizzazione (dopo scarificazione e neutralizzazione con bicarbonato di sodio), il trattamento meccanico determina il 100% di semi contaminati, mentre trattamenti con acido permettono di mantenere livelli di contaminazione a valori inferiori al 15% (fig. 2). I semi di baobab presentano un tegumento molto resistente, sia dal punto di vista meccanico sia per quanto riguarda la capacità di assorbire liquidi. L'abrasione meccanica ha evidentemente contaminato i tessuti interni del seme. Nelle prove in cui è stato utilizzato acido, il tegumento presenta abrasioni, tuttavia in questo caso i semi si trovano a contatto

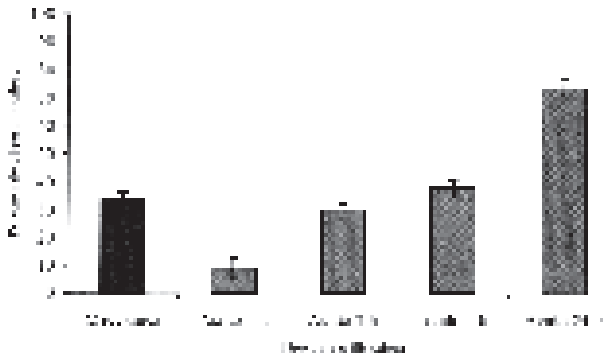


Fig. 1 - Effetto delle diverse modalità di scarificazione sulla germinazione di semi di *A. digitata*. La scarificazione meccanica è stata eseguita mediante abrasione del tegumento dei semi in modo da ottenere la rimozione di circa 1 mm<sup>2</sup> di tegumento stesso. La scarificazione chimica è stata compiuta mediante immersione dei semi in acido solforico (96%) per tempi diversi (1, 2, 4 e 24 ore) prima della semina. Le barre di errore indicano l'errore standard relativo alle percentuali di germinazione.

Fig. 1 - Effect of different type of scarification on seeds germination. The mechanical scarification was performed by abrasion of the integument. The chemical scarification was accomplished by immersion of seeds in sulphuric acid (96%) for different times (1, 2, 4 and 24 hours). The bars indicate the standard error.

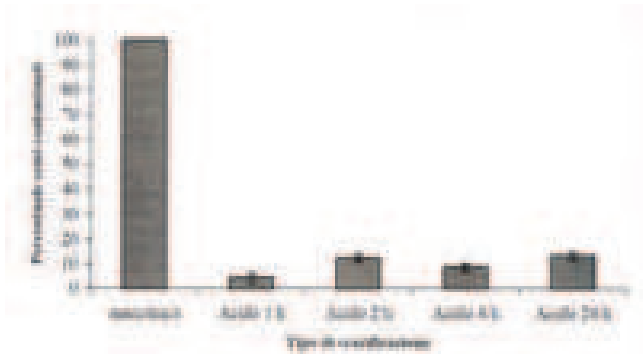


Fig. 2 - Effetto delle differenti modalità di scarificazione sulla sterilizzazione di semi di *A. digitata*. I semi sono stati sterilizzati mediante immersione in alcool etilico (70% v/v), quindi in ipoclorito di sodio al 2% per 20 minuti. E' seguita la semina *in vitro* in tubi di coltura contenenti 15 ml di terreno MS. Le barre di errore indicano l'errore standard relativo alle percentuali di contaminazione.

Fig. 2. Effect of different type of scarification on seeds sterilization. Seeds of *A. digitata* were sterilized by immersion in ethanol (70%), then in sodium hypochlorite (2%) for 20 min. Sowing was done on MS medium. The bars indicate the standard error.

con un agente (acido solforico) che non favorisce la diffusione di microrganismi all'interno del seme stesso; quindi l'applicazione dell'agente sterilizzante risulta efficace.

La germinazione di *A. digitata* non è sincrona. Il tempo minimo osservato per l'emissione della radice primaria è di tre giorni dalla semina, tuttavia i semi sono in grado di germinare oltre i trenta giorni previsti dalla prova. Per valutare se vi fosse relazione tra la velocità di germinazione e il peso dei semi, questi ultimi sono stati suddivisi in 4 categorie. I risultati indica-

no che non vi è correlazione ( $R^2 = 0,027$ ) tra il peso dei semi e il tempo di germinazione (fig. 3); l'asincronia quindi è determinata da altri fattori e non può essere ridotta selezionando i semi per categorie di peso.

Durante l'incubazione si sono manifestati ulteriori problemi relativamente allo sviluppo delle plantule. Nel 17% dei casi dopo l'emissione della radice, la crescita si è arrestata. Per questa serie di problemi la semina *in vitro*, non è stata ritenuta tecnica idonea all'ottenimento di materiale per le prove di micropropagazione, portando alla scelta della semina in condizioni di non sterilità su vermiculite. In questo caso le percentuali di germinazione si attestano al 49,4%; sebbene la percentuale sia inferiore a quella ottenuta *in vitro*, a quattro settimane si ottengono piantine ben formate con 3-4 foglie, utilizzabili per successive prove.

La sterilizzazione con ipoclorito al 2% per 10 minuti, ha permesso di ottenere valori di contaminazione inferiori al 10%. Gli espianti così ottenuti sono stati quindi utilizzati per le prove di micropropagazione nelle varie condizioni ormonali. In assenza di regolatori di crescita (condizione HF), gli espianti non muoiono ma non si sviluppano. Dosi crescenti di citochinine determinano un aumento del numero medio di germogli prodotti da ciascun espianto, del numero medio di nodi per germoglio e della loro lunghezza (tab. 1).

Tra le due citochinine impiegate, la ZR sembra avere un effetto migliore; infatti, il numero medio di nodi e la lunghezza dei germogli ottenuti alle dosi di

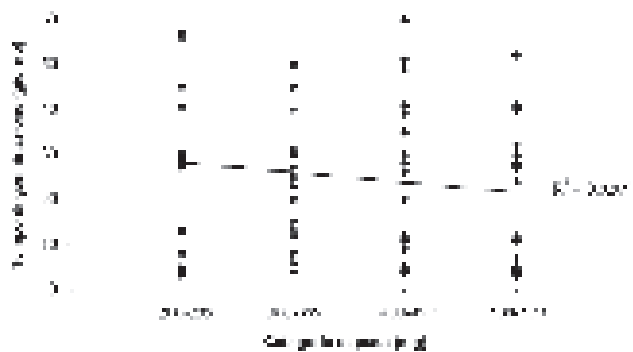


Fig. 3 - Verifica dell'influenza del peso di semi sulla velocità di germinazione *in vitro*. I semi sono stati suddivisi in quattro categorie di peso. La scarificazione per tutte le categorie è stata effettuata mediante trattamento in acido per 24 ore, mentre la sterilizzazione con ipoclorito di sodio al 2% per 20 minuti. La semina è stata effettuata in tubi contenenti terreno MS. Come parametro di germinazione è stato assunto l'emissione visibile della radice primaria dal tegumento.

Fig. 3 - Influence of seed weight on *in vitro* germination rate. Seeds were divided into four weight categories. Scarification was performed by acid treatment for 24 hours. As standard germination, primary root emission from the seed coat was used.

Tab. 1 - Effetto dei regolatori di crescita sullo sviluppo di germogli di *A. digitata* in coltura *in vitro* (media±errore standard). Lettere diverse indicano differenze significativamente diverse, per  $P \leq 0.05$  (test LSD di Fisher)

Tab. 1 - Effect of plant growth regulators on the development of shoots of *A. digitata* *in vitro* (mean±standard error). Different letters indicate significant differences at  $P \leq 0.05$  (Fisher's LSD test).

Condizione	N. medio germogli per espianto	N. medio di nodi	Lunghezza media germogli (mm)
HF	1,0±0,00	1,8±0,22a	5,5±0,71a
BAP 0,1 µM	1,1±0,05	2,0±0,44a	8,2±2,59b
BAP 1 µM	1,1±0,07	2,7±0,54b	6,6±1,77a
BAP 10 µM	1,0±0,12	2,9±0,37b	8,7±0,82b
ZR 0,1 µM	1,1±0,06	2,5±0,36b	7,3±1,67a
ZR 1 µM	1,1±0,13	4,4±1,2c	13,0±4,26c
ZR 10 µM	1,6±0,22	5,1±0,55c	22,1±3,01c
BAP 0,1 µM + IBA 1 µM	1,0±0,21	2,7±0,47b	6,4±1,20a
BAP 1 µM + IBA 1 µM	1,1±0,16	3,0±0,54b	13,9±3,04a
BAP 10 µM + IBA 1 µM	1,4±0,24	3,1±0,49b	5,2±1,36a
ZR 0,1 µM + IBA 1 µM	1,0±0,04	3,3±0,46b	10,1±2,11bc
ZR 1 µM + IBA 1 µM	1,1±0,05	3,0±0,43b	17,3±3,88c
ZR 10 µM + IBA 1 µM	1,5±0,24	3,9±0,69bc	13,4±2,25c
IBA 1 µM	1,2±0,14	3,5±0,70bc	15,0±2,70c

1 e 10 µM sono significativamente superiori a quelli ottenuti con BAP alle stesse dosi. L'aggiunta di una auxina (1 µM di IBA), alle diverse dosi di ZR o BAP, non determina un maggiore sviluppo dei germogli rispetto ai trattamenti con le sole citochinine. Solo il trattamento con 10 µM di ZR e 1 µM di IBA ha permesso di ottenere aumenti nello sviluppo dei germogli; tuttavia i valori rilevati sono paragonabili a quelli ottenuti con il trattamento della sola zeatina alla stessa concentrazione.

Sono riportati anche i dati ottenuti da espianti binodali trattati con la sola auxina alla dose impiegata nelle miscele. I risultati indicano che la sola IBA a 1 µM è in grado di stimolare la crescita dei germogli a valori paragonabili a quelli ottenuti con ZR (1 o 10 µM), da sola o in miscela. La presenza di auxina nel terreno di coltura ha determinato lo sviluppo di masse callose alla base dei segmenti binodali; tuttavia tale formazione non ha compromesso la qualità dei nuovi germogli ottenuti.

## Conclusioni

Questo lavoro intende colmare le lacune della letteratura scientifica inerenti alla micropropagazione di *A. digitata*, una pianta di sempre maggiore interesse commerciale e agronomico. Questo studio ha, per la prima volta, verificato le problematiche legate alla coltura *in vitro* utilizzando come materiale di partenza i semi. L'utilizzo di piante cresciute *in vivo* permette un approccio realistico per quanto riguarda le potenzialità e le esigenze della propagazione *in vitro*. Nel

corso delle prove sono state saggiate diverse condizioni ormonali. Dai risultati ottenuti con le prove di coltura *in vitro* emerge che per la micropropagazione di *A. digitata* è preferibile l'impiego di alte dosi (10 µM) di una citochinina, quale la ZR, piuttosto che basse dosi di una maggiormente attiva quale la BAP. Ulteriori prove sono necessarie per verificare gli effetti di diverse citochinine, quale ad esempio la 2-isopentenil adenina. Inoltre è necessario valutare gli effetti di diverse concentrazioni di diverse auxine, da sole o in combinazione con le citochinine, al fine di ottenere un maggior numero di germogli prodotti da ciascun espianto.

## Riassunto

In questo lavoro sono riportati i risultati preliminari della coltura *in vitro* di *Adansonia digitata* L., con particolare attenzione alla scarificazione e germinazione dei semi. A causa di problemi legati alla fisiologia dei semi e allo sviluppo di plantule, la semina *in vitro* non sembra offrire un sistema ottimale per ottenere materiale da micropropagare. Segmenti binodali prelevati da piante cresciute non in asepsi sono stati sterilizzati e impiegati per esperimenti di micropropagazione. Gli espianti sono stati posti su terreno di MS addizionato di varie combinazioni di regolatori di crescita (BAP, zeatina riboside, IBA).

**Parole chiave:** Baobab, germinazione, scarificazione, espianti binodali.

## Bibliografia

- ASSOGBADJO A.E., GLÈLÈ KAKAI R., EDON S., TYNDT T., SINSIN B., 2011. *Natural variation in fruit characteristics, seed germination and seedling growth of Adansonia digitata L. in Benin*. New Forests, 41:113-125.
- BAUM D.A., 1995. *Systematic revision of Adansonia*. Annals of the Missouri botanical gardens 82:440-470.
- CUNÍ SANCHEZ A., DE SMEDT S., HAQ N., SAMSON R., 2011. *Comparative study on baobab fruit morphological variation between western and southeastern Africa: opportunities for domestication*. Genet. Resour. Crop Evol., doi:10.1007/s10722-010-9647-4.
- CUNÍ SANCHEZ A., HAQ N., ASSOGBADJO A.E., 2010. *Variation in baobab (Adansonia digitata L.) leaf morphology and its relation to drought tolerance*. Genet. Resour. Crop Evol., doi:10.1007/s10722-009-9447-x.
- KATSUAKI I., KAMBOU S., 2007. *In vitro culture of an african multipurpose tree species: Adansonia digitata L.* Propagation of Ornamental Plant, 7 (2): 62-67.
- LOCKETT C.T., CALVERT C.C., GRIVETTI L.E., 2000. *Energy and micronutrient composition of dietary and medicinal wild plants consumed during drought*. Study of rural fulani, north eastern Nigeria. Int. J. Food Sci. Nutrition, 51:195-208.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant., 15:473-497.
- NOUR A.A., MAGBOUL B.I., KHEIRI N.H., 1980. *Chemical composition of Baobab fruit (Adansonia digitata L.)*. Tropical Sci., 22 (4) : 383-388.
- OSMAN M.A., 2004. *Chemical and nutrient analysis of Baobab (Adansonia digitata) fruit and seed protein solubility*. Plant foods Human Nutrition, 59 (1): 29-33.
- SVEJGAARD JENSEN J., BAYALA J., SANOU H., KORBO A., RÆBILD A., KAMBOU S., TOUGIANI A., BOUDA H.N., SØNDERGAARD LARSEN A., PARKOUDA C., 2011. *A research approach supporting domestication of Baobab (Adansonia digitata L.) in West Africa*. New Forests, DOI 10.1007/s11056-011-9246-z.
- VERTURANI S., BRACCIOLI E., BUZZONI V., MANFREDINI S., 2002. *Antioxidant capacity of Adansonia digitata L. fruit pulp and leaves*. Acta Phytotherapeutica, 5(2): 2-7.

## Radicazione ed incapsulamento di talee *vitro*-derivate di Citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf] Carrizo

Benedetta Chiancone, Fabrizio Giuseppe Casales e Maria Antonietta Germanà\*

Dipartimento DEMETRA, Università di Palermo

### Rooting and encapsulation of *vitro*-derived cuttings of Carrizo Citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]

**Abstract.** Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf] is an important *Citrus* rootstock, widespread throughout the world. In fact, in addition to the good quali-quantitative characteristics of the productions, it is tolerant to the *Citrus Tristeza Virus* (CTV). *Citrus* rootstocks are usually propagated by seed because of their polyembryony. The micropropagation and the encapsulation technology can be an effective alternative to the traditional methods of propagation. However, the high potential of the technology of synthetic seed is, sometimes, limited by the low conversion obtained. In this study, a preliminary test was carried out to improve the rooting of Carrizo citrange uninodal *vitro*-derived cuttings, identifying the best combination of the growth regulators: alpha-naftalenacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA) and indole-3-acetic acid (IAA) at various concentrations. The most responsive medium, with NAA (0.5 mg/l) and IBA (2.0 mg/l) has been, then, used for the encapsulation experiment. Regarding the encapsulation test, high percentages of viability and regrowth were recorded, while the conversion rate was low. Further studies are required both to improve *in vitro* rooting and the conversion levels of Carrizo synthetic seeds.

**Key words:** *Citrus Tristeza Virus*, growth regulators, citrus rootstocks, synthetic seed.

### Introduzione

Il citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf] Carrizo è un importante portinnesto degli agrumi diffuso in tutto il mondo per la sua tolleranza al virus della tristezza degli agrumi (CTV) (Germanà *et al.*, 2011). La domanda di questo portin-

nesto aumenta in maniera costante e per tale motivo, disporre di un metodo efficiente per la produzione di piante di citrange Carrizo *true-to-type* e *virus-free* risulta importante per il vivaismo agricolo. I portinnesti degli agrumi vengono usualmente propagati per seme perché caratterizzati da poliembrionia. La micropropagazione, insieme alla tecnologia del seme sintetico, può essere una valida alternativa ai metodi tradizionali di propagazione. I semi artificiali o sintetici (propaguli *vitro*-derivati incapsulati in una matrice di alginato di calcio con funzione trofica e protettiva) 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). Le elevate potenzialità della tecnologia del seme sintetico sono talvolta limitate dai bassi livelli di conversione ottenuti (Germanà *et al.*, 2007; 2011).

In questo studio, è stata svolta una prova preliminare su talee uninodali *vitro*-derivate di citrange Carrizo, ponendole in coltura su mezzi diversi per il tipo e per la concentrazione auxinica al fine di migliorare la loro risposta rizogena. Il mezzo di coltura che ha indotto la più alta percentuale di radicazione è stato, in seguito, usato come endosperma artificiale e come substrato di semina in una successiva prova di incapsulamento.

### Materiali e metodi

#### *Rizogenesi*

La prova di rizogenesi è stata svolta utilizzando porzioni di 1 cm di germogli *vitro*-derivati di citrange Carrizo (fig. 1) e valutando 6 mezzi di coltura differenti per la componente auxinica. Il mezzo di riferimento utilizzato è stato quello messo a punto da Al-Bahrany (2002) (denominato R5) costituito da sali minerali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) e addizionato di 0,1 g/l di mioinositolo, 1,0 mg/l di piridossina, 0,2 mg/l di tiamina, 1,0 mg/l di acido nicotinico, 30 g/l di saccarosio, 0,5 mg/l di acido naftalenacetico (NAA), 2,0 mg/l di acido indol-3-butirrico (IBA) e 8,5 g/l di Plant Agar (Micropoli). Gli altri

\* mariaantonietta.germana@unipa.it

Tab. 1 - Influenza del mezzo di coltura sui diversi parametri, dopo 6 settimane in coltura.

Tab. 1 - *Effects of different media on several parameters, after 6 weeks in culture.*

Mezzo	Germogliamento %	Lunghezza germogli cm	Radicazione %	Radici n°	Lunghezza radici cm
M1	32	1,1a	31ab	3,4	2,3
M2	27	1,0a	14bc	2,0	1,6
M3	27	0,7ab	44ab	1,3	1,4
M4	29	1,0a	36ab	1,4	1,1
R5	34	0,7ab	53a	1,6	2,4
C	43	0,6b	6c	1,0	2,0

Per ciascuna colonna, valori seguiti da lettere differenti sono statisticamente diversi per  $p \leq 0,05$  (ANOVA a una via, test di Tukey).

**M1:** 1,0 mg/l NAA, 1,0 mg/l IBA; **M2:** 2,0 mg/l NAA, 2,0 mg/l IBA; **M3:** 1,0 mg/l IBA, 1,0 mg/l IAA; **M4:** 2,0 mg/l IBA, 2,0 mg/l IAA; **R5:** Al-Bahrany (2002); **C:** nessun regolatore di crescita.

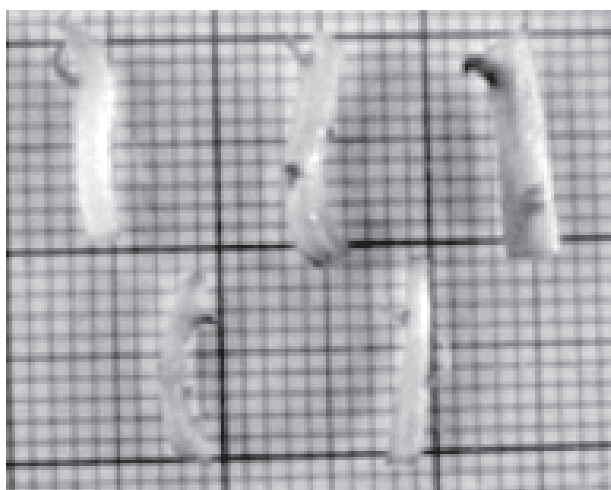


Fig. 1 Talee vitro-derivate di citrange Carrizo.  
Fig. 1 *Vitro-derived cuttings of Carrizo citrange.*

substrati utilizzati (denominati M1, M2, M3 ed M4) differivano per la combinazione e la concentrazione dei regolatori di crescita in essi contenuti (tab. 1). È stato, inoltre, preparato un mezzo di coltura privo di regolatori di crescita (C). Il pH di ciascun mezzo di coltura è stato portato al valore di 5,8 prima della sterilizzazione in autoclave a 121 °C e 104 kPa per 21 minuti. Per ciascuna prova sono stati utilizzati 36 espianti (6 talee/piastra scatola Petri, contenente 25 ml di mezzo), per un totale di 216 espianti. Le talee sono state incubate a  $27 \pm 1$  °C con fotoperiodo di 16 ore di luce con l'ausilio di lampade bianche fluorescenti (TMN 30 W/84; Philips, Suresnes, France) alla densità di flusso fotonico fotosintetico di  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Il monitoraggio delle microtalee è avvenuto con cadenza settimanale per sei settimane ed è stata valutata la percentuale di gemme schiuse, la percentuale di germogliamento (considerando i germogli di lunghezza  $>0,4$  cm), la lunghezza media dei germogli, la percentuale di espianti radicati, il numero di radici per espianto radicato e la lunghezza media delle radici. I dati sono stati elaborati ricorrendo all'ANOVA a una

via e la separazione delle medie è stata effettuata mediante test di Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### *Incapsulamento*

Il materiale vegetale utilizzato per gli esperimenti è stato ottenuto dalla proliferazione *in vitro* di germogli di citrange Carrizo, posti in coltura su mezzo denominato CRM (Germanà *et al.*, 2011), contenente sali minerali e vitamine MS e arricchito con 30 g/l di saccarosio, 1 mg/l di NAA, 10 mg/l di 6-benzilammipurina (BAP) e 8 g/l di agar (pH 5,8). Sono state prelevate porzioni uninodali di 3-4 mm di lunghezza (microtalee), dotate di due gemme ascellari e prive di foglie. L'incapsulamento di queste (fig. 2) è stato eseguito secondo il protocollo riportato da Micheli e Standardi (2005), utilizzando i substrati CRM ed R5 (entrambi a concentrazioni dimezzate di sali minerali e vitamine), senza (HF) o con regolatori di crescita (a concentrazione dimezzata), con e senza un pretrattamento a freddo, consistente nella conservazione delle microtalee prima dell'incapsulamento per 7 giorni a 4 °C, seguito da immersione delle capsule in una soluzione induttiva rizogena, costituita da 5 mg/l di IBA e 15 g/l di saccarosio, per 3 giorni a 4 °C al buio, secondo gli schemi riportati in tabella 2. Per ciascun trattamento sono state utilizzate 36 capsule (6 capsule per scatola Petri). Le condizioni di crescita sono state

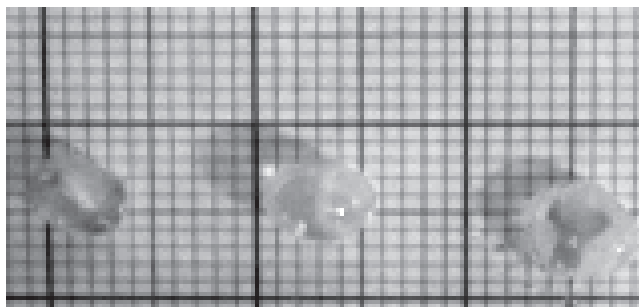


Fig. 2 - Microtalee di citrange Carrizo incapsulate.  
Fig. 2 - *Encapsulated microcuttings of Carrizo citrange.*

Tab. 2 - Influenza del pretrattamento, della composizione dell'endosperma artificiale e del substrato di semina sui diversi parametri dopo 45 giorni di coltura.

