

Applicazioni in Italia dell'androgenesi e della ginogenesi al miglioramento genetico di specie orto-floricole

Paolo Riccardi e Agostino Falavigna*

CRA-ORL Unità di Ricerca per l'Orticoltura, Montanaso Lombardo (LO)

Application of androgenesis and gynogenesis to vegetable and ornamental crop species in Italy

Abstract. Haploid plants have only one copy of chromosome from male (andro-genetic) or female (gynogenetic) gametic cell. Doubled-haploids (DH) genotypes obtained after chromosome doubling can directly become new varieties of autogamous and vegetative propagated crop species or to be used as parents of F_1 hybrids. Spontaneous haploids were found in more than 100 crops, but could not be used for breeding purpose because insufficient or found in not interesting genetic background. Protocols to obtain haploids through anthers, isolate microspores, ovules ovaries and flowers in vitro culture were developed for many species and now are applied to cereal vegetable and ornamental crops. The main achievements obtained in Italy by using haploids for vegetable and ornamental crops breeding are presented in this paper.

- Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). In vitro anther culture technique has been applied during the last thirty-five years. Selected DH female and male clones were used as parents of all-male hybrids, the best of which nowadays are cultivated over most of asparagus growing area in Northern Italy. In vitro anther culture of tetraploid plants derived by crossing *A. officinalis* with the wild relatives *A. maritimus* and *A. acutifolius* gave di-haploid plants that were successful crossed with diploid *A. officinalis* genotypes to introgress new genetic resistance to biotic and abiotic stresses.
- Onion (*Allium cepa* L.). Phenotypic depression caused by iterated selfing cycles is a great limit for homozygous lines production. In vitro anther culture was unsuccessful, while 1% average yield of haploid was obtained from flower buds culture. Chromosome doubling of haploid plant was obtained in vitro by immersion of shoots in a 10 mg/l colchicine aqueous solution, followed by

micropropagation through adventitious shoots. At present in vitro bud flower culture is systematically applied by seed companies for large scale doubled-haploid lines production and for genetic stabilization of male-sterile lines.

- Eggplant (*Solanum melongena* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.). In vitro anther culture was successful carried out to obtain doubled-haploid plants from lines segregating for morphologic traits and disease resistance. Plants obtained by protoplast fusion between *S. melongena* and the wild relatives *S. aetiopicum* e *S. integrifolium* were intercrossed. Following in vitro anther culture of tetraploid lines so obtained, di-haploid plants with a good recombination level of three parental species were obtained and utilized to introgress new genetic diseases resistance and fruit quality into *S. melongena*.
- Melon (*Cucumis melo* L.). A method to yield haploid plants from in vitro culture of dissected unfertilized ovaries was set up and successfully applied to winter melon (*C. melo* var. *inodorus*) to stabilize valuable local varieties, and to select resistant lines to *Fusarium oxysporum* f. s. *melonis*.
- Anemone (*Anemone coronaria* L.). The varieties of this cultivated species are obtained from intercross between few heterozygous parents; therefore phenotypic variability for several morphologic traits are observed among the plants. An in vitro anther culture procedure was set up to obtain doubled-haploid fertile plants, offering to the seed companies the chance to obtain F_1 hybrids.

In the next future an improvement of in vitro protocols may allow to improve haploid production; besides studies about genes sequencing and characterization involved in the androgenetic and ginogenetic processes will give a great contribution to optimize in vitro culture media.

Key words: Anemone, Asparagus, breeding, Eggplant, haploidy, Melon, Onion, Pepper.

* agostino.falavigna@entecra.it

Introduzione

Gli individui aploidi sono caratterizzati dalla presenza nelle loro cellule di una sola copia di cromosomi e si formano in modo naturale nelle angiosperme quando una cellula uovo o sinergide contenuta nell'embriosa origina un embrione senza l'intervento della fecondazione. Una pianta aploide è ovviamente sterile, ma quando l'intero suo assetto cromosomico raddoppia, diventa fertile e perfettamente omozigote; perciò viene denominata "diplo-aploide".

Le piante diplo-aploidi sono particolarmente utili nei programmi di miglioramento genetico perché manifestano contemporaneamente tutti i caratteri genetici, compresi quelli recessivi; di conseguenza in una sola generazione è teoricamente possibile eliminare tutte quelle che portano caratteri genetici non desiderati. Inoltre nelle specie dioiche ed in tutti i casi di auto-incompatibili o maschio-sterilità, l'ottenimento di diplo-aploidi rappresenta l'unica pratica via per arrivare all'omozigosi.

Nelle specie o genotipi tetraploidi gli individui aploidi (denominati di-aploidi) presentano un numero cromosomico diploide ($x = 2n$), mantengono un certo livello di eterozigosi, sono parzialmente fertili e danno origine a progenie fertili quando incrociati con i normali genotipi diploidi della stessa specie.

I primi aploidi spontanei sono stati trovati da Blakeslee *et al.*, (1922) in *Datura stramonium* ed attualmente sono noti in oltre 100 specie vegetali superiori, ma il loro impiego nel miglioramento genetico è stato impossibile data la scarsa resa o il ritrovamento in genotipi di nessun interesse.

La possibilità di ottenere diplo-aploidi attraverso coltura *in vitro* di antere fu dimostrata per la prima volta da Guha e Maheswari (1964) in *Datura innoxia* e da Bourgin e Nitsch (1967) in *Nicotiana*. In seguito sono state messe a punto anche le tecniche di coltura *in vitro* anche di microspore isolate, ovuli non fecondati, embrioni derivati da impollinazione con polline irradiato o da incroci tra specie geneticamente lontane. Esaurienti descrizioni di tutte queste tecniche e delle relative problematiche sono riportate da Bajai (1990), Jain *et al.* (1996), Barcaccia e Falcinelli (2006), Bhojwani e Dantu (2010).

Finora la produzione di genotipi diplo-aploidi attraverso colture *in vitro* è stata possibile in oltre 200 specie, ma il loro sistematico impiego nell'attività di miglioramento genetico finalizzata alla costituzione di nuove varietà è limitata a: cereali (riso, frumento orzo), orticole (asparago, cipolla, melanzana peperone, patata, melone, zucchini, cetriolo, brassicacee), barbabietola da zucchero, patata. In questo lavoro

sono presentati i principali risultati conseguiti presso le istituzioni pubbliche italiane applicando l'androgenesesi o la ginogenesi *in vitro* al miglioramento genetico di specie orticole e floricole.

Asparago (*Asparagus officinalis* L.)

L'asparago è una specie dioica e perenne, con un ciclo colturale medio di 10-15 anni. In una varietà riprodotta attraverso libera impollinazione le piante maschili sono più produttive, tolleranti le malattie e longeve rispetto a quelle femminili. Secondo Rick e Hanna (1943) la funzionalità maschile e femminile sembrerebbe controllata da un singolo gene, per cui le piante femminili sarebbero *m/m* e quelle maschili *m/M*. Altri autori invece hanno proposto un modello basato su due geni dominanti e strettamente concatenati: uno attivante l'androceo "A" e l'altro sopprimente il gineceo "G" (Marks, 1973; Charlesworth e Charlesworth, 1979).

In asparago l'unica modalità pratica per ottenere ibridi F_1 costituiti solo da piante maschili (*M/m*) è l'incrocio tra individui femminili (*m/m*) e maschili (*M/M*), impropriamente definiti "supermaschi". Due metodologie hanno finora consentito di ottenere genotipi supermaschi: autofecondazione di piante andromonoiche di costituzione genetica *M/m* e coltura *in vitro* di antere prelevate da piante maschili eterozigoti (*M/m*).

L'andromonoica ha trovato una difficile applicazione al miglioramento genetico a causa del complesso sistema di eredità genetica (almeno tre geni) ed dalla conseguente difficoltà del suo trasferimento da un genotipo all'altro (Franken, 1970).

La tecnica di coltura *in vitro* di antere è stata messa a punto da Pelletier *et al.* (1972) e sistematicamente applicata al programma di miglioramento genetico condotto presso CRA-ORL fin dal 1974 (Falavigna, 1976). L'obiettivo generale del progetto era di ottenere ibridi adatti alla coltivazione nelle tradizionali aree delle regioni settentrionali; d'altra parte quelli di provenienza estera, introdotti in diversi periodi, avevano mostrato problematiche anche maggiori rispetto alle popolazioni locali, determinate dalla insufficiente adattabilità all'ambiente e/o dalla suscettibilità all'apertura delle brattee del turione (Falavigna e Porcelli, 1986).

Le antere sono state coltivate *in vitro* seguendo la tecnica di Pelletier (1972) con parziali modifiche riguardo a tipo e concentrazione delle sostanze di crescita (Qiao e Falavigna, 1990). In tabella 1 sono riportati i principali risultati ottenuti e le problematiche incontrate.

Tab. 1 - Principali aspetti della tecnica di coltura *in vitro* di antere applicata per ottenere cloni androgenetici di asparago.
 Tab. 1 - Main features of *in vitro* anther culture applied to obtain androgenetic clones of asparagus.

Caratteristica	Dato sperimentale ottenuto
Numero complessivi di antere coltivate <i>in vitro</i>	280.000 circa
Tempo di permanenza <i>in vitro</i> dell'antera per osservare gli embioni androgenetici sull'antera	30-40 giorni (oltre 45 giorni il rischio di rigenerazione da tessuto somatico è elevato)
Numero di embrioni prodotti per 100 antere coltivate <i>in vitro</i> (fig. 1)	Da 0,1 a 40 con una media generale di 2,4
Percentuale di embrioni da cui è stato possibile rigenerare piantine	50 (gli altri sono rimasti come calli incapaci di rigenerare steli e/o radici)
Rapporto percentuale di cloni androgenetici aploidi: diploidi: poliploidi	2,7: 58,8: 36,5
Risposta all'androgenesi di molti genotipi di interesse per il progetto	Insufficiente
Rigenerazione di cloni da tessuto somatico	Circa 5% dei cloni ottenuto
Numero di cloni androgenetico ottenuti	Circa 3.000
Numero di cloni selezionati	Circa 200 (rapporto 1:1 tra i due sessi)
Numero di piante rigenerate da ogni embrione	10-30



Fig. 1 - Embrione androgenetico ottenuto da coltura *in vitro* di asparago (sinistra), melanzana (centro) e peperone.

Fig. 1 - Androgenetic embryo obtained from *in vitro* anther culture of asparagus (left), eggplant (middle) and pepper.

Dalla coltura *in vitro* di circa 280.000 antere, sono stati ottenuti 1.800 cloni diplo-aploidi androgenetici con un rapporto 1:1 tra femminili e maschili (come atteso). La valutazione in pieno campo è avvenuta per un periodo minimo di tre anni su un terreno naturalmente infetto da funghi patogeni del genere *Fusarium* (responsabili di gravi marciumi radicali). La selezione dei migliori cloni diplo-aploidi è avvenuta tenendo presente sanità del rizoma e delle radici, vigore della piante e resistenza alla ruggine (Falavigna *et al.*, 2002). Tutti i cloni selezionati hanno mostrato una decisa depressione fenotipica, ma la riduzione a 20-30 gg del periodo annuale di raccolta dei turioni (rispetto ai normali 60 gg) ha permesso alle piante di raggiungere un vigore non troppo inferiore rispetto ai genotipi eterozigoti (Falavigna *et al.*, 2008). Allo scopo di ottimizzare l'eterosi degli ibridi prodotti, sono state favorite le combinazioni tra parentali diplo-aploidi ottenuti da genotipi di diversa origine. La similarità genetica recentemente stimata tra la maggior parte dei cloni diplo-aploidi selezionati, utilizzando marcatori molecolari, permetterà in futuro di orientare meglio la scelta delle combinazioni di incrocio da realizzare (Riccardi *et al.*, 2011).

Gli ibridi maschili ottenuti attraverso impollinazio-

ni manuali sono stati distinti in due categorie: “due vie” quando entrambi i parentali erano diplo-aploidi e “tre vie” se il parentale femminile era eterozigote; i primi sono stati migliori per omogeneità del prodotto ottenuto ed i secondi per produzione e qualità del seme.

Presso l'azienda di CRA-ORL a Montanaso Lombardo (LO) e nelle zone tipiche di produzione dell'asparago, sono stati finora ottenuti e valutati circa 350 ibridi sperimentali interamente maschili, nove dei quali hanno raggiunto interesse commerciale per la produzione di turioni verdi o bianchi delle regioni settentrionali (gli unici iscritti sul Registro Nazionale delle Varietà Orticole). Gli ibridi Ringo, Gladio, Argo, Golia e Marte, sono stati largamente coltivati negli anni '90, mentre Eros, Ercole e Franco, da oltre un decennio rappresentano la quasi totalità delle coltivazioni di asparago verde nelle regioni settentrionali (Falavigna *et al.*, 2008). In Veneto e Friuli Venezia Giulia dove prevale la produzione di turioni bianchi (Veneto e Friuli Venezia Giulia), l'ibrido Zeno è largamente preferito agli ibridi di provenienza estera, soprattutto per longevità della coltura e qualità del prodotto. Nel 2012 inizierà la diffusione in coltura degli ibridi maschili ‘Vittorio’ (bianco) e Giove (verde) rispettivamente migliori di Zeno ed Eros per produzione, qualità del turione e resistenza a malattie.

La collezione di cloni diplo-aploidi mantenuta presso CRA-ORL è sicuramente la più ricca al mondo e permetterà di ottenere ibridi superiori a quelli attuali; però più ambiziosi traguardi del miglioramento genetico, in un futuro più lontano, sono attesi a seguito di ibridazione interspecifica.

A questo scopo, presso CRA-ORL sono state scelte la varietà tetraploide Violetto d'Albenga di *A. officina-*

lis (O), un'accessione coltivata di *A. maritimum* (M) molto precoce, resistente alla ruggine e tollerante sia al sale che a *Fusarium* spp. e la specie spontanea *A. acutifolius* (tetraploide, eccellenti qualità organolettiche del turione ed adatta ad ambienti caldo-aridi). La quasi totale sterilità dell'ibrido [(OxM)xA], è stata superata reincrociandolo con "O". La coltura in vitro di antere delle piante BC₁ maschili così ottenute, ha permesso di ottenere cloni di-aploidi con i 20 cromosomi tipici della specie coltivata (Falavigna *et al.*, 2008).

Un vasto programma di incrocio tra i migliori cloni di-aploidi e cloni diplo-aploidi è in atto al fine di ottenere materiali genetici dotati di nuove resistenze a malattie e qualità del turione. La disponibilità di marcatori specie-specifici potrà contribuire ad accertare l'effettiva presenza di genoma delle due specie *A. maritimum* e *A. acutifolius* in progenie diploidi avanzate derivate dall'incrocio con *A. officinalis*.

Cipolla (*Allium cepa* L.)

La cipolla è una specie allogama ad impollinazione entomofila, caratterizzata da un elevato livello di proterandria. Anche se nell'ambito della stessa infiorescenza è possibile l'autofecondazione attraverso il trasporto del polline da un fiore all'altro, le varietà riprodotte attraverso libera impollinazione sono caratterizzate da piante altamente eterozigoti.

La produzione di ibridi in cipolla avviene attraverso due principali metodi:

- incrocio tra una linea maschio-sterile come parentale femminile ed una maschio-fertile come impollinatrice;
- incrocio tra due linee con livello di proterandria così elevato da ridurre al minimo l'autofecondazione.

In entrambi i casi, l'eccessiva depressione fenotipica delle linee parentali, conseguente a ripetuti cicli di autofecondazione, rappresenta un ostacolo al raggiungimento dell'omozigosi completa delle linee parentali degli ibridi, con negative ripercussioni sull'omogeneità fenotipica e sull'eterosi.

Le ricerche riguardanti la coltura *in vitro* di antere e di microspore isolate non hanno permesso di ottenere individui androgenetici (Campion *et al.*, 1984; Roy, 1989). Le prime piante aploidi di cipolla sono state invece ottenute presso CRA-ORL da Campion e Azzimonti (1988) attraverso coltura *in vitro* di ovuli non fecondati. Tecnicamente più facile è stata la successiva coltura *in vitro* di ovari e fiori (Keller, 1990; Campion *et al.*, 1992). Tutti gli autori concordano sui seguenti risultati: - produzione diretta di piante aploidi senza lo sviluppo di callo, - rigenerazione quasi totale

di piante aploidi; - forte dipendenza del genotipo con un produzione di aploidi variabile da 0 a 1% per 100 espianti coltivati (Hassandokht e Campion, 2002).

Un significativo contributo alla produzione di linee ginogenetiche diplo-aploidi di cipolla è stato fornito da Campion *et al.* (1995). Applicando la tecnica messa a punto da Campion *et al.* (1992) è stato realizzato il confronto tra la coltura di fiori e di ovari per 15, 30 e 45 giorni, sui substrati F₆ ed F₇ differenti per tipo e concentrazione di 2,4D, 6BA ed NAA. Successivamente gli espianti sono stati trasferiti sullo stesso substrato senza ormoni. Le due tesi di controllo sono state: coltura immediata sul substrato senza ormoni; permanenza sul substrato con gli ormoni per l'intero periodo (180 giorni). Fiori ed ovari esposti per 15-30 giorni agli ormoni contenuti nel substrato hanno fornito embrioni ginogenetici con una capacità di evolvere a piante più che doppia rispetto a quelli esposti per l'intero periodo; inoltre alcune piante aploidi sono state ottenute anche sul substrato privo di ormoni. Questi risultati hanno dimostrato che in cipolla esiste una minima propensione alla ginogenesi spontanea e che le sostanze di crescita influiscono positivamente solo nella fase di induzione al processo e negativamente sulla successiva rigenerazione a pianta.

La duplicazione *in vitro* del numero cromosomico delle piantine aploidi è avvenuta con successo a seguito di immersione per 24 ore in una soluzione acquosa contenente 10 mg/l di colchicina e successiva micropropagazione attraverso germogli avventizi.

L'esperienza maturata negli ultimi dieci anni presso il CRA-ORL ha dimostrato che le piante diplo-aploidi si adattano bene alle condizioni di serra e quando allevate nelle richieste condizioni di fotoperiodo, evolvono a bulbo che nell'anno successivo origina scapi con sufficiente fertilità dei fiori (Schiavi *et al.*, 2010).

In sintesi la tecnica sopradescritta, che consiste nella coltura *in vitro* di fiori è in grado di dare origine a piante diplo-aploidi in circa 240 giorni, con una frequenza variabile da 0,1 a 5% in relazione al genotipo di cipolla utilizzato. Essa è attualmente applicata da parte di industrie sementiere per la produzione di linee diplo-aploidi anche di genotipi maschio-sterili, da utilizzate per costituire ibridi di cipolla innovativi per uniformità e caratteristiche organolettiche del bulbo. Per lo stesso motivo la stessa tecnica è applicata anche presso CRA-ORL alle varietà locali Rossa di Tropea, Bianca di Pompei e Paglierina di Sermide.

Melanzana (*Solanum melongena* L.)

La melanzana è una specie neutro-diurna, con un

ciclo perenne nei climi tropicali ed annuale nelle zone temperate, dove però in coltura protetta si può protrarre per due anni. Il prodotto commerciale è un frutto, che in funzione della varietà è di colore viola, nero, verde, bianco e forma variabile da allungata a globosa. Anche se la specie è considerata autogama, in condizioni di pieno campo la percentuale di allogamia può oscillare da 0,2 a 48 (Franceschetti e Lepori, 1985).

I principali obiettivi del miglioramento genetico della melanzana riguardano la qualità del frutto (forma, colore, consistenza della polpa, ritardata maturazione dei semi, contenuto in glico-alcaloidi) e resistenza a malattie terricole (*Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* s.sp. *melongenae*, nematodi).

Individui aploidi derivati da partenogenesi spontanea non sono mai stati ritrovati in questa specie, mentre sono stati ottenuti per la prima volta da Isouard *et al.* (1979) attraverso coltura *in vitro* di antere. Successivamente, le ricerche condotte da Dumas de Vaulx e Chambonnet (1982) hanno permesso di ottenere aploidi su più larga scala adottando tre precise fasi *in vitro*:

- coltura di antere sul substrato di induzione “C” per otto giorni al buio ed a 35 ° C e poi quattro giorni a 25 ° C ad una intensità luminosa di 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per 16 ore al giorno;
- trasferimento delle antere sul substrato di differenziazione “R”;
- trasferimento sul substrato V3 degli embrioni androgenetici ottenuti.

Un ulteriore perfezionamento della tecnica è avvenuto studiando le condizioni colturali delle piante donatrici di antere, la concentrazione delle sostanze ormonali e il momento ottimale per la raccolta dei boccioli fiorali (Rotino *et al.*, 1987).

Fin dall’inizio degli anni ’90, la metodologia sopra descritta è stata estesamente applicata ai programmi di miglioramento genetico presso CRA-ORL. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il tempo richiesto per la produzione di embrioni androgenetici è compreso tra 30 e 120 giorni, che la produzione di embrioni per ogni 100 antere varia da 2 a 25 in funzione del genotipo, che gli embrioni in grado di rigenerare piante sono mediamente 15,4% e che il rapporto tra aploidi/diplo-aploidi è 60/40 (Rotino, 1996).

Le piante diplo-aploidi ottenute hanno mostrato un livello di fertilità accettabile e sono state riprodotte normalmente attraverso autofecondazione; mentre per quelle aploidi è stato necessario duplicare il numero cromosomico. Al riguardo le piante allevate in serra sono state private sia delle foglie che dell’apice; quindi, all’ascella del picciolo fogliare è stata depositata una piccola quantità di lanolina contenente 0,5% di

colchicina: circa 50% dei germogli ascellari prodotti è risultata diploide.

Presso CRA-ORL, dalla coltura *in vitro* di antere appartenenti a progenie segreganti derivate da incrocio tra materiali genetici di diversa origine sono state complessivamente ottenute alcune migliaia di linee diplo-aploidi. Le migliori linee, selezionate per produzione e qualità del prodotto, sono attualmente utilizzate come parentali di ibridi F₁, attraverso progetti sostenuti da alcune industrie sementiere.

La carenza nel genoma della specie coltivata di resistenze genetiche a importanti malattie, ha indotto a considerare l’introggressione dei relativi geni attraverso ibridazione con alcune specie selvatiche affini (Daunay *et al.*, 1993). Presso CRA-ORL sono state prese in considerazione *S. sodomeum*, spontanea in vaste aree della Sicilia, molto tollerante a *Verticillium dahliae* ed utilizzata in passato come portainnesto; *S. aethiopicum* e *S. integrifolium* (= *S. aethiopicum* gr. *Aculeatum*) che comprendono alcune accessioni dotate di resistenza a *Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae* ed a *Ralstonia solanacearum*, responsabile di una batteriosi particolarmente dannosa in Asia.

L’incrocio tra *S. melongena* e *S. sodomeum* ha originato un ibrido interspecifico fertile, dal quale, attraverso successivi reincroci seguiti da selezione, è stato possibile ottenere linee segreganti dotate di buona tolleranza al patogeno e sufficiente qualità del frutto. La coltura *in vitro* di antere prelevate dalle migliori piante ha dato origine a linee diplo-aploidi che potranno dare origine a ibridi altamente innovativi.