Tab. 2 - Effect of the pretreatment, of the artificial endosperm and of the sowing substrate on several parameters, after 45 days of in vitro culture.

Trattamento	Vitalità %	Ripresa %	Conversione %
T1	100	100a	17
T2	100	50,0b	-
T3	100	47,2b	-
T4	100	50,0b	-
T5	100	61,1b	-
T6	100	22,2c	-

Per ciascuna colonna, valori seguiti da lettere differenti sono statisticamente diversi per  $p \leq 0,05$  (ANOVA a una via, test di Tukey).

Legenda:

Trattamento	Pretrattamento	Endosperma	Mezzo di semina
T1	Si	CRM	CRM HF
T2	No	R5	R5 HF
T3	No	R5 HF	R5
T4	No	R5	R5
T5	No	R5 HF	R5 HF
T6	Si	R5	R5 HF

le medesime sopra descritte. I dati rilevati dopo 45 giorni a partire dalla semina e con cadenza settimanale, erano riferiti ai parametri: vitalità (% di espianti di aspetto verde, senza necrosi o ingiallimenti); ripresa (% di microtalee incapsulate che hanno prodotto germogli di lunghezza superiore a 4 mm); conversione (% di semi sintetici che hanno mostrato emergenza di germogli e radici lunghi almeno 4 mm).

I dati sono stati elaborati ricorrendo all'ANOVA a una via e la separazione delle medie è stata effettuata mediante test di Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Risultati e discussioni

### Rizogenesi

Dopo 10 giorni di coltura erano già presenti i primi germogli (lunghezza  $\geq 4$  mm); la radicazione è iniziata 15 giorni dopo la messa in coltura delle talee (fig. 3). I risultati della prova di rizogenesi sono riportati in tabella 1. Per quanto concerne la radicazione, il dato ottenuto dagli espianti posti su mezzo R5 (53%) è risultato statisticamente superiore a quello ottenuto sul mezzo di controllo (6%). I risultati ottenuti dagli espianti posti sugli altri mezzi di coltura sono statisticamente intermedi tra questi due valori. I dati ottenuti confermano quanto riferito da Montoliu *et al.* (2010), che riporta una radicazione pari a 53,2% degli espianti posti sul mezzo R5.



Fig. 3 - Talea radicata di citrange Carrizo.

Fig. 3 - Rooted cutting of Carrizo citrange.

### Incapsulamento

Le microtalee hanno mostrato una buona risposta all'incapsulamento. Esse, infatti, si sono mantenute vitali, conservando un intenso colore verde per tutta la durata dell'esperienza. La comparsa delle radici è stata più tardiva rispetto alla ripresa (fig. 4); infatti, le prime sono state osservate dopo la terza settimana di coltura (fig. 5).

I risultati della prova d'incapsulamento delle microtalee sono riportati in tabella 2. Dopo 45 giorni di coltura, la vitalità delle microtalee di Carrizo è stata molto alta, attestandosi per tutti i trattamenti al 100%. Anche i dati relativi alla ripresa sono risultati molto interessanti, compresi tra il 100% registrato nel trattamento T1 e il 22,2% rilevato per il trattamento T6. L'analisi statistica ha evidenziato differenze signifi-



Fig. 4 - Ripresa in una capsula di citrange Carrizo.

Fig. 4 - Regrowth in a capsule of Carrizo citrange.

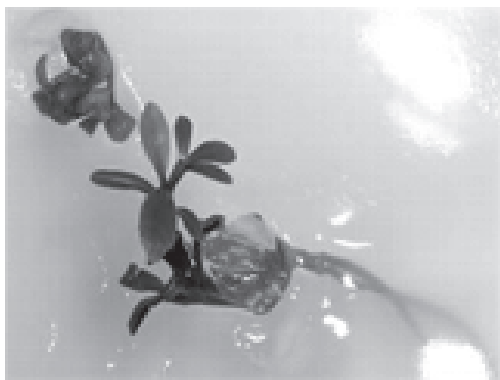


Fig. 5 - Conversione di semi sintetici di citrange Carrizo.  
Fig. 5 - Conversion of syntetic seeds of Carrizo citrange.

tive tra i trattamenti. Per quanto riguarda la conversione, i risultati hanno confermato che le microtalee incapsulate di Carrizo hanno difficoltà a radicare, facendo osservare, quindi, bassi livelli di conversione (Germanà *et al.*, 2011). Le uniche microtalee incapsulate che hanno radicato sono state quelle sottoposte al trattamento T1 (cioè con pretrattamento, endosperma CRM e mezzo di semina CRM HF).

I risultati conseguiti in questo studio sull'incapsulamento di microtalee di citrange Carrizo confermano e si allineano a quelli riportati da Germanà *et al.* (2011). Inoltre, nel confronto fra i mezzi di coltura, nonostante nella prova di radicazione *in vitro* il mezzo R5 abbia indotto i risultati migliori, per la conversione delle microtalee incapsulate il migliore è risultato il CRM.

## Conclusioni

Un approccio biotecnologico alla propagazione del citrange Carrizo può rappresentare una buona strategia per ottenere in breve tempo un elevato numero di portinnesti tolleranti al virus della tristezza. Questo studio, svolto allo scopo di approfondire le conoscenze sulla rizogenesi e sull'incapsulamento di microtalee di citrange Carrizo, ha confermato i risultati conseguiti precedentemente da altri autori per quanto riguarda l'efficacia dell'uso di differenti combinazioni di auxine. Inoltre, ha confermato che un pretrattamento a freddo effettuato prima dell'incapsulamento e l'immersione delle microtalee incapsulate in una soluzione induttiva contenente auxine ne favorisce la conversione. I risultati sembrano confermare l'applicabilità della tecnologia del seme sintetico alla produzione di uno dei più importanti portinnesti degli agrumi a livello mondiale. Ulteriori studi sono necessari al fine di aumentare la risposta rizogena delle microtalee *in vitro* e, soprattutto, la conversione dei propaguli incapsulati, per favorire l'applicazione pratica di tale strumento biotecnologico al comparto vivaistico, così

come alla conservazione del germoplasma e allo scambio di materiale vegetale.

## Ringraziamenti

Si ringrazia il CRA-ACM di Acireale per avere fornito i frutti di citrange Carrizo.

## Riassunto

Il citrange Carrizo è un portinnesto degli agrumi tollerante al *Citrus Tristeza Virus* (CTV). I portinnesti degli agrumi, grazie alla loro poliembrionia, vengono usualmente propagati per seme, ma la micropropagazione, insieme alla tecnologia del seme sintetico, possono essere una valida alternativa. In questo studio è stato individuato un mezzo di coltura che induce un'elevata risposta rizogena in microtalee di citrange Carrizo e lo stesso mezzo di coltura è stato usato per la prova di incapsulamento. Ulteriori studi sono necessari al fine di aumentare la risposta rizogena delle microtalee *in vitro* e, soprattutto, la conversione dei propaguli incapsulati.

**Parole chiave:** *Citrus Tristeza Virus*, portinnesti degli agrumi, regolatori di crescita, seme sintetico.

Lavoro finanziato dal progetto: "Lotta al virus della Tristezza degli Agrumi: Sviluppo e Innovazione" finanziato dall'Assessorato Regionale delle Risorse Agricole e Alimentari. Dipartimento Regionale degli Interventi Infrastrutturali per l'Agricoltura della Regione Sicilia.

## Bibliografia

- AL-BAHRANY A.M., 2002. *Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Science Horticulturae* 954:285-295.
- GERMANÀ M.A., HAFITZ I.A., MICHELI M., STANDARDI A., 2007. *In vitro and ex vitro conversion of encapsulated somatic embryos of Citrus reticulata* Blanco, cv. *Mandarino Tardivo di Ciaculli*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 88: 117-120 ISSN: 0167-6857.
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., CHIANCONE B., MACALUSO L., STANDARDI A., 2011. *Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange [Citrus sinensis (L.) Osb. x Poncirus trifoliata (L.) Raf]*. *Plant Cell Tissue And Organ Culture*. 106 (2): 299-307.
- MICHELI M., STANDARDI A., 2005. *Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (cv. Moraiolo). I: Effects of pretreatments, their size and the coating*. In: *Effect of pretreatments, their size and the coating*. *Current Topics in Biotechn.* 2: 81-86.
- MURASHIGE T., SKOOG F.A. 1962. *Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol Plant* 15:473-497.
- MONTOLIU A., GOMEZ-CADENAS A., PEREZ-CLEMENTE R.M., 2010. *In Vitro Adventitious Rooting of Carrizo Citrange Microshoots*. *HortScience* 45(6):988-990.
- 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.



## Propagazione *in vitro* di alcune Passiflore di interesse ornamentale

Giancarlo Fascella\*, Marcello Airò e GiovanVito Zizzo

CRA-SFM Unità di Ricerca per il Recupero e la Valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria (PA)

### **In vitro propagation of Passiflora species with ornamental value**

**Abstract.** With the aim to define a micropropagation protocol of some *Passiflora* species of high ornamental value, an *in vitro* cultivation trial was carried out for *P. edulis* Simms., *P. coerulea* L. e *P. foetida* L. Nodal cuttings from open-air plants were sterilized and placed *in vitro* on Murashige & Skoog (MS) basal medium. In the multiplication phase, four benzyl-adenine (BA) concentrations (0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mg l<sup>-1</sup>) were tested by adding them on MS basal substrate. Best results, in terms of multiplication rate and quality of propagation material, were achieved with BA 0.5 and 0.75 mg l<sup>-1</sup> whereas highest concentration recorded lower rate or higher rate together with superior hyperhydricity incidence. In the rooting phase, two concentrations (0.5 and 1.0 mg l<sup>-1</sup>) of indole butyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA), alone or combined, were added on MS substrate and tested. *In vitro* rooting response varied according with the species: on *P. coerulea*, the highest rate was observed in all treatments containing both hormones; on *P. edulis*, higher rooting rate and root length were recorded with IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 1 mg l<sup>-1</sup>; on *P. foetida*, best results were obtained in the treatment with IBA 1 mg l<sup>-1</sup>.

**Key words:** plant growth regulator, micropropagation, Passion flower.

### **Introduzione**

Il genere *Passiflora* comprende circa 500 specie tra piante rampicanti, lianose e piccoli alberi ed è il più vasto della famiglia delle Passifloraceae. Numerose specie vengono coltivate ai Tropici per la produzione di frutti eduli, mentre altre sono allevate, all'aperto (nei luoghi più caldi del globo) o in serra, per i loro fiori assai vistosi e colorati e molto apprezzati nel comparto florovivaistico (Dornelas *et al.*, 2006), nonché per il fogliame di dimensione e consistenza variabile.

Alcune specie sono state ampiamente utilizzate, in molti Paesi, per le loro proprietà terapeutiche (analgesiche, sedative, ansiolitiche, antimicrobiche, etc.) (Dhawan *et al.*, 2004).

Le tecniche di coltivazione *in vitro* delle specie ornamentali consentono una rapida propagazione massale dei genotipi di maggior interesse, favorendo di conseguenza, la commercializzazione di materiale vegetale sano ed uniforme (Winkelmann *et al.*, 2006). Inoltre, abbinata alle tecnologie più avanzate (trasformazione genetica, variabilità somaclonale), la micropropagazione è in grado di supportare i programmi di miglioramento genetico delle piante (Nhut *et al.*, 2006).

Sono stati precedentemente definiti protocolli di propagazione *in vitro* per le specie *Passiflora coccinea*, *P. herbertiana*, *P. mollissima* e *P. suberosa* (Drew, 1991), così come per *P. incarnata* (Mingozzi *et al.*, 2003) utilizzata nel settore farmacologico. E' stata, inoltre, ottenuta rigenerazione di germogli *in vitro* a partire da porzioni di foglia e da protoplasti di cellule fogliari su *P. edulis* f. *flavicarpa* (Becerra *et al.*, 2004; Davey *et al.*, 2005), nonché da tralci dell'ibrido *P. incarnata* L. x *P. tucumanensis* L. 'Guglielmo Betto' (Pipino *et al.*, 2010).

Presso il CRA-SFM di Bagheria (PA) è da qualche anno presente una collezione di Passiflore, coltivate all'aperto, da valorizzare a fini ornamentali come pianta rampicante per l'arredo di giardini e/o terrazzi. Nonostante questo genere sia stato precedentemente studiato, allo scopo di approfondire alcuni aspetti tecnici riguardanti i protocolli di micropropagazione, è stata condotta una prova di introduzione, moltiplicazione e radicazione *in vitro* delle specie *P. coerulea* L., *P. edulis* Simms. e *P. foetida* L.

### **Materiali e metodi**

Microtalee apicali e nodali delle suddette specie sono state prelevate da piante madri allevate in pien'aria e sterilizzate mediante immersione in etanolo al 70% per 60 secondi, successivo passaggio per 20 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% ed infine triplice risciacquo in acqua distillata

\* giancarlo.fascella@entecra.it

sterile. Il materiale così sterilizzato è stato introdotto in coltura su substrato agarizzato di Murashige e Skoog (1962) arricchito con 30 g/l<sup>-1</sup> di saccarosio e 8 g/l<sup>-1</sup> di agar. La percentuale di contaminazione degli espianti è stata valutata dopo 15 giorni.

Una volta certi dell'asepsi del materiale vegetale, questo è stato trasferito in substrato di moltiplicazione MS additivato con differenti concentrazioni di benziladenina (BA): 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg l<sup>-1</sup>. E' stato adottato uno schema sperimentale di tipo fattoriale (3 specie x 4 dosi di BA) con 4 ripetizioni per trattamento e 5 espianti per ripetizione. Il materiale *in vitro* veniva allevato in camera di crescita a 24 ± 1 °C (fotoperiodo di 16 ore) con lampade fluorescenti 40W Osram che fornivano un PPFd pari a 28 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. I tassi di moltiplicazione degli espianti sono stati osservati dopo circa 30 giorni.

Le plantule provenienti dalla fase di moltiplicazione sono state trasferite in substrato di radicazione MS con aggiunta di uno o due ormoni auxinici. Sono state saggiate due concentrazioni (0,5 e 1,0 mg l<sup>-1</sup>) di acido indolbutirrico (IBA) e di acido naftalenacetico (NAA), sia da soli che in combinazione tra loro. E' stato adottato uno schema sperimentale di tipo fattoriale (2 ormoni x 2 dosi) con 3 ripetizioni/trattamento e 5 espianti/ripetizione. Dopo circa 40 giorni sono stati valutati i tassi di radicazione delle plantule, il numero e la lunghezza delle radici.

Le piantine radicate *in vitro* sono state successivamente trasferite in vasi riempiti con un substrato a base di torba e perlite (1:1, v/v), collocati in bancali dotati di riscaldamento basale ed impianto di tipo mist, realizzati all'interno di una serra, per favorirne l'ambientamento. Dopo circa 30 giorni, sono stati rilevati tassi di attecchimento.

I dati raccolti sono stati sottoposti all'analisi della varianza e le medie sono state confrontate tramite relativo errore standard. I dati espressi in percentuale sono stati trasformati nei relativi valori angolari e così elaborati; nelle figure e nelle tabelle vengono riportati i dati non trasformati.

## Risultati e discussione

L'introduzione *in vitro* del materiale vegetale in studio non ha presentato problematiche particolari, nonostante le piante madri siano state allevate all'aperto, non evidenziando differenze nelle percentuali di contaminazione degli espianti in funzione della specie analizzata (30-40%) (dati non riportati). La possibilità di disporre in breve tempo di un adeguato quantitativo di materiale vegetale sterile risulta di fondamentale importanza per la definizione

di un efficiente protocollo di propagazione di massa (Lucchesini e Mensuali-Sodi, 2004), soprattutto quando le piante madri sono adulte.

Per quanto riguarda la fase di moltiplicazione, le dosi intermedie di BA (0,5 e 0,75 mg l<sup>-1</sup>) hanno consentito di ottenere, per tutte le specie studiate, un soddisfacente tasso moltiplicativo (1,2; 1,6 e 3,1 germogli/espianto, rispettivamente per *P. edulis*, *P. coerulea* e *P. foetida*) (tab. 1) ed una buona qualità dei germogli (intesa come assenza di iperidricità, di imbrunimento basale, etc.). Di contro, il livello ormonale più elevato (1 mg l<sup>-1</sup>) ha fatto registrare o una medesima resa moltiplicativa (*P. coerulea*) o un decremento dei tassi (-1,4 su *P. foetida*), oppure, come su *P. edulis*, un maggior numero di germogli/espianto (+1,0) ma anche un maggiore presenza di germogli vitrescenti e di callo (dati non riportati). E' infatti noto come il fenomeno dell'iperidricità venga considerato una caratteristica negativa in quanto in grado di compromettere la vitalità delle plantule ottenute da coltura *in vitro* (Hazarika e Bora, 2010). Così come è altrettanto risaputo che uno degli obiettivi dei protocolli di micropropagazione è rappresentato dall'individuazione di una dose ormonale in grado di abbinare efficienza ed economicità dei costi (Yunus *et al.*, 2012).

Relativamente alla fase di radicazione, è stata evidenziata una differente risposta delle plantule ai trattamenti ormonali in funzione della specie osservata: su *P. coerulea*, i tassi più elevati (86,2%) sono stati osservati in tutte le tesi in cui erano presenti entrambi i fitoregolatori, mentre quelli più contenuti (10,1%) sono stati rilevati nella tesi che non prevedeva l'utilizzo di ormoni (controllo) (fig. 1). Su *P. edulis*, i più alti tassi di radicazione *in vitro* (83,0%) sono stati registrati nella tesi con IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 1 mg l<sup>-1</sup>, quelli più bassi (0,1%) invece in corrispondenza del controllo (fig. 2); su *P. foetida*, i risultati migliori (80,0% di radicazione) sono stati ottenuti con IBA 1 mg l<sup>-1</sup>, seguiti da NAA 1 mg l<sup>-1</sup> e IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 1 mg l<sup>-1</sup> (65,2% di plantule radicate), mentre le percentuali più basse sono state osservate nel controllo (fig. 3).

Tab. 1 - Effetto della dose di BA (mg l<sup>-1</sup>) sul tasso di moltiplicazione (n. germogli/espianto) delle tre specie in osservazione. (\* = medie ± errori standard).

Tab. 1 - Effect of BA dose (mg l<sup>-1</sup>) on multiplication rate (n. shoots/explants) of the three *Passiflora* species.

Dosi	<i>P. coerulea</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. foetida</i>
BA 0,25	1,0 ± 0,1*	0,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1
BA 0,5	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,6 ± 0,2
BA 0,75	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,1	3,7 ± 0,2
BA 1,0	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,2

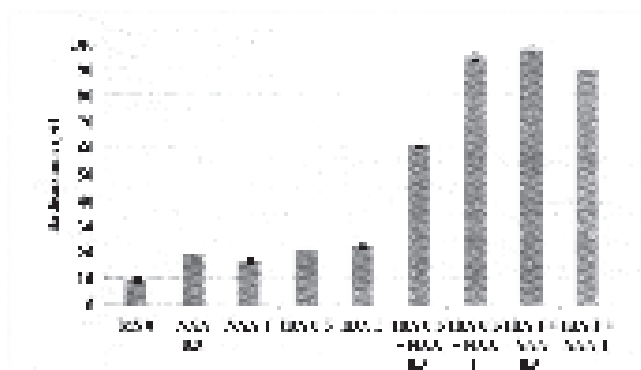


Fig. 1 - Percentuali di radicazione di *P. coerulea* a diversa concentrazione e combinazione di PGR (medie  $\pm$  errori standard).  
Fig. 1 - Rooting percentages in *P. coerulea* with different PGR concentrations.

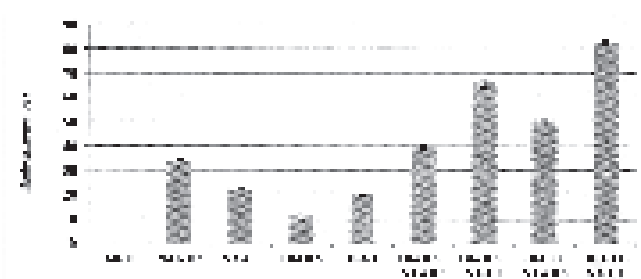


Fig. 2 - Percentuali di radicazione di *P. edulis* a diversa concentrazione e combinazione di PGR (medie  $\pm$  errori standard).  
Fig. 2 - Rooting percentages in *P. edulis* with different PGR concentrations.

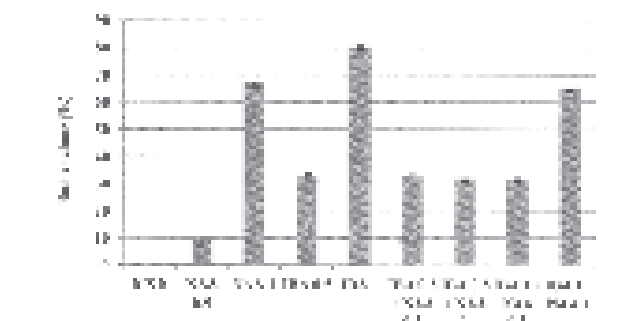


Fig. 3 - Percentuali di radicazione di *P. foetida* a diversa concentrazione e combinazione di PGR (medie  $\pm$  errori standard).  
Fig. 3 - Rooting percentages in *P. foetida* with different PGR concentrations.

Tab. 2 - Effetto dei PGR ( $\text{mg l}^{-1}$ ) sul numero e sulla lunghezza delle radici nelle tre specie in osservazione (\* = medie  $\pm$  errori standard).  
Tab. 2 - Effect of PGR ( $\text{mg l}^{-1}$ ) on root number and length of the three *Passiflora* species.

Dosi	Radici/plantula (n.)			Lunghezza radici (cm)		
	<i>P. coerulea</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. foetida</i>	<i>P. coerulea</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. foetida</i>
0 (controllo)	1,2 $\pm$ 0,2*	0	0	1,5 $\pm$ 0,9	0	0
NAA 0,5	1,4 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,2
NAA 1,0	2,0 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 1,5	1,7 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,6
IBA 0,5	1,5 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 0,1
IBA 1,0	1,9 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,7	6,6 $\pm$ 0,4
IBA 0,5 + NAA 0,5	5,2 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,2
IBA 0,5 + NAA 1,0	4,4 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 1,9	1,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,1
IBA 1,0 + NAA 0,5	4,0 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,5
IBA 1,0 + NAA 1,0	4,8 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,3

La maggior efficacia dell'azione combinata di due fitoregolatori rispetto a quella di un singolo ormone è stata precedentemente documentata da alcuni studi condotti su differenti specie ornamentali (Janarthanam e Seshadri, 2008; Papafotiou, 2010; Shatnawi, 2011), così come la differente risposta di più specie e/o cultivar ad uno stesso livello ormonale (Pati *et al.*, 2006).

Le tre specie in studio si sono, inoltre, differenziate sia per il numero di radici prodotte da ciascuna plantula che per la lunghezza delle radici: su *P. coerulea*, le plantule con il maggior numero di radici (4,6) sono state rilevate nelle tesi contenenti i due fitoregolatori di crescita rispetto a quelle in cui era presente un solo tipo di auxina (1,7), mentre le radici di maggior lunghezza media (3,9 cm) sono state misurate con IBA 0,5 + NAA 0,5 (tab. 2). Su *P. edulis*, la tesi con IBA 0,5  $\text{mg l}^{-1}$  ha permesso di ottenere il più elevato numero di radici (4,0) e la massima lunghezza delle stesse (4,7 cm); su *P. foetida*, invece, le tesi con entrambi gli ormoni hanno fatto registrare un numero di radici più alto (2,7) rispetto a quelle in cui era presente un solo PGR (1,6), mentre le radici più lunghe (6,6 cm) sono state rilevate con IBA 1  $\text{mg l}^{-1}$  ed, a seguire, con NAA 0,5  $\text{mg l}^{-1}$  (5,5 cm) (tab. 2).

Infine, i tassi di ambientamento delle piantine radicate *in vitro* sono risultati variabili in funzione delle specie oggetto studio (85, 72 e 61%, rispettivamente per *P. edulis*, *P. coerulea* e *P. foetida*) (dati non riportati in tabella).

### Conclusioni

Il presente lavoro ha permesso di definire un efficiente protocollo di propagazione *in vitro* di tre *Passiflora* d'interesse ornamentale, evidenziando come concentrazioni di BA comprese tra 0,5 e 0,75  $\text{mg l}^{-1}$  consentano di ottenere, per tutte le specie studiate, un soddisfacente tasso di moltiplicazione abbi-

nato una buona qualità dei germogli. Mentre la risposta moltiplicativa degli espianti alla BA è risultata piuttosto uniforme, con le opportune differenze tra le specie, quella delle plantule agli ormoni auxinici nella fase di radicazione è stata disomogenea e, quindi, di non facile interpretazione. Pertanto, proprio a causa della variabilità della risposta delle specie durante la radicazione (in termini di tassi, numero e lunghezza delle radici), è necessario che vengano, di volta in volta, apportate le opportune modifiche durante la messa a punto dello specifico protocollo in funzione del genotipo considerato.

### Ringraziamenti

Si ringrazia il sig. G. Giardina per la collaborazione tecnica.

### Riassunto

Allo scopo di valorizzare alcune Passiflore a fini ornamentali, microtalee delle specie *P. edulis* Simms., *P. coerulea* L. e *P. foetida* L. sono state introdotte *in vitro* e successivamente trasferite in substrato di moltiplicazione a diversa concentrazione di benziladenina (BA): 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg l<sup>-1</sup>. Le dosi intermedie di BA hanno consentito di ottenere soddisfacenti tassi moltiplicativi ed una buona qualità dei germogli; BA 1 mg l<sup>-1</sup> ha invece fatto registrare o un decremento dei tassi o un loro incremento abbinato ad una maggiore iperidricità. Nella fase di radicazione, sono state saggiate due concentrazioni (0,5 e 1,0 mg l<sup>-1</sup>) di acido indolbutirrico (IBA) e di acido naftalenacetico (NAA), sia da soli che in combinazione. La risposta delle plantule è variata con la specie: i più elevati tassi di radicazione sono stati osservati nelle tesi in cui erano presenti entrambi gli ormoni, sia su *P. coerulea* che su *P. edulis*, con IBA 1 mg l<sup>-1</sup> su *P. foetida*.

**Parole chiave:** fitoregolatori, micropropagazione, *Passiflora* spp.

Ricerca finanziata con il Progetto Mi.P.A.A.F. "INNOVazione di prodotto: *passiflora* e *solanum* ORnamentali per una filiera florovivaistica di QUALITÀ (IN.OR.QUA)", Pubblicazione n. 5.

### Bibliografia

- BECERRA D.C., FORERO A.P., GONGORA G.A. 2004. *Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of Passiflora edulis f. flavicarpa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 87-90.
- DAVEY M.R., ANTHONY, P., POWER J.B., LOWE K.C. 2005. *Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives*. Biotechnology Advances 23: 131-171.
- DHAWAN K., DHAWAN S., SHARMA A. 2004. *Passiflora: a review update*. J. Ethnopharmacology 94: 1-23.
- DORNELAS M.C., TSAI S.M., MARTINELLI RODRIGUEZ A.P. 2006. *Expressed sequence tags of genes involved in the flowering process of Passiflora species*. In: Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology, Teixeira da Silva ed., Vol. I: 483-488.
- DREW R.A. 1991. *In vitro culture of adult and juvenile bud explants of Passiflora species*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 26: 23-27.
- HAZARIKA B.N., BORA A. 2010. *Hyperhydricity - a bottleneck to micropropagation of plants*. Acta Hort. 865: 95-101.
- JANARTHANAM B., SESHADRI S. 2008. *In vitro manipulations of Rosa bourboniana L.* Acta Hort. 769: 357-370.
- LUCCHESINI M., MENSUALI-SODI A. 2004. *Influence of media composition and vessel ventilation on in vitro propagation of Phyllirea latifolia L.* Sci. Hort. 100: 117-125.
- MINGOZZI M., LUCCHESINI M., MENSUALI-SODI A. 2003. *La propagazione in vitro della Passiflora incarnata*. Colture protette 9: 139-144.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NHUT D.T., DON N.T., VU N.H., THIEN N.Q., THUY D.T.T., DUY N., TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2006. *Advanced technology in micropropagation of some important plants*. In: Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology, Teixeira da Silva ed., Vol. II: 325-335.
- PAPAFOTIOU M. 2010. *In vitro propagation of temperate zone woody plants with potential ornamental use*. Acta Hort. 885: 255-262.
- PATI P.K., RATH S.P., SHARMA M., SOOD A., AHUJA P.S. 2006. *In vitro propagation of rose-a review*. Biot. Adv. 24(1): 94-114.
- PIPINO L., BRAGLIA L., GIOVANNINI A., FASCELLA G., MERCURI A. 2010. *In vitro regeneration and multiplication of Passiflora hybrid 'Guglielmo Betto'*. In: S. Mohan Jain and S.J. Ochatt (eds.), 'Protocols for in vitro propagation of ornamental plants', Methods in Molecular Biology Ser. 589:153-162. Springer-Humana Press, New York, USA.
- SHATNAWI M.A. 2011. *Multiplication and cryogenic storage of Artemisia herba-alba: A medicinal plant*. Food, Agriculture & Environment 9: 340-344.
- WINKELMANN T., GEIER T., PREIL W. 2006. *Commercial in vitro plant production in Germany in 1985- 2004*. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 86: 319-327.
- YUNUS M.F., AZIZ M.A., KADIR M.A., RASHID A.A. 2012. *In vitro propagation of Etlingera elatior (Jack) (torch ginger)*. Sci. Hort. 135: 145-150.

## La propagazione *in vitro* del *Carex oshimensis* 'Evergold'

Ermanno Sacco<sup>1\*</sup>, Romano Roncasaglia<sup>2</sup>, Giuliano Dradi<sup>2</sup> e Barbara Ruffoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

<sup>2</sup> Vivai Piante Battistini, Martorano di Cesena (FC)

### Micropropagation of *Carex oshimensis* 'Evergold'

**Abstract.** The variegated sedge 'Evergold' (*Cyperaceae*) is an evergreen perennial ornamental grass native to Japan; it has dense tufts with flexible leaves decorated with a broad yellow-cream center stripe. Basal buds were collected from 10 months-old plants and sterilized with a solution of NaOCl (2.5% of active chlorine) followed by three rinses of sterile distilled water. The explants were multiplied on MS base medium supplemented with benzyladenine (BA) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) at a concentration of 1 mg/L each and cultured at 23±1 °C with a photoperiod of 16 hours of light and a P.P.F.D. of 30 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. To increase the efficiency of micropropagation and quality of explants trials were carried out using the temporary immersion system in RITA<sup>®</sup>. Rooting trials were carried out with indole acetic acid (IAA) or indolbutyric acid (IBA) or naphthaleneacetic acid (NAA) each at 0.5 mg/L. The IAA induced the highest rooting (90.5%), the highest number of roots per explant (5.58), the greater length of roots (2.92 cm) and the best explant quality. The shoots with or without roots, were transferred in the greenhouse for acclimatization, half in potting soil and perlite (1:1, v/v) and half in potting soil and sand (1:1, v/v). The best viability rate and quality of plants was obtained for plants already rooted *in vitro* and transferred in the sand mixture. The explants cultured in the RITA<sup>®</sup> containers showed an excellent quality and high viability rate (≥ 94.4%) in the acclimatization greenhouse.

**Key words:** sterilization, rooting, IAA, acclimatization, TIS culture.

### Introduzione

Il genere *Carex*, con circa 2.000 specie, è il più grande della famiglia delle *Cyperaceae* ed è uno dei generi di piante vascolari più diffusi e importanti dal punto di vista ecologico (Reznicek, 1990); il loro areale di distribuzione va dalle regioni tropicali all'ar-

tide (Bernard, 1990). I carici prediligono luoghi umidi e spesso si possono trovare lungo le sponde di corsi d'acqua, paludi o acquitrini. Per questo motivo sono utilizzati in programmi di ripristino di habitat selvatici. Molte specie ornamentali sono comunemente utilizzate come piante da giardino e sono molto apprezzate in quanto resistenti alla siccità e per la loro capacità di svilupparsi sia in ombra che in pieno sole. Il *Carex oshimensis* 'Evergold' (carice variegato) è una pianta erbacea perenne sempreverde, originaria del Giappone, che presenta ciuffi folti e persistenti con foglie flessibili e ricadenti ornate da una banda larga centrale giallo-crema, mentre le infiorescenze, insignificanti, sono piccole spighe marroni. In assenza di dati relativi, l'obiettivo di questo studio è stato quello di ottimizzare il protocollo di propagazione *in vitro* per produzione massale di piantine da vaso e da giardino.

### Materiali e metodi

Dai ciuffi, ripuliti dalle foglie, sono state prelevate le gemme basali che sono state sterilizzate mediante immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio (2,5% di cloro attivo) e gocce di Tween20<sup>®</sup> a cui sono seguiti tre risciacqui di acqua distillata sterile. Gli espianti asettici così ottenuti sono stati moltiplicati a cadenza mensile su terreno di coltura con sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionati con benziladenina (BA) e acido gibberellico (GA<sub>3</sub>) alla concentrazione di 1 mg/l ciascuno e sono stati mantenuti in camera di crescita a 23±1 °C con un fotoperiodo di 16 ore di luce e un P.P.F.D. di 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Il contenimento di eventuali contaminazioni batteriche dopo la sterilizzazione è stato effettuato utilizzando un antibiotico (Cefotaxime: 10 ml/l) e rinnovando spesso il terreno di coltura con subcolture di 20 giorni. Una volta ottenuto un numero sufficiente di espianti sterili sono state effettuate prove di radicazione confrontando terreni di coltura contenenti sali e vitamine MS e tre auxine: acido indolacetico (IAA), acido indolbutirrico (IBA) e acido naftalenacetico (NAA) ciascuno alla concentrazione di 0,5 mg/l. Sono state considerate 3 ripetizioni con 7 espianti ciascuna per trattamento. Dopo 30 giorni dall'impianto, oltre

\* ermannotdomenico.sacco@entecra.it

alla percentuale di radicazione, sono stati rilevati il numero di radici per espianto, la lunghezza delle radici (cm), l'altezza (cm) e il peso (g) degli espianti. Le condizioni colturali sono state quelle descritte nella fase di moltiplicazione. Il materiale radicato e non è stato trasferito dopo 30 giorni in serra di ambientamento, metà in substrato di coltura costituito da terriccio commerciale e perlite (1:1, v/v) e metà in terriccio commerciale e sabbia (1:1, v/v) sotto mist con spruzzatura di 10 secondi ogni 30 minuti. Dopo 30 giorni sono stati rilevate la percentuale di sopravvivenza e la qualità delle piante. Sono state effettuate inoltre esperimenti utilizzando il sistema di immersione temporanea (TIS): gli espianti provenienti dal terreno di moltiplicazione descritto precedentemente sono stati allevati in contenitori in polipropilene autoclavabili di 500 ml (RITA®, Cirad-Francia) in cui sono stati inseriti 160 ml di mezzo liquido prima della sterilizzazione in autoclave ed è stato impostato un ciclo di tre minuti di gorgogliamento ogni tre ore. I terreni utilizzati nel TIS sono stati preparati con sali e vitamine MS addizionati o meno con BA e GA<sub>3</sub> alla concentrazione di 1 mg/l ciascuno o IAA alla concentrazione di 0,5 mg/l. Sono state considerate 3 ripetizioni di 12 espianti ciascuna per trattamento. Sono stati rilevati, dopo 30 giorni, la percentuale di radicazione, il numero di radici per espianto, la lunghezza delle radici (cm), l'altezza (cm) e il peso (g) degli espianti. Gli espianti allevati con il sistema di immersione temporaneo sono stati poi trasferiti in serra d'ambientamento in substrato di coltura costituito da terriccio commerciale e sabbia (1:1, v/v) sotto mist con un'umidità relativa del 70%; dopo 30 giorni si è rilevato il tasso di vitalità degli espianti.

## Risultati

Con il sistema di sterilizzazione adottato è stato possibile ottenere una buona percentuale di espianti sterili. Saltuariamente, in alcune linee, è stato necessario utilizzare l'antibiotico per bloccare lo sviluppo di batteri endogeni latenti che però non hanno mai avuto effetto negativo sulla proliferazione dei germogli. Il tasso di moltiplicazione medio si è stabilizzato su 4,8 valore che permette una sufficiente velocità di produzione di piantine anche a scopo commerciale (fig. 1).

Gli espianti allevati con il sistema di immersione temporaneo (TIS) hanno mostrato un'ottima qualità e una minore iperidricità dei tessuti rispetto agli espianti allevati su mezzo agarizzato; l'utilizzo del terreno di coltura usato nella fase di moltiplicazione su substrato solido (BA+ GA<sub>3</sub> 1mg/l) ha fornito nel TIS un maggior peso e la maggiore altezza degli espianti (fig. 2).

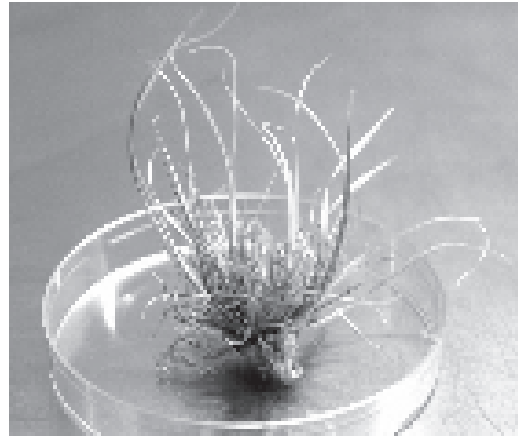


Fig. 1 - Cluster in moltiplicazione *in vitro* (BA+ GA<sub>3</sub> 1 mg/l).  
Fig. 1 - Cluster *in vitro* multiplication (BA+ GA<sub>3</sub> 1 mg/l).

In fase di radicazione, l'utilizzo di IAA alla concentrazione di 0,5 mg/l ha indotto il miglior tasso di radicazione (90,5%) combinato ad una buona qualità delle radici (numero di radici per espianto: 5,58 e lunghezza: 2,92 cm) (figg. 3 e 4). Utilizzando IBA alla stessa concentrazione è invece stato conseguito un peso maggiore degli espianti (fig. 4) che però non ha fornito alcun risultato utile in termini di radicazione.

Le piante già radicate *in vitro* hanno avuto una buona percentuale di ambientamento in serra (fig. 5, dopo 30 giorni); l'inserimento di sabbia nel substrato ha influito positivamente sulle performaces di ambientamento. Inoltre sia in presenza che in assenza di radici gli espianti allevati in TIS hanno mostrato un elevato tasso di vitalità (97,9%) in serra d'ambientamento consentendo quindi una migliore ottimizzazione dei tempi di propagazione *in vitro* (fig. 5).

## Conclusioni

Lo studio condotto su questa specie al fine di

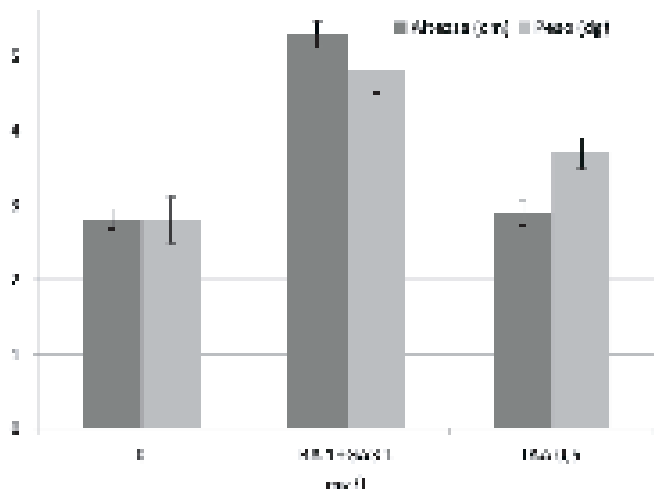


Fig. 2 - Altezza e peso degli espianti allevati in TIS.  
Fig. 2 - Height and weight of the shoots grown in TIS.

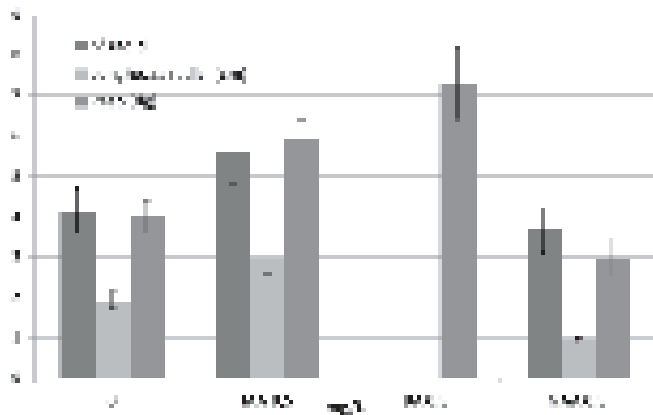


Fig. 3 - Effetto delle auxine saggiate sul numero e lunghezza delle radici e sul peso degli espianti (valore medio  $\pm$  E.S.).

Fig. 3 - In rooting trial effect of the auxins on the number and the length of roots and on the weight of explants (average  $\pm$  S.E.).

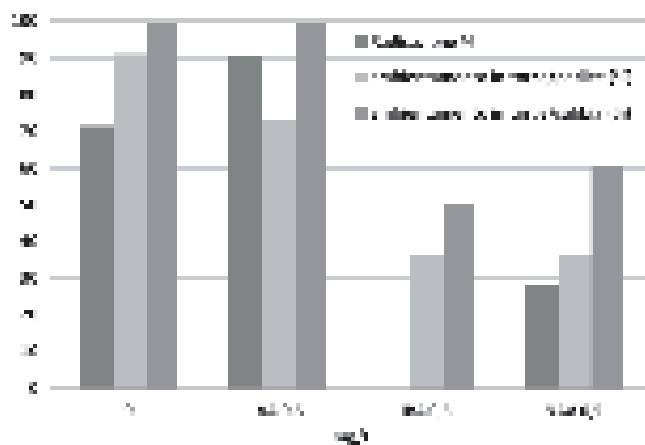


Fig. 4 - Radicazione (%) degli espianti in relazione all'auxina saggiata e percentuali di ambientamento in relazione alla combinazione tra le auxine saggiate *in vitro* e al substrato colturale utilizzato in serra.

Fig. 4 - Rooting percentage related to auxins and acclimatization percentages related to either the auxins used *in vitro* and the substrate used in the greenhouse (turf/perlite or turf/sand).

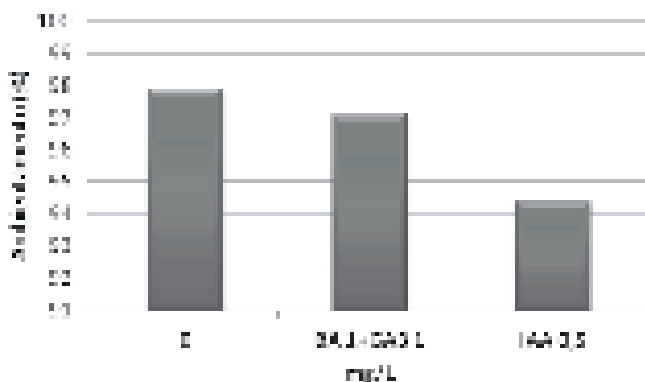


Fig. 5 - Ambientamento (%) degli espianti provenienti dal sistema di immersione temporanea.

Fig. 5 - Acclimatization (%) of explants coming from Temporary Immersion.

estendere l'impiego della propagazione *in vitro* su scala commerciale ha consentito l'ottimizzazione di ogni fase del ciclo micropropagativo permettendo la produzione di piante che hanno mostrato un'ottima qualità. L'utilizzo del sistema di immersione temporanea è, inoltre, risultato essere una valida alternativa al tradizionale sistema di propagazione *in vitro* in quanto ha permesso sia la produzione di piantine di qualità sia un risparmio dei tempi di ambientamento *ex vitro*.

### Riassunto

Il *Carex oshimensis* 'Evergold' originario del Giappone, è una graminacea ornamentale usata come pianta da vaso e da giardino. Le gemme basali prelevate da piante adulte sono state sterilizzate con NaOCl (2,5%) seguito da risciacqui in acqua distillata sterile. Gli espianti sono stati moltiplicati su terreno con sali MS addizionati con BA (1 mg/l) e GA<sub>3</sub> (1 mg/l). E' stato utilizzato il sistema TIS per aumentare la qualità delle piantine. In radicazione sono state confrontate IAA, IBA e NAA ciascuna a 0,5 mg/l. L'IAA ha indotto il maggior tasso di radicazione (90,5%), il maggior numero di radici per espianto (5,58), la maggior lunghezza delle radici (2,92 cm) e la migliore qualità degli espianti. In ambientamento sono stati confrontati terriccio commerciale e perlite (1:1, v/v) o terriccio commerciale e sabbia (1:1, v/v). L'utilizzo della sabbia ha permesso migliori performances di ambientamento; un elevato tasso di vitalità ( $\geq 94,4\%$ ) e ambientamento è stato ottenuto con le piante prodotte in TIS.

**Parole chiave:** sterilizzazione, radicazione, IAA, ambientamento, TIS.

### Bibliografia

BERNARD, J. M., 1990. *Life history and vegetative reproduction in Carex*. Can. J. Bot. 68:1441-1448

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 15: 473-497.