Poiché l’incrocio tra *S. melongena* e le altre due specie era noto per originare individui sterili o con scarsissima fertilità, presso CRA-ORL facendo ricorso alla fusione di protoplasti, sono stati ottenuti gli ibridi somatici allotetraploidi (*S. melongena* + *S. aethiopicum*) e (*S. melongena* + *S. integrifolium*) (Rotino *et al.*, 1998). La successiva ibridazione sessuale tra i due ibridi somatici e la coltura di antere *in vitro* delle piante così ottenute, hanno dato origine a genotipi di-aploidi dotati di un sufficiente livello di fertilità. La ricombinazione genetica delle tre specie parentali nelle piante di-aploidi è stata dimostrata attraverso osservazioni fenotipiche ed analisi genetico-molecolari (Rizza *et al.*, 2002; Rotino *et al.*, 2005; Toppino *et al.*, 2008).

L’incrocio e reincrocio tra individui di-aploidi e linee diploidi di interesse per il progetto hanno permesso di selezionare linee resistenti a *Fusarium* e dotate di buone caratteristiche produttive e qualitative del frutto. La combinazione di tali linee con quelle tolleranti a *Verticillium* derivate da ibridazione con *S. sodomeum*, ha aperto nuove prospettive per ottenere

linee diplo-aploidi e quindi ibridi dotati di resistenze genetiche multiple, oltre a innovativi caratteri qualitativi del frutto.

Peperone (*Capsicum annuum* L.)

Il peperone in Italia è rappresentato da moltissime varietà caratterizzate da diversa forma, colore, dimensione e piccantezza del frutto. La specie è tipicamente autogama con un tasso di allogamia oscillante da 1 a 8%; pertanto nell'ambito delle singole varietà le piante presentano un elevato livello di omozigosi. Il ricorso all'ibridazione con le specie *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. baccatum*, *C. chacoense* è spesso indispensabile per ottenere varietà con resistenze genetiche a numerosi virus, *Verticillium dahliae*, e nematodi; mentre l'accessione messicana "Serrano Criolo de Moreno" di *C. annuum* con frutto piccolo e molto piccante consente di recuperare la resistenza a *Ptytophthora capsici* (Nervo *et al.*, 1992). Attualmente singole resistenze a nematodi o a virus sono presenti in diversi ibridi di recente introduzione in coltura, mentre le numerose varietà locali italiane presentano caratteristiche organolettiche pregevoli, ma sono sensibili a tutte le malattie.

Il principale obiettivo del miglioramento genetico del peperone è la selezione di genotipi dotati di elevata produttività, buone caratteristiche qualitative del frutto e resistenza genetica a più malattie, le più importanti delle quali sono causate da *P. capsici*, *Verticillium dahliae*, CMV e TSWV. La disponibilità di aploidi e di marcatori molecolari associati alla resistenza nei confronti di singole malattie, consentono rispettivamente di ridurre i tempi e di migliorare l'efficacia del processo selettivo.

Individui aploidi spontanei di peperone sono stati ritrovati da diversi autori con una frequenza media di 0,1 per ogni 100 semi, ma con forti oscillazioni determinate dal genotipo e dalle condizioni colturali. Un aumento della frequenza di aploidi è stata ottenuta da Dumas de Vaulx e Pochard (1974), trattando i fiori dopo impollinazione con ossido di azoto (N₂O).

Un'efficace tecnica per ottenere aploidi e diplo-aploidi attraverso coltura in vitro di antere è stata proposta da Doumas de Vaulx *et al.* (1981). I substrati di induzione e differenziazione degli embrioni ottenuti sono gli stessi di quelli riguardanti la melanzana; mentre lo sviluppo delle piante in vitro è favorito dalla presenza nel substrato di carbone attivo. L'applicazione di questa tecnica presso CRA-ORL, ha permesso di evidenziare che:

- il tempo richiesto per la produzione di embrioni androgenetici è compreso tra 21 e 42 giorni;

- la produzione di embrioni per ogni 100 antere varia da 1,5 a 14,6 in funzione del genotipo;
- 5 mg/l di nitrato d'argento nel substrato aumenta la produzione media di embrioni e di piante rispettivamente del 75% e 14%;
- gli embrioni in grado di rigenerare piante sono mediamente 15,5% ed è influenzata positivamente dalla presenza di carbone attivo;
- il rapporto tra individui aploidi/diplo-aploidi è 50/50 (Nervo *et al.*, 1995).

La coltura *in vitro* di antere di linee segreganti derivate da incroci intraspecifici od interspecifici ha permesso di ottenere linee diplo-aploidi dotate di buona resistenza genetica a *Phytophthora capsici* e frutto non piccante di buone dimensioni, recentemente incrociate con linee resistenti a *Verticillium dahliae* e/o virus allo scopo di ottenere linee dotate di resistenze genetiche multiple.

Melone (*Cucumis melo* L.)

Le varietà di melone coltivate in Italia sono riconducibili a tre tipi:

- reticolato (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) con frutto a buccia sottile e corrugata a formare una specie di reticolo, polpa giallo-arancio molto dolce e aromatica;
- cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) con frutto liscia a buccia di colore tendente al giallo divisa a spicchi, polpa verde-gialla;
- melone d'inverno (*Cucumis melo* var. *inodorus*) con frutto di forma ovoidale o ellittica, buccia liscia o rugosa, sottile, polpa di colore bianco o verdognolo, scarsamente profumata.

Individui aploidi di melone sono stati ottenuti da Dumas de Vaulx (1979), a seguito di incrocio con la specie tetraploide *C. ficifolius*, ma con frequenza non sufficiente per il loro utilizzo nel miglioramento genetico. Inoltre la coltura in vitro di antere ed ovuli non ha fornito risultati positivi (Drianovska e Ilieva, 1983). Una prima efficiente tecnica per ottenere aploidi è consistita nell'impollinazione *in situ* con polline irradiato. Quattro settimane dopo l'impollinazione i semi sono stati estratti dai frutti e sterilizzati in una soluzione di ipoclorito di sodio. Gli embrioni contenuti nei semi sono stati distinti in aploidi ginogenetici (forma a cuore) e diploidi (forma asimmetrica allungata dei cotiledoni) di origine zigotica (fig. 2). Gli embrioni aploidi allevati *in vitro* su un substrato privo di sostanze ormonali hanno differenziato steli e radici. Utilizzando questa tecnica ed analizzando circa 20.000 semi, Ficcadenti *et al.* (1995) hanno messo in evidenza i seguenti aspetti:

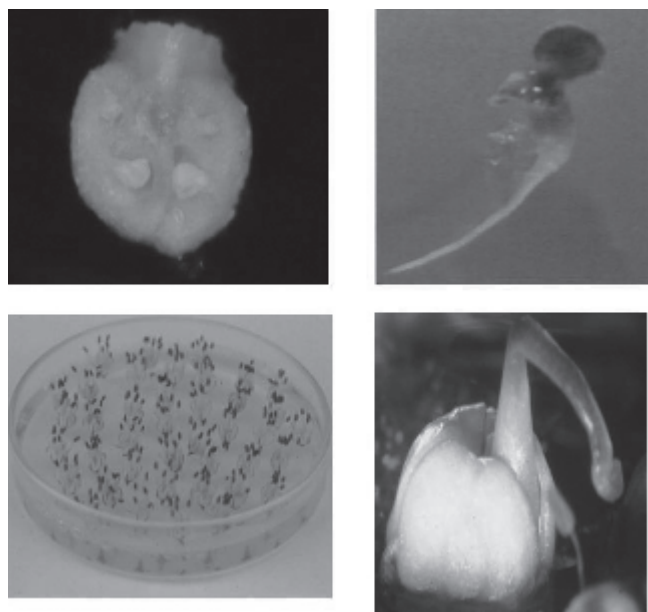


Fig. 2 - In alto: sezione di ovario di melone ed embrione ginogenetico ottenuto da coltura *in vitro*; in basso: coltura *in vitro* di fiori di cipolla ed embrione ginogenetico.

Fig. 2 - Upper part: ovary slide of melon and gynogenetic embryo obtained from *in vitro* culture; bottom part: flower culture of onion and gynogenetic embryo.

- la dose migliore di radiazione è 0,6 KGy ottenuta con Cobalto 60;
- la produzione media di embrioni aploidi è di 0,3% con un intervallo compreso tra 0,4 e 0,1 in funzione del genotipo;
- le piante aploidi sono sterili, ma tendono spontaneamente a raddoppiare il numero di cromosomi, diventando facilmente diplo-aploidi fertili.

Un netto aumento della produzione di aploidi di melone è stato conseguito presso CRA-ORA attraverso la coltura *in vitro* di sezioni di ovari (Ficcadenti *et al.*, 1999). Ovari di boccioli fiorali ermafroditi sono stati espianati da: la linea inbred 7-82 di *C. melo reticulatus*, le due varietà Purceddu e Giallo Paceco di *C. melo inodorus* e due ibridi F₁ ottenuti dall'incrocio tra le due varietà e la linea inbred. Ciascun ovario lungo circa 10-12 mm, opportunamente sterilizzato, è stato sezionato orizzontalmente e le 7-9 sezioni ottenute, coltivate *in vitro* su un substrato di base MS con 0,09 µM di T-diazuron, un derivato dell'urea con effetto simile alla BAP. Dopo quattro giorni di coltura gli espianati sono stati trasferiti sul substrato di base MS con 0,27 µM di ANA e 0,88 µM di BAP, dove piante aploidi sono state ottenute in 4-6 settimane, con una resa media variabile da 8 a 25 per 100 ovari, in funzione del genotipo. La praticità e la buona produzione di aploidi hanno facilitato l'applicazione del metodo sopradescritto durante l'ultimo decennio, permettendo di ottenere linee omozigoti dotate di caratteristiche

migliorative per resistenza alle malattie e per qualità del frutto (Ficcadenti *et al.*, 2010).

Anemone (*Anemone coronaria* L.)

Il genere *Anemone* (*Ranunculaceae*) presenta numerose specie ornamentali, tra cui in Italia prevale *A. coronaria*, coltivata per la produzione di fiori recisi. Questa specie è tipicamente allogama e le progenie derivate da autofecondazione mostrano elevata depressione fenotipica, oltre a sterilità (Horovitz, 1991). Inoltre, la moltiplicazione *in vitro* di piante selezionate per produzione e qualità del fiore, non è economicamente conveniente (Ruffoni *et al.*, 2005). Pertanto le varietà di anemone attualmente disponibili sono moltiplicate per seme derivato dall'interincrocio di pochi individui eterozigoti che danno origine a progenie non omogenee.

La prima efficace tecnica di coltura *in vitro* di antere è stata riportata da Joansson e Eriksson (1977) per varie specie di spontanee. Più recentemente presso CRA - Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali di Sanremo (Imperia) Laura *et al.* (2006) hanno condotto estese ricerche riguardanti la specie coltivata *A. coronaria*. Antere di diverse varietà sono state coltivate su due substrati sovrapposti: quello basale di Nitsch e Nitsch (1969) con 10 g/l di carbone attivo e 8 g/l di agar e quello sovrastante identico al primo, ma senza carbone attivo ed agar. In un primo esperimento il confronto è avvenuto tra presenza ed assenza di 0,1 mg/l di IAA utilizzando antere raccolte in modo indistinto tra piante di ciascuna varietà; nel secondo esperimento, eliminando l'IAA da entrambi i substrati, sono state prese in considerazione piante singole di ciascuna varietà. I risultati possono essere riassunti come segue:

- nessuna proliferazione di tessuto somatico è stata osservata per tutte le tesi a confronto;
- gli embrioni sono diventati visibili tra 12 e 23 settimane dopo l'avvio della coltura *in vitro*;
- la presenza di IAA ha influito in modo positivo o negativo sul processo di androgenesi, in funzione della varietà, con una produzione di piante compresa tra 17 e 0,2% di antere coltivate;
- in assenza di IAA le piante androgenetiche ottenute hanno mostrato una migliore capacità di crescita *in vitro* e di adattamento alla serra;
- il numero di cromosomi nelle cellule in metafase è variato da 8 (aploide) a 32 (tetraploide);
- le analisi genetico-molecolari utilizzando marcatori RAPD hanno confermato l'origine androgenetica di tutte le piante ottenute.

Anche se preliminari, questi risultati dimostrano la

possibilità di ottenere linee diplo-aploidi o tetraploidi da utilizzare per la costituzione di veri ibridi F_1 molto uniformi ed innovativi per forma e colore del fiore. Opportuni aggiustamenti dei substrati di coltura potrebbero essere strategici per ottenere piante androgenetiche anche in altre ranunculacee ornamentali.

Conclusioni

Le ricerche finora condotte per ottenere individui diplo-aploidi attraverso androgenesi e ginogenesi *in vitro* hanno riguardato principalmente la composizione dei substrati di coltura, i trattamenti termici prima o dopo la messa in coltura e le condizioni colturali delle piante donatrici di gametofiti. Permangono problemi derivanti dalla forte dipendenza del genotipo sulla produzione di aploidi e dalla mancanza di adeguati protocolli per tutte le specie frutticole, oltre moltissime orticole (es. pomodoro, carciofo, finocchio) e floricole di rilevante interesse economico per l'Italia. L'affinamento della composizione dei substrati di coltura permetterà di aumentare la produzione di aploidi nelle specie già note e forse di ottenerne anche in quelle finora recalcitranti. Più decisi miglioramenti potrebbero derivare dagli studi sulla microspora od ovulo nel momento in cui è indotta a divisioni mitotiche seguite dallo sviluppo di un embrione aploide o diplo-aploide. Il sequenziamento dell'intero genoma, ormai praticabile a costi relativamente bassi, potrebbe permettere l'identificazione dei geni o sequenze coinvolti nell'induzione dei processi di andro-ginogenesi e nelle successive fasi di sviluppo *in vitro*.

La caratterizzazione di tali geni, il loro studio in sistemi eterologhi e la comprensione delle funzioni proteiche ad essi associate potrebbe dare un grosso contributo alla ottimizzazione dei substrati utilizzati per la coltura.

Riassunto

Gli individui aploidi presentano una sola copia di cromosomi di una cellula sessuale femminile (ginogenetici) o maschile (androgenetici). I diplo-aploidi, derivati dal raddoppiamento dei cromosomi possono diventare nuove varietà di specie autogame od a moltiplicazione vegetativa, oppure essere utilizzati come parentali di ibridi. Presso istituzioni pubbliche italiane impegnate in ricerche nei comparti orticolo e floricolo i genotipi diplo-aploidi hanno trovato applicazione per il miglioramento genetico di: asparago, cipolla, melanzana, peperone, melone, anemone. Inoltre in asparago e melanzana la coltura *in vitro* di antere di genotipi tetraploidi derivate da ibridazione interspeci-

fica, ha permesso di ottenere genotipi di-aploidi, utilizzati per introgredire nelle due specie nuovi geni di resistenza alle malattie e qualità del prodotto.

Parole chiave: Anemone, aploidia, Asparago, Cipolla, Melanzana, Melone, miglioramento genetico, Peperone.

Bibliografia

- BAJAI Y.P.S., 1990. Biotechnology in agriculture and Forestry. Vol 12: *Haploids in Crop Improvement*. Springer-Verlag, Berlin.
- BARCACCIA G., FALCINELLI M., 2006. Genetica e genomica. Vol. 3: *Genomica e biotecnologie genetiche*. Liguori, Napoli.
- BHOJWANI S.S., DANTU P.K., 2010. *Haploid plants*. In: Davey m., Anthony P. eds, *Plant Cell Culture*. Wiley-Blackwell, USA: 61-95.
- BLAKESLEE A.F., BELLING J., FARNHAM M.E., BERGNER A.D., 1922. *A haploid mutant in the Jimson weed, Datura stramonium*, Science 55: 646-647.
- BOURGIN J.P., NITSCH J.P., 1967. *Obtention de Nicotiana haploids à partir d'étamines cultivées in vitro*. Ann. Physiol. Veg. 9: 377-382.
- CAMPION B., AZZIMONTI M.T., 1988. *Evolution of ploidy level in haploid plants of onion (Allium cepa) obtained through in vitro gynogenesis*. In 4th EUCARPIA Allium Symposium Wellesbourne UK, September 6-9, 1988, pp 85-89.
- CAMPION B., AZZIMONTI M.T., VICINI E., SCHIAVI M., FALAVIGNA A., 1992. *Advances in haploid plant induction in onion (Allium cepa L.) through in vitro gynogenesis*. Plant Science 86: 97-104.
- CAMPION B., BOHANEC B., JAVORNIK B., 1995. *Gynogenic lines of onion (Allium cepa L.): evidence of their homozygosity*. Theor. Appl. Genet. 91: 598-602.
- CAMPION B., FALAVIGNA A., SORESSI G.P., SCHIAVI M., 1984. *Efforts for in vitro androgenesis in onion (Allium cepa L.)*. In 3rd EUCARPIA Allium Symposium Wageningen September 4-6 1984, p. 110.
- CHARLESWORTH D., CHARLESWORTH B. 1979. *The Evolutionary Genetics of Sexual Systems in Flowering Plants*. Proc. R. Soc. London B 205: 513-530.
- DAUNAY M.C., CHAPUT M.H., SIHACHAKR D., ALLOT M., VEDEL F., DUCREUX G., 1993. *Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (Solanum melongena L.) with Solanum aetiopicum L.* Theor Appl Genet 85: 841-850.
- DRIANOVSKA O.A., ILIEVA I.N., 1983. *In vitro anther and ovule culture in musk melon (Cucumis melo L.)*. C. R. Acad. Bulgare Sci, 36 (8): 1107-1110.
- DUMAS DE VAULX, R., 1979. *Obtention de plantes aploides chez le melon (Cucumis melo L.) après pollinisation par Cucumis ficifolius*. C.R. Acad. Sci. Paris, 289: 875-878.
- FALAVIGNA A., 1976 - *Miglioramento genetico dell'Asparago di Altedo (cv. Precoce d'Argenteuil)*. Conoscere per Produrre, 3 (10): 25-28.
- FALAVIGNA A., 2002. *Practical aspects of a breeding program of asparagus based on in vitro anther culture*. Acta Horticulturæ, 589: 201-210.
- FALAVIGNA A., S. PORCELLI, 1986. *Asparago: nuove tecniche e varietà adatte per risalire la china*. Giornale di Agricoltura, 96: 41-45.
- FALAVIGNA A., P. ALBERTI, P.E. CASALI, L. TOPPINO, G. MENNELLA, W. HUAISONG, 2008. *Interspecific hybridization for Asparagus Breeding in Italy*. Acta Hort, 776: 291-297.
- FALAVIGNA A., P.E. CASALI, P. ALBERTI, 2008. *Performance of Asparagus genotypes in Fusarium-Infested and uninfested Soil*. Acta Hort, 776: 161-166.

- FALAVIGNA A., P.E. CASALI, R. PEDRETTI, 2008. *Gli ibridi più produttivi e tolleranti il Fusarium*. L'Inf. Agrario, 64 (3): 45-49.
- FICCADENTI N., VERONESE P., SESTILI S., CRINÒ P., LUCRETTI S., SCHIAVI M., FACCARDO F., 1995. *Influence of genotype on the induction of haploidy in Cucumis melo L. by using irradiated pollen*. J. Genet. & Breed., 49: 359-364.
- FICCADENTI N., SESTILI S., ANNIBALI S., DI MARCO M., SCHIAVI M., 1999. *In vitro gynogenesis to induce haploid plants in melon Cucumis melo L.*
- FICCADENTI N., GIARDINI, A.; SESTILI, S.; LO SCALZO, R.; GUARINO, L.; PALERMO, M. L.; TUMBARELLO, B.; MONTELEONE, G.; BONO, M.; BONGIOVI, C., 2010. *Varietà migliorate e nuovi ibridi rilanciano il melone d'inverno*. L'Inf. Agrario 66 (9): 59-66.
- FRANCESCHETTI U., AND LEPORI G., 1985. *Impollinazione naturale incrociata nella melanzana*. Sementi Elette 31 (6): 25-28.
- FRANKEN A.A. (1970). *Sex characteristics and inheritance of sex in asparagus (Asparagus officinalis L.)*. Euphytica 19: 277-287.
- GUHA S., MAHESWARI S.C., 1964. *In vitro production of embryos from anther of Datura*. Nature 204: 497.
- HASSANDOKHT M.R., B. CAMPION, 2002. *Low temperature, medium and genotype effect on the gynogenic ability of onion (Allium cepa L.) flowers cultured in vitro*. Advances in Horticultural Science, 16 (2): 72-78.
- HOROVITZ A., 1991. *The pollination syndrome of Anemone coronaria L.; an insect-biased mutualism*. Acta Hort. 288: 283-287.
- ISOUARD, G., RAQUIN C., DEMARLY Y., 1979. *Obtention des plantes haploïdes et diploïdes par culture in vitro d'anthers d'aubergine (Solanum melongena L.)*. C. R. Acad. Sci. Paris Série D, 288: 987-989.
- JAIN S.M., SOPORY S.K., VEILLEUX, 1996. *In vitro haploid production in higher plants*. Kluwer Academic Publishers., London.
- JOANSSON L., ERIKSSON T., 1977. *Induced embryo formation in anther cultures of Anemone species*. Physiol. Palnt. 40:172-174.
- KELLER J., 1990. *Culture of unpollinated ovules, ovaries and flore buds in some species of the genus Allium and aploide induction via gynogenesis in onion (Allium cepa L.)*. Euphytica 47: 241-247.
- LAURA M., SAFAVERDI G., ALLAVENA A., 2006. *Androgenetic plants of Anemone coronaria derived through anther culture*. Plant Breeding 125: 629-634.
- MUREN R.C., 1989. *Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion*. HortScience 24: 833-834.
- NERVO G., CARANNANTE G., AZZIMONTI M.T., ROTINO G.L., 1995. *Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production*. In: Terzi M., Cella R., Falavigna A. Eds. Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, 155-160. Kluwer Academic Publishers.
- NERVO G., TAMIETTI G., SCHIAVI M., 1992 - *Individuazione di fonti di resistenza a Phytophthora capsici Leon e Verticillium dahliae Klebahn in Capsicum spp. e loro impiego in programmi di breeding*. XXXVI Convegno Annuale S.I.G.A., Metaponto (MT), 5-8 Ottobre 1992, pp 66-67.
- NITSCH J.P., NITSCH C., 1969. *Haploid plants from pollen grain*. Science 163:85-87.
- PELLETIER G., RAQUIN C., SIMON G., 1972. *La culture in vitro d'anthere d'Asperge (Asparagus officinalis L.)*. C. R. Acad. Sci., 274 (6): 848-851.
- QIAO Y.M., FALAVIGNA A., 1990. *An improved in vitro anther culture method for obtaining doubled-haploid clones of asparagus*. Acta Horticulturae, 271: 145-150.
- QIN X., ROTINO G.L., 1995. *Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 41: 145-149.
- RICCARDI P., CASALI P.E., MERCATI F., FALAVIGNA A., SUNSERI F., 2011. *Genetic characterization of asparagus doubled haploids collection and wild relatives*. Scientia Hort., 130: 691-700.
- RICK C.M., HANNA G.C. 1943. *Determination of Sex in Asparagus officinalis L.* Am. J. Botany, 30: 711-714.
- RIZZA, F., MENNELLA G., COLLONNIER C., SIHACHAKR D., KASHYAP V., RAJAM M.V., PRESTERÀ M., ROTINO G.L., 2002. *Androgenetic dihaploids from somatic hybrids between Solanum melongena and S. aethiopicum group gilo as a source of resistance to Fusarium oxysporum f.sp. melongenae*. Plant Cell Report 20: 1022-1032.
- ROTINO G.L., 1996 - *Haploidy in Eggplant*. In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. Eds., In vitro Haploid Production in Higher Plants., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 3: 115-141.
- ROTINO G.L., FALAVIGNA A., RESTAINO F., 1987. *Production of anther-derived plantlets of eggplant*. Capsicum Newsletter 6: 89-90.
- ROTINO G.L., PERRI E., A. D'ALESSANDRO, G. MENNELLA, 1998. *Characterization of fertile somatic hybrids between eggplant (S. melongena L.) and S. integrifolium poir*. In: Proc. Xth EUCARPIA Meeting on "Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant" Avignon (Francia) 7-11 Settembre 1998; pp 213-217.
- ROTINO G.L., SIHACHAKR D., RIZZA F., VALÈ G., TACCONI M.G., ALBERTI P., MENNELLA G., SABATINI E., TOPPINO L., D'ALESSANDRO A., ACCIARRI N., 2005. *Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (Solanum melongena L.) and its wild relatives*. Acta Physiologiae Plantarum, 27(4B): 723-733.
- ROY S.C., 1989. *Differentiation and anther culture of Allium cepa*. In: Proc. Int. Symp. Hortic. Gerplasm, Cultivated and wild. Part II. Vegetables, 1988, pp. 267-272. Acad Publ. Beijing.
- RUFFONI B., SEMERIA L., LAURA M., SAVONA M., BISIO A., 2005. *In vitro morphogenesis and micropropagation of Anemone coronaria L. hybrids*. Propagation of hornamental plants, 5: 74-77.
- SCHIAVI M., MENNELLA G., PERRONE D., 2010. *Cipolla*. In: Falavigna ed, Progetto di ricerca per potenziare la competitività di orticole in aree meridionali: 29
- TOPPINO L., MENNELLA G., RIZZA F., D'ALESSANDRO A., SIHACHAKR D., ROTINO G.L., 2008. *ISSR and isozyme characterization of androgenetic di-haploids reveals tetrasomic inheritance in tetraploid somatic hybrids between Solanum melongena and Solanum aethiopicum group Gilo*. Journal of Heredity 99 (1): 304-315.