REZNICEK A. A., 1990. *Evolution in sedges (Carex, Cyperaceae)* Can. J. Bot. 68 :1409-1432.

## Rapida ed efficiente procedura di moltiplicazione *in vitro* di *Vanda* spp.

Paola Chiavazza\*, Andrea Faggio, Paolo Oderio e Marco Devecchi

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università di Torino

### Rapid and efficient procedure in aseptic propagation of *Vanda* spp.

**Abstract.** Seed propagation of orchids produces undesirable variability, in addition to inherent difficulty of seed germination, due to the extremely small content of endosperm. The present study aims at the development of a quickly and efficiently technique of *in vitro* culture of two species of genus *Vanda*. Multiplication procedure started using node explants properly sterilized and grown on MS medium with addition of different concentrations and combinations of growth regulators (NAA, BA). Combination of NAA 0,3 mg/l and BA 0,5 mg/l proved to be the best in terms of high regeneration frequency, early initiation of the culture and the subsequent development of seedlings. Use of NAA at higher concentrations resulted in the proliferation of large masses of callus; BA at lower doses (0,5 mg/l) gave rise to a small number of regenerants, while at higher concentrations (5 mg/l) there was no satisfactory elongation of formed PLBs. Root elongation phase occurred after about a month in MS0, with the formation of 1-4 roots/shoot. Rooted seedlings of 2-5 cm in length were transferred to pots with substrate for epiphytes where completed the acclimatization in about 4 weeks with a high survival rate (> 90%).

**Key words:** PBLs (protocorm-like bodies or pseudoprotocorms), orchids, aseptic culture

### Introduzione

La micropropagazione di orchidacee è stata segnalata per diversi generi appartenenti a questa famiglia. La maggior parte delle orchidee di importanza commerciale viene propagata tramite rigenerazione di protocormi (Protocorm-Like Bodies, PLBs) derivante da nodo (Tokuhara e Mu, 2001; Vij *et al.*, 2000) e da organogenesi indotta da vari tipi di espianco: come apici, nodi, foglie e callo in *Oncidium* (Su *et al.*, 2006), *Dendrobium* (Martin e Madassery, 2006) e *Paphiopedilum* (Chen *et al.*, 2004). Per indurre la for-

mazione di PLBs o la diretta produzione di germogli sono stati utilizzati diversi tipi di regolatori di crescita. BAP e NAA hanno indotto rigenerazione diretta in *Dendrobium* (Martin e Madassery, 2006), mentre altre auxine e citochinine si sono rivelate efficaci nella induzione di embrioni somatici in *Oncidium* (Su *et al.*, 2006). Questo studio è stato condotto per valutare la possibilità di indurre la formazione di PLBs da espianco di nodo di due specie di *Vanda*.

### Materiali e metodi

Espianco di nodo provenienti da due specie di *Vanda* (*V. tricolor*, *V. coerulea*) di fonte commerciale, sono stati usati come materiale di partenza. Dopo opportuna sterilizzazione, mediante immersione in ipoclorito di sodio (1% per 20') e ripetuti lavaggi in acqua sterile, gli espianco isolati sono stati posti in coltura in contenitori da 120 ml in substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) contenente il 2% di saccarosio come fonte di carbonio e incubati a 25°C con fotoperiodo di 16h/8h. Sono stati studiati gli effetti di due diverse combinazioni ormonali: NAA 0,3 mg/l/BA 0,5 mg/l e di NAA 1 mg/l/BA 5 mg/l. Nel corso della coltura si sono osservati la percentuale di inquinamento degli espianco, il numero di PLBs prodotti e il loro successivo sviluppo in plantule. I dati sono stati sottoposti ad ANOVA utilizzando il software Graph Pad Prism.

### Risultati e discussione

A pochi giorni dall'inizio della coltura, solo una piccola percentuale di espianco (< 10%) risultava non sterile, evidenziando che il trattamento prescelto con ipoclorito di sodio poteva considerarsi soddisfacente. Dopo circa quattro settimane di coltura è stato possibile osservare la comparsa delle prime risposte di rigenerazione diretta con la combinazione ormonale NAA 0,3/BA 0,5 mg/l, mentre in presenza di NAA 1/BA 5 mg/l gli espianco mostravano proliferazione di evidenti masse di callo (fig. 1) che solo successivamente differenziavano in PLBs. Inoltre, dove i regolatori di crescita erano presenti a concentrazioni mag-

\* paolamaria.chiavazza@unito.it



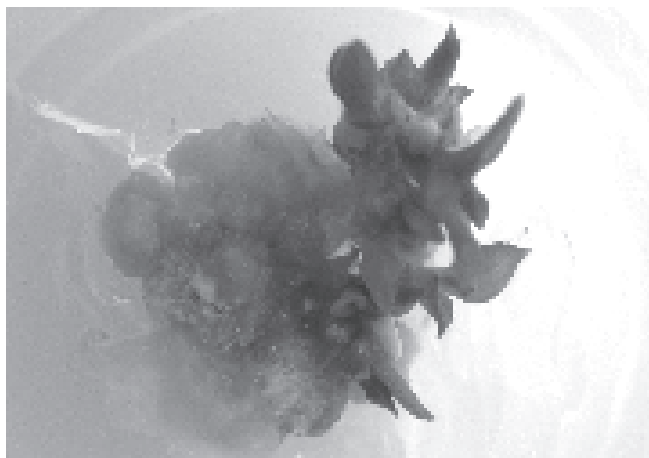


Fig. 1 - Proliferazione di callo in substrato contenente la combinazione NAA 1/BA 5 mg/l.

Fig. 1 - Callus growth in medium containing the combination NAA 1/BA 5 mg/l.

giori, a fronte di un numero più elevato di rigeneranti/nodo in formazione (fig. 2), si evidenziava un ritardo di maturazione dei PLBs con successiva incapacità degli stessi a proseguire nell'evoluzione del normale processo morfogenetico (fig. 3). Dopo una prima subcoltura di quattro settimane, la produzione dei rigeneranti proseguiva con una seconda subcoltura, fino alla ottava settimana. Si procedeva in seguito ad un ulteriore trasferimento dei PLBs formatisi, questa volta in substrato MS0 allo scopo di ottenere un efficace allungamento dell'apparato radicale (fig. 4). Dopo circa un mese di permanenza in MS0 le giovani plantule, dotate di 2-4 radici, raggiungevano una lunghezza di 2-5 cm (fig. 5) e potevano essere trasferite in un comune substrato per epifite. Il periodo di acclimatazione si protraeva per circa quattro settimane, con una elevata percentuale di sopravvivenza (> 90%).



Fig. 2 - Formazione di PBLs in NAA 0,3/BA 0,5 mg/l (sinistra) e in NAA 1/BA 5 mg/l (destra).

Fig. 2 - PBLs formation in NAA 0.3/BA 0.5 mg/l (left) and in NAA 1/BA 5 mg/l (right).

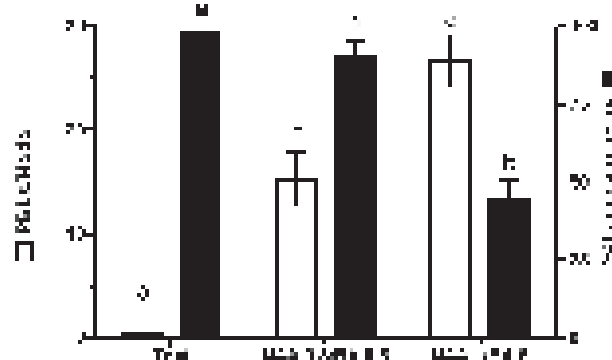


Fig. 3 - Confronto tra induzione di PBLs/nodo e resa in piante trapiantabili.

Fig. 3 - Comparison between PBLs/nodo induction and yield in transplantable plants.



Fig. 4 - Radici in allungamento in substrato MS0.

Fig. 4 - Roots elongation in MS0 medium.

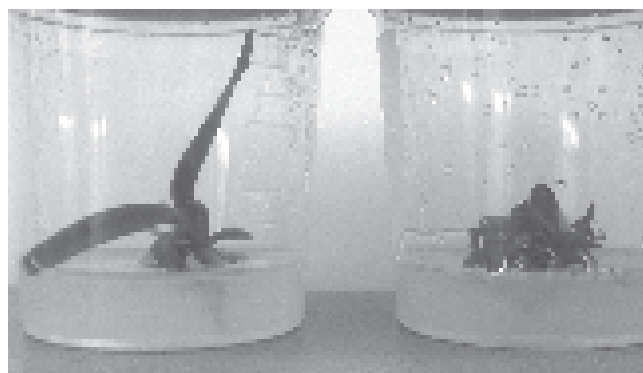


Fig. 5 - Giovani plantule al momento del trasferimento in mezzo base MS (destra) e in stadio finale di accrescimento (sinistra).

Fig. 5 - Young seedlings at the beginning of the subculture in basal medium MS (right) and in final stage of growth (left).

## Conclusioni

Il genere *Vanda* possiede un basso potenziale di propagazione vegetativa in normali condizioni di serra e, come per altre orchidee a sviluppo monopodiale, l'utilizzo di apici/meristemi come sistema di micro-

propagazione, oltre alla difficoltà intrinseca della tecnica, porta a un rapido depauperamento della pianta donatrice. Ciononostante, il presente studio ha dimostrato che l'azione sinergica di auxine/citochinine per la rigenerazione in tempi brevi di numerosi aggregati di PLBs, a loro volta passibili di ulteriore moltiplicazione *in vitro* entro poche settimane di crescita, rende l'utilizzo di espianti di nodo una tecnica efficiente e facilmente perseguibile per l'ottenimento di un elevato numero di giovani piante trapiantabili in circa quattro mesi di coltivazione.

### Riassunto

La procedura di moltiplicazione *in vitro* di due specie del genere *Vanda* ha avuto inizio utilizzando espianti di nodo coltivati in mezzo MS con aggiunta di differenti concentrazioni e combinazioni di regolatori di crescita (NAA, BA). La combinazione di NAA 0,3 mg/l e BA 0,5 mg/l si è rivelata la migliore in termini di elevata frequenza di rigenerazione, precoce iniziazione della coltura e successivo sviluppo di plantule. L'uso di NAA a concentrazioni maggiori (1 mg/l) ha comportato la proliferazione di masse di callo; BA a dosaggi minori (0,5 mg/l) ha dato origine

a un numero inferiore di PBLs, mentre a concentrazioni maggiori (5 mg/l) non si rendeva evidente un soddisfacente accrescimento dei rigeneranti prodotti.

**Parole chiave:** PLBs (*protocorm-like bodies* o pseudoprotocormi), orchidacee, coltura aseptica.

### Bibliografia

- CHEN T.Y., CHEN J.T., CHANG W.C., 2004. *Plant regeneration through direct bud formation from leaf cultures of Paphiopedilum orchids*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 76: 11-15.
- MARTIN K.P., MADASSERY J., 2006. *Rapid in vitro propagation of Dendrobium hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies*. Sci. Hort. 108: 95-99.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant 15: 473-497.
- SU Y.J., CHEN J.T., CHANG W.C., 2006. *Efficient and repetitive production of leaf-derived somatic embryos of Oncidium*. Biol. Plant. 50(1): 107-110.
- TOKUHARA K., MU M., 2001. *Induction of embryogenetic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk bud of Phalenopsis (orchidaceae)*. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37: 457-461.
- VIJ S.P., KHER A., GUPTA A., 2000. *Orchid micropropagation*. In: Chadha K.L., Ravindran P.N., Saahijram L. (eds) Biotechnology in Horticultural and Plantation Crops, Malhotra Printing House (New Delhi): 598-641.

## Propagazione *in vitro* di *Phyllostachis aurea* e di *Sasa minor* da pianta adulta mediante espianti nodali

Paola Chiavazza\*, Andrea Faggio, Umberto Grieco e Marco Devecchi

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università di Torino

### ***In vitro* propagation of *Phyllostachis aurea* and *Sasa minor* by nodal explants in mature plant**

**Abstract.** The establishment of aseptic culture from mature plant involves, however, the initial problems of contamination and high endogenous rates of greater instability in the propagation and, finally, considerable difficulties of rooting in different kinds of bamboo that easily root *in vivo*. The objective of this study was to determine an efficient *in vitro* propagation protocol of two bamboo species significantly required as ornamental plants. The research took into account the study of some commonly used plant growth regulators (NAA, BA) and their combination for effective production of microshoots. It has also been attempted the stimulation with coumarin to improve the poor rhizogenic capability of the two species. Coumarin (1-benzopyran-2-one) is an aromatic compound, active in many plant families already used in the past to stimulate rooting activity in recalcitrant plants. From experiments which are about to be concluded, we can assume the effectiveness of rhizogenic competence stimulation in *Phyllostachis* while in *Sasa* rooting frequency, expressed as percentage of rooted explants and number of formed roots, is still to be considered modest.

**Key words:** aseptic culture, seedlings, multiple sprouts.

### Introduzione

In generale, il ciclo di fioritura del bambù può variare da 25 fino a 60 anni (Gielis e Debergh, 1998). Dopo aver prodotto il seme, la pianta muore (Banik, 1995). I semi hanno la peculiarità di non avere un periodo di dormienza ed hanno, inoltre, una bassa vitalità. I sistemi di propagazione vegetativa tradizionale, di fatto, non sono molto efficienti ed il livello con il quale vengono utilizzate le riserve esistenti di

bambù, non permettono un ripopolamento sufficiente (Gielis e Oprins, 1998).

La coltura *in vitro* rappresenta quindi un metodo alternativo per una rapida moltiplicazione di questa pianta. Sono noti da tempo embriogenesi ed ottenimento di plantule da colture di callo (Huang e Murashige, 1983; Kheng *et al.*, 2011; Gillis *et al.*, 2007), nonché da altri tipi di tessuto (Varmah e Pant, 1981). Scopo di questa nota è la descrizione di un protocollo di micropropagazione di due specie di bambù richieste a livello ornamentale, utilizzando espianti di nodo prelevati da piante adulte.

### Materiali e metodi

Con la finalità di instaurare una procedura di micropropagazione, si sono utilizzati apici e gemme laterali prelevati da rami di piante di circa otto anni di due differenti generi (*Phyllostachis aurea* e *Sasa minor*). Il prelievo del materiale veniva attuato a partire dalla fase di germogliamento primaverile (fine febbraio, marzo). Segmenti di nodo di circa 2,5 - 3,5 cm di lunghezza contenenti almeno una gemma ascellare sono stati privati della guaina e lavati con acqua corrente per circa 15 minuti (fig. 1). Gli espianti sono

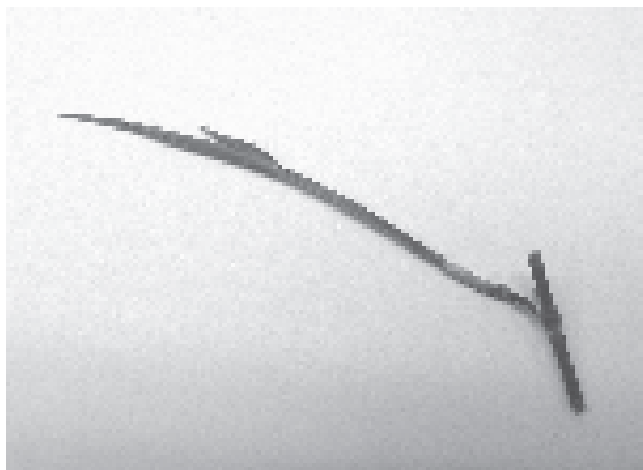


Fig. 1 - Segmento di nodo utilizzato come materiale di partenza.  
Fig. 1 - Nodal segment used as starting material.

\* paolamaria.chiavazza@unito.it

stati in seguito sottoposti a trattamento di sterilizzazione in ipoclorito di sodio all'1% per 30 minuti e risciacquati ripetutamente con acqua sterile prima della messa in coltura. Il primo trapianto e la successiva stabilizzazione della coltura sono stati realizzati in tubi di vetro, contenenti un unico espianto, su substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato con NAA 0,1 mg/l e BA 5 mg/l. In seguito, accertata la completa sterilità dei rigeneranti, si è preferito utilizzare contenitori in materiale plastico da 120 ml, in cui venivano posti in coltura 4 -5 germogli, incubati a 25 °C con un fotoperiodo di 16 h e intensità luminosa di 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (fig. 2). In tutte le fasi della micropropagazione è stato impiegato saccarosio al 2% e agar allo 0,7%, aggiustando il pH a 5,8.

Per la successiva fase di radicazione, i germogli prodotti sono stati messi in coltura in presenza di due diversi regolatori di crescita (IBA 2 mg/l, IAA 3 mg/l), entrambi noti per la loro specifica azione nell'indurre la comparsa di apici radicali. In seguito, ottenendo scarsa risposta da entrambi i trattamenti, è stato preso in considerazione l'uso della cumarina a concentrazioni di 2, 4, 8 e 16 mg/l (dati non riportati), già utilizzata in passato come composto aromatico stimolatore di rizogenesi in piante recalcitranti (Karhu e Zimmerman, 1993).

## Risultati e discussione

Uno degli obiettivi primari di questo protocollo di rigenerazione consisteva nella formazione di un elevato numero di rigeneranti *true-to-type*, da avviare successivamente alla fase di radicazione. Alla fine del primo ciclo di coltura, della durata di circa quattro

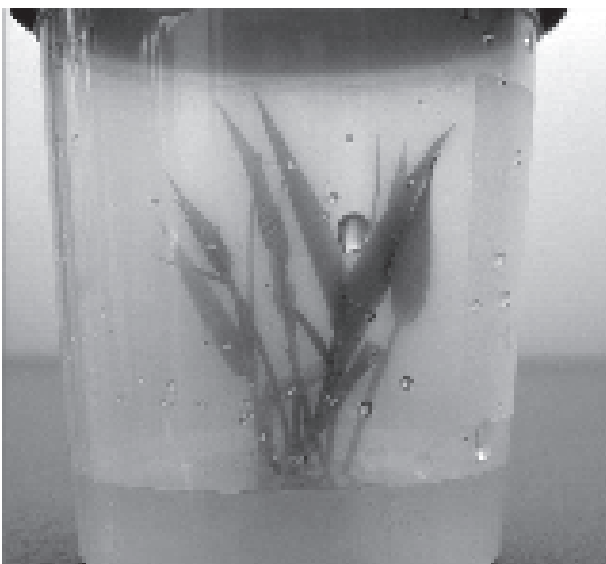


Fig. 2 - Inizio del ciclo di subcoltura in *Phyllostachis aurea*.  
Fig. 2 - Beginning of subculture in *Phyllostachis aurea*.

settimane, si potevano osservare numerosi germogli di buona qualità, aventi altezza variabile di 2 - 6 cm. Mentre una aliquota di questa produzione veniva nuovamente avviata alla moltiplicazione, una parte dei nuovi germogli prodotti era trasferita in mezzo MS con l'aggiunta, in un caso, di IBA 2 mg/l e nell'altro, di IAA 3 mg/l. L'uso separato, sia *in vitro* che *in vivo*, di entrambi questi regolatori di crescita, non ha significativamente migliorato la frequenza di radicazione nei due generi di bambù (fig. 3).

La consapevolezza di essere in presenza di piante recalcitranti alla radicazione *in vitro* ha individuato un secondo obiettivo di questo lavoro, consistente nella ricerca di composti, già utilizzati in passato su diverse specie, in grado di stimolare la rizogenesi.

La scelta della cumarina, molecola a struttura benzopiranic, sembra aver aumentato di circa il 50% la frequenza di radicazione in *Sasa* con plateau evidente già alle dosi minori (2 e 4 mg/l). Da tenere presente che in questa specie si evidenzia, in mezzo base, una percentuale di radicazione modesta (40%) che raggiunge il 60% in presenza di cumarina a 4 mg/l. Dosi maggiori (8 e 16 mg/l) non incrementano il numero di germogli in grado di radicare. La totalità delle piante prodotte erano in grado di acclimatarsi in tempi brevi, dando origine ad esemplari con un buon apparato radicale (fig. 4).

Dato maggiormente indicativo si riscontra con l'uso di cumarina in *Phyllostachis* dove, a fronte di una radicazione da considerarsi pressoché nulla in presenza di opportune stimolazioni con IBA ed IAA, si riscontra invece un aumento del numero di germogli con radici (circa 10%) in presenza di cumarina a 8 mg/l. Da esperimenti in via di conclusione, sembra confermato il notevole incremento nella frequenza di radicazione (100%) che avviene in presenza di cumarina a 16 mg/l (dati non riportati).

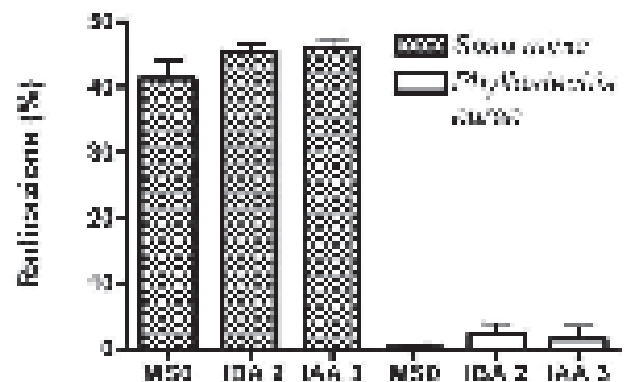


Fig. 3 - Frequenza di radicazione in *Phyllostachis* ed in *Sasa* in presenza ed in assenza di fitoregolatori.  
Fig. 3 - Rooting frequency of *Phyllostachis* and *Sasa* in presence of growth regulators and in hormone free condition.



Fig. 4 - Esemplare di *Sasa* a circa 18 mesi dall'ambientamento.  
Fig. 4 - Acclimatization of a 18-months old plant of *Sasa*.

## Conclusioni

Ipotizzando che il dato riguardante la radicazione *in vitro* possa essere generalizzato, si può pensare di estendere il protocollo a tutte quelle specie la cui instaurazione della coltura asettica deve obbligatoriamente avvenire da pianta adulta. In questo caso è ampiamente nota una evidente recalcitranza alla radicazione anche in piante che emettono facilmente radici *in vivo*.

Nel nostro caso, resta ancora da spiegare il diverso grado di risposta nella stimolazione della competenza rizogena dovuta a cumarina in *Sasa* e *Phyllostachis*. Studi successivi dovranno riguardare gli effetti di questa molecola allelopatica, nota per alterare gli assetti auxinici, sull'anatomia e la morfologia radicale e su una eventuale interazione tra la cumarina e i sistemi che regolano l'assorbimento ed il trasporto del nitrato nelle cellule radicali.

## Riassunto

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare un efficiente protocollo di propagazione *in vitro* di due generi di bambù significativamente richiesti come piante ornamentali. La ricerca ha preso in considerazione lo studio di alcuni fitoregolatori di comune utilizzo (NAA, BA) e la loro combinazione per una efficace produzione di microgermogli. Si è inoltre tentata la via della stimolazione con cumarina per migliorare la scarsa capacità rizogena delle due specie. Da esperimenti in via di conclusione, si può ipotizzare l'efficacia della stimolazione della competenza rizogena per *Phyllostachis*, mentre in *Sasa* la frequenza di radicazione, espressa sia come percentuale di espianti radicati che come numero di radici emesse, è ancora da considerarsi modesta.

**Parole chiave:** coltura asettica, germinelli, germogli multipli.

## Bibliografia

- BANIK R.L., 1995. *Selection criteria and population enhancement of bamboos*. In: WILLIAMS J.T., RAMANUJA RAO I.V., Rao A.N (Eds.) Genetic enhancement of bamboo and rattan, INBAR technical Report (New Delhi): 99-110.
- GIELIS J., DEBERGH P.C., 1998. *In vitro flowering of bamboos*. Flowering Newsletter 3: 22-25.
- GIELIS J., OPRINS J., 1998. *The strategic role of biotechnology in mass scale production of woody bamboos*. In: El Bassam, Behl, Prochnow (Eds), Sustainable agriculture for Food, Energy and Industry. James and James (London): 165-171.
- GILLIS, K., GIELIS, J., PEETERS, H., DHOOGHE, E., AND OPRINS, J. 2007. *Somatic embryogenesis from mature Bambusa balcooa Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos*. Plant Cell Tiss Org Cult 91:115-123.
- HUANG L.C., MURASHIGE T., 1983. *Callus culture investigation of bamboo I., callus cultures of Bambusa, Phyllostachis and Sasa*. Bot. Bull. Acad. Sin 24: 31-52.
- KARHU S.T., ZIMMERMAN R.H., 1993. *Effect of light and coumarine during root initiation on rooting apple cultivars in vitro*. Advances in horticultural science, 7 (1): 33- 36.
- KHENG T. CHEAH, LEE C. CHAILLE. *Somatic Embryogenesis From Mature Bambusa ventricosa*. Published by College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), University of Hawai'i. BIO-11., August 2011.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant 15: 473-497.
- VARMAH J.C., PANT M., 1981. *The production and utilization of bamboos*. The Indian Forest 107: 465-476.

## Micropropagazione di *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

Claudia Ruta, Angela Campanelli, Anna Tagarelli, Luigi Tedone, Giuseppe De Mastro e Irene Morone-Fortunato\*

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università di Bari

### Micropropagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

**Abstract.** The effects of plant growth regulators on the development of *Stevia* shoots cultivated *in vitro* and of mycorrhizal symbiosis on the *ex-vitro* establishment of microplants were investigated. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni is an herbaceous perennial herb, belonging to family *Asteraceae*. The leaves of this species are source of diterpene glycosides, such as stevioside and rebaudiosides. These compounds are estimated to be 100-300 times sweeter and, especially stevioside, are largely used as non-caloric natural sweetener for balanced diet. The problem of this species is its high variability in seed propagation, resulting in variability in sweetener level and composition. Micropropagation can provide production of genetically homogenous population in large numbers. Therefore, an efficient plant micropropagation system has been developed *in vitro* employing buds of *Stevia* from three different lines selected on the basis of their stevioside production. In the first step, multiple shoots were induced in the basal medium MB (Morone-Fortunato *et al.*, 2005) supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and indole-3-acetic acid (IAA) or with isopentenyl adenine (2ip), gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and indole-3-acetic acid. BAP plus IAA supported the best combination for shoot quality and number of shoots produced by two ecotypes (lines 27 and 38). In the second step, shoot rooting was obtained culturing microshoots in the basal medium enriched with liquid nutrient solution containing indole-3-acetic acid at different concentrations (0, 1.5 mg l<sup>-1</sup> or 4.5 mg l<sup>-1</sup>). The higher concentration of IAA played an important role on rooting response showing the best rooting percentages for all cultured lines of stevia. Mycorrhizal inoculation was an important biotechnology to improve *ex-vitro* acclimatization and vegetative performance.

**Key words:** *in vitro* culture, multiplication, rooting, mycorrhizal symbiosis, acclimatization.

### Introduzione

La stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni] è una pianta erbacea-arbustiva perenne appartenente alla famiglia delle *Asteraceae*. Originaria delle regioni settentrionali del Sud America, viene coltivata a fini commerciali in Cina, Taiwan, Thailandia, Corea, Giappone, India e Malesia. L'importanza di questa specie è legata al valore alimentare, nutrizionale e sanitario. Le foglie hanno un elevato potere edulcorante di 100-300 volte superiore al saccarosio (Tanaka, 1982), grazie alla presenza di glucosidi diterpenici, quali lo stevioside e il rebaudioside, che possono fornire un dolcificante totalmente naturale e a basso valore calorico, senza grassi e maltodestrine, ottimale per le diete ipocaloriche.

Tale aspetto, sostenuto dalla sensibilità ecologica dei consumatori, sempre più attenti nella scelta di prodotti naturali, ha determinato un notevole interesse attorno a questa coltura di importanza salutistica e la richiesta urgente di produrre grandi quantitativi di piante da germoplasma selezionato.

Diversi sono, pertanto, gli studi condotti sulla stevia per l'individuazione di protocolli di micropropagazione (Tamura *et al.*, 1984; Ferreira e Handro, 1988; Sivaram e Mukundan, 2003; Mitra e Pal, 2007), quale tecnica alternativa alla propagazione gamica. I semi, infatti, hanno percentuali di germinazione molto bassa e la propagazione da seme non consente l'ottenimento di popolazioni omogenee per composizione e tenore in glucosidi (Nakamura e Tamura, 1985; Miyagawa *et al.*, 1986). La micropropagazione potrebbe risolvere questo problema fornendo piante uniformi.

In questa ricerca si sono voluti studiare il comportamento *in vitro* di tre chemiotipi di stevia, selezionati in campo per l'elevato contenuto in stevioside, e la risposta a differenti combinazioni ormonali, al fine di ottenere la miglior crescita *in vitro* degli espianti allevati. L'obiettivo è stato quello di migliorare la fase di proliferazione e radicazione dei germogli e di incrementare l'attecchimento *ex-vitro* delle plantule ricorrendo alla tecnica di inoculazione micorrizica al trapianto.

\* irene.morone@agr.uniba.it

## Materiali e metodi

### Micropropagazione per gemme ascellari

L'espianto primario è costituito da apici vegetativi (7-8 mm) prelevati da piante madri selezionate e mantenute in campo presso l'azienda sperimentale "Pantanelli" in agro di Policoro (MT). Il substrato base (MB) è costituito da macroelementi di Murashige e Skoog (1962), microelementi di Nitsch e Nitsch (1972), Fe-EDTA (30 mg l<sup>-1</sup>), tiamina HCl (0,4 mg l<sup>-1</sup>), mioinositolo (100 mg l<sup>-1</sup>), agar (7 g l<sup>-1</sup>) e saccarosio (20 g l<sup>-1</sup>) secondo il protocollo di Morone-Fortunato *et al.*, 2005.

In fase di stabilizzazione e moltiplicazione sono state saggiate due diverse combinazioni ormonali:

- isopentenil adenina (2ip - 1 mg l<sup>-1</sup>), acido indolacetico (IAA - 1 mg l<sup>-1</sup>), acido gibberellico (GA<sub>3</sub> - 0,025 mg l<sup>-1</sup>);
- 6-benzilaminopurina (BAP - 0,5 mg l<sup>-1</sup>), IAA (3 mg l<sup>-1</sup>).

Dopo quattro settimane è stato valutato il numero dei germogli prodotti da ogni singolo espianto posto in coltura. Gli espianti sono stati subcolturali per tre volte al termine delle quali è stato valutato l'indice medio di moltiplicazione dei germogli. Questi ultimi, ottenuti per moltiplicazione e microtalea, sono stati indotti alla radicazione su un substrato nutritivo agarizzato privo di ormoni, arricchito da uno strato sottile di soluzione nutritiva liquida (MB) contenente IAA a diverse concentrazioni (0 - 1,5 - 4,5 mg l<sup>-1</sup>). Dopo 40 giorni è stata rilevata la percentuale di espianti radicati. Gli espianti sono stati incubati in camera di crescita a 23±1 °C con fotoperiodo di 16 h e intensità della luce di 60 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### Ambientamento

Nella fase di acclimatazione *ex-vitro* 50 plantule radicate, con altezza del germoglio di 5 cm circa, per ciascun chemiotipo, sono state trapiantate in vasetti (v = 0,2 dm<sup>3</sup>) contenenti una miscela sterile di torba (torba bruna di sfagno, carbonio organico di origine biologica 46%, azoto organico 1,2%, sostanza organica 80%, pH 6) e perlite (2:1, v/v) e trasferite in una serra metallo-vetro, provvista di impianto di nebulizzazione e climatizzata a 20-25 °C, con umidità relativa ridotta da 85-90% a 60-65% nel corso delle prime 2 settimane.

La metà delle piantine trapiantate per ogni chemiotipo di stevia sono state inoculate con funghi micorrizici arbuscolari della specie *Glomus viscosum*. L'inoculo micorrizico, 10 grammi per vasetto, consiste di circa 50-60 spore, micelio esterno e frammenti di radici micorrizzate ottenute da piante di fragola

(*Fragaria x Ananassa* Duch.) usate come piante trappola per moltiplicare l'inoculo. Dopo 60 giorni dal trapianto è stato effettuato il conteggio delle piante sopravvissute ed è stata stimata la percentuale di attecchimento *ex vitro*. Sulle stesse, per ciascuna tesi (micorrizzata o non micorrizzata) e per ciascun chemiotipo, sono stati inoltre valutati i parametri di crescita e simbiotici.

Dieci piante scelte a caso per ciascun chemiotipo di stevia sono state raccolte e sono stati determinati i seguenti parametri: altezza (cm), numero di foglie per pianta (n), peso fresco e secco porzione epigea (g), area fogliare (cm<sup>2</sup>), peso fresco e secco porzione ipogea (g). I pesi secchi sono stati misurati dopo essiccazione dei campioni in stufa a 105°C per 48 ore. L'area fogliare è stata misurata con l'ausilio di un Licor LAI Area Meter 3100.

Inoltre, le radici sono state colorate usando il metodo di Philips e Haymann (1970) per poter valutare la percentuale di colonizzazione micorrizica con il metodo di Trouvelot *et al.* (1986).

### Analisi statistica

Per tutti gli esperimenti è stato adottato uno schema sperimentale a randomizzazione completa. I dati sono stati statisticamente analizzati con ANOVA e successivamente i confronti tra le medie sono stati effettuati con il metodo di Student-Newman-Keuls (test SNK) ad un livello di significatività p≤0,01.

## Risultati e discussione

E' stato definito un valido protocollo di micropropagazione, dal quale emerge il miglior effetto della combinazione ormonale BAP + IAA per un'ottimale induzione alla moltiplicazione dei germogli rispetto alla combinazione 2ip + IAA + GA<sub>3</sub> (tab. 1).

Tab. 1 - Numero di germogli per espianto ottenuti in tre chemiotipi selezionati di *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Linea 26, 27, 38) allevati per 4 settimane *in vitro* su substrato arricchito con differenti combinazioni ormonali: 2ip (1 mg l<sup>-1</sup>) + IAA (1 mg l<sup>-1</sup>) + GA<sub>3</sub> (0,025 mg l<sup>-1</sup>) o BAP (0,5 mg l<sup>-1</sup>) + IAA (3 mg l<sup>-1</sup>). Lettere diverse indicano differenze significative (Test SNK - p≤0,01).

Tab. 1 - Shoots/explant number of three chemotypes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni after 4 weeks of *in vitro* culture related to different hormonal combinations: 2ip (1 mg l<sup>-1</sup>) + IAA (1 mg l<sup>-1</sup>) + GA<sub>3</sub> (0,025 mg l<sup>-1</sup>) or BAP (0,5 mg l<sup>-1</sup>) + IAA (3 mg l<sup>-1</sup>). Different letters indicate different values according to SNK's Test (p≤0,01).

Combinazione ormonale	Germogli / espianto (n ± e.s.)		
	Linea 26	Linea 27	Linea 38
2ip+IAA+GA <sub>3</sub>	3,3±0,4 b	2,8±0,3 b	3,7±0,4 b
BAP + IAA	4,0±0,3 b	8,0±0,6 a	7,0±0,5 a

La comparazione tra medie (test SNK -  $p \leq 0,01$ ) evidenzia la migliore risposta dei chemiotipi 27 e 38 sulla differenziazione dei germogli (tab. 1), mostrando un indice medio di moltiplicazione, sullo stesso substrato di proliferazione, molto elevato rispetto al chemiotipo 26 (fig. 1).

Lo screening di radicazione ha rilevato un progressivo aumento della percentuale dei germogli radicati all'aumentare della concentrazione di IAA nel substrato di coltura. Alla concentrazione più elevata ( $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ ) la rizogenesi, infatti, ha interessato l'87,5% degli espianti in coltura. I tre chemiotipi di stevia oggetto di studio hanno manifestato un comportamen-

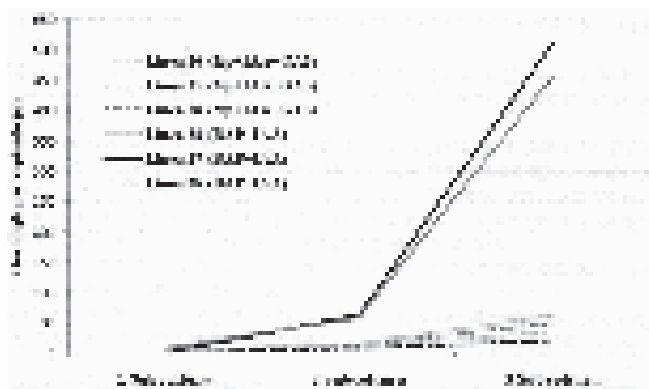


Fig. 1 - Indice medio di moltiplicazione di tre chemiotipi selezionati di *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Linea 26, 27, 38) allevati per 4 settimane *in vitro* su substrato arricchito con differenti combinazioni ormonali: 2ip ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) + IAA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) +  $\text{GA}_3$  ( $0,025 \text{ mg l}^{-1}$ ) o BAP ( $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ) + IAA ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Fig. 1 - Multiplication average index of shoots of three chemotypes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni grown on substrate enriched in 2ip ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) + IAA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) +  $\text{GA}_3$  ( $0,025 \text{ mg l}^{-1}$ ) or BAP ( $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ) + IAA ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ) after 4 weeks of *in vitro* culture.

to simile in risposta ai tre dosaggi ormonali di IAA saggiati in fase di radicazione (fig. 2).

L'ambientamento rappresenta una fase molto delicata ai fini dell'attecchimento *ex-vitro* delle plantule micropropagate (Wang *et al.*, 1993) che può essere mitigata dalla micorrizzazione (Ruta *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2008; Estrada-Luna e Davies, 2003; Duffy e Cassells, 2000). I risultati della ricerca confermano un effetto favorevole dell'inoculazione micorrizica per superare gli stress da trapianto. I tre chemiotipi di stevia ambientati e micorrizzati hanno registrato, a 60 giorni dal trapianto, percentuali di attecchimento

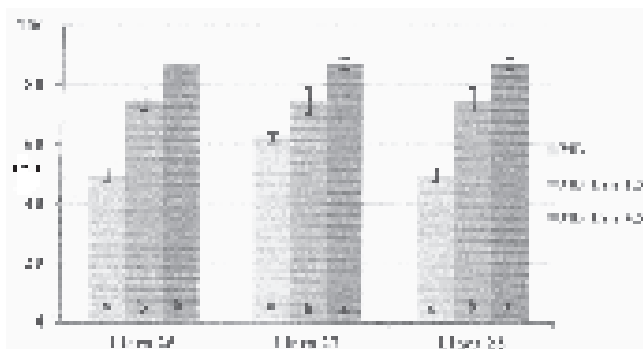


Fig. 2 - Percentuale di radicazione dei germogli di tre chemiotipi selezionati di *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Linea 26, 27, 38), allevati per 4 settimane *in vitro* su substrato arricchito in IAA a diverse concentrazioni ormonali ( $0 - 1,5 - 4,5 \text{ mg l}^{-1}$ ). Gli istogrammi indicano i valori medi e le barre  $\pm$  l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. Test SNK ( $p \leq 0,01$ ).

Fig. 2 - Rooting percentage of shoots of three chemotypes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni grown on substrate enriched in IAA ( $0 - 1,5 - 4,5 \text{ mg l}^{-1}$ ) after 4 weeks of *in vitro* culture. Histograms represent the average and the bars  $\pm$  standard error. Different letters indicate different values according to SNK's Test ( $p \leq 0,01$ ).

Tab. 2 - Principali caratteristiche bio-morfologiche di piantine di tre chemiotipi selezionati di *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Linea 26, 27, 38) allevate in serra su substrato arricchito in inoculo micorrizico (*Glomus viscosum* AM+) o in assenza di inoculo (testimone AM-), a due mesi dal trapianto. Comparando i dati lungo le colonne della tabella, lettere diverse, indicano differenze statisticamente significative.

Test SNK ( $p \leq 0,01$ ).

Tab. 2 - Main bio-morphological characteristics of three chemotypes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni grown in greenhouse on substrate enriched with mycorrhizal inoculum (*Glomus viscosum* AM+) or without inoculum (control AM-) two months after transplants.

Different letters indicate different values according to SNK's Test ( $p \leq 0,01$ ).

Caratteristiche	Altezza (cm)	Accestimento (n)	Fogli (n)	Area fogliare (cm <sup>2</sup> )	Peso epigeo		Peso ipigeo	
					Fresco (g)	Secco (g)	Fresco (g)	Secco (g)
Micorrizza (M)								
AM+	23,2a	3,0	39,3a	42,8a	2,3a	0,5	2,5	0,4
AM-	17,7b	2,2	31,5b	36,0b	1,8b	0,4	1,9	0,3
Signif.	*	NS	*	*	*	NS	NS	NS
Chemiotipo (S)								
Linea 26	27,1a	3,2a	27,0b	45,9a	2,6a	0,6a	3,1a	0,5a
Linea 27	18,9b	3,0a	42,3a	40,2ab	2,3a	0,4ab	2,6a	0,3b
Linea 38	15,3b	1,7b	37,0ab	32,0a	1,4b	0,3b	1,0b	0,2c
Signif.	*	*	*	*	*	*	*	*
M x S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS



pari circa al 90% rispetto alle tesi non micorrizzate, i cui valori si sono attestati su percentuali del 65%.

I rilievi distruttivi, per ogni linea di stevia studiata, hanno evidenziato un effetto benefico dell'influenza della simbiosi micorrizica su molti parametri morfologici saggiati (tab. 2). La linea 26 evidenzia i migliori accrescimenti nella fase *post-vitro* (tab. 2).

L'efficacia della performance simbiotica è stata confermata dalla determinazione della percentuale di infezione micorrizica, risultata superiore al 60% per ogni linea, indice di una buona affinità simbiotica tra il *Glomus* inoculato e la pianta ospite.

## Conclusioni

In conclusione, la metodologia descritta nel presente studio è appropriata per la moltiplicazione di *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Il lavoro ha consentito di individuare un buon protocollo per l'accrescimento *in vitro* dei germogli di stevia, permettendo di ottenere un buon tasso di proliferazione e la produzione di microtalee radicate; in fase di ambientamento, l'aggiunta di inoculo micorrizico al substrato di coltura ha determinato un miglioramento della performance delle piantine.

## Riassunto

La ricerca condotta ha portato all'individuazione di un efficace protocollo per la micropropagazione di chemiotipi differenti *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Gemme apicali e ascellari, prelevate da piante madri allevate in campo, hanno rappresentato il materiale di partenza per la coltura *in vitro*. Per la fase di stabilizzazione e moltiplicazione sono state testate due differenti combinazioni ormonali: isopentenil adenina, acido indolacetico e acido gibberellico o 6-benzilaminopurina e acido indolacetico. Dopo quattro settimane i germogli, ottenuti per moltiplicazione e microtalea, sono stati indotti alla radicazione su un substrato nutritivo agarizzato privo di ormoni arricchito da uno strato sottile di soluzione nutritiva liquida contenente IAA a diverse concentrazioni (0 - 1,5 - 4,5 mg l<sup>-1</sup>). Durante l'ambientamento *ex vitro*, avvenuto in serra climatizzata e nebulizzata, è stato valutato l'effetto della tecnica di micorrizzazione per ridurre gli stress da trapianto. Il miglior substrato di moltiplicazione è risultato quello arricchito in BAP e IAA (7-8 germogli per espianto). La maggiore percentuale di germogli radicati (80%) è stata osservata sul substrato

contenente la più alta concentrazione di IAA. Le piante micorrizzate all'ambientamento si sono accresciute maggiormente delle non micorrizzate.

## Bibliografia

- DUFFY E. M., CASSELLS A. C., 2000. *The effect of inoculation of potato (Solanum tuberosum L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution*. Appl. Soil Ecol., 15, 137-144.
- ESTRADA-LUNA A.A., DAVIES F.T.J.R., 2003. *Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (Capsicum annuum) plantlets during acclimatization and post-acclimatization*. J. Plant Physiol., 160, 1073-1083.
- FERREIRA C.M., HANDRO W., 1988. *Micropropagation of Stevia rebaudiana through leaf explants from adult plants*. Planta Med. 54, 157-160.
- KAPOOR R., SHARMA D., BHATNAGAR A.K. 2008. *Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications*. Sci. Hort. 116, 227-239.
- MITRA A., PAL A., 2007. *In vitro regeneration of Stevia rebaudiana (Bert) from nodal explants*. J. Plant Biochem. Biotech. 16, 59-62.
- MIYAGAWA H., FUJIOKA N., KOHDA H., YAMASAKI K., TANIGUCHI K., TANAKA R., 1986. *Studies on the tissue culture of Stevia rebaudiana and its components. II. Induction of shoot primordia*. Planta Med. 52, 321-323.
- MORONE FORTUNATO I., RUTA C., CASTRIGNANÒ A., SACCARDO F., 2005. *The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes*. Sci. Hort., 106, 4, 472-483.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture*. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- NAKAMURA S., TAMURA Y., 1985. *Variation in the main glycosides of Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)*. Jpn. J. Trop. Agric. 29, 109-116.
- NITSCH J.P., NITSCH C., 1969. *Haploid plants for pollen grains*. Science 63, 85-87.
- PHILLIPS J.M., HAYMAN D.S., 1970. *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection*. Trans. Br. Mycol. Soc. 55, 158-161.
- RUTA C., PERRINI R., TAGARELLI A., MORONE FORTUNATO I., 2009. *Use of arbuscular mycorrhiza for acclimatization of micropropagated plantlets of melon, oregano, artichoke and Spanish broom*. Acta Hort., 812, 473-477.
- SIVARAM L., MUKUNDAN U., 2003. *In Vitro culture studies on Stevia rebaudiana*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 39, 520-523.
- TAMURA Y., NAKAMURAS., FUKUI H., TABATA M., 1984. *Clonal propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by stem tip culture*. Plant Cell Rep. 3, 183-185.
- TANAKA, O., 1982. *Steviol-glycosides: new natural sweeteners*. Trends Anal. Chem. 1, 246-248.
- TROUVELOT A., KOUCH J., GIANINAZZI-PEARSON V., 1986. *Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire: Recherche of method d'estimation ayant une signification fonctionnelle*. Les Mycorrhizes: Physiologie and Genetique. 1<sup>er</sup> Seminaire Dijon, Ed. INRA, Paris. 217-221.
- WANG H., PARENT S., GOSSELIN A., DESJARDINS Y., 1993. *Study of vesicular arbuscular mycorrhizal peat-based substrates on symbiosis establishment, acclimatization and growth of three micropropagated species*. J. Am. Soc. Hort. Sci., 118: 896-901.