La micropropagazione applicata al miglioramento genetico dell'asparago in Italia

Paolo Riccardi, Luisa Ferrari, Pier Emilio Casali e Agostino Falavigna*
CRA-ORL Unità di Ricerca per l'Orticoltura, Montanaso Lombardo (LO)

Micropropagation applied to asparagus breeding in Italy

Abstract. Cultivated asparagus (*Asparagus officinalis* L.) is a dioecious and perennial species, therefore conventional breeding methods cannot be applied and commercial hybrid seed can be obtained only if the parents of hybrids are cloned in vitro. In the frame of the asparagus breeding program carried out at CRA-Research Units for Vegetable Crops one-hundred-one doubled-haploid and five heterozygous clones were micropropagated either to replace the old plants grown in the field or to establish the fields for commercial hybrids seed production. Apex shoots 0.5-1.0 mm long, explanted from sterilized spears and cultured onto medium N. 85, started multiple shoots proliferation after 5 to 20 subcultures according to genotype. Multiple shoots joined at the basal part with a parenchyma-like tissue were rooted onto medium N. 102. Vancomicine (100 ppm) e cefotaxime (200 ppm) antibiotics in the media insured the complete absence of endogenous bacteria and mycoplasmas. The results obtained highlighted a strong genotype influence on shoots multiplication rate and rooting capability. No differences in micropropagation attitude were observed between male and female clones and between doubled haploid and heterozygous genotypes. By considering the whole in vitro culture process, asparagus genotypes could be grouped into two main categories (easily or hardly micropropagated), therefore the micropropagation aptitude might be controlled by a small set of genes.

Key words: *Asparagus officinalis*, in vitro culture, clones, hybrids, seed production.

Introduzione

L'asparago comune (*Asparagus officinalis* L.) è una specie dioica (piante unisessuate) e perenne, originaria dell'Europa Orientale (Luzný, 1979). La colti-

vazione dell'asparago in Italia è la più antica al mondo ed è descritta con molti dettagli da Catone intorno al 200 a.C. nel suo trattato *De agri cultura*.

La parte edule della pianta di asparago è un giovane germoglio, denominato turione, noto fin dall'antichità per le virtù salutistiche, tanto che il celebre naturalista svedese Linneo (1707-1778) pose alla specie la denominazione *officinalis*. La presenza di composti funzionali nei turioni di asparago è bene documentata nella letteratura scientifica internazionale (Chin *et al.*, 2008).

La coltura di asparago è naturalmente adatta alle aree climatiche caratterizzate da anni con quattro stagioni ben distinte. Il ciclo annuale inizia in primavera con la raccolta dei turioni, prosegue con lo sviluppo della vegetazione estiva che diventa senescente in autunno e termina con il riposo invernale. Il periodo produttivo della coltura inizia circa due anni dopo l'impianto e si protrae per 10-12 anni.

Negli ultimi decenni la disponibilità di ibridi privi di esigenze in freddo ha permesso di espandere la coltivazione anche a paesi con clima caldo (es. costa atlantica del Perù), dove la sospensione dell'irrigazione e il suo ripristino inducono la pianta rispettivamente alla dormienza ed al risveglio vegetativo, consentendo di programmare la produzione di turioni durante l'intero anno.

Complessivamente nel mondo sono coltivati ad asparago 184.700 ettari che forniscono una produzione di 1,47 milioni di tonnellate. In Europa l'Italia, con 6.590 ha e 45.200 t, occupa il terzo posto in termini di produzione complessiva, dopo Germania (16.700 ha, 72.500 t) e Spagna (12.000 ha, 47.600 t), ma è in prima posizione per quella unitaria che è di 6,86 t/ha (Falavigna, 2011).

I primi ibridi di asparago, derivati dalla combinazione di quattro piante eterozigoti, furono diffusi in Francia verso la metà degli anni '60 del secolo scorso, ma l'elevata variabilità fenotipica tra le piante ed il basso livello di eterosi furono le principali cause del loro rapido abbandono. Un deciso miglioramento in termini di produzione unitaria e di qualità del prodotto è stato possibile fin dal decennio successivo introdu-

* agostino.falavigna@entecra.it

cendo in coltura ibridi ottenuti derivati dalla combinazione di due parentali (uno femminile e l'altro maschile), i quali devono essere clonati attraverso coltura in vitro ai fini della produzione di seme su larga scala (Thévenin e Doré, 1976).

L'elevato interesse della micropropagazione dell'asparago, ha determinato lo sviluppo di numerosi metodi, i principali dei quali sono riportati di seguito.

- Taleaggio di frammenti di steli (Loo, 1946; Galston, 1948; Gorter, 1965; Andreassen e Ellison, 1967; Aynsley, 1973).
- Induzione di callo, a partire da porzioni di stelo o da cladofilli e formazione di embrioni (Reuther, 1990; 1996).
- Coltura di meristemi prelevati da turioni o da gemme sotterranee (Murashige *et al.*, 1972; Rivière e Muller, 1974; Doré, 1975).
- Microtaleaggio in vitro (Doré, 1988).
- Coltura di cellule isolate (Jullien, 1974).
- Coltura di protoplasti (Levi e Sink, 1990; Dan e Stephens, 1991).
- Proliferazione di germogli multipli avventizi a partire da apici di turioni (Yang e Clore, 1973; 1974; Chin, 1982; Adler *et al.*, 1985).

Tutte le tecniche che prevedono l'induzione di callo e successiva rigenerazione di piante non hanno trovato pratica applicazione a causa dell'elevata incidenza di variazioni del livello di ploidia. I principali limiti della coltura di meristemi sono da mettere in relazione alla laboriosità del metodo (prelevamento di tanti meristemi quante sono le piante da ottenere) ed alla difficoltà di adattamento delle piantine alle condizioni di serra. L'ottenimento di piante da microtalee di steli generati *in vitro* richiede tempi molto lunghi, specie per la radicazione. Sulla base dei risultati riportati in letteratura, la tecnica che consiste nell'induzione, moltiplicazione e radicazione dei germogli avventizi multipli è stata ritenuta la più efficiente e sicura per la mancata induzione di variazioni somaclonali.

Materiali e metodi

I genotipi (cloni) di asparago sottoposti a micropropagazione sono stati: 101 diplo-aploidi femminili o maschili e 5 eterozigoti femminili, che fanno parte dell'ampia collezione ottenuta presso CRA-ORL ed utilizzata per la produzione di ibridi F1 interamente maschili. I cloni eterozigoti sono stati selezionati in varietà locali italiane; mentre quelli diplo-aploidi sono derivati da coltura in vitro di antere prelevate da piante maschili di diversa origine (Riccardi *et al.*, 2011). L'attività di micropropagazione è stata finalizzata a:

- ottenere circa 50 piante di tutti i cloni per la sosti-

tuzione delle rispettive vecchie piante in pieno campo, oppure per il loro rilascio a ditte seminatrici ai fini del miglioramento genetico;

- ottenere 500 - 1.000 piante dei cloni parentali degli ibridi maschili, costituiti presso CRA-ORL, per allestire i campi destinati alla produzione di seme su scala commerciale.

Tutte le colture in vitro sono state mantenute a temperatura costante di 23±1 °C, fotoperiodo di 16 ore e intensità luminosa di circa 1.500 lux ottenuta con lampade tipo GRO-lux (analoghe a quelle utilizzate per illuminare gli acquari). La tecnica utilizzata, descritta per la prima volta da Yang e Clore (1973) e modificata da Chin (1982) consiste nell'induzione, proliferazione e radicazione di germogli avventizi, partendo da apici vegetativi prelevati dai turioni. Il tipo e la concentrazione delle sostanze di crescita sono state modificate per migliorare la micropropagabilità dei genotipi utilizzati. Allo scopo di prevenire le contaminazioni causate da batteri e micoplasmi, a tutti i substrati di coltura sono stati aggiunti 200 mg/l di cefotaxime e 100 mg/l di vancomicina preventivamente sterilizzati attraverso micro-filtrazione. L'aggiunta è avvenuta quando il substrato era ad una temperatura intorno ai 50 °C.

Induzione e proliferazione dei germogli avventizi

I turioni con punta ben chiusa sono stati sterilizzati attraverso immersione per circa 15' in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% di cloro attivo, seguita da tre risciacqui in acqua sterile demineralizzata. Gli apici vegetativi di lunghezza variabile da 0,5 a 2 mm, situati sotto le brattee, sono stati collocati in contenitori di plastica modello 'Magenta' a forma cubica e lato di cm 6,5, contenente circa 20 ml di substrato n 85 (tab. 1). L'obiettivo perseguito attraverso le prime subcolture, avvenute con cadenza di circa 20 giorni, è stato quello di sostituire progressivamente i tessuti dell'espianto originale con nuovi germogli avventizi. A tale riguardo ad ogni subcoltura ciascun germoglio multiplo è stato ridotto ad una lunghezza di circa 2 cm e diviso verticalmente in 3-5 porzioni, formate da alcune micro-gemme unite alla base da un tessuto parenchimatico vascolarizzato, simile a quello del rizoma della pianta. Inoltre particolare attenzione è stata adottata per asportare completamente l'eventuale tessuto non differenziato (callo) che è un forte competitor nel confronto dei germogli avventizi.

I germogli multipli bene adattati alla coltura *in vitro* hanno rappresentato il materiale di partenza per la successiva fase di moltiplicazione su più larga scala; il periodo ottimale tra una subcoltura e l'altra è stato di 25-30.

Tab. 1 - Composizione dei substrati utilizzati per la micropropagazione dell'asparago.

Tab. 1 - Composition of media utilized for *Asparagus* micropropagation.

Costituenti	Substrati	
	N 85	N. 102
Macro e micro elementi di M S	Concentrazione piena	
Pantotenato di calcio, Piridossina, Tamina, Acido nicotinico, Glicina	1 mg/l	1 mg/l
Biotina	0,01 mg/l	0,01 mg/l
BAP	0,2 mg/l	0,1 mg/l
Ancymidol	0,1 mg/l	0,5 mg/l
NAA	0,2 mg/l	0,2 mg/l
Kinetina	0,1 mg/l	0,1 mg/l
Inositolo	100 mg/l	100 mg/l
Saccarosio	30 g/l	60 g/l
Carbone attivo (solo per allungamento radici nei tubi)	-	500 mg/l
Agar purificato per batteriologia	7 g/l (0,7%)	7 g/l (0,7%)
pH	6	6

Radicazione dei germogli avventizi ed adattamento in serra delle piante

I germogli multipli in fase di attivo accrescimento sono stati trasferiti sul substrato di radicazione N. 102 (tab. 1). Quando le radici hanno raggiunto una lunghezza di circa 2 cm, il germoglio è stato suddiviso verticalmente in modo da ottenere plantule dotate di uno o pochi steli collegati ad una sola radice attraverso una minima parte di tessuto parenchimatico. Le plantule così ottenute sono state trasferite in gruppi di tre in tubi di vetro temperato lunghi 200 mm e diametro di 20 mm, contenente circa 15 ml di substrato 102 addizionato di 500 mg/l di carbone attivo. Ogni 30-50 giorni i germogli multipli non radicati sono stati ritrasferiti per tre volte al massimo, sullo stesso substrato.

L'ambientamento in serra delle piantine derivate da micropropagazione è avvenuto con un fotoperiodo di almeno 14 ore ed intensità luminosa moderata. Ciascuna piantina è stata collocata in un vasetto 7x7 cm di lato, contenente terriccio molto leggero e permeabile. La temperatura del terriccio è stata mantenuta costantemente a 24 °C attraverso riscaldamento basale, mentre quella dell'ambiente ambiente è variata da 18 a 25 °C. Durante le prime due settimane di permanenza in serra le piantine sono state coperte con film plastico al fine di evitare la disidratazione della debole e scarsa vegetazione.

Risultati

Tra i genotipi di asparago sono state notate forti differenze riguardo l'attitudine alla micropropagazio-

ne, ma nessuno di essi è apparso totalmente recalcitrante. Mentre tutti i parentali degli ibridi commerciali sono stati clonati secondo il programma previsto, per circa il 10% dei cloni diplo-aploidi non è stato finora possibile ottenere il numero di piante richiesto.

Di seguito sono riassunti i principali risultati delle ricerche riguardanti la fase di moltiplicazione dei germogli, ottenuti a seguito di un costante confronto tra substrati contenenti diverse concentrazioni e tipo di sostanze di crescita, utilizzando i genotipi di interesse per il progetto.

- La presenza di 0,1 p.p.m. di ancymidol, noto per contrastare la sintesi di gibberelline, ha impedito l'eccessivo sviluppo dei microsteli in altezza e contemporaneamente ridotto la proliferazione di callo.
- La riduzione della Kinetina (K) da 0,2 ppm a 0,1 ppm e la contemporanea aggiunta di 0,2 ppm di 6-Benzyl-adenina (BAP), ha favorito la differenziazione del tessuto parenchimatico alla base dei germogli multipli, tanto importante nella successiva fase di radicazione. Concentrazioni di BAP superiori a 0,2 ppm hanno permesso di aumentare il numero di steli differenziati, ma indotto una parziale loro vetrificazione e rallentato notevolmente il tempo richiesto per la radicazione sul substrato N.102.
- Per i genotipi a bassa capacità moltiplicativa, la sostituzione di 0,2 ppm di (BAP) con 2-5 ppm di 2-isopentenil-adenina (2-ip) ha permesso di migliorare la differenziazione del tessuto parenchimatico alla base dei germogli multipli e di conseguenza di aumentarne il ritmo di moltiplicazione, ma ha ritardato notevolmente la successiva fase di radicazione.

Il numero di subcolture necessarie per avviare la proliferazione dei germogli avventizi è variato da 5-7 (3-5 mesi) per i genotipi più rispondenti ed oltre 20 (circa 12 mesi) per quelli più recalcitranti. Ad ogni subcoltura il tasso di moltiplicazione dei germogli avventizi è oscillato da oltre 6 a 1,5 (tab. 2). Per tutti i genotipi sottoposti a clonazione *in vitro* è stata osservata una stretta relazione positiva tra il tempo richiesto per avviare la proliferazione dei germogli avventizi ed il ritmo di moltiplicazione degli stessi (fig. 1). La costante presenza del tessuto parenchimatico alla base dei germogli multipli e la bassa produzione di callo indifferenziato sono stati gli indici più significativi riguardanti la corretta applicazione del protocollo di micropropagazione; inoltre l'abilità dell'operatore tecnica ha giocato un ruolo determinante a tale riguardo.

La presenza di 0,5 mg/l di ancymidol sul substrato N. 102 ha indotto il totale arresto dei germogli multi-

Tab. 2 - Risposta dei cloni di asparago alle diverse fasi della micropropagazione.

Tab. 2 - Response of asparagus clones to different micropropagation phases.

Fasi	Alta	Media	Bassa
Subcolture necessarie per ottenere i primi germogli multipli (N.)	5-7	8-10	11-20
Ritmo di moltiplicazione dei germogli ad ogni subcoltura (N.)	>6	5-3	1,5-2
Germogli radicati dopo tre subcolture su substrato 102 (%)	>80	80-20	3-18
Sopravvivenza delle piante in serra (%)	>95	>95	>95

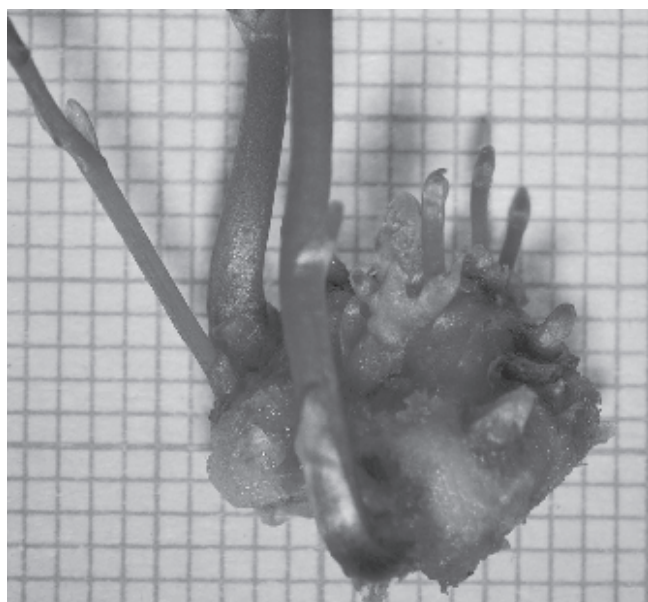


Fig. 1 - Adventitious shoots joined at bottom part by a parenchyma tissue similar to that of an *in vivo* plant rhizome.

pli che hanno assunto una colorazione decisamente antocianina. L'emissione di una o più radici dal parenchima basale dei germogli è iniziata dopo circa 30 giorni di coltura (fig. 2). La percentuale di germogli con una o più radici differenziate dopo tre subcolture è variata da oltre ottanta a circa tre, rispettivamente per i genotipi più e meno rispondenti (tab. 2). La presenza nel substrato 102 di carbone attivo alla concentrazione di 500 p.p.m. ha permesso di aumentare lo sviluppo dell'apparato radicale delle piantine. In 2-3 mesi di permanenza nei tubi le piantine di asparago hanno completato il loro sviluppo differenziando un vero micro-rizoma con micro-gemme e steli. Recenti esperienze hanno dimostrato che la conservazione delle piantine in tali condizioni può superare 1,5 anni. Indipendentemente dal periodo di permanenza nei tubi, la sopravvivenza delle piantine alle condizioni di serra è stata superiore a 95%.

Considerando insieme le diverse fasi della coltura *in vitro*, dei 106 cloni di asparago utilizzati, 51, 10 e



Fig. 2 - Multiple adventitious shoot, rooted after 30 days of culture on 102 medium.

Fig. 2 - Multiple adventitious shoot, rooted after 30 days of culture on 102 medium.

45 hanno mostrato un'attitudine alla micropropagazione rispettivamente alta, media e bassa; inoltre nessuna differenza è stata riscontrata tra i cloni femminili e maschili (tab. 3). La maggior frequenza di cloni nelle due classi estreme e la possibile ripartizione in esse di quelli con attitudine media, fanno ritenere che i cloni di asparago possano essere distinti in facilmente e difficilmente propagabili e che il relativo sistema genetico sia controllato da pochi geni.

L'esperienza finora acquisita permette di indicare che per impostare correttamente un campo destinato alla produzione commerciale di seme ibrido di asparago, è necessario disporre di un congruo stock di germogli avventizi in attiva proliferazione, allo scopo di

Tab. 3 - Numero di cloni con diversa attitudine alla micropropagazione.

Tab. 3 - Number of clones with different micropropagation capability.

Micropropagabilità	Alta	Media	Bassa	Totale
Cloni femminili	33	5	26	64
Cloni maschili	18	5	19	42
Totale	51	10	45	106

evitare la lunga fase di adattamento dei tessuti alla coltura *in vitro*. La conoscenza della micropropagabilità e della capacità rizogena (alta, media, bassa) di entrambi i parentali dell'ibrido è indispensabile per valutare il tempo necessario per ottenere il numero di germogli multipli da sottoporre a radicazione ed il momento in cui trasferire i germogli sul substrato di radicazione. Tale programmazione appare indispensabile tenuto presente che:

- il momento ottimale per trasferire le piantine dal vitro alla serra è la fine di febbraio;
- un buon adattamento richiede circa 3 mesi;
- è molto opportuno allestire il campo di produzione seme non dopo la fine di maggio, allo scopo di limitare lo stress da trapianto e per predisporre le piante al riposo invernale in condizioni fisiologiche ottimali;
- le piante di asparago mal sopportano la coltivazione in vaso in quanto le grosse radici di riserva si attorcigliano attorno al vaso e perciò incontrano maggiori difficoltà nell'espandersi in profondità nel terreno;
- il rapporto ottimale tra le piante del clone parentale femminile e quelle del clone maschile è di 3 a 1 circa;

Nella tabella 4 è riportato il numero di piante micropropagate, utilizzate tra gli anni 2000 e 2008 per allestire i campi destinati alla produzione commerciale di seme dei sette ibridi maschili costituiti presso CRA-ORL. Nel 2011 sono stati prodotti circa 6,5 milioni di semi, con una media di circa 1.400 per ogni pianta femminile. Le osservazioni finora condotte direttamente sulle piante derivate da micropropagazione e sugli ibridi F1 da esse derivati, hanno permesso di escludere la manifestazione di variazioni somaclonali sia epigenetiche che genetiche dominanti.

Tab. 4 - Ibridi interamente maschili di asparago costituiti presso CRA-ORL con relativo numero di piante dei due cloni parentali ottenute attraverso micropropagazione.