## Studio delle capacità di rigenerazione di *Cystoseira*

Andrea Magnani<sup>1-3\*</sup>, Mauro Masini<sup>1</sup>, Giorgio De Paoli<sup>2</sup>, Filippo Ferrario<sup>3</sup> e Laura Airoidi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Microplant, Società Agricola Ceccaroni Claudia, Diegaro di Cesena (FC)

<sup>2</sup> Consulente colture in vitro, Cesena (FC)

<sup>3</sup> Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna

### Regeneration potential of brown macroalgae of genus *Cystoseira*

**Abstract.** The habitat generated by the macroalgae of the genus *Cystoseira* can be lost. The extension of these macroalgae is reduced. The causes of this recession are poorly understood, and even less is known about the factors contributing to the resilience of these systems. The aim of the work was to analyze regeneration ability of *C. barbata* fragments depending on temperature and light. We carried out an experiment in which the effects of the following factors were analyzed: temperature, light, sterilization protocol and culture medium. We evaluated the effects on the number of shoots appeared, and the presence / absence of sterility for each experimental sample. The interaction between light and temperature is relevant in determining tissue regeneration. Light intensity is particularly important at high temperature (25°C) when a greater number of sprouts were generated compared to cooler temperature (18°C). The best substrate tested is "sterilized sea water" the preferable method of sterilization tested is "subsequent washing with sterile sea water."

**Key words:** *In vitro* colture, *Cystoseira barbata*, temperature, light, regeneration .

### Introduzione

Le macroalghe brune del genere *Cystoseira* creano habitat marini che offrono cibo, riparo ed ancoraggio a diverse specie e modificano gradienti di luce, sedimentazione e idrodinamismo. L'areale di distribuzione di *Cystoseira* sta subendo una drastica riduzione (Mangialajo *et al.*, 2008). Lo scopo del presente lavoro è la comprensione di come fattori abiotici quali intensità di luce e temperatura influenzano lo sviluppo di nuovi germogli in frammenti di tallo di *Cystoseira barbata*. Il sistema di coltura *in vitro* consente di tenere sotto controllo le condizioni sperimentali che in

campo risulterebbero soggette a forti variazioni. Le condizioni sperimentali sono state determinate facendo riferimento sia a dati di letteratura che alle condizioni ambientali a cui è esposta la popolazione naturale di *C. barbata* presente nelle acque del Monte Conero (Ancona). Durante il periodo riproduttivo dell'alga (marzo-giugno) la temperatura media dell'acqua è di 18 °C valore in corrispondenza del quale sono stati osservati sviluppo di callo e rigenerazione tissutale in espianti di *Cystoseira osmundacea* (Polne-Fuller *et al.*, 1987, Lawlor *et al.*, 1990). La temperatura media dell'acqua durante il periodo estivo è invece di 25 °C. In campo, l'intensità luminosa a livello delle fronde di *C. barbata* può variare da 210  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a 12  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Irving *et al.*, 2009). In coltura, valori di intensità luminosa superiori a 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  possono essere causa di stress (West, 2005). Dato che non è stato possibile individuare un protocollo valido in letteratura per la coltura di *Cystoseira barbata*, sono stati inoltre considerati approcci di tipo metodologico differenti al fine di testare come la rigenerazione dei talli era influenzata dai diversi trattamenti.

### Materiale e metodi

Il disegno sperimentale adottato per lo studio ha considerato i seguenti fattori: Temperatura, Intensità luminosa, Metodo di sterilizzazione e Terreno di coltura. Temperatura: fattore fisso con due livelli (18 e 25 °C). Intensità luminosa: fattore fisso con due livelli (Hi: 70-80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Low: 20-30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Metodo di sterilizzazione: fattore fisso con tre livelli (EtOH: alcol etilico 70° (Gusev *et al.*, 1987); PC: Proclin™ 200 preservative (principio attivo: 2-metil-4-isotiazolin-3-one); DS: (dieci diluizioni successive in acqua di mare sterile). Terreno di coltura: fattore fisso con due livelli [SW: Acqua di mare sterile; VS: Terreno di Von Stosch (Grund) (Harrison e Berger, 2005)]. Il materiale algale è stato pulito da detriti, epifiti e mitili con bisturi e garze sterili e lasciato a riposo per circa 12 ore in acqua di mare con un ossigenatore. Una base d'appoggio di 1 cm, formata da acqua di mare ed agar, è stata inserita in provette di polipro-

\* andre8a7@hotmail.it

pile (25 ml) con tappo a vite successivamente sterilizzate con trattamento termico in autoclave a 120° per 20 minuti. Sono stati ottenuti frammenti di tallo algale di circa 1,5 cm di lunghezza, inseriti in un unico contenitore per evitare problemi di pseudo replicazione. I campioni sono stati sterilizzati e riposti nelle provette sopra alla base di agar con terreno di coltura sterilizzato. Per ogni combinazione di fattori sono state utilizzate 4 repliche. La luce è stata fornita con 3 lampade al neon da 21 W opportunamente schermate con una rete opaca per ottenere l'intensità luminosa voluta con un fotoperiodo 12:12 ore luce/buio.

Al termine dell'esperimento (2 subcolture di 2 settimane ciascuna) è stato valutato il numero di germogli comparsi e la presenza/assenza di inquinamenti delle colture comparando foto scattate all'inizio ed alla fine dell'esperimento. I dati relativi al numero di germogli sono stati analizzati tramite ANOVA. La sterilità dei campioni è stata valutata come presenza/assenza di evidente inquinamento, assegnando 1 nel caso di coltura sterile e 0 nel caso contrario. I dati relativi alla sterilità sono stati analizzati tramite PERMANOVA basandosi su una matrice di similarità tra campioni (metodo del *simple matching*).

## Risultati e discussione

Data la significatività delle interazioni fra i diversi fattori è preferibile concentrare l'attenzione su queste piuttosto che sull'effetto dei singoli fattori.

Dai risultati è emerso che temperatura e luce sono fattori chiave nell'influenzare lo sviluppo di nuovi germogli (interazione "Temperatura × Intensità luminosa × Terreno di coltura" (ANOVA  $P=0,0102$ ) (fig. 1). Inoltre il test a posteriori SNK indica come l'acqua di mare sterile risulta un terreno migliore rispetto al terreno Von Stosch (Grund) ( $SW > VS$ ). A 18 °C il numero medio di germogli non differisce in funzione dell'esposizione all'intensità luminosa. Invece a 25 °C si è ottenuta germogliazione quasi esclusivamente con alti livelli di intensità luminosa ( $1,6 \pm 0,6$  media  $\pm$  ES). Tale valore risulta doppio rispetto a ciò che è stato ottenuto a 18 °C a prescindere dall'esposizione luminosa adottata ( $0,83 \pm 0,3$  e  $0,87 \pm 0,4$  per intensità luminosa rispettivamente alta e bassa, media  $\pm$  ES). La scarsa germogliazione, a 25 °C con bassa intensità luminosa, può essere spiegabile in tal modo: aumenti di temperatura comportano una maggiore richiesta di energia da parte dell'alga, non fornita dalla scarsa illuminazione. A temperature più elevate si assiste anche ad un incremento delle attività metaboliche degli agenti inquinanti che, moltiplicandosi

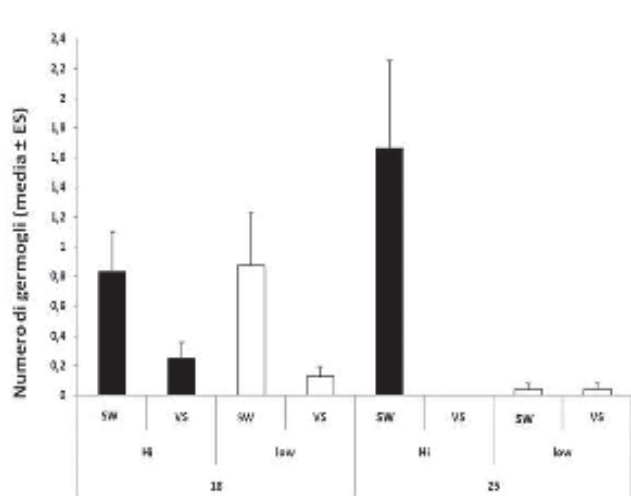


Fig. 1 - Capacità rigenerativa dei frammenti di tallo algale di *Cystoseira barbata* (numero medio di germogli  $\pm$  ES). Temperatura: 18 °C e 25 °C. Luce: alta intensità (Hi), bassa intensità (Low). Terreno di coltura: Von Stosch (grund) (VS), acqua di mare sterile (SW).

Fig. 1 - Regenerative capacity of the algal thallus fragments of *Cystoseira barbata* (average number of shoots  $\pm$  SE). Temperature: 18 °C and 25 °C. Light: High intensity (Hi), low intensity (Low). Medium: Von Stosch (grund) (VS), sterile seawater (SW).

più velocemente, possono creare metaboliti secondari e prodotti di scarto dannosi allo sviluppo di nuovi germogli. La luce infine, potrebbe essere un fattore di stress per agenti inquinanti ed inibire il loro metabolismo, aumentando la produzione di germogli dai talli algali. Per quanto riguarda la valutazione del metodo di sterilizzazione nelle colture *in vitro* di *Cystoseira barbata*, si ha difficoltà ad ottenere elevate percentuali di sterilità nei campioni. L'efficacia della metodica di sterilizzazione impiegata è fortemente influenzata dal terreno di coltura utilizzato ("Metodo di sterilizzazione × Terreno di coltura", PERMANOVA  $P=0,0483$ ). In particolar modo il terreno di coltura acqua di mare sterile, essendo più povero di sostanze nutritive rispetto al suo arricchimento (VS), è quello che ha evidenziato minore sviluppo di agenti inquinanti nella fase di coltura (fig. 2). Il metodo sterilizzante che assicura buone rese di campioni sterili, per entrambi i terreni di coltura, è basato sull'impiego di alcol etilico tuttavia utilizzando EtOH non si sono notati sviluppi di germogli. Tale sterilizzazione chimica risulta non adeguata, compromettendo la capacità di germogliare dei talli algali. A temperature basse e con terreno di coltura "acqua di mare sterile" si ottengono percentuali maggiori di sterilità sui campioni. In questo caso è evidente che la temperatura può influenzare la crescita dei microrganismi (White, 1991), ed i terreni di coltura più ricchi possono offrire maggiori risorse per lo sviluppo di contaminanti.

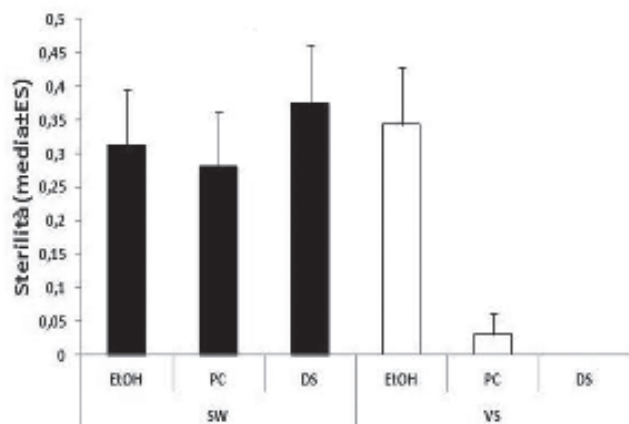


Fig. 2 - Frequenza media di sterilità nei campioni trattati. Metodi di sterilizzazione: alcol 70°(EtOH), Proclin (PC), Diluizioni successive in acqua di mare sterile (DS). Terreni di coltura: Von Stosch (grund) (VS), acqua di mare sterile (SW).

Fig. 2 - Average frequency of sterility in the treated samples. Methods of sterilization: 70 ° alcohol (EtOH), Proclin (PC), subsequent dilutions in sterile sea water (DS). Culture media: Von Stosch (grund) (VS), sterile seawater (SW).

## Conclusioni

*Cystoseira barbata* è in grado di rigenerare nuovo tessuto da frammenti di tallo. Temperatura e luce sono da ritenere fattori determinanti la produzione di nuovi germogli: in particolare la resa migliore è ottenuta in condizioni di temperatura corrispondenti al periodo estivo ed intensità di luce elevata in accordo con quanto descritto per il ciclo di sviluppo di *Cystoseira* in ambiente naturale (Baghdadli 1994, Irving 2009). Le conoscenze legate alla coltura di macroalghe in laboratorio a partire da frammenti non sono molto approfondite. Lo studio effettuato è stato utile a definire che la sterilità del campione è un requisito importante per lo sviluppo dei talli frammentati, perché i tessuti inquinati hanno rese inferiori e mostrano germogli più piccoli e sottili che nelle colture sterili. E' consigliabile rivedere nei prossimi esperimenti i protocolli utilizzati, aggiungendo procedure per eliminare il più possibile le fonti di inquinamento dei campioni. Il terreno di coltura arricchito (Von Stosch) è un substrato di coltura migliorabile sia per quanto concerne la germogliazione che per la sterilità. E' ipotizzabile che in campioni maggiormente sterili, tale arricchimento possa avere effetti positivi, ma in condizioni di scarsa sterilità esso promuove la crescita di organismi contaminanti.

## Riassunto

Il presente lavoro ha come scopo analizzare la capacità di rigenerazione dell'alga bruna *Cystoseira*

*barbata* in funzione di temperatura, luce, metodi di sterilizzazione e terreno di coltura. Come variabili di risposta si è considerato il numero di germogli e la presenza/assenza di sterilità. Dallo studio è risultato che temperatura e luce influenzano la capacità rigenerativa dei talli. L'intensità luminosa è determinante ad alta temperatura (25°C) che consente una maggiore resa rispetto a temperatura inferiore (18°C). Il substrato migliore è risultato "acqua di mare sterilizzata", il metodo di sterilizzazione preferibile è "lavaggio successivo con acqua di mare sterile".

**Parole chiave:** Colture *in vitro*, *Cystoseira barbata*, temperatura, luce, rigenerazione.

## Bibliografia

- BAGHDADLI D., TREMBLIN G., DUCHER M., 1994. *The Effects of Light Quality on Growth, Photosynthesis and Development in Cultivated Thalli of Cystoseira barbata* C. Ag. f. *aurantia* (Kütz.) Giaccone (Phaeophyceae, Fucales). *Botanica Marina* 37: 43- 50
- FALACE A., ZANELLI E., BRESSAN G., 2006. *Algal transplantation as a potential tool for artificial reef management and environmental mitigation*. *Bulletin of Marine Science* 78:161-166.
- GORMAN D., CONNELL S., RUSSELL B., 2009. *Land-to-sea connectivity: linking human-derived terrestrial subsidies to subtidal habitat change on open rocky coasts*. *Ecol. Appl.* 19:1114-1126.
- GUSEV M., TAMBIEV A., KIRIKOVA N., SHELYASTINA N., ASLANYAN R., 1987. *Callus formation in seven species of agarophyte marine algae*. *Marine Biology* 95: 593-597.
- HARRISON P., BERGER V., 2005. *Marine culture media*. In: *Andersen RA (ed) Algal culturing techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press.
- IRVING AD., BALATA D., COLOSIO F., FERRANDO GA., AIROLDI L., 2009. *Light, sediment, temperature, and the early life-history of the habitat-forming alga Cystoseira barbata*. *Marine Biology* 156:1223-1231.
- LAWLOR H., BOROWITZKA M., MCCOMB J., 1990. *Tissue culture of brown seaweeds*. *Austral. J. Biotech.* 4:260-264.
- MANGIALAJO L., CHIANTORE M., CATTANEO-VIETTI R., 2008. *Loss of furoid algae along a gradient of urbanisation, and structure of benthic assemblages*. *Marine Ecology* 358:63-74.
- PANAYOTIDIS P., FERETOPOULOU J., MONTESANTO B., 1999. *Benthic Vegetation as an Ecological Quality Descriptor in an Eastern Mediterranean Coastal Area (Kalloni Bay, Aegean Sea, Greece)*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48: 205-214.
- POLNE-FULLER M., GIBOR A., 1987. *Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture*. *Hydrobiologia* 151-152: 131-138.
- THIBAUT T., PINEDO S., TORRAS X., BALLESTEROS E., 2005. *Long-term decline of the populations of Fucales (Cystoseira spp. and Sargassum spp.) in the Albères coast (France, North-western Mediterranean)*. *Marine Pollution Bulletin* 50: 1472-1489.
- WEST J., 2005. *Long term macroalgal culture maintenance*. In: *Andersen RA (ed) Algal culturing techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press.
- WHITE P., KALFF J., RASMUSSEN J., GASOL J., 1991. *The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats*. *Microbial Ecology* 21: 99-118.

## Colture *in vitro* e micropropagazione di *Arundo donax*

Valentina Bobbio\*, Cristina Borghi, Marina Laura e Andrea Allavena

CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

### **In vitro culture and micropropagation of *Arundo donax***

**Abstract.** *Arundo donax*, or common reed, is a species native to Southeast Asia. Recent studies have identified *A. donax* as the most productive species among all the energy biomass crops, with the lowest environmental impact. The ability of *in vitro* regeneration and propagation of *A. donax* was evaluated using leaves and immature inflorescences as explants. The cultures were kept in the dark during callus induction and transferred to light for regeneration. Several media and protocols, reported in literature and new ones, were compared. In dark condition, DM8 medium caused the reprogramming of floral meristems into vegetative ones that developed into shoots after transfer of the explants to light. The shoots grew into complete plants on MS0 medium. It is expected that the regeneration from inflorescences can be used for micropropagation and for the induction of genetic variability in *A. donax* a species notoriously sterile.

**Key words:** common reed, biomass, plant regeneration.

### Introduzione

L'*Arundo donax* (*Poaceae*) o canna comune è una specie originaria del Sud Est asiatico, ben ambientata nel bacino del Mediterraneo. Costituisce un ottimo candidato per la produzione di biomassa per uso combustibile e per la produzione di bioetanolo. In uno studio condotto dalla Comunità Europea [FAIR 3 CT96 2028 "Giant reed (*Arundo donax* L.) Network"], la canna viene indicata come una tra le più promettenti specie da biomassa in ambiente mediterraneo. Produce ogni anno 25 tonnellate/Acro di fibra di alta qualità più di qualsiasi altra specie. Un confronto tra 7 specie ligno-cellulosiche effettuato in Italia da Di Candilo (2008) ha messo in evidenza la superiore capacità di produzione di biomassa di *A. donax* (40 t/Ha di sostanza secca), rispetto alle altre piante utilizzate. Nonostante sia una specie C3, *A. donax* ha

un'efficienza d'utilizzazione di energia radiante superiore a quella del mais (4,1 g/Mj contro 3,4 g/Mj; Ceotto comunicazione personale). La capacità della canna comune di depurare le acque reflue contaminate, le basse esigenze colturali e la conseguente adattabilità alla coltivazione in terreni marginali comunemente non utilizzati per la coltivazione di specie produttrici di alimenti e di foraggi, depongono a favore della coltivazione della specie per la produzione di biomassa con un minimo impatto ambientale.

Il presente lavoro ha lo scopo di individuare un metodo di rigenerazione della canna comune adatto per la micropropagazione ed altre utilizzazioni.

### Materiali e metodi

Sono state effettuate prove di coltura *in vitro* a partire da foglie e infiorescenze immature (lunghezza massima 9 cm). Gli espianti sono stati sterilizzati in una soluzione contenente l'1% di ipoclorito di sodio e sciacquati in acqua sterile. Frammenti di foglia sono stati messi in coltura per l'induzione di callo su 4 terreni aventi come base il terreno Murashige e Skoog (MS, 1962) con saccarosio 30g/l, Phytigel 0,04% (pH 5.5) e contenenti i seguenti fattori di crescita: *Arundo1* (2,4D 0,2 mg/l, Thidiazuron 0,1 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 ml di una soluzione al 6%, Adenina emiosolfato 80 mg/l); *Arundo2* (IAA 1 mg/l, 2,4D 2 mg/l); *Arundo3* (IAA 1 mg/l, 2,4D 2 mg/l, thidiazuron 0,2 mg/l); *Arundodir* (NAA 5 mg/l, Kinetina 2 mg/l). Le porzioni di infiorescenza sono state messe in coltura per l'induzione di callo sui terreni utilizzati per le foglie e su altri 6 terreni indicati in letteratura: Straub *et al.*, 1988; DM8 (Laszlo *et al.*, 2002); MS1, MS1+100, MS2 e MS4 (Lauzer *et al.*, 2000).

Le colture sono state conservate al buio per un mese; successivamente i calli formati sono stati trasferiti sui terreni di rigenerazione (tab. 1), avendo cura di conservarne una parte sul terreno di origine, e posti alla luce (fotoperiodo 16 ore luce; 35µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

### Risultati e discussione

I frammenti di foglia hanno formato callo su tutti i terreni valutati. Il callo ottenuto sul terreno contenente

\* valentina.bobbio@entecra.it

Tab. 1 - Composizione dei terreni usati per la rigenerazione e la micropropagazione di *A. donax*.  
 Tab. 1 - Media composition for the regeneration and the micropropagation of *A. donax*.

Composizione	Rigar1	Rigar2	1	2	3	4
Sali MSO	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l
Saccarosio	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
Vitamine	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
TDZ	0,05mg/l	0,05mg/l	3mg/l	3mg/l	1mg/l	1mg/l
BA		1mg/l	1mg/l	0,3mg/l	1mg/l	0,3mg/l
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
AGAR	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%

te NAA (*Arundodir*) ha dato origine a radici, mentre quello su *Arundo2* (contenente 2,4D) si è mantenuto indifferenziato per numerose subcolture (fig. 1), e non ha rigenerato germogli nemmeno dopo trasferimento sui terreni di rigenerazione. La formazione di callo è stata osservata a partire dalle infiorescenze sulla maggior parte dei terreni; contemporaneamente si sono sviluppate radici sul terreno *Arundodir*. Le infiorescenze messe in coltura su DM8 (fig. 2) hanno prodotto pochissimo callo. Il trattamento su DM8 ha

prodotto una riprogrammazione dei meristemi fiorali in meristemi vegetativi che ha portato alla formazione di germogli in seguito al trasferimento degli espianti alla luce (fig. 3). Cicli successivi di micropropagazione (fig. 4) sono stati possibili trasferendo tali germogli su terreno 4 contenente TDZ (1 mg/l) e BAP (0,3 mg/l). Plantule radicate sono state ottenute dai germogli rigenerati su DM8 e da quelli micropropagati in seguito a trasferimento su terreno MS privo di fattori di crescita.