Tab. 4 - *Asparagus all-male hybrids obtained by CRA-ORL with respective number of plants obtained by micropropagation.*

Ibrido	N. piante per clone parentale		Anno di impianto	N. semi prodotti nel 2011 (x1000)
	♀	♂		
Eros	1.500	500	2000/2006	4.000
Ercole	300	150	2003	1.000
Franco	300	150	2003	800
Vittorio	200	100	2010	120
Giove	1.000	500	2009	280
Zeno (tunnel)	400	50	2004	100
Italo	800	300	2008	200
Totale	4.500	1.750	-	6.500

D'altra parte un'eventuale mutazione genetica recessiva, molto difficilmente potrebbe manifestarsi nella generazione F1, vista l'improbabilità che essa avvenga in entrambi i parentali.

Conclusioni

La micropropagazione dell'asparago ha finora trovato utile applicazione anche in Italia, per mantenere i genotipi utili ai programmi di miglioramento genetico e per l'allestimento dei campi destinati alla produzione commerciale di seme ibrido.

Per i genotipi di asparago meno rispondenti alla coltura *in vitro* è richiesto un ulteriore affinamento della tecnica con riferimento soprattutto al tipo e concentrazione delle sostanze di crescita.

Considerati gli attuali costi, è ancora lontana la disponibilità di una tecnica di micropropagazione in grado di rendere disponibili vitro-cloni da destinare direttamente alla coltivazione.

Riassunto

L'asparago comune (*Asparagus officinalis* L.) è una specie dioica con un ciclo colturale di 10-12 anni. La coltivazione di ibridi è stata possibile solo quando efficienti tecniche di micropropagazione sono state applicate ai rispettivi parentali.

Cento-sei cloni diplo-aploidi ed eterozigoti sono stati sottoposti a moltiplicazione *in vitro* per rimpiazzare le vecchie piante e per allestire i campi destinati alla produzione su larga scala di seme di ibridi commerciali. La tecnica applicata consiste nella induzione, moltiplicazione e radicazione di germogli avventizi multipli. Una forte influenza del genotipo è stata notata in tutte le fasi di coltura *in vitro*. Considerando le diverse fasi della coltura *in vitro*, i cloni di asparago sono stati distinti in facilmente o difficilmente propagabili, presumibilmente con un controllo oligogenico del carattere.

Parole chiave: *Asparagus officinalis*, colture *in vitro*, cloni, ibridi, produzione seme.

Bibliografia

- ADLER P.R., DUFALOT R.J., WATERS L. Jr., 1985. *Ancymidol rates and application timing influence asparagus transplant growth*. HortSci. 20: 196-198.
- ANDREASSEN D., ELLISON J.H., 1967. *Root initiation of stem cuttings from mature Asparagus plants*. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 90: 169-162.
- AYNSLEY J.S., MARSTON M., 1975. *Aerial plantlet formation in Asparagus officinalis L.* Sci. Hort. 3(2): 149-155.
- CHIN C., 1982. *Promotion of shoot and root formation in*

- Asparagus in vitro* by ancymidol. HortSci. 17(4): 590-591.
- CHIN C., GARRISON S., 2008. *Functional Elements from Asparagus for human health*. Proc. 11th Int. Asparagus Symp., Acta Hort. 776: 219.
- DAN Y., STEPHENS C.T., 1991. *Studies of protoplast culture types and plant regeneration from callus-derived protoplast of Asparagus officinalis L. Lucullus 234*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 27:321-331.
- DORÉ C., 1975. *Utilization de la culture in vitro chez l'asperge cultivée*. Ph. D. thesis, Faculté Science d'Orsay, Orsay, France
- DORÉ C., 1988. *Nouveau regard sur le comportement de l'asperge (Asparagus officinalis L.) multipliée in vitro*. Agronomic, 8: 843-850.
- FALAVIGNA A., 2011. *Asparago: strategie per vincere sul mercato*. L'Inf. Agrario LXVI(6): 2-4.
- GALSTON A.W., 1948. *On the physiology of root initiation in excised Asparagus*. Stem Tip. Amer. J. Bot. 35: 281-7.
- GORTER C.J. 1965. *Vegetative propagation of Asparagus officinalis by cuttings*. J. Hortic. Sci. 40:177-179.
- JULLIEN M., 1974. *Culture in vitro of leaf tissue cells of Asparagus officinalis L. Development of strains with permanent embryogenesis and regeneration of whole plants*. Cr. Acad. Sci. Paris D 279: 747.
- LEVI A., SINK K.C., 1990. *Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus*. J. Plant Physiol. 137:184-189.
- LOO S.W., 1946. *Further experiments on the culture of excised asparagus tips in vitro*. Am. J. Bot. 33:156-159.
- LUŽNÝ J., 1979. *The history of asparagus as a vegetable, the tradition of its growing in Czechoslovakia (CSSR) and the prospect of its further propagation and breeding*. in: Proc. 5th Int. Asparagus Symp.: 82-86
- MURASHIGE T., SHABDE M.N., HASEGAWA P.M., TAKATORI F.H., JONES J.B., 1972. *Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 97:158-161.
- REUTHER G., 1990. *Biochemical studies with long term propagated Asparagus callus of different organogenic competence*. Acta Hort. 271: 91-101.
- REUTHER G., 1996. *Somatic embryogenesis in Asparagus suspension cultures*. Proc. 8th Int. Asparagus Symp., Acta Hort. 415: 215.
- RICCARDI P., CASALI P.E., MERCATI F., FALAVIGNA A., SUNSERI F., 2011. *Genetic characterization of asparagus doubled haploids collection and wild relatives*. Sci. Hort., 130: 691-700.
- RIVIERE S., MULLER J.F., 1974. *Resultats obtenus par la multiplication vegetative in vitro des bourgeons souterrains de l'Asparagus officinalis L.* C.r. Acad. Sci., Paris, D., 279: 899-902.
- THÉVENIN L., DORÉ C., 1976. *L'amélioration de l'asperge et son atout majeur, la culture in vitro*. Ann. Amélior. Plantes 26:655-674.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M., TAKAHASHI T., 1989. *Survival of cultured cells and somatic embryos of Asparagus officinalis cryopreserved by verification*. Plant Cell Reports 8:418-421.
- YANG H., CLORE W., 1973. *Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture*. HortSci. 8:141-143.
- YANG H., CLORE W., 1974. *Development of complete plantlets from moderately vigorous shoots of stock plants of asparagus in vitro*. HortSci. 9:138-140.

Mutation breeding in Petunia: ottimizzazione di parametri chiave, rigenerazione in vitro e screening di nuove varietà

Alma Balestrazzi^{1*}, Lorenzo Ventura², Armando Buttafava², Mattia Donà¹, Anca Macovei¹, Annalisa Giovannini³, Federica Nicoletti³, Raffaele Langella⁴ e Daniela Carbonera¹

¹ Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia

² Dipartimento di Chimica Generale, Università di Pavia

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

⁴ Albani Vincenzo e Ruggeri Italiana s.s.a., Civitavecchia (RO)

Mutation breeding in *Petunia*: optimization of key parameters, *in vitro* regeneration and screening of new varieties

Abstract. Ionizing radiation, a source of genetic variability, is used in association with *in vitro* regeneration to develop novel plant varieties with improved traits (*Mutation Breeding*). Protocols currently available need to be improved in order to increase mutation frequency and enhance commercial exploitation. Within this context, we have carried out an investigation aimed at obtaining optimised protocols based on gamma-ray-mutagenesis with the final goal of producing novel *Petunia x hybrida* varieties, starting from commercially relevant genotypes.

Key words: gamma ray, comet assay, ROS, *Petunia x hybrida*.

Introduzione

Gli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti sono correlati alla quantità di energia assorbita per unità di massa (dose) e, per una data dose, gli effetti biologici dipendono anche dalla velocità con cui l'energia viene somministrata (*dose rate*) (Shu, 2009). Gli effetti associati al parametro *dose rate* sono stati studiati nel sistema modello *Arabidopsis thaliana* da Kovalchuk *et al.* (2007). Questi autori hanno dimostrato che i geni coinvolti nel riparo del DNA e nella risposta antiossidante sono attivati in condizioni di elevata *dose rate* (*High Dose Rate*, HDR) mentre non si osservano alterazioni dei profili di espressione in risposta a bassa *dose rate* (*Low Dose Rate*, LDR). Tuttavia, le conoscenze attuali in questo settore risul-

tano ancora troppo limitate, in particolare per quanto riguarda i meccanismi molecolari e cellulari che mediano la risposta della pianta. In questo lavoro è stata analizzata la risposta alla radiazione gamma (γ), in funzione del parametro *dose rate*, in espianti di *Petunia x hybrida* costituiti da dischi fogliari indotti a rigenerare *in vitro*. Il genere *Petunia* comprende non solo varietà *elite* di elevato valore commerciale ma anche genotipi modello che possono essere utilizzati nell'ambito della ricerca di base e applicata (McKim e Hay, 2010). Per quanto riguarda gli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti, assistiamo ad una rinnovata attenzione nei confronti di queste problematiche dovuta alle implicazioni di tipo commerciale ad esse correlate. Il *breeding* basato sull'impiego di radiazioni ionizzanti richiede protocolli ottimizzati per aumentare l'efficienza di mutazione e di produzione di fenotipi d'interesse (Shu, 2009). Il Comet assay o *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) consente di misurare il danno al DNA in termini di rotture a singolo e doppio filamento (Collins, 2004). Questa metodica si applica per la valutazione degli effetti genotossici di sostanze chimiche, in studi di epidemiologia molecolare e ricerche di base sul danno al DNA e sui meccanismi di riparo (Collins *et al.*, 2004).

L'obiettivo di questo lavoro è stato valutare gli effetti della radiazione gamma su tessuti e cellule di *Petunia x hybrida* focalizzando l'attenzione sull'analisi della capacità di rigenerazione, la valutazione del danno indotto al DNA e le dinamiche di riparo.

Materiale e metodi

Il genotipo Ariel[®] di *Petunia x hybrida* è stato fornito dalla ditta Albani e Ruggeri s.s.a. (Civitavecchia, Roma). I dischi fogliari (0,5 x 0,5 cm) sono stati excisi da plantule cresciute *in vitro* e incubati in un terreno di coltura (5 dischi fogliari per piastra Petri) contenenti sali e vitamine MS (Murashige e Skoog 1962), sac-

* alma.balestrazzi@unipv.it

carosio 30 mg/l, agar 0,8 % e un pH di 5,7 per una settimana in camera climatizzata a 22-24 °C con fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e un flusso luminoso pari a 65-70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Una dose totale di radiazione γ pari a 25 e 50 Gy è stata somministrata agli espianti usando la bassa intensità (*Low Dose Rate*, LDR) di 0,29 Gy/min proveniente da una sorgente Cobalto⁶⁰. Gli espianti irraggiati ed i controlli non sottoposti ad irraggiamento sono stati quindi trasferiti sul terreno di rigenerazione composto da sali e vitamine MS (Murashige e Skoog 1962), benzil-adenina (BA) 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, acido naftalene acetico (NAA) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, saccarosio 30 g/l, agar 0,8 %, un pH di 5,7 e incubati in camera climatizzata come precedentemente descritto. Sono stati effettuati due esperimenti indipendenti. In ogni esperimento sono state analizzate tre ripetizioni per ciascun trattamento (irraggiato con 25 e 50 Gy e non irraggiato) per ciascun tempo (0, 2, 4, 6 e 24 h). Per il *Comet assay* si è proceduto ad estrarre i nuclei dagli espianti di *Petunia x hybrida* come descritto da Gichner *et al.* (2000). La sospensione contenente i nuclei è stata miscelata in ugual volume con una soluzione di agarosio (1 % in tampone fosfato) e depositata sulla superficie di vetrini ricoperta di agarosio. I vetrini sono stati incubati 20 min a temperatura ambiente in tampone di lisi (2.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM EDTA) e poi sottoposti ad elettroforesi in tampone alcalino (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH pH > 13) per 20 min a 0,72 V/cm a 4 °C. Al termine, i vetrini sono stati lavati con 0.4 M Tris-HCl pH 7,5 e con etanolo 70 % (v/v) e asciugati per una notte a temperatura ambiente. I vetrini sono stati colorati con 20 μl di DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Per ciascun vetrino sono stati analizzati 100 nuclei utilizzando un microscopio a fluorescenza e i risultati espressi in unità arbitrarie (u. a.).

Risultati e discussione

Effetti della radiazione sulla capacità di rigenerazione

Nel caso degli espianti non trattati, la proliferazione cellulare così indotta ha determinato la comparsa di calli sui margini esterni degli espianti da cui successivamente sono stati ottenuti germogli, con una frequenza di rigenerazione prossima al 90%. Inoltre è stato osservato un numero di germogli per espianto compreso tra 8 e 15, con germogli di lunghezza variabile (0,5-1,0 cm). Quando gli espianti sono stati trattati con una dose di 25 Gy, l'efficienza di rigenerazione si è ridotta significativamente (45%). È stato possibile tuttavia rigenerare linee mutagenizzate che sono state ulteriormente propagate *in vitro* (fig. 1). La

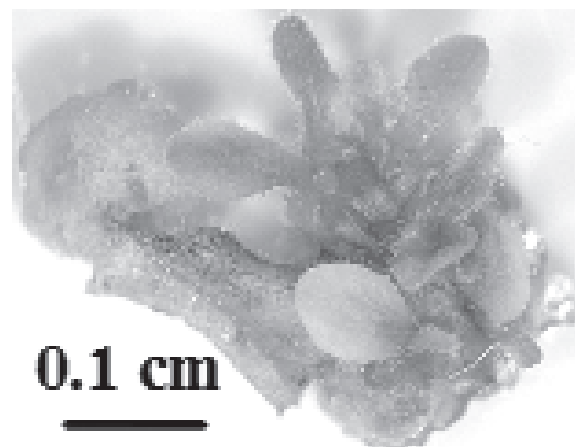


Fig. 1 - Rigenerazione di germogli da un espianto fogliare di *Petunia x hybrida* sottoposto ad irraggiamento.
Fig. 1 - *Regeneration of buds from explant of Petunia x hybrida* after gamma-ray radiation.

dose più elevata di radiazione (50 Gy) ha ulteriormente compromesso la capacità di rigenerazione che si è ridotta a valori del 10-12 %. In questo caso è stato possibile rigenerare *in vitro* solo un numero estremamente limitato di linee mutagenizzate con fenotipo anomalo. Queste linee non sono state in grado di sopravvivere.

Danno al DNA e capacità di riparo in risposta alla LDR

La versione alcalina del *Comet assay* o *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) è stata utilizzata per valutare il danno al DNA indotto da trattamenti con radiazione γ (dose totale 25 e 50 Gy) in condizioni LDR ed è stato misurato contemporaneamente il livello di rotture a singolo e doppio filamento (fig. 2). Gli effetti genotossici della radiazione γ sono stati monitorati a tempi successivi dal trattamento, allo scopo di costruire una cinetica della risposta di riparo. In cellule esposte a 25 Gy, il danno al DNA è 273 \pm 6 u.a. subito dopo il trattamento mentre si osserva una progressiva riduzione del danno solo a partire da 6 h. Al termine dell'esperimento (24 h) il livello di danno osservato nel campione irraggiato è tuttavia significativamente superiore rispetto al controllo non trattato. In cellule esposte a 50 Gy, il danno al DNA è risultato più elevato a 0 h (320 \pm 6 u.a.) con una evidente riduzione a 2 h (281 \pm 6 u.a.) e poi nei tempi successivi (fig. 2). I risultati ottenuti indicano differenze significative nel livello di danno al DNA indotto da 25 e 50 Gy, somministrati in condizioni LDR. Le cinetiche di riparo del DNA evidenziano risposte differenti a 2 h dal trattamento in cellule trattate con 25 e 50 Gy,

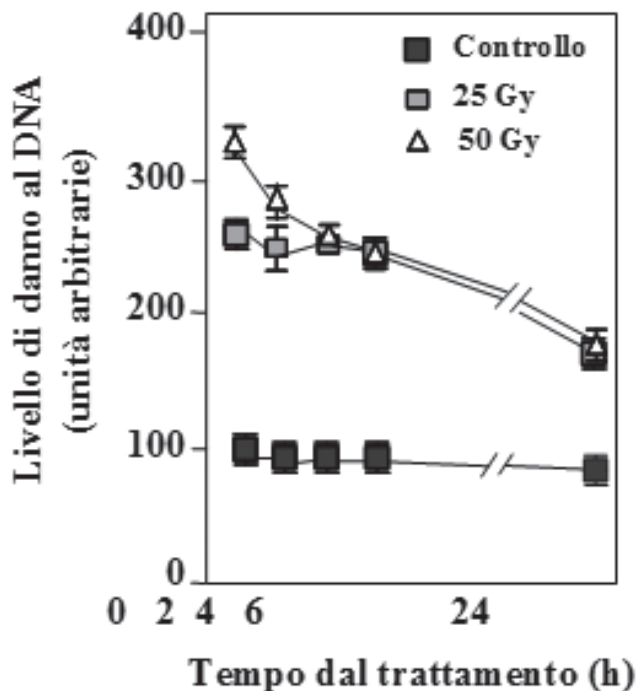


Fig. 2 - Risultati del SCGE o *Comet assay* effettuati a tempi diversi su espianti fogliari di *Petunia x hybrida* sottoposti a radiazione γ somministrata in condizioni LDR.

Fig. 2 - Results of *Comet assay* in different times on explants of *Petunia x hybrida* after gamma-ray radiation in LDR condition.

poichè all'aumentare della dose totale il riparo diventa più efficiente. E' possibile quindi ipotizzare l'esistenza di una correlazione positiva tra dose totale, livello di danno al DNA ed efficienza dei meccanismi di riparo attivati nel periodo di tempo immediatamente successivo all'irraggiamento.

Conclusioni

I risultati illustrati evidenziano la necessità di studi più approfonditi per l'ottimizzazione di alcuni parametri chiave del *Mutation Breeding*, in particolare per quanto riguarda le condizioni di irraggiamento ed i

possibili effetti citotossici. Le analisi effettuate su *Petunia x hybrida* hanno tuttavia consentito di definire valori di dose totale e *dose rate* che consentono di mantenere una adeguata capacità rigenerativa. Il saggio SCGE o *Comet assay* costituisce uno strumento rapido ed economico per valutare l'effetto genotossico dei trattamenti di mutagenesi su espianti fogliari di petunia.

Riassunto

Le radiazioni ionizzanti sono fonte di variabilità genetica ed in associazione con la rigenerazione *in vitro* sono utilizzate per sviluppare nuove varietà dotate di tratti d'interesse (*Mutation Breeding*). I protocolli attualmente disponibili necessitano un miglioramento per aumentare la frequenza di mutazione ed ampliarne le ricadute applicative. In questo contesto, è stato avviato uno studio per ottenere protocolli ottimizzati di mutagenesi con radiazione gamma allo scopo di produrre nuove varietà di *Petunia x hybrida* a partire da genotipi di interesse commerciale.

Parole chiave: raggi gamma, *comet assay*, ROS, *Petunia x hybrida*.

Bibliografia

- COLLINS A.R., 2004. *The comet assay for DNA damage and repair*. *Mol. Biotech.* 26: 249-261.
- GICHNER T., PTACEK O., STAVREVA D.A., WAGNER E.D., PLEWA M.J., 2000. *A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation*. *Mut. Res.* 470: 1-9.
- KOVALCHUK I., MOLINIER J., YAO Y., ARKHIPOV A., KOVALCHUK O., 2007. *Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation*. *Mut. Res.* 624: 101-113.
- MCKIM S., HAY A., 2010. *Patterning and evolution of floral structures-marking time*. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 20: 448-453.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant.* 15: 73-79.
- SHU H., 2009. *Induced Plant Mutations in the Genomic Era*. FAO (Roma): 425-427.

Embryo e Immature Seed Rescue a supporto del miglioramento genetico in Rosa hybrida

Matteo Caser¹, Annalisa Giovannini³, Fulvio Dente³, Gian Guido Ghione², Andrea Mansuino² e Valentina Scariot¹

¹Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università di Torino

²NIRP International, Az. Agricola di Ghione L. & Figli, Ventimiglia (IM)

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

In vitro Embryo and Immature Seed Rescue in support of genetic improvement in Rosa hybrida

Abstract. Breeding is a long process in the rose industry. Premature death of developing embryos due to incompatibility and delayed germination, caused by seed dormancy, are the main causes. *In vitro* techniques could be of help. Immature seed and embryo rescue may offer a valuable way to increase hybridization efficiency, introduce genotypes with interesting ornamental traits, and shorten time needed to obtain seedlings. In this study, *in vitro* embryo and immature seed rescue were carried out in *Rosa hybrida*. Seeds and embryos ethesed for 1, 2, 3 and 4 weeks after pollination (WAP) were sterilized and placed onto two germination media: MS and MS with 6-benzylaminopurine (BAP; 2.5 mg/L) and gibberellic acid 3 (GA₃; 0.5 mg/L). Four different conditions of light and temperature were applied. Preliminary data showed that only seeds harvested at 3 WAP germinated from 2 months of *in vitro* culture on. No effect of genotype and pre-treatment was highlighted while the medium MS added with phytohormones performed better than the mere MS.

Key words: breeding, seed dormancy, *in vitro* culture, plant growth regulators, rose.

Introduzione

Il miglioramento genetico in *Rosa* è un processo lungo e laborioso. In particolare, fattori limitanti per il successo dell'ibridazione sono l'aborto prematuro degli embrioni e la disomogeneità e bassa percentuale di germinazione dei semi (Gudin, 1994; Mohapatra e Rout, 2005). Tecniche di coltura *in vitro* possono essere utilizzate per superare questi limiti, aumentando così il numero di semenzali su cui effettuare la selezione (Gudin, 1994).

In rosa, la coltura *in vitro* di embrioni (Mohapatra e Rout, 2005) è stata condotta in passato principalmente su semi maturi, ovvero dopo 16 settimane dalla data di impollinazione (16 WAP) (Lammerts, 1946; Asen e Larsen, 1951), con risultati non soddisfacenti e, più recentemente, su semi immaturi a 3, 4, 5 e 6 WAP (Gudin *et al.*, 1990; Gudin 1994; Mohapatra e Rout, 2005). In particolare, Mohapatra e Rout (2005) hanno sviluppato un efficiente protocollo di coltura di embrioni in *R. floribunda* 'Arunima', che ha promosso lo sviluppo degli embrioni già dopo quattro settimane di coltura su substrato MS addizionato con regolatori di crescita e fotoperiodo 16h-8h. In *R. hybrida*, invece, Gudin *et al.* (1990) e Gudin (1994) hanno dimostrato che embrioni prelevati da semi immaturi, prima del raggiungimento dello stadio di torpedo, possono svilupparsi in forma incompleta e con basse percentuali di germinazione, ma che pretrattamenti con basse temperature possono promuovere lo sviluppo dell'embrione a 4 WAP, facendo ipotizzare la presenza di un'endodormienza fisiologica negli embrioni, nelle prime fasi di sviluppo, che ne ostacola la germinazione.

Conoscenze più approfondite sullo sviluppo dell'embrione durante le prime fasi successive all'impollinazione e sulla capacità germinativa di semi immaturi a 1, 2, 3 e 4 WAP appaiono quindi di particolare interesse ai fini di delucidare il ruolo dell'endodormienza in ibridi di rosa. Inoltre, la possibilità di far germinare embrioni a poche settimane dall'impollinazione potrebbe essere di notevole interesse per abbreviare i tempi di conservazione e germinazione dei semi e, quindi, di ottenimento dei semenzali che caratterizzano le attività di *breeding* in rosa.

Materiali e metodi

Materiale vegetale e piano sperimentale

Cinorrodi ottenuti da due incroci di *R. hybrida*, codice 1308 (cultivar 1599 X cultivar 7473) e codice 1324 (cultivar 1985 X cultivar 1848) sono stati raccolti a 1, 2, 3 e 4 settimane dopo l'impollinazione (WAP).

* valentina.scariot@unito.it

In particolare, la cultivar 1599 è nota per essere una pianta madre a bassa fertilità, mentre la 1985 ad alta fertilità; entrambe le piante impollinatrici (7473 e 1848) risultano essere invece ad alta fertilità (Pipino *et al.*, 2011). Le ibridazioni sono state condotte presso le strutture della NIRP International (Ventimiglia (IM), impiegando il loro materiale genetico.

I cinorrodi sono stati conservati a 4 °C per 7 giorni, quindi sono stati lavati con 1% (v/v) Tween 20, risciacquati in acqua per 30 minuti, sterilizzati con 1,8% di ipoclorito di sodio per 30 minuti e risciacquati tre volte con acqua distillata sterile. Dopo essere stati aperti in condizioni asettiche, i singoli semi immaturi a 1, 2, 3 e 4 WAP e gli embrioni a 1 e 2 WAP sono stati posizionati in coltura nei tubi De Wit con due substrati differenti:

- MS (Murashige e Skoog, 1962) macro e microelementi con saccarosio 30 g l⁻¹ e Phytigel 4 g l⁻¹ (MS) senza regolatori di crescita;
- MS con aggiunta di benzilaminopurina (BAP, 2,5 mg l⁻¹) e acido gibberellico (GA₃, 0,5 mg l⁻¹).

Sono state quindi valutate quattro differenti condizioni di fotoperiodo e temperatura:

- luce 24-h a 23 °C,
- luce 24-h a 4 °C,
- buio 24-h a 23 °C
- buio 24-h a 4 °C.

Dopo due settimane, tutti i semi sono stati mantenuti ad un fotoperiodo di 16-h, a 23 °C. I semenzali ottenuti sono stati quindi moltiplicati *in vitro* e successivamente acclimatati *in vivo* (fig. 1) presso le strutture del CRA-FSO a Sanremo (Imperia).

Analisi statistica

Con lo scopo di valutare la germinazione dei semi immaturi e degli embrioni, i dati rilevati sono stati soggetti al Between-Subjects Effects' Tests, utilizzando l'analisi non parametrica Tamhane test ANOVA mediante l'utilizzo del pacchetto statistico SPSS versione 16.0 (Chicago).

Risultati e discussione

Nel presente studio, gli embrioni e i semi prelevati a 1 e 2 WAP non si sono sviluppati, mentre solo i semi immaturi a 3 WAP sono stati in grado di germinare, avvalorando studi precedenti (Pipino, 2011). Prima delle 3 WAP, infatti, l'embrione era risultato non ancora completamente formato (Gudin, 1994) ed avere alti livelli di acido abscissico (ABA) (Pipino 2011), ormone dalla nota funzione inibitrice. Tuttavia, contrariamente a quanto riportato da Burger *et al.*

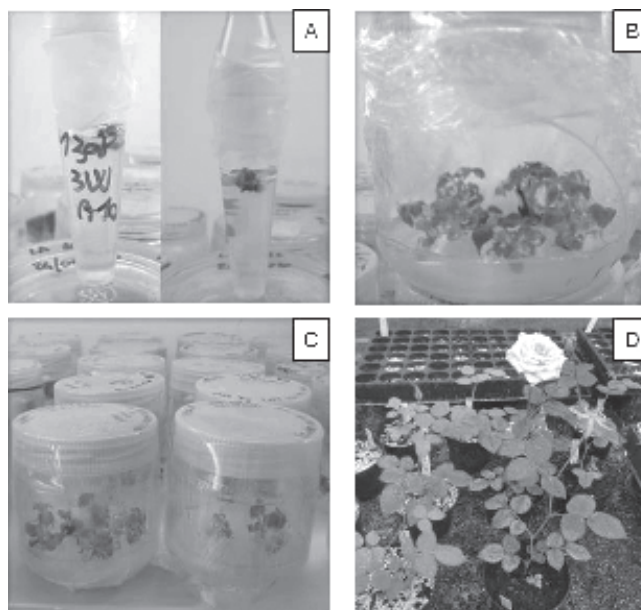


Fig. 1 - Germinazione *in vitro* (A) di un seme immaturo di *Rosa hybrida* L. codice 1308 posto in MS + regolatori di crescita e moltiplicazione (B) e radicazione (C) dei germogli ottenuti. Le piante sono state in seguito acclimatate (D) presso le strutture del CRA-FSO a Sanremo.

Fig. 1 - In vitro germination (A) of an immature seed of *Rosa hybrida* L. code 1308 placed in MS medium supplemented with phytohormones, multiplication (B), and rooting (C) of the multiplied shoots. Plants acclimatized (D) at CRA-FSO Research Unit for Floriculture and Ornamental Species, Sanremo (IM), Italy.

(1990) e Gudin (1994), che indicavano, ai fini dell'*embryo rescue*, di raccogliere i cinorrodi a 4-5 WAP, anche i semi raccolti a 4 WAP non hanno germinato. In questo stadio, i livelli di ABA nell'embrione raggiungono i valori statisticamente minori (Bewley, 1997; Baskin e Baskin, 2004; Pipino, 2011); probabilmente, però, oltre le 3 WAP la concentrazione dell'ormone aumenta nel testa e la consistenza del pericarpo ostacola meccanicamente la germinazione, evidenziando un consistente ruolo della dormienza fisica.

I semi a 3 WAP, in cui la formazione dell'asse embrionale e dei cotiledoni è ormai costituita ed il tegumento del seme non si è ancora indurito (Pipino, 2011), sembrano quindi i più appropriati per la messa a punto della tecnica di *embryo rescue* in *R. hybrida*.

In questi semi, nel presente studio, la germinazione è cominciata dopo due mesi dalla messa in coltura e, dopo un anno, è germinato il 7,9% dei semi codice 1308 (su un totale di 190 semi posti in coltura) ed il 3,5% dei semi codice 1324 (su un totale di 57 semi posti in coltura). L'analisi statistica non ha evidenziato comunque differenze significative tra i due incroci saggiati, e, quindi, tra pianta madre molto fertile e poco fertile, e tra i quattro pretrattamenti (luce/buio, 23/4 °C) effettuati, in contrasto con quanto affermato da Gudin (1994). Analizzando invece i dati senza

prendere in esame l'effetto dei pretrattamenti, sono risultate significative le differenze osservate nei due substrati impiegati: il substrato MS + BAP e GA₃ ha promosso la germinazione, permettendo di ottenere il 12,7% di semi germinati, contro il 3,3% ottenuto sul substrato MS senza regolatori di crescita (tab. 1).

In conclusione, i risultati del presente studio suggeriscono la possibilità di applicare la tecnica dell'*embryo rescue* in rosa, prelevando gli embrioni a 3 WAP e ponendoli in coltura su un substrato MS con citochinine e gibberelline. Possibilità di migliorarne l'efficienza risiedono nell'isolamento dell'embrione dal testa, per sottrarlo all'effetto inibitore dell'ABA, nella scarificazione del pericarpo, per ridurre le barriere meccaniche, e nel saggiare diverse combinazioni e concentrazioni di regolatori di crescita nei mezzi colturali, per rendere più omogenea la germinazione e ottenere piante ben sviluppate in tempi minori.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano lo staff della NIRP International per la disponibilità ad utilizzare il +materiale vegetale e Antonio Mercuri, Federica Nicoletti e Laura De Benedetti per il supporto tecnico.

Riassunto

Lo studio dello sviluppo dell'embrione e della capacità germinativa *in vitro* di semi immaturi può essere una fonte di informazioni utili per il miglioramento genetico in *Rosa*. Nella presente ricerca, tecniche di *embryo* ed *immature seed rescue* sono state impiegate in semi di *R. hybrida* prelevati a 1, 2, 3 e 4

Tab. 1 - Effetto degli incroci, dei substrati e loro interazione sulla germinazione dei semi immaturi di *Rosa hybrida* raccolti a 3 WAP.

Tab. 1 - Main effects of crosses, culture media, and their interaction on the germination rate of *R. hybrida* seeds at 3 WAP.

Codice incrocio	Percentuale
1324	7,9
1308	3,5
<i>P</i>	ns
Substrati	
MS	3,3
MS + regolatori di crescita	12,7
<i>P</i>	*
Interazioni	
Codice incrocio X Substrati	ns

La rilevanza statistica dei Between-Subjects Effects' Tests è stata valutata mediante il test non parametrico Tamhane Test ANOVA (* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,001$, ns = non-significativo).

settimane dall'impollinazione, saggiando due substrati di germinazione (MS e MS addizionato con 2,5 mg l⁻¹ di benzilaminopurina e 0,5 mg l⁻¹ di acido gibberellico) e quattro condizioni di fotoperiodo e temperatura (luce/buio, 23/4 °C). Risultati preliminari indicano che solo i semi prelevati a 3 settimane sono in grado di germinare.

Parole chiave: *breeding*, coltura *in vitro*, embrione, regolatori di crescita, seme immaturo.

Ricerca finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, Progetto 11058/7643/2009 "Studio sulla compatibilità all'incrocio ed individuazione di marcatori della fertilità in cultivar commerciali di rosa al fine di ottimizzare il lavoro di ibridazione e la costituzione varietale" (FERTROS).

Bibliografia

- ASEN S., LARSEN RE., 1951. *Artificial culturing of rose embryos*. Pennsylvania State College, Prog. Rep. 40: 4.
- BASKIN J.M., BASKIN C.C., 2004. *A classification system for seed dormancy*. Seed Science Research, 14: 1-16.
- BEWLEY J.D., 1997. *Seed germination and dormancy*. Plant Cell, 9: 1055-1066.
- BURGER D.W., LIU L., ZARY K.W., LEE C.I., 1990. *Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of Rosa hybrida L.* Plant Cell Tissue Organ Culture, 21: 147-152.
- GUDIN S., 1994. *Embryo rescue in Rosa hybrida L.* Euphytica, 72: 205-212.
- GUDIN S., ARENE L., CHAVAGNAT A., BULARD C., 1990. *Influence of endocarp thickness on rose achene germination: genetic and environmental factors*. HortScience, 25: 786-788.
- LAMMERTS W.E., 1946. *Use of embryo culture in rose breeding*. Plants and Gardens, 2: 11.
- MOHAPATRA A., ROUT G.R., 2005. *Study of embryo rescue in floribunda rose*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 81: 113-117.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- NIKBAKHT A., KAFI M., MIRMASOUMI M., BABALAR M., 2005. *Micropropagation of Damask Rose (Rosa damascena Mill.) cvs Azaran and Ghamsar*. International Journal Agriculture and Biology, 7: 535-538.
- PIPINO L., 2011. *Improving seed production efficiency for hybrid rose breeding*. PhD thesis, Ghent University and University of Turin, pagg 189. ISBN: 978-90-5989-447-1.
- PIPINO L., LABEKE M.C. VAN, MANSUINO A., SCARIOT V., GIOVANNINI A., LEUS L., 2011. *Pollen morphology as fertility predictor in hybrid tea roses*. Euphytica, 178: 203-214.
- RAM M., PRASAD K.V., KAUR C., SINGH S.K., ARORA A., KUMAR S., 2011. *Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of Rosa hybrida L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 104: 171-179.

Ottenimento di triploidi mediante coltura *in vitro* di semi di *Citrus clementina* Hort. ex Tan., cv Monreal bianco e Monreal verde

Benedetta Chiancone, Simona Giorlando e Maria Antonietta Germanà

Dipartimento DEMETRA, Università di Palermo

Triploid recovery through *in vitro* seed culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., cv. Monreal bianco and Monreal verde

Abstract. The importance of triploids ($2n = 3x = 27$) in *Citrus* is due to the seedlessness of their fruits. This characteristic, in fact, is one of the main goals of *Citrus* breeding, since the seed presence is not well accepted by the fresh fruit market. For this reason, several strategies, based on traditional and innovative methods, have been developed, in order to obtain triploids. Several researches demonstrated the occurrence of occasional triploids among seedlings obtained from small seeds obtained by diploid $2x \times 2x$ crosses of monoembryonic *Citrus* cultivars. In this research, with the aim of isolating triploids, the ploidy level of seedlings obtained from seeds of different sizes, extracted from fruits of two monoembryonic cultivars of *Citrus clementina* Hort. ex Tan.: Monreal Bianco and Monreal Verde has been detected. These cultivars present numerous seeds if cultivated close to other compatible *Citrus*. Seedlings were obtained *in vitro* culturing "dried" (weight ≤ 20 mg), "small" (weight between 21 and 60 mg), "medium" (weight between 61 and 120 mg) and "big" (weight ≥ 121 mg) seeds. All the seed categories germinated, even if with different percentages. Seedlings with well developed rooting and foliar apparatus were transferred in Magenta boxes. Per each obtained seedling, a leaf was picked, to analyze the ploidy level by the flow cytometer. Seedlings obtained from "big" and "medium" seeds were all diploids for both Monreal Bianco and Monreal Verde. On the contrary, were triploids the 4.6% of seedlings obtained from "small" seeds of Monreal Bianco and the only germinated dried seed of Monreal Verde.

Key words: clementine, ploidy, seedlessness, seedlings.

Introduzione

Da diversi anni ormai, si ritiene di fondamentale importanza, ottenere nuove varietà di agrumi che siano apirene, o al più, che contengano pochi semi. Le preferenze dei consumatori si sono, infatti, sempre più orientate verso questa caratteristica fino a far quasi scomparire dal mercato le vecchie varietà con semi. Uno degli obiettivi più importanti del miglioramento genetico è, quindi, l'ottenimento di nuove cultivar apirene. Un ruolo importante, viene svolto dai triploidi che spesso coniugano l'assenza dei semi ad una maggiore dimensione dei frutti. Purtroppo, i triploidi di agrumi spontanei sono molto rari in natura (Vardi e Spiegel-Roy, 1978; Ollitrault *et al.*, 1996; Vardi, 1996; Esen e Soost, 1971; Raza *et al.*, 2003).

Attualmente, le strategie di miglioramento genetico degli agrumi, sia tradizionali che innovative, finalizzate all'ottenimento dei triploidi, sono molteplici. Fra i metodi convenzionali ricordiamo gli incroci tra $2n \times 4n$ e $2n \times 2n$ (Esen e Soost, 1973, 1977, 1979; Geraci *et al.*, 1975; Starrantino e Recupero, 1981) che possono essere combinati con la coltura *in vitro* di embrioni e la selezione mediante analisi con citometria di flusso (Ollitrault *et al.*, 1996; Soost e Cameron, 1969, 1980; Cameron e Burnett, 1978; Esen *et al.*, 1979; Starrantino e Recupero, 1981; Jaskani, 1998; Guo e Deng, 1998). Per esempio, nel 1958, due triploidi ibridi, privi di semi e a maturazione precoce, 'Oroblanco' e 'Melogold' sono stati ottenuti dall'ibridazione tra un diploide e un tetraploide ($2x \times 4x$), il pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) \times il pompelmo (*Citrus paradisi* Macf.) ricco di semi (Soost e Cameron, 1969; 1980). Inoltre, individui triploidi sono stati selezionati fra semenzali ottenuti da semi poco sviluppati, estratti da frutti di piante diploidi (Lapin, 1937; Frost, 1943; Iwamasa, 1966; Esen e Soost, 1971; Padoan *et al.*, 2009; Aleza *et al.*, 2010).

In questo studio, al fine di individuare triploidi, è stato analizzato il livello di ploidia dei semenzali ottenuti da semi di diverse dimensioni, estratti da frutti delle due varietà di clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan): Monreal Bianco (MAB) e Monreal

* mariaantoniaetta.germana@unipa.it

Verde (MAV). Queste due varietà derivano da una mutazione indotta da irraggiamento con raggi gamma e risanata nel 1987, mediante microinnesto, presso il CRA-ACM di Acireale.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

Frutti di MAB e MAV (fig. 1) sono stati raccolti nel mese di novembre dal campo collezione Orléans della Facoltà di Agraria di Palermo. I frutti di queste due varietà contengono semi quando le piante vengono coltivate in prossimità di altri agrumi compatibili. I semenzali sono stati ottenuti mettendo in coltura semi raggrinziti (peso ≤ 20 mg), piccoli (peso compreso tra 21 e 60 mg), medi (peso compreso tra 61 e 120 mg) e grandi (peso ≥ 120 mg) (fig. 2). Dopo la sterilizzazione, gli espianti sono stati posti in coltura. Per ciascun genotipo sono stati messi in coltura in piastre Petri (100 x 15mm), contenenti 15 ml del mezzo di germinazione (Germanà *et al.*, 2008) 80 semi grandi, 80 medi, 110 piccoli di MAB e 130 piccoli di MAV e 45 raggrinziti. Il numero di semi germinati è stato rilevato per ciascuna categoria di seme e per ciascun genotipo ogni settimana per 7 settimane. Alla settima settimana, i dati rilevati sono stati elaborati mediante ANOVA a una via e la separazione delle medie è stata effettuata mediante test di Tukey ($p < 0,05$). Dopo 7 settimane, i semenzali ben sviluppati sono stati trasferiti in Magenta (Sigma V8505). Al trasferimento in Magenta è stata prelevata una fogliolina da ciascun semenzale per analizzarne la ploidia. I semenzali sono stati mantenuti nei Magenta per altre 10 settimane ed in seguito trasferiti su un substrato di torba e agriperlite (1:2).

Analisi della ploidia

Il livello di ploidia è stato determinato mediante analisi citofluorimetrica. Porzioni di tessuto di circa

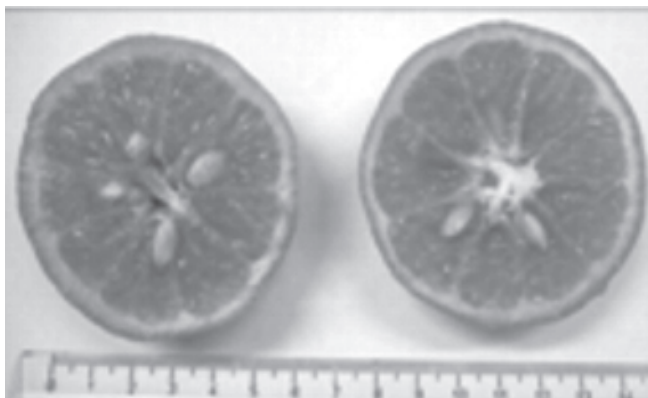


Fig. 1 - Frutto di Monreal Verde.
Fig. 1 - Monreal Verde fruit:

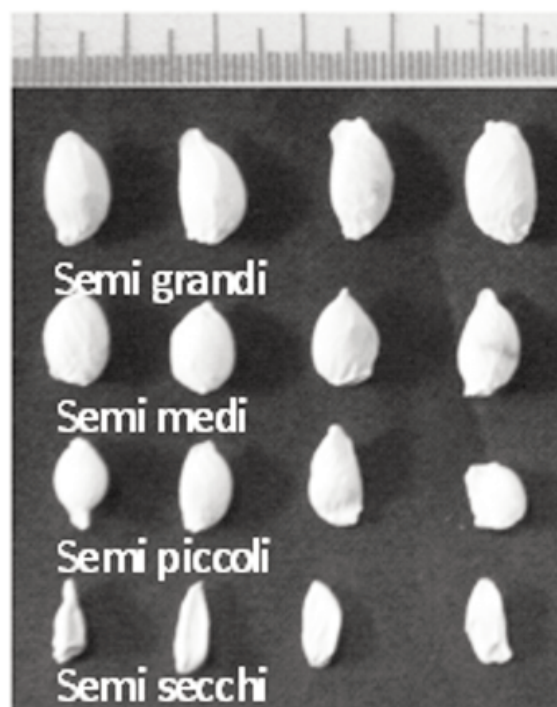


Fig. 2 - Diverse categorie di semi.
Fig. 2 - Different seed sizes.

0,5 cm², prelevate da foglioline di semenzali di 7 settimane, sono state tagliuzzate con una lametta, dopo averle immerse in 1 ml di *extraction buffer* (Partec Cystain UV Precise P). Inoltre, è stata aggiunta, come controllo, una porzione di foglia prelevata dalla pianta madre, che è noto essere diploide. La sospensione è stata passata attraverso un filtro di nylon da 30 μ m e mescolata con 1 ml di CyStain[®] PI Absolute P, DAPI (Partec). Il contenuto relativo di DNA dei campioni è stato determinato con un Partec Cell analyser PA II (Partec GmbH, Münster, Germania). Per ciascun genotipo, sono stati analizzati un totale di 201 semenzali, di cui 70 ottenuti da semi grandi, 70 da semi medi, 60 da semi piccoli e 1 da seme raggrinzito di MAV. Nel caso di Monreal Verde sono state analizzate le foglie della piantina proveniente dall'unico seme raggrinzito germinato.

Risultati

Germinazione dei semi

Per entrambi i genotipi, i semi si sono ingrossati già dopo la prima settimana di coltura. Dopo la settima settimana di coltura, i dati relativi alla germinazione non hanno subito ulteriori cambiamenti (fig. 3). Per il MAB, dopo la settima settimana di coltura, solo il 55,6% dei semi piccoli aveva germinato, mentre nel caso dei semi grandi e dei semi medi si sono raggiunte percentuali rispettivamente del 94,4% e 87,5%;

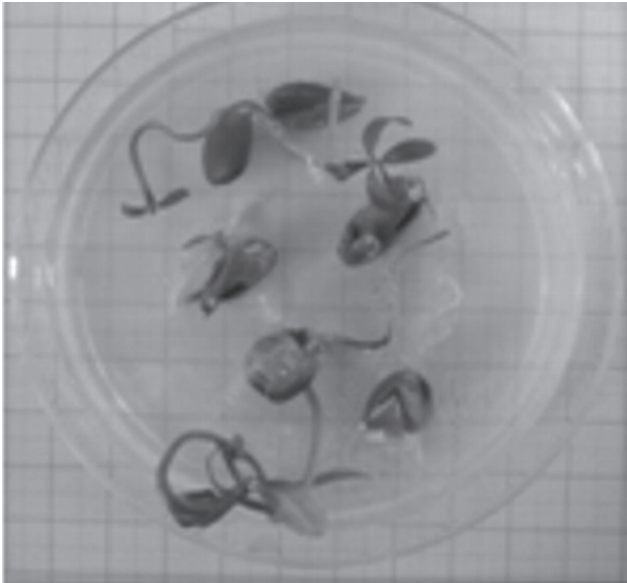


Fig. 3 - Germinazione dei semi di Monreal Bianco.
Fig. 3 - Germination of Monreal bianco seeds.

nessun seme raggrinzito ha germinato. Nel caso del MAV, alla settima settimana di coltura, le percentuali rilevate sono state le seguenti: per i semi grandi 95,1%, per i semi medi 94,4%, per i semi piccoli 46% e per i semi raggrinziti 2,2%. Per entrambi i genotipi, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze nella percentuale di germinazione dei semi grandi e medi, mentre differenze sono state riscontrate con le altre due categorie (fig. 4).