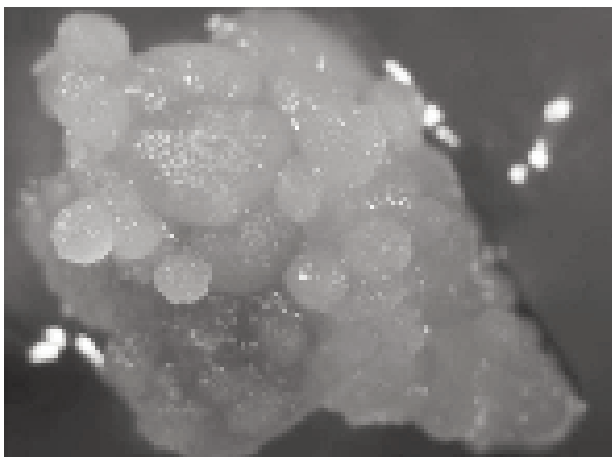


Fig. 1 - Callo sviluppatosi su terreno Arundo 2.  
 Fig. 1 - Callus developed on Arundo 2 medium.

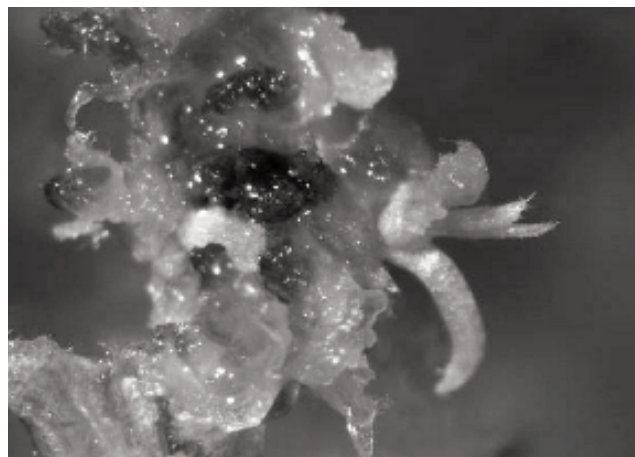


Fig. 3 - Rigenerazione di germoglio su DM8.  
 Fig. 3 - Shoot regeneration on DM8 medium.

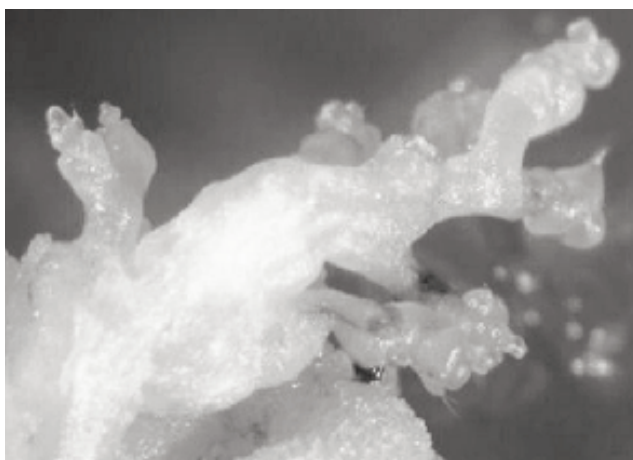


Fig. 2 - Dettaglio di infiorescenza immatura.  
 Fig. 2 - Detail of immature inflorescence.



Fig. 4 - *A. donax* su terreno di micropropagazione 4.  
 Fig. 4 - *A. donax* on micropropagation medium 4.

## Conclusioni

La rigenerazione di *A. donax* è risultata possibile esclusivamente a partire da infiorescenze immature messe in coltura su terreno DM8. Il terreno 4 si è dimostrato il migliore per la micropropagazione. Allo stato attuale delle conoscenze, le infiorescenze immature sono il tessuto elite per eventuali trattamenti finalizzati all'induzione di variabilità genetica (mutagenesi classica, mutagenesi sito specifica, trasformazione genetica) a carico di questa specie caratterizzata da sterilità.

## Riassunto

*Arundo donax*, o canna comune, è una specie originaria del Sud-Est asiatico. Studi recenti hanno identificato in *A. donax* la specie con la maggiore capacità di produzione di biomassa e di sostanza secca e con il minor impatto ambientale. In questo lavoro è stata valutata la capacità di rigenerazione e di propagazione *in vitro* di *A. donax* utilizzando, come espianti, foglie e infiorescenze immature. Le colture sono state tenute al buio durante la fase di induzione del callo e trasferite alla luce per la rigenerazione. Sono stati preparati diversi terreni di coltura sia descritti in letteratura sia di nuova formulazione. Il trattamento con il terreno DM8 ha causato la riprogrammazione di

meristemi florali in meristemi vegetativi che hanno prodotto germogli dopo il trasferimento degli espianti alla luce.

I germogli ottenuti sono stati ulteriormente micropropagati su idoneo terreno ed hanno dato plantule radicate dopo il trasferimento su MS0. Ci si aspetta che la rigenerazione da infiorescenze possa essere usata per micropropagazione e per l'induzione di variabilità genetica in questa specie notoriamente sterile.

**Parole chiave:** canna comune, biomassa, rigenerazione.

## Bibliografia

- DI CANDILO M., CEOTTO E., DIOZZI M. 2008 *Comparison of 7 ligno-cellulosic biomass feedstock species: 6-years results in the Low Po Valley. Multi-functional Agriculture, Agriculture as a Resource for Energy and Environmental Preservation.* 10<sup>th</sup> Congr. Eur. Soc. Agron., Bologna, It. J. Agron., 3: 481-482.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* *Physiol. Plantarum* (Oph.) 15, 473-497.
- MARTON, LASZLO ET AL., 2002. United States Patent Application 20020166149.
- STRAUB P.F., DECKER M., GALLAGHER J.L., 1988 *Tissue culture and long-term regeneration of Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steud.* *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 15: 73-78,
- LAUZER D., DALLAIRE S., VINVENT G., 2000. *In vitro propagation of reed grass by somatic embryogenesis.* *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 60, 229-234.

## Due geni SERK coinvolti nel differenziamento in *Cyclamen persicum* Mill.

Savona Marco<sup>1,3</sup>, Mattioli Roberto<sup>2</sup>, Nigro Stefania<sup>2</sup>, Falasca Giuseppina<sup>1</sup>, Della Rovere Federica<sup>1</sup>, Costantino Paolo<sup>2</sup>, De Vries Sacco<sup>4</sup>, Trovato Maurizio<sup>2</sup>, Ruffoni Barbara<sup>3</sup> e Altamura Maria Maddalena<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Ambientale, Università "Sapienza" di Roma

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia e Biotecnologia, Università "Sapienza" di Roma

<sup>3</sup> CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

<sup>4</sup> Laboratorio di Biochimica, Wageningen University (Olanda)

SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK) genes are involved in somatic embryogenesis in numerous species. SERK genes encode leucine-rich repeat receptor-like kinases, forming a subgroup among leucine-rich repeat-receptor-like kinases in plants. SERK genes exist as gene families in numerous species. Their expression is also positively related to zygotic embryogenesis in some species. However, numerous studies suggest a role in development, at least for specific SERKs, broader than in somatic and zygotic embryogenesis, with redundant and non-redundant functions between SERKs of the same family. *Cyclamen persicum* is an ornamental plant with high economic relevance, in vitro propagated through somatic embryogenesis from immature ovules. However, the genetic mechanisms regulating somatic embryogenesis in this plant, and the relationship with zygotic embryogenesis, are unknown. To this aim, we investigated the possible expression of *Cyclamen persicum* SERK genes during somatic and zygotic embryogenesis. Two SERK genes were isolated from the embryogenic callus, named CpSERK1 and CpSERK2, and deposited in GenBank under the Accession Number JF511659 and GU189408, respectively. The expression of both genes characterized ovule primordia, and, after fertilization, a strong expression was observed in the early divisions of the zygote up to globular stage. The

expression of both genes was still high in the embryo at the torpedo stage. By contrast, it was highly reduced in the mature zygotic embryo, being only present in the shoot and root poles, and in the procambium. In situ hybridizations during somatic embryogenesis and organogenesis in vitro showed that the expression of both genes started in clumps of pluripotent stem cells, from which both pre-embryogenic aggregates and organ meristemoids derived, and continued in their trans-amplifying, meristem-like, derivatives. Expression declined in organ meristemoids, in parallel with a partial loss of meristemization. In mature somatic embryos, and in shoot and root primordia, CpSERK1 and CpSERK2 were expressed in meristems, similarly to mature zygotic embryos and primary meristems in planta. The results point to SERK1 and SERK2 as markers of pluripotency in cyclamen. It is proposed that the high expression of these genes in the trans-amplifying derivatives of the stem cells maintains a pluripotent condition leading to totipotency, and consequently somatic embryogenesis (1). Present results are also promising for the use of the selected genes for biotechnology. In fact, we standardized the protocol for producing synthetic seeds in this crop, and have in mind to use these CpSERKs for a rapid screening of the embryogenic calli to reduce the costs of synthetic seed production and to increase flower variety.



## L'epifillia di *Kalanchoe*: un modello per lo studio della propagazione vegetativa delle piante

Cristina Borghi, Marina Laura, Valentina Bobbio e Andrea Allavena

Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali (CRA-FSO), Sanremo (IM)

L'epifillia (*viviparia vegetativa*) è un sistema di riproduzione asessuale comune nel genere *Kalanchoe* (fam. *Crassulaceae*) che consiste nella formazione di plantule complete prevalentemente sulle foglie o sulle infiorescenze. Da un punto di vista istologico la formazione delle plantule è caratteristica di ogni specie, variando da germogli avventizi in *K. laxiflora* Baker a embrioni somatici in *K. pinnata* Persoon.

Il fenomeno può essere costitutivo oppure indotto in maniera specie-specifica dal fotoperiodo, da stress idrici o stress da ferita. In particolare, in *K. x houghtonii* (n=51), ibrido interspecifico tetraploide tra *K. daigremontiana* Hamet & Perrier (n=17) e *K. delagoensis* Ecklon & Zeyher (n=34), le plantule vivipare si formano su supporti posti negli incavi tra i denti del margine fogliare. Tale ibrido è comunemente conosciuto come “*Mother of Thousands*” a causa di una notevole proliferazione di plantule lungo il margine fogliare. Le plantule, cadendo a terra, radicano facilmente e originano una pianta completa. La viviparia si riscontra oltre che nelle *Crassulaceae* in diverse specie appartenenti a famiglie botaniche distanti tra loro come ad esempio le *Liliaceae*, le *Graminaceae*.

Per le piante la capacità di riproduzione asessuata offre vantaggi in termini ecologici ed evolutivi. Nella pratica agricola la riproduzione asessuata consente di ottenere varietà uniformi a partire da singoli individui di popolazioni segreganti (Koltunow *et al.*, 1995).

Sono presentate due strategie utilizzate per comprendere i meccanismi molecolari che portano alla formazione di propaguli vivipari in *K. x houghtonii*: clonaggio di geni candidati e loro analisi funzionale; sequenziamento del trascrittoma di tessuti che esprimono la viviparia mediante tecnologia GS FLX 454 Titanium System (Roche) e identificazione di geni potenzialmente coinvolti nel processo. L'espressione nelle foglie di *K. x houghtonii* di numerosi omologhi di geni coinvolti nei processi di embriogenesi indica che la viviparia della specie è riconducibile ad un fenomeno di embriogenesi somatica. Inoltre la sovra espressione di un singolo gene è in grado di modificare il processo di embriogenesi somatica in un processo di rigenerazione avventizia. I dati prodotti verranno discussi alla luce delle implicazioni di carattere botanico ed evolutivo e delle ricadute sulla propagazione delle piante agrarie.

## Prove di micropropagazione di *Citrus clementina* Hort ex Tanaka cv comune

Girolamo Russo<sup>1</sup>, M. Potenza<sup>1</sup>, Venturino Bisignano<sup>2</sup> e Giovan Battista Polignano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università di Bari

<sup>2</sup> CNR-IGV, Istituto di Genetica Vegetale, Bari

Da piante di Clementine “Comune” sono state asportate, nel mese di ottobre, le produzioni vegetative dell’anno (germogli di 10-15 cm). I germogli sono stati risciacquati e sezionati in porzioni uninodali delle dimensioni di circa 5-7 mm di lunghezza. La sterilizzazione superficiale delle microtalee è stata effettuata immergendole per 20 minuti in soluzione acquosa di ipocloroto di sodio (ACE) al 20%, tre risciacqui con acqua sterile e successiva immersione in soluzione al 5% di PPM<sup>®</sup> (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Tech. Laboratories, USA). Successivamente, in condizioni di asepsi, gli espianti sono stati messi a coltura in provette sterili contenenti 20 ml di substrato. Le colture sono state mantenute in camera di crescita ad una temperatura di  $26 \pm 2$  °C con fotoperiodo di 16 ore di luce, di intensità pari a  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nella fase di stabilizzazione sono stati utilizzati tre tipi di substrato:

- M0: Murashighe&Skoog a dose dimezzata con aggiunta di saccarosio (50g/l), malto-agar (1g/l), agar (8g/l), acido ascorbico (0,5g/l) e PPM<sup>®</sup> (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Tech. Laboratories, USA) (5ml/l);
- M1: Murashighe&Skoog a dose dimezzata addizionato con BAP (2,5 mg/l) con aggiunta di saccarosio (50g/l), malto-agar (1g/l), agar (8g/l), acido ascorbico (0,5g/l) e PPM<sup>®</sup> (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Tech. Laboratories, USA) (5ml/l);
- Murashighe&Skoog a dose dimezzata addizionato con BAP (5 mg/l) con aggiunta di saccarosio (50g/l), malto-agar (1g/l), agar (8g/l), acido ascorbico (0,5g/l) e PPM<sup>®</sup> (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Tech. Laboratories, USA) (5ml/l).

Dall’analisi dei risultati ottenuti, il substrato indi-

cato come M1 è risultato il più idoneo per la fase di stabilizzazione *in vitro* del clementine Comune. Gli espianti appartenenti alla tesi M1, sono stati trasferiti per la fase di proliferazione dei germogli. Anche in questo caso sono stati posti a confronto due substrati, differenti per il tipo di fitoregolatori aggiunti:

- P1: Murashighe&Skoog a dose dimezzata addizionato con BAP (2,5 mg/l) e IBA (5 mg/l) con aggiunta di saccarosio (50g/l), malto-agar (1g/l), agar (8g/l) e acido ascorbico (0,5g/l);
- P2: Murashighe&Skoog a dose dimezzata addizionato con GA<sub>3</sub> (15 mg/l) e NAA (0,20 mg/l) con aggiunta di saccarosio (50g/l), malto-agar (1g/l), agar (8g/l) e acido ascorbico (0,5g/l).

D’analisi dei dati rilevati nel corso della sperimentazione, si può affermare che il substrato indicato come M1 è risultato il più idoneo per la fase di stabilizzazione *in vitro*. Ha permesso, infatti, di ottenere un maggior numero di espianti vitali (92%) con elevata ripresa vegetativa (89%), un maggior numero di germogli per espianto (1,6) ed una minima produzione di callo (2%). Dal confronto delle due tesi utilizzate per la fase di moltiplicazione, si evince che il substrato P2 ha stimolato una maggiore produzione di nodi (3,5 in media) ed una maggiore lunghezza dei germogli (35 mm in media). Il substrato P1, invece, ha stimolato la produzione di un maggior numero di germogli (2 in media). In conclusione si può affermare che la micropropagazione rappresenta, anche per la specie presa in esame, un valido strumento per la conservazione di germoplasma vegetale e per la diffusione di portainnesti e varietà selezionate, soprattutto in quei Paesi in cui le normative per l’introduzione di materiale di propagazione *in vivo*, non certificato, sono molto restrittive.

## Moltiplicazione *in vitro* per la produzione di piante madri di varietà rifiorenti e unifere di fragola

Nives Gimelli, Maria Luigia Maltoni, Pierluigi Lucchi e Walther Faedi

CRA - Unità di Ricerca per la Frutticoltura, Forlì

La fragola è stata la prima specie frutticola interessata dalla moltiplicazione *in vitro*. Nel 1974 P. Boxus sviluppò una tecnologia di coltura *in vitro* al fine di risanare, da virus, le piante madri di fragola. Tale tecnica si dimostrò molto vantaggiosa e in breve tempo fu applicata in Europa in diversi laboratori commerciali. Nonostante ciò, dopo qualche anno, venne abbandonata a seguito di anomalie che le piante prodotte *in vitro* manifestavano per gli elevati dosaggi ormonali e per il numero incontrollato di subcolture a cui erano state sottoposte. Attualmente, i laboratori certificati di micropropagazione in Europa sono regolamentati da norme, diverse in ogni Paese, che stabiliscono tipologia, dosaggi ormonali e il numero massimo di subcolture ammesso. In Italia il numero di subcolture non è superiore a 5, non ci sono riferimenti precisi per i dosaggi ormonali e il rinnovo del mericlone deve avvenire entro 2 anni.

Il settore vivaistico italiano ricorre a questa tecnica ai soli fini del “risanamento”, della “costituzione di fonti primarie” e dello scambio internazionale di materiale. Con il metodo tradizionale è facile la diffusione di parassiti e agenti patogeni quali virus, micoplasmi, nematodi e tarsonemi che sono, direttamente o indirettamente, trasmessi attraverso gli stoloni di piante già contaminate; per la fragola appare del tutto necessaria una rivalutazione della micropropagazione *in vitro* come valido supporto all’attività vivaistica.

In Italia, nel 2010 la produzione vivaistica è stata circa 150 milioni di piante di fragola. Le aziende vivaistiche producono principalmente quattro tipi di piante utilizzando tecniche di macropropagazione che si basano essenzialmente sulla capacità della pianta di emettere stoloni: piante fresche a radice nuda, piante fresche da cime radicate, piante frigo conservate, *trayplant*. Esistono tuttavia varietà rifiorenti di fragola, portatrici del carattere DN (*day neutral*), che presentano scarsa attitudine stolonifera e per le quali è necessario adottare, per la produzione di piante, tecniche alternative a quelle tradizionali.

### Attività svolta

Da alcuni anni il CRA-FRF di Forlì svolge attività di micropropagazione *in vitro* per la conservazione di germoplasma, per il risanamento da malattie e per la costituzione di fonti primarie di fragola. Nel 2010 si è applicata questa tecnica per la produzione di piante di varietà rifiorenti, al fine di aumentarne le rese unitarie in vivaio. A questo scopo si è valutata la resa produttiva di piante madri micropropagate, a confronto con piante madri ottenute con la tecnica tradizionale. Lo studio è stato effettuato su due varietà ‘Portola’ (rifiorente, neutrodiurna) e ‘Pircinque’ (unifera, brevidiurna). È stato utilizzato un protocollo standard che prevede, per la fase di moltiplicazione *in vitro*, un substrato contenente 0,1 mg/l di benzilaminopurina.

### Risultati

*In vitro* la varietà rifiorente ha espresso una capacità di accostamento, nella fase iniziale (prime due subcolture), inferiore a quella della varietà unifera, in quanto si è riscontrato una minore quantità di gemme ascellari preformate a legno. Portola, infatti, ha avuto un tasso di moltiplicazione pari a 2,5-3, mentre per la Pircinque è stato di 4-5.

In vivaio, è stata confermata la già nota maggior attività stolonifera delle piante madri micropropagate. L’effetto “micro” si è osservato per entrambe le varietà con valori di +29% per l’unifera e ben +82% per la rifiorente rispetto alle “macro”.

I controlli genetici in vivaio hanno dimostrato che le piante di ‘Portola’ prodotte *in vitro* con bassi dosaggi ormonali sono risultate fenotipicamente stabili, confermando la validità di questa tecnica al fine di migliorare le rese vivaistiche delle varietà rifiorenti.

## Osservazioni sull'organogenesi *in vitro* di due selezioni di specie da "tappeto erboso"

Francesca Tardelli<sup>1</sup>, Barbara Ruffoni<sup>2</sup>, Marco Savona<sup>2</sup> e Maurizio Pacini<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie, Università di Pisa

<sup>2</sup> CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

<sup>3</sup> Azienda Agricola Pacini Maurizio, Rigoli (PI)

La produzione e la selezione di specie da "tappeto erboso" è un settore in continua e crescente espansione e la tendenza attuale vede uno spiccato interesse verso la selezione di genotipi particolarmente resistenti sia a problemi legati alla siccità, sia a problemi di natura meccanica derivanti dal calpestamento. Le regioni del Mediterraneo sono caratterizzate da un clima temperato che si presenta altamente idoneo per l'impiego di particolari ibridi da "tappeto erboso" quali "Tifway 419", derivante da un incrocio tra *Cynodon dactylon* X *C. transvaalensis*, e *Zoysia tenuifolia*. Queste due selezioni, nonostante siano caratterizzate da una certa diversità morfologica, mostrano i requisiti commerciali richiesti oltre ad una notevole tolleranza verso la salinità. Essendo ibridi sterili non è possibile la propagazione per seme. La loro commercializzazione avviene mediante talee direttamente trapiantate nel suolo. Questa tecnica di propagazione agamica prevede costi elevati per la necessità di impiego di una ingente forza lavoro con elevata manualità dell'operatore. Nel presente lavoro sono stati investigati i processi di propagazione *in vitro* e di organogenesi al fine di mettere a punto un sistema più veloce e riproducibile alternativo al sistema commercialmente utilizzato.

Per iniziare la coltura *in vitro* di Tifway 419 e *Zoysia tenuifolia* sono state prese in considerazione porzioni di infiorescenze, frammenti di filo d'erba e porzioni nodali; le porzioni nodali sono risultate essere la tipologia di tessuto totipotente più indicato alla generazione di callo indifferenziato. Il materiale è stato sottoposto a sterilizzazione superficiale (70% etanolo per 1', 4% ipoclorito per 20' e 2 risciacqui in acqua sterile); gli espianti sono stati divisi longitudinalmente in frammenti di 5 mm di lunghezza e messi su substrato base MS base addizionato con 2-iP (0,8 mg/L) e con diverse concentrazioni di 2,4-D (2 o 4 mg/L). Gli espianti sono stati mantenuti alla temperatura di 24°C ± 1, in condizioni sia di buio che di luce (16h/8h a 3500 lux). I frammenti di callo cresciuti alla luce con la caratteristica pigmentazione verde sono stati poi trasferiti su mezzo MS privo di ormoni e in presenza di carbone attivo (10 g/l). Dopo 4 settimane, i germogli così ottenuti sono stati trasferiti su mezzo MS contenente GA<sub>3</sub> (0,1 mg/l), BA (1 mg/l) e NAA (0,5 mg/l) per indurre proliferazione massiva. Quest'ultimo terreno ha garan-

tito buone percentuali di rigenerazione dei germogli, ma solo in presenza di luce. In parallelo, sono state imposte prove preliminari in coltura liquida utilizzando 1 g di callo sospeso in 30 mL di mezzo colturale MS addizionato con 2,4-D (2 mg/l) e 2-iP (0,8 mg/l) in continua agitazione (120 rpm); le subcolture in questo caso sono state effettuate a scadenza settimanale. La selezione e la sincronizzazione cellulare è stata realizzata mediante l'ausilio di filtri con pori da 500 µm; dopo 15-20 giorni le cellule sono state trasferite in piastre Petri con mezzo di coltura MS liquido addizionato con BA (0,1 o 2 mg/l), in stato dinamico a 60 rpm per evidenziare l'eventuale differenziamento di strutture embrio-simili.