Trasferimento dei semenzali in vivo

Durante le 10 settimane di coltura nei magenta, per entrambi i genotipi analizzati è stato osservato che i semenzali triploidi risultavano più grandi rispetto ai semenzali diploidi della stessa età. Tale differenza si è andata attenuando nel tempo, fino a diventare quasi nulla nelle piantine trasferite in serra. Il 70% dei semenzali di Monreal Bianco e Verde trasferiti *in vivo* ha superato la crisi di trapianto (fig. 5).

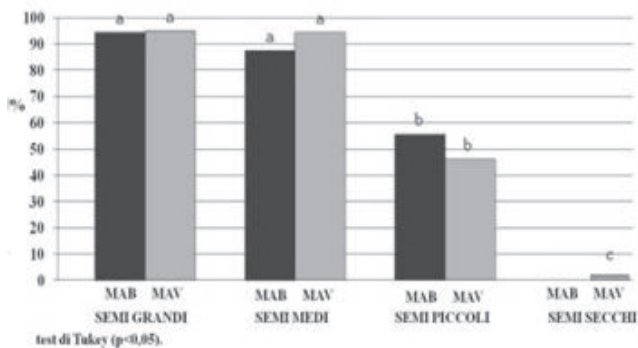


Fig. 4 - Percentuale di germinazione dei semi di Monreal Bianco e Verde dopo 7 settimane di coltura.

Fig. 4 - Germination % of Monreal Bianco and Verde seeds after 7 weeks of culture.

Analisi della ploidia

L'analisi citofluorimetrica eseguita su foglie di semenzali di Monreal Bianco, ha mostrato che il 100% dei semenzali ottenuti da semi grandi e medi erano diploidi, mentre il 4,6% dei semenzali ottenuti dai semi piccoli erano triploidi. Per quanto riguarda, il Monreal Verde, i semenzali ottenuti da semi grandi, medi e piccoli erano diploidi, l'unico semenzale ottenuto da seme piccolo era triploide. Questi risultati confermano ciò che era stato riportato in altri studi (Esen e Soost, 1971, 1973; Padoan *et al.*, 2009; Aleza *et al.*, 2010), in cui sono stati ottenuti triploidi spontanei da germinazione di semi piccoli provenienti da impollinazione libera e controllata di genotipi monoembrionici. Vi sono diverse ipotesi per spiegare la presenza di triploidi spontanei nella formazione degli embrioni. Una meiosi anormale sembra essere la causa più importante della formazione dei gameti 2n (Conicella *et al.*, 2003; Frost, 1943; Esen e Soost, 1971; Lim *et al.*, 2001; Ramanna, 1983). I problemi durante il processo meiotico possono verificarsi sia durante la prima divisione meiotica (FDR) che durante la seconda divisione meiotica (SDR) (Veilleux, 1985; Bretagnolle e Thompson, 1995). Il confronto del numero allelico e dell'intensità del profilo teoricamente dedotta dai pattern isoenzimatici ha supportato l'ipotesi che la SDR è il meccanismo mediante il quale si formano gameti 2n in *Citrus clementina* (Esen *et al.*, 1979; Luro *et al.*, 2000, 2004; Chen *et al.*, 2008). La SDR accade tanto frequentemente nei gameti femminili quanto in quelli maschili (Luro *et al.*, 2000; Raza *et al.*, 2003). L'origine femminile dei

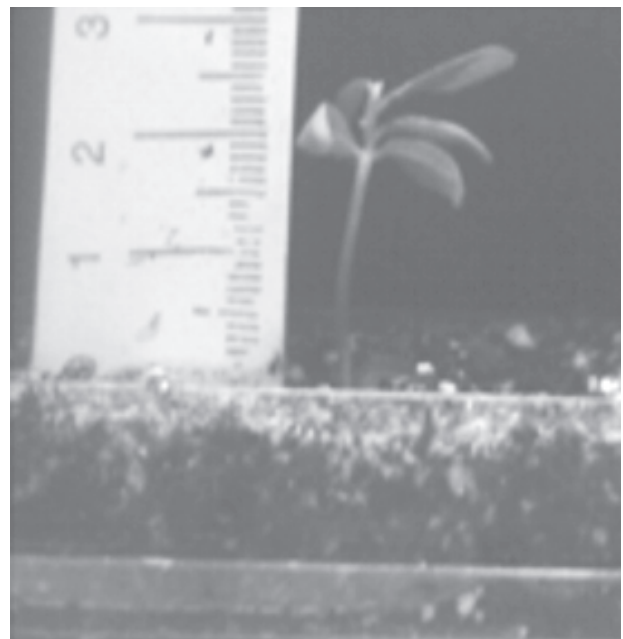


Fig. 5 - Semenzale di Monreal Bianco trasferito *in vivo*.
Fig. 5 - In vivo seedling of Monreal Bianco.

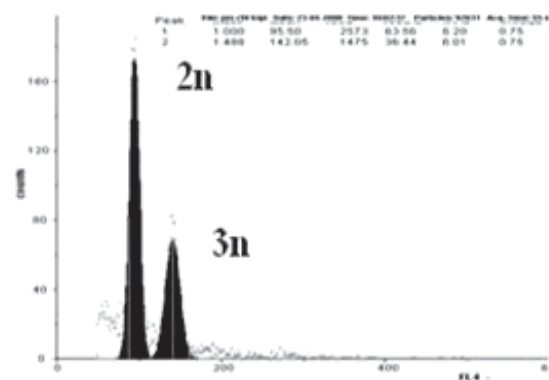


Fig. 6 - Analisi citofluorimetrica di un semenzale triploide (3n) a confronto con un campione di ploidia nota (2n).

Fig. 6 - Seedling ploidy analysis.

triploidi spontanei è stata dimostrata anche dall'osservazione dell'associazione di embrioni triploidi con endosperma pentaploide (Esen e Soost, 1977, Esen *et al.*, 1979; Wakana *et al.*, 1981; Ollitrault *et al.*, 2007).

Conclusioni

I frutti di *Citrus* con i semi non sono accettati dal mercato della frutta fresca. Per tale motivo, l'ottenimento di nuove cultivar con frutti apireni, oltre che facili da sbucciare, è considerato uno degli obiettivi principali dei programmi di miglioramento genetico degli agrumi. In questo studio, triploidi sono stati selezionati attraverso l'analisi citofluorimetrica di semenzali ottenuti dalla germinazione *in vitro* di semi piccoli e raggrinziti dei genotipi Monreal Apireno Bianco e Monreal Apireno Verde che contengono semi quando coltivati in prossimità di altri agrumi compatibili. In particolare, il 4,6% dei semenzali ottenuti dai semi piccoli di Monreal Bianco analizzati, e il semenzale ottenuto dall'unico seme raggrinzito di Monreal Verde sono risultati triploidi. In conseguenza dei risultati ottenuti, sarebbe utile incrementare l'efficienza di questo metodo per rendere disponibili un più alto numero di triploidi negli agrumi.

Riassunto

L'importanza dei triploidi ($2n = 3x = 27$) negli agrumi deriva dall'apirenia dei loro frutti. Diverse ricerche hanno mostrato che è possibile isolare triploidi nei semenzali provenienti da semi di piccole dimensioni di cultivar monoembrioniche di agrumi. In questo studio, è stato analizzato il livello di ploidia dei semenzali ottenuti da semi di diverse dimensioni, estratti da frutti di due varietà di clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), al fine di individuare triploidi. In particolare, i genotipi oggetto di studio sono

stati il Monreal Bianco (MAB) e il Monreal Verde (MAV). Queste due varietà derivano da una mutazione indotta da irraggiamento con raggi gamma e risanata nel 1987, mediante microinnesto, presso il CRA-ACM di Acireale. Sono risultati triploidi il 4,6% dei semenzali ottenuti dai semi piccoli di MAB e l'unico semenzale raggrinzito germinato di MAV.

Parole chiave: apirenia, clementine, semenzali, ploidia.

Bibliografia

- ALEZA P., JUAREZ J., CUENCA J., OLLITRAULT P., NAVARRO L., 2010 *Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x 3 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs*. Plant Cell Report 29: 1023-1034
- BRETAGNOLLE F., THOMPSON J.D., 1995. *Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants*. New Phytologist 129: 1-22.
- CAMERON J.W., BURNETT R.H., 1978. *Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid citrus hybrids*. HortScience 13: 167-169.
- CHEN C., LYON M.T., O'MALLEY D., FEDERICI C.T., GMITTER J., GROSSER J.W., CHAPARRO J.X., ROOSE M.L., GMITTER JR. F.G. 2008. *Origin and frequency of 2n gametes in Citrus sinensis x Poncirus trifoliata and their reciprocal crosses*. Plant Sci. 174: 1-8.
- CONICELLA C., CAPO A., CAMMARERI M., ERRICO A., SHAMINA N., MONTI, L.M., 2003. *Elucidation of meiotic nuclear restitution mechanisms in potato through analysis of microtubular cytoskeleton*, Euphatica 133: 107-115.
- ESEN A., SOOST R.K., 1971. *Unexpected triploids in Citrus: Their origin, identification and possible use*. J. Heredity 62: 329-333.
- ESEN A., SOOST R.K., 1973. *Precocious development and germination of spontaneous triploid seed in citrus*. J. Heredity 64: 147-154.
- ESEN A., SOOST R.K., 1977. *Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratios in Citrus*. Proc. I Cong. mundial de Citricultura, Murcia, Valencia: 53-63.
- ESEN A., SOOST R.K., GERACI G., 1979. *Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus*. J. Heredity 70: 5-8.
- FROST H.B., 1943. *Genetics and breeding*. In: The Citrus Industry Webber and Batchelor (eds.), University of California Press, Berkeley, CA, USA Vol. 1, 817-913.
- GERACI G., ESEN A., SOOST R.K., 1975. *Triploid progenies from 2x X 4x crosses of Citrus cultivars*. J. Heredity. 66:177-178.
- GERACI G., 1978. *Percentage of triploid offspring of cross pollinated diploid polyembryonic citrus*. In: Proc. Int. Soc. Citriculture, 1: 57-8
- GERMANÀ M.A., MACALUSO L., PATRICOLO G., CHIANCONE B., 2008 *Morphogenic response in vitro of epicotyl segments of Citrus macrophylla*. Plant Biosystems 142: 661-664.
- GUO W.W., DENG X.X., 1998. *Somatic hybrid plantlet regeneration between citrus and its wild relative, Murraya paniculata via protoplast electrofusion*. Plant Cell Reports 18: 297-300
- IWAMASA M., 1966. *Studies on the sterility in genus Citrus with special reference to the seedlessness*. Bull. Hort. Res. St. B 6: 1-81.
- JASKANI M.J., 1998. *Interploidal hybridization and regeneration*

- of Kinnow mandarin*. Ph.D. Thesis, Dept. of Hort., Univ. Agric., Faisalabad, Pakistan.
- LAPIN W.K., 1937. *Investigation on polyploidy in citrus work*. All-Union Sci. Res. Inst. Humid subtrop. 1:1-68
- LIM K.B., RAMANNA M.S., DE JONG J.H., JACOBSEN E., VAN TUYL J.M., 2001. *Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclearrestitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH*. Theor. Appl. Gen. 103: 219-230.
- LURO F., MADDY F., JACQUEMOND C., FROELICHER Y., MORILLON R., RIST D., OLLITRAULT P., 2004. *Identification and evaluation of diployny in clementine (Citrus clementina) for use in breeding*. Proc. XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. Acta Horticulturae 663: 841-847.
- LURO F., MADDY F., OLLITRAULT P., RIST D., 2000. *Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus hybrids*. Proc. of Int. Soc. Citr. IX Congress, 3-7th December Orlando, FL, 168-169.
- OIYAMA I., OKUDAI N., TAKAHARA T., 1981. *Ploidy level of seedlings obtained from 2x x 4x crosses of citrus*. Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 32-34.
- OLLITRAULT P., DAMBIER D., ALLENT V., LURO F., JACQUEMOND C., 1996. *In vitro rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler citrus breeding*. Proc. Eighth International Citrus Congress; ISC, South Africa, Vol. 1, p. 254-258.
- OLLITRAULT P., LURO F., YAMAMOTO M., 2007. *Seedlessness and ploidy manipulation*. In: Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology, I A. Khan (Ed.), CABI 197-218.
- PADOAN D., CHIANCONE B., GERMANÀ M.A., 2011. *Occurrence of spontaneous triploids from small seeds of Hernandina clementine*. Proceedings Second International Citrus Biotechnology Symposium. Catania, November 30-December 2, 2009. (Gentile A. and La Malfa S. eds.). Acta Horticulturae 892: 287-294.
- RAMANNA M.S., 1983. *First division restitution gametes through fertile desynaptic mutants of potato*, Euphatica 3: 337-350.
- RAZA H., KHAN M.M., KHAN A.A., 2003. *Seedlessness in Citrus*. Int. J. Agr. Biol. 5: 388-391.
- SOOST R.K. 1987. *Breeding citrus-genetics and nocellar embryony. Improving vegetatively propagated crops*. A. Abott & R. Atkin, Academic Press, London. 83-110.
- SOOST R.K., CAMERON J.W., 1969. *Citrus*. In: Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics. F.D. Fewerda, F. De WIT (eds.) 129-162.
- SOOST R.K., CAMERON J.W., 1980. *'Oroblanco', a triploid pum-melograpefruit hybrid*. HortScience 15 (5): 667-669.
- STARRANTINO A., RECUPERO G.R., 1981. *Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females and 4x male*. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 31-32.
- VARDI A., 1996. *Strategies and consideration in mandarin improvement programmes*. Proc. Int. Soc. Citricul, 1:109-112.
- VARDI A., SPIEGEL-ROY P., 1978. *Citrus breeding, taxonomy and the species problem*. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 51-57.
- VEILLEUX R.E. 1985. *Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding*. Plant Breeding Review 3: 253-288.
- WAKANA A., IWAMASA M., UEMOTO S., 1981. *Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in poly-embryonic Citrus*. Proc. Int. Soc. Citr. 1: 135-139.

Le colture *in vitro* come strumento per valutare gli effetti della salinità da NaCl in *Myrtus communis* L.

Patrizia Di Cori¹, Andrea Frattarelli², Simona Lucioli², Paolo Nota², Emilia Caboni^{2*} e Cinzia Forni¹

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata"

² CRA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

***In vitro* cultures as a tool to evaluate the effects of NaCl salinity in *Myrtus communis* L.**

Abstract. Salinity is one of the major abiotic stresses that affects crop quality and productivity. Today more than 800 million hectares of land throughout the world are salt affected. Effect of salt stress was examined in *in vitro* shoot cultures, derived from axillary buds of a *Myrtus communis* genotype from the CRA - Fruit Trees Research Centre of Rome. Shoots were transferred to an agarised rooting medium (2 mg/L IBA) and after 30 days rooted shoots were transferred to a liquid culture media with 0, 125 or 250 mM NaCl for 15 or 30 days. The following physiological and biochemical parameters were detected on rooted plant: shoot and root length, chlorophyll a and b, carotenoids and proline content, guaiacol peroxidase activity and lipid peroxidation level by malondialdehyde formation measurement. Shoot and roots length and chlorophyll content significantly decreased depending on the exposure time and salt concentrations. Carotenoids content variations were not detected. A significant increase of guaiacol peroxidase activity was found in relationship to the concentration. Proline content and lipid peroxidation level was not affected by salt treatments. Other studies are in progress to further characterise the response to NaCl in this species.

Key words: antioxidants, myrtle, salt stress response.

Introduzione

La salinità dei suoli costituisce il principale fattore in grado di limitare la produttività e la qualità degli agroecosistemi e interessa 800 milioni di ettari di terreno nel mondo (FAO, 2008).

Lo stress salino è indotto dalla presenza in eccesso di sali nel terreno in cui la pianta si sviluppa.

L'aumento della salinità del suolo determina l'aumento del potenziale osmotico della soluzione circolante, ciò comporta un investimento energetico maggiore da parte della pianta stessa per assorbire l'acqua dal suolo. Il sale influenza il metabolismo della pianta per l'effetto citotossico degli ioni, ne ostacola lo sviluppo riducendo la capacità di assorbimento dell'acqua e dei nutrienti ed induce uno stress ossidativo, tra i principali responsabili del danno cellulare (Tuteja, 2007). Le risposte di una pianta allo stress salino possono essere molteplici, dall'adattamento fisiologico per continuare la crescita, sebbene ridotta, alla totale sospensione della crescita fino a quando cessano le condizioni di stress. L'analisi delle risposte fisiologiche delle piante allo stress salino permette di prevedere l'entità degli effetti di tale stress sulle specie, al fine di tutelare le specie sensibili. Inoltre, la comprensione dei meccanismi che rendono le piante capaci di adattarsi allo stress salino e mantenere inalterati i tassi di crescita consente la selezione di specie o genotipi tolleranti di interesse agrario.

Il mirto è una specie tipica del bioma di macchia mediterranea. Tale specie ben si adatta a diverse tipologie pedologiche, è attualmente impiegata a scopo ornamentale, nel campo alimentare e cosmetico e sta acquisendo interesse agronomico per la valorizzazione di terreni marginali.

Lo scopo del lavoro è stata la caratterizzazione di alcuni parametri fisiologici e biochimici coinvolti nella risposta allo stress salino in *Myrtus communis* al fine di comprendere i meccanismi che determinano la tolleranza allo stress in questa specie. Inoltre, tale approccio consente di individuare parametri morfologici o metabolici che potranno essere utilizzati come indicatori della tolleranza al sale nei diversi genotipi.

Materiali e metodi

Sono state utilizzate colture *in vitro* di germogli ottenute da gemma ascellare di piante di *M. communis* L. coltivate *in vivo*. La sterilizzazione delle gemme è

* emilia.caboni@entecra.it

stata effettuata mediante immersione in alcool etilico (70 % v/v) per 1 minuto e successivamente in NaClO 0,8 % per 20 minuti. Il terreno di coltura basale per la moltiplicazione (TM) consisteva in sali LP (Quoirin *et al.*, 1977), composti organici (Caboni *et al.*, 2002), acido 3-indolbutirrico (IBA 0,05 mg/l), benzilammipopurina (BAP 0,4 mg/l), saccarosio (30 g/l) e agar (5,5 g/l, B e W, Italia). I germogli micropropagati sono stati mantenuti per 30 giorni su un terreno di radicazione (TR) contenente sali MS (Murashige e Skoog, 1962), composti organici (Caboni *et al.*, 2002), agar (5,2 g/l), saccarosio (20 g/l) ed IBA (2 mg/l) per indurre la formazione delle radici. Le piante radicate sono state trasferite su terreno TM privo di agar e fitoregolatori e NaCl a concentrazione crescente (0, 125 e 250 mM); le seguenti valutazioni di parametri fisiologici e biochimici sono state effettuate dopo 15 e 30 giorni di esposizione ai trattamenti: misurazione della lunghezza di germogli e radici, del contenuto in clorofilla a e b e dei carotenoidi (Lichtenthaler, 1987) e della prolina (Bates *et al.*, 1973), valutazione della variazione dell'attività enzimatica della guaiacolo perossidasi (G-POX) (Forni *et al.*, 2001) e del livello di perossidazione dei lipidi misurato attraverso il saggio della malondialdeide (Dhindsa *et al.*, 1981).

Tutte le colture sono state mantenute ad una temperatura di 24±1°C, con un fotoperiodo di 16 ore, intensità luminosa 40 μmol m⁻² s⁻¹.

Per ogni esperimento sono state effettuate 3 repliche indipendenti e sui dati ottenuti è stata calcolata la media ± errore standard (ES).

Risultati e discussione

Il sale ha ridotto in maniera significativa la lunghezza dei germogli alla concentrazione più elevata (fig. 1) e delle radici ad entrambe le concentrazioni (fig. 1). Il contenuto in clorofilla a e b (fig. 2) diminuisce significativamente nei campioni trattati con NaCl rispetto ai controlli, come precedentemente evi-

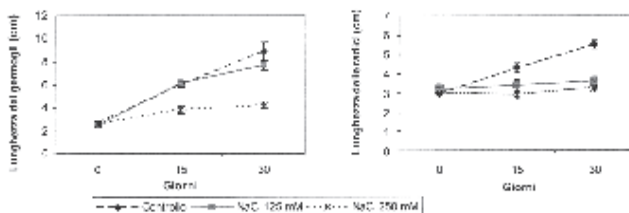


Fig. 1 - Lunghezza media della parte epigea (sinistra) e della radice misurata all'inizio del trattamento e dopo 15 e 30 giorni in presenza di NaCl e nel controllo (Barre verticali = ± ES; n = 21).
Fig. 1 – Shoot (left) and root length at the beginning of the experiments and after 15 or 30 days with NaCl and in the control medium (Vertical bars = ± SE; n = 21).

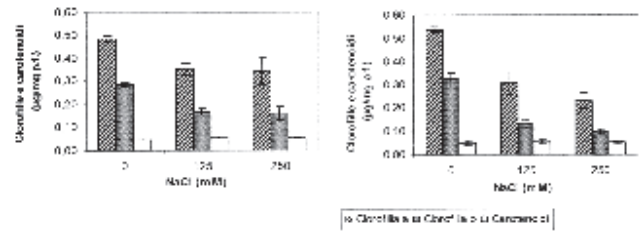


Fig. 2 - Contenuto in clorofille e carotenoidi delle plantule trattate con NaCl per 15 (sinistra) e 30 giorni (Barre verticali = ± ES).
Fig. 2 - Chlorophylls and carotenoids contents of plantlets maintained for 15 (left) or 30 days in culture media supplied with increasing NaCl concentrations (Vertical bars = ± SE).

denziato in altre specie che vengono esposte ad uno stress salino, indotto *in vivo* oppure *in vitro* (Furtana e Tipirdamaz, 2010; Erturk *et al.*, 2007). La salinità non ha indotto un aumento del contenuto in prolina (dati non mostrati) e carotenoidi (fig. 2) che sembrano non avere un effettivo ruolo nella risposta allo stress salino in questa specie. Diversamente rispetto ad altre specie in cui l'incremento della biosintesi di questo aminoacido è correlato a meccanismi di adattamento della pianta allo stress salino (Tuteja, 2007), la produzione di prolina nel mirto non sembra un meccanismo di risposta allo stress osmotico causato da NaCl. Questo risultato è in accordo con i risultati di uno studio condotto su *Hordeum vulgare* L., nel quale il contenuto in prolina non era correlabile alla tolleranza al sale dei genotipi (Chen *et al.*, 2007). L'analisi di altri osmoliti compatibili, quali la glicina betaina, attualmente in corso, potrà dare maggiori informazioni sui meccanismi osmoregolativi nel mirto in risposta allo stress salino.