Si è osservato che le due selezioni considerate mostrano sostanziali differenze per quanto riguarda la produttività-proliferazione delle masse callose e la successiva capacità proliferativa dei germogli. Questa diversità potrebbe trovare la sua spiegazione nel diverso equilibrio ormonale endogeno che caratterizza le due specie; infatti, *Zoysia tenuifolia* produce un callo fibroso, scarsamente friabile di colore giallo tenue ma è caratterizzata da un ottimo tasso di moltiplicazione dei germogli che sta ad indicare un elevato contenuto endogeno di citochinine. Tifway 419, invece, produce elevate quantità di callo friabile più o meno pigmentato ma la specie è caratterizzata da un processo di moltiplicazione dei germogli molto lento che sta ad indicare un'accentuata dominanza apicale correlata ad alti livelli di auxine endogene. MS addizionato con BA 0,5 (per *Zoysia*) o 1 mg/L (Tifway) è stato indentificato come mezzo idoneo per l'accrescimento e proliferazione dei germogli. Anche per le colture su substrato liquido è stato evidenziata una diversità nella risposta dovuta alle due selezioni, così come già osservata in nella coltura solida. L'ibrido Tifway 419 ha sviluppato già dopo 4 settimane colture cellulari bianche con caratteristiche embriogeniche, mentre per *Zoysia tenuifolia* è stata osservata una difficoltà maggiore nella disgregazione cellulare. Al momento però, dalle colture cellulari, non sono ancora state ottenute strutture propagative. Le prove di ambientamento relative all'allevamento *ex vitro* dei germogli propagati hanno evidenziato per entrambe le selezioni una capacità di adattamento pari al 100%.

## L'attività di micropropagazione della ditta Brea a supporto dell'azienda di ibridazione

**Manuela Brea<sup>1</sup>, Ezio Brea<sup>2</sup> e Marina Brea<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Azienda agricola Brea Manuela, Sanremo (IM)

<sup>2</sup>Azienda Agricola Brea Ezio, Sanremo (IM)

<sup>3</sup>Azienda Agricola Artemisia, Migliarino Pisano (PI)

A partire dai primi del '900 Riccardo Brea inizia un lavoro di miglioramento genetico sul garofano, specie all'epoca in rapida espansione nel nostro territorio. Tale lavoro, continuato dal figlio Ezio ha portato alla brevettazione di numerosi genotipi tra i quali: "Rosso garibaldi", "Brio" "Trieste", "Perla", il garofano "Eolo". In seguito l'attività di breeding si è allargata ad altre specie come la rosa, la calla, il ranuncolo e il *Dianthus barbatus*.

Il laboratorio di micropropagazione è nato nel 1993 a supporto dell'attività di miglioramento genetico con lo scopo di produrre cloni di ranuncolo, specie che si stava affermando con una propria connotazione come fiore reciso in contrapposizione al precedente utilizzo come mazzeria e per il quale era necessario studiare una diversa strategia di propagazione per mantenere l'omogeneità della produzione. Dagli incroci originali e di particolare pregio commerciale,

nell'arco dei diversi anni di attività, sono stati selezionati alcuni cloni (15) su cui è stata applicata la propagazione clonale *in vitro*. Questo materiale, ambientato, è stato poi utilizzato nelle prime coltivazioni monoclonali. Il ranuncolo da clone è diventato negli ultimi anni una delle più importanti realtà produttive della Riviera.

In seguito, per il *Dianthus barbatus* è stato messo a punto il sistema di risanamento e di produzione di piccole quantità di piante micropropagate, utilizzate come piante madri per il successivo taleaggio. Oggigiorno viene effettuata anche attività di risanamento e micropropagazione di cloni di *Zantheschia aetiopica* selezionati per taglia ridotta.

Tutto il lavoro di ricerca sul ranuncolo è compreso nell'attività del consorzio "Fiori e Frutti", finanziato dal Ministero delle Attività Produttive.

## Controllo della crescita di piante micropropagate di pesco, kiwi e carciofo durante la fase di acclimatamento

Enrico Maria Lodolini<sup>1</sup>, Yousef Beni Houd<sup>1</sup>, Giuseppe Zuccherelli<sup>2</sup>, Vita Capaccio<sup>2</sup>, Oriano Navacchi<sup>2</sup> e Davide Neri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche

<sup>2</sup> VITROPLANT S.p.A., Cesena

La fase di acclimatamento *ex vitro* rappresenta un momento molto delicato poiché la pianta micropropagata deve acquisire rapidamente un'efficiente attività autotrofa nell'ambiente esterno. Durante le prime fasi di acclimatamento la pianta è soggetta a molti stress (soprattutto termico e idrico) e la crescita vegetativa è fortemente limitata a causa della scarsa attività fotosintetica. Anche le radici presentano difficoltà ad acclimatarsi alle nuove condizioni per cui le piante necessitano di una specifica gestione degli interventi di concimazione per meglio superare lo stress del trapianto su substrato.

L'obiettivo della sperimentazione è stato di studiare l'effetto di trattamenti fogliari con dosi diversificate di azoto ed elementi nutritivi, per favorire un accrescimento vegetativo equilibrato delle piante anche su substrato non concimato probabilmente più favorevole all'acclimatamento radicale. Le "specie" utilizzate nello studio sono state carciofo (cv. Apollo), kiwi (cv. Hayward) e due portinnesti del pesco (GF677 e Garnem) trapiantate in due differenti tipi di substrato (concimato e non). I trattamenti fogliari a confronto sono stati: i) Azoto 0,1%, Fosfato di potassio 0,2%, Solfato di magnesio 0,2%, Acidi umici 0,1% + Rame 0,2%, Manganese 2,5%, Zinco 1,2%, Ferro 0,5%, Molibdeno 0,1%, Calcio metalosato 0,1%; ii) Azoto 0,2% e altri elementi alle concentrazioni citate; iii) controllo non trattato. I trattamenti sono stati eseguiti

in quattro epoche, a circa 10 giorni di distanza l'uno dall'altro. A differenza delle altre specie, in carciofo l'azoto è stato fornito solo nella prima epoca di concimazione e il fosforo è stato aumentato dello 0,1% in ciascuna delle successive epoche di trattamento con l'obiettivo di favorire un maggiore indurimento della pianta. Rilievi biometrici e distruttivi periodici su apparato radicale e porzione aerea sono stati eseguiti per studiare i ritmi di crescita delle piante.

I risultati hanno mostrato che in presenza di substrato concimato è preferibile utilizzare una dose inferiore di azoto per via fogliare per contenere l'eccessivo allungamento del fusto (piante filate) in tutte le specie in prova. In carciofo, l'incremento della concentrazione di fosforo durante l'intero ciclo di acclimatamento ha garantito un aumento del calibro al colletto e un maggior accumulo di sostanza secca nelle piante. In condizioni di substrato non concimato, il controllo della crescita attraverso trattamenti fogliari sembra essere più efficiente e costituisce un ottimo strumento per ottenere piante di altezza e calibro richiesto dal mercato.

Il presente lavoro indica che è consigliabile intervenire con concimazioni moderate, meglio se fornite per via fogliare e modulando dosi e rapporto dei singoli elementi nutritivi a seconda della fase del ciclo di acclimatamento, in modo da garantire una crescita vegetativa equilibrata e limitare stress occulti.

## Giovanilità e vigoria in piante di olivo micropropagato

**Enrico Maria Lodolini<sup>1</sup>, Tonino Cioccolanti<sup>1</sup>, Massimo Bastianelli<sup>1</sup>, Giuseppe Zuccherelli<sup>2</sup>, Vita Capaccio<sup>2</sup>, Oriano Navacchi<sup>2</sup> e Davide Neri<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche*

<sup>2</sup> *VITROPLANT S.p.A., Cesena*

La giovanilità è lo stadio fisiologico della pianta intera o di porzioni di essa ed è caratterizzato dall'incapacità di riprodursi. In olivo, i tessuti giovanili si differenziano morfologicamente da quelli maturi mostrando caratteristiche specifiche ben riconoscibili: crescita vigorosa e irregolare del germoglio con distanza internodale incostante, numero variabile di meristemi ascellari per nodo, numero di foglie per nodo maggiore di due, foglie di dimensioni ridotte, ispessite, di colore verde più scuro e arrotondate rispetto alle foglie di porzioni mature. Tali caratteristiche morfologiche interessano la pianta intera e sono molto evidenti durante i primi anni di sviluppo da seme (giovanilità), potendo anche manifestarsi su porzioni in forte crescita vegetativa (vigoria) di piante adulte in stadio maturo. Ne consegue che spesso giovanilità e vigoria vegetativa vengono confuse o erroneamente utilizzate come sinonimi a causa delle caratteristiche morfologiche comuni, sebbene dal punto di vista fisiologico tali termini abbiano un

significato completamente diverso. A livello fisiologico vengono considerati rigidi e irreversibili gli stadi di giovanilità, maturità e senescenza, mentre appaiono flessibili e reversibili (plasticità fenotipica) le diverse fasi all'interno dei singoli stadi (in maturità: vegetativa, equilibrio vegeto-riproduttivo e insenilimento).

La teoria che la micropropagazione favorisca in olivo una regressione del materiale vegetale maturo ad uno stadio giovanile, con un ritardo significativo dell'entrata in produzione delle piante in campo, è spesso infondata, mentre risulta fortemente legata allo stadio fisiologico del materiale di partenza.

L'obiettivo della sperimentazione è stato di studiare le differenze morfologiche delle diverse porzioni di piante adulte di olivo, in confronto a piante provenienti da due diverse tipologie di propagazione (talea e propagazione *in vitro*), al fine di individuare caratteri facilmente associabili allo stadio giovanile o alla fase vegetativa dello stadio maturo.

## Sviluppo di protocolli di propagazione *in vitro* ed ambientamento per nuove costituzioni di *Limonium*

Maurizio Antonetti, Sonia Cacini, Silvia Pacifici e Gianluca Burchi

CRA-VIV Unità di Ricerca per il Vivaismo e la Gestione del Verde Ambientale ed Ornamentale, Pescia (PT)

A partire dal settembre 2009, nell'ambito del progetto NEWVARITALY finanziato dal MiPAAF, 48 linee clonali di *Limonium*, selezionate presso il CRA-VIV ed il CRA-FSO, sono oggetto di una ricerca finalizzata all'individuazione di efficienti protocolli di micropropagazione ed ambientamento anche per genotipi parzialmente recalcitranti. In seguito ad ulteriori selezioni basate su caratteristiche estetiche ed innovative per il mercato, la selezione è stata ridotta dapprima a 31 e successivamente a 6 genotipi. Su questi ultimi sono in corso caratterizzazioni molecolari mediante marcatori AFLP, allo scopo di ottenere *fingerprinting* genetici utili per eventuali richieste di privativa comunitaria. Esperienze preliminari hanno permesso di ripartire le linee clonali di partenza in tre gruppi distinti, sulla base dell'attitudine alla micropropagazione: 1) genotipi con tasso di moltiplicazione *in vitro* medio-alto e buona attitudine alla radicazione (*L. gmelinii*, *L. otolepis*, *L. latifolium*, *L. altaica*, *L. serotinum* ed ibridi tra queste specie); 2) genotipi con elevato tasso di moltiplicazione *in vitro* ma che possono manifestare difficoltà nella radicazione (specialmente se in presenza di quantità eccessive di citochinine) (*L. sinense*, *L. aureum*, *L. bonduelli*, alcuni genotipi di *L. sinuatum* ed ibridi tra queste specie); 3) genotipi parzialmente o totalmente recalcitranti alla micropropagazione, specialmente nella fase di radicazione (*L. suworowii*, *L. perigrinum*, *L. tataricum*, alcuni genotipi di *L. sinuatum*). Sono stati utilizzati substrati a formulazione MS (in alcuni casi a concentrazioni modificate e/o con la sostituzione delle vita-

mine del terreno B5) senza ormoni o con l'aggiunta di BAP (0,2 e 0,5 mg/l) o kinetina (1 mg/l) per la fase di moltiplicazione, e di NAA (0,5 mg/l), IAA (1 mg/l o 2 mg/l) ed IBA (1 mg/l, o *pulse* di 12mg/l per 24h) per la fase di radicazione. Al fine di valutare l'efficienza dei vari substrati, sono stati presi in considerazione i tassi di moltiplicazione e di radicazione *in vitro*, l'incremento di biomassa, le dimensioni e l'aspetto generale dei germogli, l'eventuale incidenza di necrosi o di fenomeni di vitescenza. I germogli radicati sono stati ambientati in tunnel sotto serra ombreggiata con bancale riscaldato (T° min. 10°C) e nebulizzazione temporizzata (3' x 3 / die). L'ambientamento è stato effettuato su 3 diverse tipologie di substrato: 1) mix composto da 2/3 terriccio universale a base di torba e 1/3 agriperlite 2) cubetti di torbe brune e bionde pressate in alveoli plastici rivestiti di polistirolo areato con aggiunta di agriperlite sciolta. 3) mix composto da Biomax (50%), clinoptilolite (20%), agriperlite (30%). Il terzo substrato riveste una valenza ecologica di grande interesse: il Biomax infatti, al contrario della torba estratta dalle torbiere naturali, è un substrato a base di residui derivanti dalla lavorazione dell'orzo. Il successo dell'ambientamento è stato valutato in relazione agli ormoni utilizzati in fase di radicazione ed ai substrati. Sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: percentuale di sopravvivenza; eventuale sviluppo di patologie fungine; peso fresco e peso secco degli apparati fogliari e radicali; area fogliare; colore (mediante colorimetro); contenuto di clorofilla *a* e *b* nelle foglie.



## Micropropagazione di *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* Fiori cv “Violetto di Provenza”

**Claudia Ruta, Angela Campanelli, Anna Tagarelli, Giuseppe De Mastro e Irene Morone-Fortunato**  
*Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università di Bari*

La messa a punto di protocolli per la propagazione *in vitro* di cultivar tardive di carciofo ha consentito la moltiplicazione e la distribuzione agli agricoltori di cloni provenienti da piante madri selezionate. Attualmente, pertanto, l'impiego di piantine micropropagate per l'impianto di carciofaie a produzione primaverile è una realtà. Le problematiche relative alla micropropagazione di tipologie precoci di carciofo si sono rivelate, invece, decisamente più complesse, sia in relazione alle fasi di radicazione e ambientamento, sia per l'instabilità genetica. È risaputo, infatti, che il comportamento *in vitro* è caratteristica legata al genotipo, così che spesso cultivars della stessa specie presentano una diversa attitudine al *in vitro*. Inoltre, nel carciofo il carattere precocità viene classificato fra i caratteri a genetica complessa e ciò giustificherebbe il diverso comportamento *in vitro* delle due tipologie “tardivo” e “precoce”.

I numerosi studi da noi effettuati hanno consentito la messa a punto di un efficace protocollo di micropropagazione per la cultivar rifiorante “Catanese” relativamente agli ecotipi “Brindisino” e “Locale di Mola”. Scopo del presente studio è stata la validazione di tale protocollo alla cultivar rifiorante “Violetto di Provenza”.

Apici vegetativi di 0,5-0,6 cm, isolati da carducci provenienti da una carciofaia selezionata in agro di Mola di Bari, sono stati stabilizzati per tre settimane sul mezzo di coltura arricchito in isopentenil adenina (2ip), (1 mg l<sup>-1</sup>), acido indolacetico (IAA) (1mg l<sup>-1</sup>) e

acido gibberellico (GA3) (0,025 mg l<sup>-1</sup>), raggiungendo dimensioni minime di 3 cm.

Per la fase di moltiplicazione, i germogli sono stati allevati sul substrato nutritivo addizionato con 6-benzilaminopurina (BAP) (0,05 mg l<sup>-1</sup>). Sono state effettuate tre subcolture a intervalli di 25 giorni e per ciascuna si è misurato l'indice di moltiplicazione. I germogli proliferati, raggiunte le dimensioni minime di 5cm, sono stati trasferiti sul mezzo arricchito con IAA (10 mg l<sup>-1</sup>) per l'induzione alla radicazione.

L'ambientamento *ex vitro* delle plantule radicate è avvenuto in serra climatizzata e nebulizzata, valutando l'effetto della tecnica di micorrizzazione per ridurre gli stress da trapianto.

Alla fine della fase di stabilizzazione si è registrata la sopravvivenza del 72% degli espianti iniziali. L'indice di proliferazione è stato mediamente pari a 3 per ogni subcoltura, consentendo di ottenere 27 germogli a partire da un unico espianto. I germogli radicati sono stati circa il 63%. La percentuale di plantule che hanno superato la fase di ambientamento è stata del 74% , se sottoposte a inoculo micorrizico, e del 45%, se non micorrizzate.

I risultati conseguiti hanno evidenziato un'ottima risposta della cultivar “Violetto di Provenza” al protocollo da noi già messo a punto per la cultivar “Catanese”. La ricerca prosegue in pieno campo al fine di verificare il comportamento produttivo delle piante ottenute.

## Selezione precoce di germogli di olivo micropropagato in base al diverso livello di vigoria

**Tonino Cioccolanti<sup>1</sup>, Enrico Maria Lodolini<sup>1</sup>, Massimo Bastianelli<sup>1</sup>, Giuseppe Zuccherelli<sup>2</sup>, Vita Capaccio<sup>2</sup>, Oriano Navacchi<sup>2</sup> e Davide Neri<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche*

<sup>2</sup> *VITROPLANT S.p.A., Cesena*

In olivo, la maggiore vigoria riscontrata in piante micropropagate, rispetto a quelle ottenute per talea, sembra essere inesorabilmente legata all'acclimatamento al "vitro" e può comportare un ritardo dell'entrata in produzione nei primi anni di impianto.

L'obiettivo della sperimentazione è stato di studiare in fase di moltiplicazione le micro talee di Arbequina ottenute da espanti del 2000, 2007, 2010 e di Coratina e Frantoio (2000, 2010), sottoposti a più subculture. E' stata formulata l'ipotesi che un numero elevato di subcolture sia potenzialmente causa di maggiore vigoria ed è stata valutata la possibilità di selezionare in fase precoce (in moltiplicazione o pre-ambientamento) il materiale con minore vigoria sulla base di caratteri morfologici facilmente identificabili.

Sui germogli in fase di moltiplicazione sono state eseguite misurazioni di calibro, lunghezza, numero nodi, numero foglie/meristemi ascellari per nodo, presenza di germogli anticipati, peso fresco e peso secco.

I risultati hanno messo in luce una distribuzione normale per i diversi parametri dei germogli con diversa permanenza in vitro. L'Arbequina ha mostrato una marcata disformità morfologica, mentre si è riscontrata una differenza significativa con Coratina e Frantoio che hanno invece presentato una minore vigoria in entrambe gli anni di espanto.

Questo studio preliminare lascia presupporre un diverso livello di vigoria delle piante di Arbequina in fase di moltiplicazione in vitro con possibili ricadute sull'acclimatamento e sul comportamento vegeto-riproduttivo nei primi anni d'impianto ex-vitro. L'identificazione di alcuni caratteri morfologici utili ad una selezione precoce del materiale micropropagato può consentire l'ottenimento e la commercializzazione di piantine a ridotto livello di vigoria, con attitudine alla precoce entrata in produzione e comparabili con quelle da talea.

## Contributo della coltura *in vitro* nel miglioramento genetico e varietale di tre tipiche specie floricole del ponente ligure, Anemone, Ranuncolo e Papavero

Mario Rabaglio, Giuseppe Campagna, Fabio Brusco, Silvia Condor e Alberto Biancheri  
 Az. Agr. Biancheri Creations, Camporosso Mare (IM)

Nell'ambito del contratto di programma "Fiori & Frutti" finanziato dal Ministero dello Sviluppo Economico ed avente come oggetto la "Ricerca e sperimentazione per la valorizzazione di specie caratterizzanti la produzione floricola ligure", l'attività del laboratorio aziendale nel triennio 2008-2011 si è rivolta al miglioramento dei protocolli di micropropagazione, acclimatamento di nuove varietà selezionate, così come la conservazione *in vitro* delle linee parentali utilizzate nel breeding commerciale. La ricerca ha interessato tre specie note per la loro rilevanza economica come il ranuncolo (*Ranunculus asiaticus* L.), l'anemone (*Anemone coronaria* L.) e il papavero (*Papaver nudicaule* L.), che già avevano manifestato comportamenti e problematiche differenti nell'ambito delle colture *in vitro*. Le plantule di Anemone derivate da prelievi meristematici e dalla rigenerazione di brattee fiorali, sono allevate su substrati di moltiplicazione addizionati con differenti tipi di citochinine, individuando in MS+0,5 mg/l BAP+0,01 mg/l IBA il substrato che garantiva il miglior rapporto qualità / quantità. La radicazione si è ottenuta su substrato MS addizionato di fruttosio (30g/l) e IBA (0,5 mg/l) impiegando esclusivamente plantule provviste di un pseudorizoma dal quale si sviluppano numerose radici. L'acclimatamento lento e difficoltoso (sensibilità al marciume) ha prodotto piante fiorite dalle quali sono stati raccolti rizomi dal singolare aspetto morfologico. La clonazione di genotipi selezionati di Ranuncolo attraverso un nuovo approccio definito di tipo conservativo, che permette cioè di non perdere l'originalità genetica anche dopo un massiccio prelievo di espianti, è avvenuta utilizzando procedure

standard già consolidate nell'ambito aziendale. La qualità delle subcolture è comunque migliorata con la riduzione della quantità di BA a valori di 0,3 mg/l assicurando, a seconda del genotipo, un tasso medio di moltiplicazione pari a 1,5-1,8. Per indurre la formazione di organi di riserva *in vitro* (vitrozampa) simili ai normali rizomi, si è intervenuti sulla componente nutrizionale e strutturale del terreno di coltura (zucchero, ormoni, agar). Utilizzando plantule di 1-1,5 cm ben formate dotate di un paio di foglie estese e verdi, dopo circa 45-55 giorni si produce un progressivo ingrossamento delle singole unità radicali. Il recupero in condizioni di asepsi di tali neoformazioni (vitrozampe), il loro stoccaggio e il ri-germogliamento controllato ottenuto *in vitro*, danno positive indicazioni sulla possibilità di un loro impiego nella conservazione a lungo termine delle varietà, in alternativa ad un sistema di crescita rallentata (frigoconservazione). Nel Papavero, selezioni di linee sementiere omogenee per il colore dei fiori sono state inoculate *in vitro* con trattamento sanitizzante in etanolo e ipoclorito di Na, originando colture stabilmente asettiche per l'80%. Le diverse subcolture su MS+0,5 mg/L BA hanno prodotto "clumps" regolari, privi di alterazioni fisiologiche (vitrescenza) e con interessanti tassi di moltiplicazione. Le plantule singolarmente separate appaiono recalcitranti nella fase di rizogenesi, anche quando sottoposte a tipi e dosi differenti di auxine e zuccheri. L'acclimatamento di alcune piante ben radicate è regolare e con la loro fioritura si sono confermate le caratteristiche fenotipiche rilevate durante l'attività di selezione *in vivo*, prospettandone l'impiego nel breeding commerciale dopo l'analisi dell'ACG.