Nelle colture di mirto esposte al sale è stato evidenziato un incremento dose dipendente dell'attività G-POX (fig. 3), mentre dall'analisi della malondialdeide non sono stati evidenziati aumenti di livello della perossidazione dei lipidi, indice di danno delle membrane (dati non mostrati). Questo risultato indicherebbe il coinvolgimento dell'enzima G-POX nella

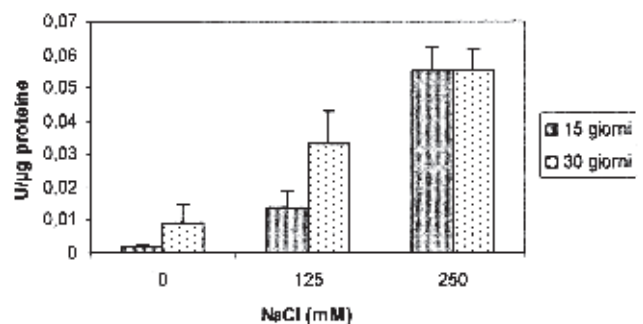


Fig. 3 - Attività dell'enzima G-POX nelle plantule trattate con NaCl (Barre verticali = ± ES).
Fig. 3 - G-POX activity of plants treated with NaCl (Vertical bars = ± SE).

risposta allo stress salino come anche dimostrato in cotone dove i genotipi tolleranti mostrano elevati valori di attività delle perossidasi, che non sono riscontrati in quelli sensibili (Gosset *et al.*, 1994). Le G-POX, infatti, sono coinvolte in numerosi processi metabolici inclusi la degradazione dell'acido-3-indolacetico e la biosintesi della lignina. Inoltre, nella specie *Lycopersicon pennellii* i livelli di perossidazione dei lipidi di membrana e di H₂O₂, nei mitocondri e nei perossisomi, si riducono in presenza di un aumento nell'attività di enzimi (G-POX, ascorbato perossidasi e superossido dismutasi) coinvolti nei processi di detossificazione della cellula (Mittova *et al.*, 2004). Ulteriori approfondimenti potranno confermare quali delle due funzioni svolte dall'enzima G-POX, controllo delle *reactive oxygen species (ROS)* o lignificazione della parete, limitano in mirto il danno alle membrane in presenza di NaCl. Al fine di verificare quali altri enzimi siano direttamente coinvolti nella risposta allo stress salino, sono in corso analisi per individuare eventuali variazioni dell'attività degli altri principali enzimi antiossidanti (superossido dismutasi e catalasi). Questi preliminari risultati suggeriscono che il mirto tollera la salinità e ci hanno permesso di raccogliere informazioni sui meccanismi di risposta allo stress salino in questa specie. E' possibile, inoltre, confermare l'importanza delle colture *in vitro*, come utile strumento di indagine per lo studio degli effetti degli stress abiotici in un ambiente controllato.

Riassunto

In questo lavoro colture *in vitro* di germogli di *M. communis* sono state indotte a radicare in presenza di IBA (2 mg/l) e le plantule radicate sono state trasferite su un terreno liquido contenente NaCl 0, 125 e 250 mM. Dopo 15 e 30 giorni di esposizione ai trattamenti sulle plantule sono state effettuate analisi fisiologiche e biochimiche: determinazione della lunghezza di germogli e radici, valutazione del contenuto in clorofilla a e b, carotenoidi e prolina e della variazione di G-POX e di perossidazione lipidica. La salinità ha ridotto significativamente la lunghezza di germogli e radici e il contenuto in clorofilla, ma non ha indotto un aumento del contenuto in prolina e carotenoidi che sembrano non avere un effettivo ruolo nella risposta allo stress salino in questa specie. Nelle colture di mirto esposte al sale è stato, inoltre, evidenziato un incremento dose dipendente dell'attività G-POX, mentre non sono stati riscontrati aumenti di livello della perossidazione dei lipidi, indice di danno delle

membrane. Questo risultato indica un possibile coinvolgimento dell'enzima G-POX nella risposta allo stress salino. Dai preliminari risultati ottenuti il mirto risulta essere una specie tollerante alla salinità. E' possibile, inoltre, confermare l'importanza delle colture *in vitro* come strumento di indagine per lo studio degli effetti degli stress abiotici in un ambiente controllato.

Parole chiave: antiossidanti enzimatici e non-enzimatici, mirto, risposta allo stress salino.

Bibliografia

- BATES L.S., WALDRON R.P., TEARE I.D. 1973. *Rapid determination of free proline in water stress studies*. Plant Soil 29: 205-207.
- CABONI E., D'ANGELI S., CHIAPPETTA A., INNOCENTI A.M., VAN ONCKELEEN H., DAMIANO C., 2002. *Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenic process*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 70: 199-206.
- CHEN Z., CUIN T.A., ZHU M., TWOMEY A., NAIDU B.P., SHABALA S., 2007. *Compatible solute accumulation and stress mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance*. J. Exp. Bot. 58: 4245-4255.
- DHINDSA R.S., MATOWE W. 1981 Drought Tolerance in Two Mosses: Correlated with Enzymatic Defence Against Lipid Peroxidation. J Exp. Bot. 32: 79-91
- ERTURK U., SIVRITEPE N., YERLIKAYA C., BOR M., OZDEMIR F., TURKAN I., 2007. *Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro*. Biol. Plant. 51 (3): 597-600.
- FAO, 2008. *FAO Land and plant nutrition management service*. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- FORNI C., CHEN J., PANCIONI L., GRILLI CAIOLA M., 2001. *Evaluation of the fern Azolla for growth, nitrogen and phosphorus removal from wastewater*. Water research 35 (6): 1592-1598.
- FURTANA B.G., TIPIRDAMAZ R., 2010. *Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (Cucumis sativus L.) to salinity*. Turk. J. Biol. 34: 287-296.
- GOSSET D.R., MILLHOLLON E.P., LUCAS M.C., 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. Crop Sci. 34: 706-714.
- LICHTENTHALER H.K., 1987. *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*. In: Methods in Enzymology. S.P. Colowich and N.O. Kaplan. eds (Academic Press), 148: 350-382.
- MITTOVA V., GUY M., TAL. M., VOLOKITA M., 2004. *Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species Lycopersicon pennellii*. J. Exp. Bot. 55: 1105-1113.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., BOXUS P.H., 1977. *Un premier bilan de 10 années de recherches sur le coltures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux*. In: Compte Rendu des recherches 1976-1977. Station de cultures fruitières et maraichères, pp 93-117.
- TUTEJA N., 2007. *Mechanisms of high salinity tolerance in plants*. In: Methods in enzymology, 428: 419-438.

Effetto del *meta*-topolin sulla capacità morfogenica *in vitro* di foglie di *Prunus spp.*

Adele Gentile¹, Maribel Jàquez Gutiérrez², Carmine Damiano¹, Javier Martinez², Paolo Nota¹, Andrea Frattarelli¹ e Emilia Caboni*

¹ CRA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

² Facultad Ciencias Agrotecnológicas, University of Chihuahua – Mexico

Effect of *meta*-topolin on *in vitro* morphogenic ability of *Prunus spp.*

Abstract. The effect of *meta*-topolin, an aromatic cytokinin, on the shoot quality and on morphogenic activity in the *Prunus* rootstocks Torinel (*Prunus domestica*, L.) and Ferdor (*Prunus insititia x domestica*) was evaluated. *In vitro* shoots were maintained for 3 sub-cultures in a culture medium (QL macrosalts and MS microsals and organics) containing BA, 0.7 mg l⁻¹ (control), or different concentrations (0.5, 1.0 or 1.5 mg l⁻¹) of *meta*-topolin (pre-conditioning). To obtain adventitious shoot regeneration, leaves from shoots grown on 0.5 mg l⁻¹ of *meta*-topolin and on the control medium were excised and cultured 10 days in darkness on a medium supplemented with BA, TDZ or zeatin and NAA and then transferred to a NAA-free medium in the light. *Meta*-topolin treated shoots of both rootstocks showed a higher shoot proliferation and a higher chlorophyll content than the control. Concerning adventitious shoot regeneration, during the darkness incubation period, leaves started to develop callus and adventitious shoot derived from this callus after leaf transfer to the NAA-free medium. The highest adventitious shoot regeneration (67%) was obtained in Ferdor leaves excised from shoot preconditioned with *meta*-topolin during the multiplication phase and transferred to the medium supplied with 2.5 mg l⁻¹ TDZ in the regeneration phase. No regeneration occurred in the control explants.

Key words: adventitious shoot regeneration, chlorophyll, pre-treatment, shoot proliferation.

Introduzione

L'applicazione delle colture *in vitro* ha fornito negli ultimi decenni un valido strumento per le attività di miglioramento genetico non convenzionale dei vegetali (Brown e Thorpe, 1995). La rigenerazione

avventizia, in particolare, è una potenziale fonte di variabilità somaclonale oltre che un importante requisito per la trasformazione genetica. La definizione di efficienti sistemi rigenerativi, a partire da tessuti somatici maturi, punto critico per diverse specie appartenenti al genere *Prunus*, prevede l'impiego di diverse sostanze ormonali o ormone-simili. Il *meta*-topolin (*mT*), una citochinina aromatica naturale [6-(3-hydroxybenzylamino)-purine], è stato precedentemente utilizzato *in vitro* nel miglioramento del tasso di moltiplicazione e radicazione, nel controllo dell'iperidricità degli espianti e nel rallentamento della senescenza fogliare in varie specie (Aremu *et al.*, 2012 e referenze incluse). Per quanto riguarda l'induzione di organogenesi, invece, è stato finora solo applicato con successo su tessuti embrionali di *Prunus microcarpa* (Nas *et al.*, 2010). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti di questa citochinina sulla proliferazione e la qualità dei germogli da gemma ascellare e sulla rigenerazione avventizia da tessuti somatici in due portinnesti del genere *Prunus*: Torinel (*Prunus domestica*) e Ferdor (*Prunus insititia x domestica*).

Materiali e metodi

Germogli di Torinel (*Prunus domestica* L.) e Ferdor (*Prunus insititia x domestica*), originati da gemme ascellari di piante adulte, sono stati micropropagati per tre successive sub-colture in un terreno contenente 0,7 mg l⁻¹ di benziladenina (BA, controllo) o varie concentrazioni (0,5-1,0-1,5 mg l⁻¹) di *mT*. Le colture sono state mantenute a 24±1 °C con un fotoperiodo di 16 h a 37 µmol m⁻²s⁻¹ di intensità luminosa. Per gli esperimenti di rigenerazione avventizia, sono state prelevate foglie apicali dei germogli pre-trattati con BA, 0,7 l⁻¹, o con *mT*, 0,5 mg l⁻¹, incise trasversalmente rispetto alla nervatura centrale, e coltivate al buio per 10 giorni su tre terreni contenenti acido naltalenacetico (NAA), 0,7 mg l⁻¹, in combinazione con zeatina (Zea), 2 mg l⁻¹, BA, 2 mg l⁻¹ o thidiazuron (TDZ), 2,5 mg l⁻¹, rispettivamente. Successivamente,

* emilia.caboni@entecra.it

il materiale è stato trasferito alla luce e sub-colturato ogni due settimane sui terreni senza NAA. La percentuale media di espianti che hanno prodotto germogli avventizi è stata calcolata quattro settimane dopo il trasferimento degli espianti alla luce.

Determinazione del contenuto in clorofilla

La valutazione del contenuto in clorofilla è stata effettuata su foglie apicali (100 mg) dei germogli micropropagati alla fine della 3^a sub-coltura (45 giorni). Le clorofille *a* e *b* sono state estratte in 80% acetone (MacKinney, 1941) e misurate spettrofotometricamente utilizzando i coefficienti di estinzione di Inskeep e Bloom (1985).

Analisi statistica

I risultati sono la media di 10-15 espianti per 3 repliche per ogni trattamento. Tutti gli esperimenti hanno seguito uno schema completamente randomizzato; sui dati ottenuti sono state calcolate le medie e l'errore standard (ES).

Risultati e discussione

E' stato messo in evidenza che l'utilizzo in micro-propagazione della citochinina *mT* durante la fase di proliferazione può migliorare l'efficienza propagativa e rigenerativa degli espianti; soddisfacenti risultati in termini di incremento dei tassi di moltiplicazione da gemma ascellare sono stati precedentemente ottenuti, tra i fruttiferi, in melo, ciliegio e banana (Aremu *et al.* 2012). Nei portinnesti di *Prunus*, da noi valutati, l'applicazione di *mT* in fase di moltiplicazione ha indotto, alle concentrazioni di 0,5 e 1,5 mg l⁻¹, una maggiore proliferazione di germogli, una qualità degli espianti superiore, in termini di sviluppo, di espansione fogliare e di stato dell'apice (fig. 1) e un contenuto in clorofilla *a*, *b* e totale più elevato rispetto alla BA (fig. 2).

Il condizionamento con *mT* ha influenzato positivamente anche la successiva fase di rigenerazione avventizia. Le foglie provenienti da germogli moltiplicati su terreno di controllo, pur avendo formato

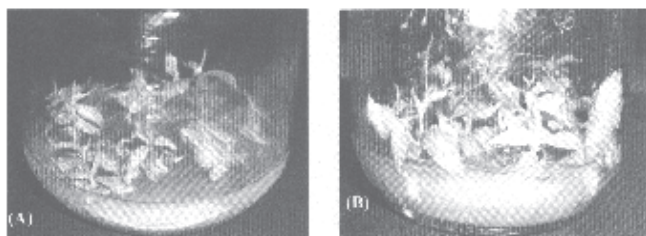


Fig. 1 - Germogli di Torinel in fase di moltiplicazione su BA 0,7 mg l⁻¹ (A) e mT 0,5 mg l⁻¹ (B).

Fig. 1 - Torinel shoots in multiplication phase on BA 0.7 mg l⁻¹ (A) and mT 0.5 mg l⁻¹ (B).

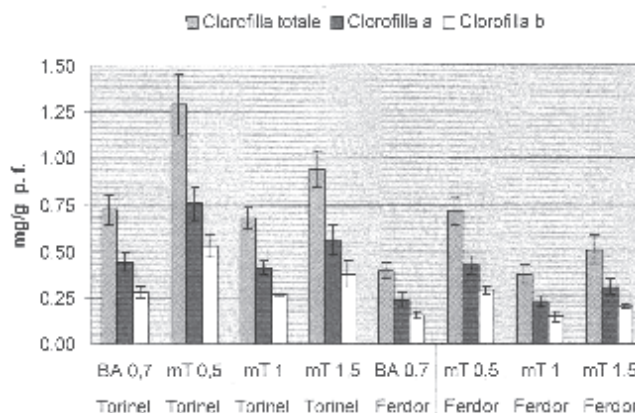


Fig. 2 - Contenuto in clorofilla (totale, *a* e *b*) nei germogli di Torinel e Ferdor dopo 3 sub-culture sui terreni contenenti BA (0,7 mg l⁻¹) o mT (0,5; 1,0 o 1,5 mg l⁻¹). Le medie sono espresse come mg/g peso fresco (p.f.) ± ES.

Fig. 2 - Chlorophyll content (total, *a* and *b*) in the shoots of Torinel and Ferdor proliferated for 3 subcultures on media containing BA 0.7 (mg l⁻¹) or mT (0.5; 1.0 or 1.5 mg l⁻¹). Values are expressed as mg/g fw ± SE.

callo, non hanno prodotto rigenerazioni avventizie (fig. 3 A). Tre settimane dopo il trasferimento alla luce, gli espianti di entrambi i portinnesti pre-trattati con *mT* hanno, invece, iniziato a produrre germogli avventizi sui calli formati a livello dei piccioli (fig. 3 B). Sia in Ferdor che in Torinel il miglior risultato, rispettivamente il 67% e il 42% di rigeneranti, è stato ottenuto applicando il pre-trattamento *mT* 0,5 mg l⁻¹



Fig. 3 - Espianti di Ferdor sul terreno di rigenerazione contenente TDZ. A) espianti provenienti da fase di moltiplicazione con BA (0,7 mg l⁻¹) o B) mT (0,5 mg l⁻¹).

Fig. 3 - Ferdor explants on regeneration medium containing TDZ. A) explant from control medium (BA); B) explant from pre-conditioning medium (mT 0.5 mg l⁻¹)

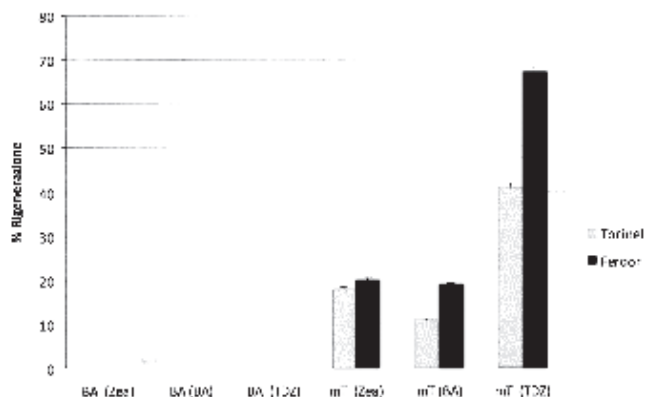


Fig. 4 - Percentuale di foglie formanti germogli avventizi (% rigenerazione \pm ES) in Torinel e Ferdor sui diversi terreni di rigenerazione (Zea, BA, TDZ). Gli espianti utilizzati provengono da germogli coltivati su BA ($0,7 \text{ mg l}^{-1}$) o *mT* ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$).

Fig. 4 - Leaves (% \pm SE) forming adventitious shoots in Torinel and Ferdor on different regeneration media (Zea, BA, TDZ). Explants excised from shoots cultured on BA ($0,7 \text{ mg l}^{-1}$) or on *mT* ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$).

in fase di condizionamento e TDZ nelle fasi di induzione ed espressione della rigenerazione avventizia (fig. 4). I nostri risultati sembrano suggerire che il condizionamento con *mT* dei germogli possa influenzare e stimolare l'organogenesi, ipotesi peraltro supportata, per altre specie, da dati di letteratura (Dobrzenski, 2002; Strnad, 1997). L'effetto positivo del TDZ sulla morfogenesi, concorda con quanto riportato in letteratura anche per altre specie del *Prunus* (Pérez-Tornero et al., 2000; Espinosa et al., 2006; Petri e Scorza, 2009).

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno evidenziato l'effetto positivo del *mT* sulla qualità degli espianti di *Prunus* nella fase di moltiplicazione *in vitro* e sulla successiva rigenerazione avventizia degli espianti fogliari derivanti dai germogli moltiplicati su *mT*.

Riassunto

Germogli di due portinnesti del *Prunus*, Torinel (*Prunus domestica*, L.) e Ferdor (*Prunus insititia x domestica*), sono stati moltiplicati *in vitro* in un terreno contenente $0,7 \text{ mg l}^{-1}$ di BA (controllo) o varie concentrazioni ($0,5$ - $1,0$ - $1,5 \text{ mg l}^{-1}$) di *meta-topolin*, *mT*, (condizionamento), una citochinina aromatica di origine naturale. Per indurre rigenerazione avventizia da germogli coltivati su BA $0,7 \text{ mg l}^{-1}$ o pre-trattati con *mT* $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ sono state prelevate foglie apicali e coltivate al buio per 10 giorni su tre terreni contenenti BA, Zea o TDZ in combinazione con NAA.

Successivamente il materiale è stato trasferito alla luce e sub-colturato ogni due settimane sui terreni in assenza di NAA. Dopo 3 sub-culture gli espianti coltivati su *mT* presentavano migliore sviluppo, un tasso di proliferazione e un contenuto in clorofilla totale più elevati rispetto al controllo. Il condizionamento degli espianti si è rivelato fondamentale anche per la successiva fase di rigenerazione: in entrambi i portinnesti solo le foglie provenienti da germogli trattati con *mT* hanno mostrato formazione di germogli avventizi. La formazione più elevata (67%) è stata ottenuta in Ferdor con un pre-trattamento dei germogli con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ di *mT* e una fase di rigenerazione su TDZ ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$).

Parole chiave: clorofilla, micropropagazione, pre-trattamento, rigenerazione avventizia

Bibliografia

- AREMU A. O., BAIRU M. W., DOLEZAL K., FINNIE J. F., VAN STADEN J. 2012. *Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges?* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 108: 1-16.
- BROWN D.C.W., THORPE T.A., 1995. *Crop improvement through tissue culture* World J. Microb. Biotech. 11: 409-415.
- DOBRAŃSZKI J., MAGYAR-TÁBORI K., JÁMBOR-BENCZÚR E., KISS E., LAZÁNYI J., BUBÁN T. 2002. *Effect of conditioning apple shoots with meta-topolin on the morphogenic activity of in vitro leaves.* Acta Agronomica Hungarica, 50: 117-126.
- ESPINOSA A.C., PIJUT P.M., MICHLER C.H. 2006. *Adventitious shoot regenerations and rooting of Prunus serotina in vitro cultures.* HortScience 41(1): 193-20.
- INSKEEP W.P., BLOOM P.R., 1985. *Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% acetone.* Plant Physiol. 77: 483-485.
- MACKINNEY G., 1941. *Absorption of light by chlorophyll solutions.* Journal of Biological Chemistry, 140: 513-531.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco.* Tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NAS M. N., BOLEK Y., SEVGİN N. 2010. *The effects of explant and cytokinin type on regeneration of Prunus microcarpa.* Sci. Hort. 126: 88-94.
- PÉREZ-TORNERO, O., EGEA J., VANOOSTENDE A., BURGOS L. 2000. *Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot.* Plant Sci. 158: 61-70.
- PETRI C., SCORZA R. 2009. *Factors affecting adventitious regeneration from in vitro leaf explants of "Improved French" plum, the most important dried plum cultivar in the USA.* Annals of Applied Biology, ISSN 0003-4746.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., BOXUS P.H. 1977. *Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux.* In: Compte Rendu des recherches 1976-1977. Station de cultures fruitières et maraichères, 93-117.
- STRNAD M., HANUS J., VANEK T., KAMÍNEK M., BALLANTINE J. A., FUSSELL B., HANKE D. E. 1997. *Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (Populus x Canadensis Moench., CV. Robusta).* Phytochemistry 45(2): 213-218.

Relazioni tra tolleranza alla salinità e accumulo di acido abscissico in cultivars di *Vitis vinifera* sottoposte a stress salino *in vitro*

Girolamo Russo^{2*}, Venturino Bisignano¹ e Giovan Battista Polignano¹

¹ CNR -IGV Istituto di Genetica Vegetale, Bari

² Dipartimento Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università di Bari

Relationships between salt tolerance and abscisic acid accumulation *in vitro* stressed *Vitis vinifera* cultivars

Abstract. In Apulia region the vegetative growth and yield of table and wine grapes are affected by the saline irrigation water. Selection of tolerant genotypes might be one of strategies to reduce the negative effect of salinity on grapevines. In order to determine the relationships among salt tolerance, leaf senescence and abscisic acid (ABA) accumulation the performances of *Vitis vinifera* cultivars under *in vitro* osmotic stress were investigated. Tissue culture is an excellent tool for salt stress tolerance without the effects of soil heterogeneity and environmental variation. Shoot tips of different *Vitis vinifera* cultivars were grown at increasing NaCl concentrations (0, 80 mM). The fresh and dry weights of shoots as well as their ABA content were determined after 45 days of *in vitro* culture. Leaf color change of basal leaves, an index of plant senescence, was measured. At any NaCl concentration the results reveal a reduction in weight of fresh and dry shoots and an increasing of endogenous ABA content. The ABA content in genotypes was determined only at 0 mM and 40 mM NaCl; it ranges from 130.03 and 422.50 ng/g in the control and 257.67 and 980.17 ng/g at 40 mM NaCl. The highest ABA contents were found in cv Inzolia among table grapes, cv Bombino bianco among wine grapes and Riparia Gloire among rootstocks. Low correlation ($r=0.20$) was observed between the ABA content and shoot growth, but further investigations are needed in *Vitis* to assess the relationships to salt stress between *in vitro* culture of shoots and field response of plants.

Key words: salt tolerance, abscisic acid, *Vitis vinifera* L.

Introduzione

La coltivazione della vite nel mondo si estende su circa 8 milioni di ettari, 2/3 dei quali sono localizzati in Europa. L'Italia è il Paese con la maggior produzione di uva da vino e da tavola: in tutte le regioni e le province si coltiva la vite. In Puglia, lo sviluppo vegetativo, la produzione e altre caratteristiche dell'uva da tavola e da vino sono influenzate dalla salinità delle acque d'irrigazione e la selezione di genotipi tolleranti potrebbe essere una delle strategie più efficaci per ridurre gli effetti negativi. Allo scopo di determinare le correlazioni tra tolleranza allo stress salino, senescenza fogliare e accumulo di acido abscissico (ABA) sono stati investigati i comportamenti di espianti di cultivars di *Vitis vinifera* allevati *in vitro* in condizioni di stress osmotico. Come riportato da numerosi autori (Singh et al. 2000, Khawale et al. 2003, Cavagnaro et al. 2006, Alizadeh et al. 2010), le colture *in vitro* rappresentano un valido strumento d'indagine per ricerche riguardanti la tolleranza a stress salini per evitare gli effetti negativi dovuti all'eterogeneità del suolo e alla variazione dei parametri ambientali.

Materiali e metodi

Apici vegetativi di 15 cultivars di uve da tavola e da vino (*Vitis vinifera* L.) e di 2 portainnesti (*Vitis riparia* e *Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri*) (tab.1) sono stati allevati su un mezzo di coltura di Murashige e Skoog (1962) opportunamente modificato per la propagazione della vite (Fanizza *et al.*, 1984) e addizionato di fitoregolatori in relazione ai differenti stadi di coltura. Le condizioni di stress salino sono state simulate mediante aggiunta nel mezzo base di dosi crescenti di sale pari a 0, 20, 40, 60, 80 mM di NaCl. Sono state effettuate 3 ripetizioni per ogni trattamento; per ogni genotipo e per ogni trattamento sono stati esaminati 12 espianti. I pesi freschi e quelli secchi (a seguito di liofilizzazione) dei germogli così come il loro contenuto in acido abscissico (ABA) sono stati misurati dopo 45 giorni di allevamento *in vitro* a tem-

* girolamo.russo@agr.uniba.it

peratura costante (24 ± 1 °C) e fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio con una intensità luminosa di 4.000 lux. Il contenuto di acido abscissico libero fisiologicamente attivo [2-cis(+)-ABA] è stato determinato con tecnica *RadioImmunoAssay* (RIA) in fase liquida utilizzando un anticorpo monoclonale ABA specifico secondo la metodica proposta da Quarrie (1993); tutti i valori riportati sono riferiti a sostanza secca. Inoltre è stata determinata la variazione del colore delle foglie basali dei germogli, mediante uno strumento leaf greenness meter SPAD-501 Minolta. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi univariata.

Risultati e conclusioni

I risultati hanno rivelato una riduzione del peso fresco e del peso secco dei germogli sottoposti a stress osmotici crescenti con diminuzione evidente del peso e diffusi fenomeni necrotici degli espianti dopo trattamento a 60 e 80 mM di NaCl (figg. 1 e 2; tab. 1). A quest'ultima concentrazione si è osservato quasi un

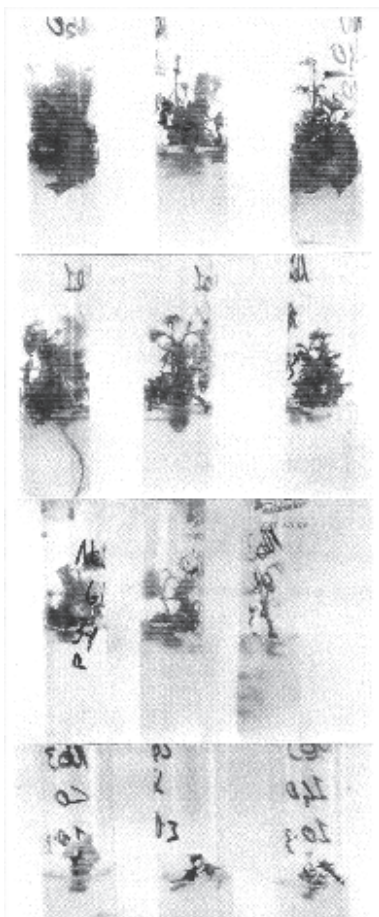


Fig. 1 - Dall'alto in basso: controllo, NaCl 20 mM, NaCl 40 mM, NaCl 60 mM; da sinistra a destra: il portinnesto 140 Ruggeri, la cv Baresana e la cv Malvasia Nera.

Fig. 1 - From top to bottom: control, 20 mM NaCl, 40 mM NaCl, 60 mM NaCl; from left to right: rootstock 140 Ruggeri, cv Baresana and cv Malvasia Nera.

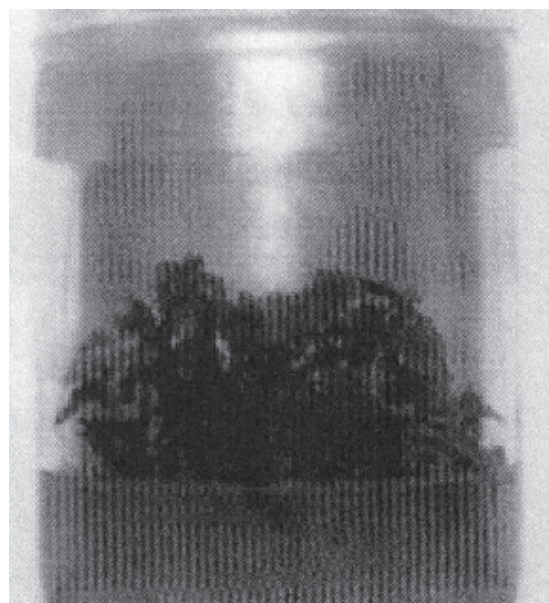


Fig. 2 - Germogli di vite non sottoposti a stress salino (NaCl 0 mM)
Fig. 2 - 'Control' salt free grape shoots (0 mM NaCl).

Tab. 1 - Valori medi del peso fresco (g) e del peso secco (g) dei germogli di tutti i genotipi di *Vitis* saggiate allevate *in vitro* sottoposti a concentrazioni crescenti (0-80 mM) di NaCl.

Tab. 1 - Fresh and dry weight mean values (g) of all the tested grape shoots grown *in vitro* under increasing (0-80mM) NaCl treatments.

Trattamenti (NaCl mM)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)
0	3,829 a*	0,189 a
20	3,365 ab	0,188 a
40	3,209 b	0,160 b
60	2,966 b	0,155 b
80	1,978 c	0,101 c

*I valori della stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti allo 0,01 P (MSD).

dimezzamento dei valori medi dei pesi dei germogli: 1,978 g per il fresco e 0,101 g per il secco rispetto ai 3,829 g e 0,189 g del controllo. A seguito di stress salino indotto da 40 mM di NaCl, ad eccezione della cv Malvasia nera, si è chiaramente osservato un aumento del contenuto endogeno di acido abscissico nei germogli di tutti i genotipi testati confermando che questo sesquiterpenoide monociclico è coinvolto nella regolazione dell'espressione di geni indotti da stress e che conferisce alla pianta l'adattabilità alla siccità, alla salinità, al freddo ed altri stress ambientali (Bray 2002, Vilarò *et al.*, 2006). Il contenuto in ABA fogliare è stata determinato nel controllo ed a 40 mM di NaCl (pari a 2,32 g/l) in quanto molto vicino alla concentrazione salina delle acque salmastre costiere usate per l'irrigazione delle vigne in Puglia. Nel controllo è stato ritrovato un più basso contenuto in ABA endogeno con valori variabili da 130,03 ng/g nella cv Negro amaro ad un massimo di 422,50 ng/g nella cv

Bombino bianco; in condizioni di stress salino sono stati trovati valori più alti variabili da 257,67 ng/g sempre nella cv Negro amaro a 980,17 ng/g nel portainnesto Riparia Gloire. A 40 mM di NaCl la cv Bombino bianco tra le uve da vino, la cv Inzolia tra le uve da tavola ed il portainnesto Riparia Gloire sono risultate con il più alto contenuto in ABA con valori rispettivamente di 602,57; 858,50 e 980,17 ng/g di sostanza secca (tab. 2). Inoltre l'analisi statistica ha evidenziato una bassa correlazione ($r=0,20$) tra contenuto in ABA e crescita dei germogli. Lo studio della variabilità di caratteri morfo-fisiologici come il peso fresco e peso secco dei germogli, l'intensità di colorazione delle foglie e di caratteri biochimici quali il contenuto endogeno in acido abscissico in condizioni di stress salino a concentrazioni crescenti di NaCl in genotipi del genere *Vitis* risulta di indubbio interesse nel miglioramento genetico per programmi di incroci e successiva selezione per resistenza alla salinità. Sono necessarie al contempo ulteriori ricerche ed analisi dei fenomeni conseguenti a stress salini *in vitro* in condizioni standard di laboratorio per poterli più strettamente correlare con quelli osservati in pieno campo su piante adulte in risposta allo stress salino da NaCl in situazioni ambientali molto più variabili e non facilmente riproducibili (Bisignano e Fanizza, 1995).

Tab. 2 - Valori medi del contenuto fogliare di acido abscissico (ng/g peso secco) in cultivar di uve da vino (V), da tavola (T) e in portainnesti (P) dopo 45 giorni di allevamento *in vitro* a concentrazioni di 0 e 40 mM di NaCl.

Tab. 2 - Mean values of abscisic acid leaf content (ng/g dry weight) in wine (V) table (T) and rootstocks (P) grapes after 45 days *in vitro* culture at 0 and 40 mM NaCl concentrations.

Cultivar	Acido abscissico (ng/g peso secco)	
	NaCl 0	NaCl 40
Bombino bianco (V)	422,50 a*	602,57 cdf
Malvasia bianca (V)	371,43 ab	456,57 ef
Malvasia nera (V)	352,43 abc	345,57 fg
Montepulciano (V)	270,93 bcd	515,17 def
Negro amaro (V)	130,03 f	257,67 g
Pampanuto (V)	171,20 def	387,57 fg
Primitivo (V)	259,17 cd	358,20 fg
Sangiovese (V)	386,10 a	611,47 cde
Trebbiano (V)	208,07 def	489,10 def
Trebbiano dorato (V)	185,30 def	635,67 cd
Uva di Troia (V)	174,37 def	353,30 fg
Baresana (T)	253,50 cde	422,30 fg
Inzolia (T)	270,60 bcd	858,50 b
Regina bianca (T)	323,17 abc	463,53 ef
Regina nera (T)	140,63 ef	270,83 g
140 Ruggeri (P)	173,13 def	740,27 c
Riparia gloire (P)	195,77 def	980,17 a

*I valori della stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti allo 0,01 P (MSD).

Riassunto

In Puglia la produzione e altre caratteristiche dell'uva da tavola e da vino sono influenzate dalla salinità delle acque d'irrigazione. Allo scopo di determinare le correlazioni tra tolleranza allo stress salino e accumulo di acido abscissico sono stati investigati i comportamenti dei germogli di 15 cvs di *Vitis vinifera* L. di uve da tavola e da vino e di 2 portainnesti. Apici vegetativi sono stati allevati a concentrazioni crescenti di NaCl (0-80 mM). I pesi freschi e secchi dei germogli e il contenuto in ABA sono stati determinati dopo 45 giorni di coltura. A concentrazioni saline crescenti si è osservato una riduzione del peso fresco e del peso secco dei germogli e valori decisamente più elevati del contenuto endogeno di ABA.

Bibliografia

- ALIZADEH M., SINGH S.K., PATEL V.B., BHATTACHARYA R.C. AND YADAV B.P., 2010. *In vitro* responses of grape rootstocks to NaCl. *Biologia Plantarum* 54, 381-385.
- BISIGNANO V., FANIZZA G., 1995. Osservazioni preliminari sulla risposta *in vitro* a stress salino da NaCl in *Vitis*. *Italus Hortus* vol.2(3), 3-7.
- BRAY E.A., 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Environ.* 25, 153-161.
- CAVAGNARO J.B., PONCE M.T., GUZMAN J., CIRRINCIONE M.A., 2006. Argentinean cultivars of *Vitis vinifera* grow better than European ones when cultured *in vitro* under salinity. *BioCell* 30, 1-7.
- FANIZZA G., TANZARELLA O.A., CARROZZO G., GRECO B., 1984. Influence of *Vitis* source in *in vitro* shoot apex culture. *Ann.Appl.Biol.* 104, 577-578.
- KHAWALE R.N., SINGH S.K., PATEL V.B., SINGH S.P., 2003. Changes due to *in vitro* sodium chloride induced salinity in grape (*Vitis vinifera* L.). *Indian J. Plant Physiol.* (Special issue) 28, 378-382.
- LEBRUN L., RAJASEKARAN K. AND MULLINS M.G., 1985. Selection *in vitro* for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of Botany* 56, 733-739.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiology Plantarum* 15, 473 - 497.
- QUARRIE S.A., 1993. RIA protocol for ABA measurement with MAC62/MAC252. Cambridge Laboratory, Norwich, UK.
- SINGH S.K., SHARMA H.C., GOSWAMI A.M., DUTTA S.P., SINGH S.P., 2000. *In vitro* growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biol. Plant.* 6, 283-286.
- SWAMY P. M. AND BRUCE N. SMITH, 1999. Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Current Science Bangalore* ias. ac. in.
- VILARO' F., CANELA-XANDRI A., CANELA R., 2006. Quantification of abscisic acid in grapevine leaf (*Vitis vinifera*) by isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 306-312.
- ZHANG J., JIA W., YANG J., ISMAIL A.M., 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop Research* 97, 111-119.

Trasformazione genetica di *Medicago truncatula* con vettori P-DNA e selezione *in vitro* di eventi *backbone-free*

Massimo Confalonieri^{1*}, Alma Balestrazzi², Caius Rommens³, Giorgio Giraffa¹, Kathy Swords⁴ e Daniela Carbonera²

¹ CRA-FLC Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggere e Lattiero-Casearie, Lodi

² Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia

³ Simplot Plant Sciences, J. R. Simplot Company, Boise (USA)

⁴ Syngenta Seeds AG, Basel (Svizzera)

Genetic transformation of *Medicago truncatula* with P-DNA vectors and *in vitro* selection of “backbone-free” events

Abstract. Most genetically modified plants obtained with conventional genetic transformation systems contain undesired DNA sequences originating from either bacteria or viruses. To limit the presence of foreign DNA in genetically engineered plants, we have recently started an investigation aimed at producing intragenic plants of *Medicago truncatula* by testing a new vector system containing a P-DNA (Plant-derived transfer DNA) region carrying only plant-derived regulatory and coding sequences.

Key words: *ipt*, *Medicago truncatula*, P-DNA technology.

Introduzione

Le sequenze introdotte finora nelle piante geneticamente modificate (PGM) diffuse sul mercato sono prevalentemente di origine batterica e virale. La diffidenza dell'opinione pubblica e degli enti governativi per quanto riguarda le differenze tra PGM e le loro controparti naturali ha spinto i ricercatori a elaborare nuove strategie molecolari che limitano, ma non eliminano, l'introduzione di DNA esogeno nelle piante coltivate. Le conoscenze attualmente disponibili sui geni vegetali e sulla loro organizzazione molecolare sono sufficientemente estese da fornire valide alternative. Per evitare la presenza di sequenze indesiderate di origine non vegetale nelle PGM, sono stati proposti e sperimentati una nuova serie di vettori che contengono

una regione P-DNA (*Plant-derived transfer DNA*) costituita esclusivamente da elementi genetici (promotore, gene di interesse e terminatore) di origine vegetale, fiancheggiata da due sequenze “RB-like” di origine vegetale in grado di attivare la mobilitazione del costrutto dalle cellule di *Agrobacterium tumefaciens* alle cellule vegetali (Rommens *et al.*, 2007). In tali vettori è stato inoltre impiegato il gene marcatore morfologico *ipt* di *A. tumefaciens* che, a causa del fenotipo anomalo ad esso associato, consente di evidenziare durante la coltura *in vitro* gli eventi indesiderati di trasferimento genico di porzioni di DNA di origine batterica esterne al P-DNA. Scopo del lavoro è stato quello di verificare l'efficacia in *Medicago truncatula* di tale sistema di vettori per la produzione di piante intrageniche.

Materiali e metodi

Si è proceduto con una serie di esperimenti di trasformazione genetica stabile utilizzando il genotipo M9-10a di *M. truncatula*, genotipo selezionato per l'elevata attitudine alla rigenerazione *in vitro* e alla trasformazione genetica (Araujo *et al.*, 2004) ed il ceppo disarmato di *A. tumefaciens* EHA105 pSIM843 (Rommens *et al.* 2004; Confalonieri *et al.*, 2010). Il vettore pSIM843 è derivato dal vettore binario pBI121 e contiene una regione P-DNA fiancheggiata da due sequenze RB-like isolate dal genoma di *Medicago sativa* che sostituiscono le sequenze RB e LB trovate nel T-DNA di *A. tumefaciens*. All'interno della regione P-DNA è presente una cassetta di espressione che comprende il gene *nptII* mentre al suo esterno è presente una cassetta di espressione per il gene *ipt* di *A. tumefaciens*. I protocolli di trasformazione genetica e di caratterizzazione molecolare (analisi PCR) utilizzati nella sperimentazione sono stati descritti da Confalonieri *et al.* (2009).

* massimo.confalonieri@entecra.it

Risultati

In seguito a trasformazione genetica di *M. truncatula* con il ceppo EHA105 pSIM843 sono state rigenerate *in vitro* diverse linee di germogli kanamicina-resistenti caratterizzate da fenotipo normale ed anormale (*ipt-shooty*). Per quanto riguarda l'efficienza di trasformazione, i risultati ottenuti con il vettore pSIM843 sono migliori a quelli ottenuti in *M. truncatula* con vettori convenzionali (Confalonieri *et al.*, 2009). Sulla base della sola selezione visiva è stata rilevata una frequenza di eventi di trasformazione *backbone-free*, ossia privi di sequenze indesiderate del vettore, pari al 58.1%. La caratterizzazione molecolare mediante analisi PCR ha consentito una valutazione più affidabile in quanto ha permesso l'individuazione di eventi di trasferimento di sequenze indesiderate del vettore non identificabili attraverso lo screening visivo delle linee trasformate abbassando la frequenza ad un valore del 44.2%.

Conclusioni

E' stata dimostrata l'effettiva funzionalità delle sequenze P-DNA di *Medicago sativa* nella specie affine *Medicago truncatula*. Tali sequenze sono state in grado di supportare efficacemente la mobilizzazione del DNA dalle cellule di *A. tumefaciens* alle cellule vegetali. Utilizzando come marcatore morfologico il gene *ipt* e con l'ausilio dell'analisi molecolare siamo altresì riusciti a selezionare gli eventi di trasformazione *backbone-free*. Sono attualmente in corso di isolamento e di caratterizzazione funzionale nuove regioni regolatrici di *Medicago* spp. che potranno essere utilizzate per predisporre vettori per la trasformazione con opportuni geni d'interesse.

Riassunto

La maggior parte delle piante geneticamente modificate ottenute con sistemi convenzionali di trasferimento genico contengono sequenze indesiderate di origine batterica e virale. Al fine di limitare nella pianta l'inserimento di sequenze di origine non vegetale, è stato recentemente avviato uno studio per la produzione di piante intrageniche di *Medicago truncatula* impiegando un nuovo sistema di vettori che contengono una regione P-DNA (*Plant-derived transfer DNA*) costituita esclusivamente da elementi genetici di origine vegetale.

Parole chiave: *ipt*, *Medicago truncatula*, tecnologia P-DNA.

Bibliografia

- ARAUJO S.S., DUQUE S.R.L., SANTOS D.M.M.F., FEVEIREIRO M.P.S., 2004. *An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of Medicago truncatula cv Jemalong*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 120: 189-197.
- CONFALONIERI M., CAMMARERI M., BIAZZI E., PECCHIA P., FEVEIREIRO M.P.S., BALESTRAZZI A., TAVA A., CONICELLA C., 2009. *Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (Medicago truncatula Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOX1) gene*. Plant Biotech. J. 7: 172-182.
- CONFALONIERI M., BORGHETTI R., MACOVEI A., TESTONI C., CARBONERA D., FEVEIREIRO M.P.S., ROMMENS C., SWORDS K., PIANO E., BALESTRAZZI A., 2010. *Backbone-free transformation of barrel medic (Medicago truncatula) with a Medicago-derived transfer DNA*. Plant Cell Rep. 29: 1013-1021.
- ROMMENS C.M., HUMARA J.M., YE J., YAN H., RICHAEI C., ZHANG L., PERRY R., SWORDS K., 2004. *Crop improvement through modification of the plant's own genome*. Plant Physiol. 135:421-431.
- ROMMENS C.M., 2007. *Intragenic crop improvement: combining the benefits of traditional breeding and genetic engineering*. J. Agric. Food Chem. 55: 4281-4288.

Miglioramento genetico dell'elleboro mediante tecniche *in vitro*

Margherita Beruto¹, Alessandro Bisignano¹, Serena Viglione¹ e Paolo Curir²

¹ IRF- Istituto Regionale per la Floricoltura, Sanremo (IM)

² CRA-FSO- Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

Il fenomeno della globalizzazione nel settore florovivaistico ha favorito la diffusione delle coltivazioni in diverse aree mondiali. Tale situazione ha posto i produttori dell'area Mediterranea, prima detentori di una eminente posizione derivata dal clima temperato invernale e buone condizioni di luminosità, sotto una forte pressione competitiva. L'utilizzo di prodotti innovativi e di alta qualità è quindi diventato fondamentale per la stessa sopravvivenza delle aziende. Lo sviluppo di tali prodotti, tuttavia, richiede attività di ricerca ed una forte interazione tra pubblico-privato e lungo la catena produttiva. Per anni lo sviluppo di nuovi prodotti si è rilevato, nel nostro Paese, piuttosto sporadico e frammentario. L'esigenza di poter disporre di prodotti innovativi impone che sia sviluppato un sistema di trasferimento dell'innovazione in accordo al modello "di relazione". In tale schema, è presente una stretta interazione pubblico-privato finalizzata a sviluppare le diverse fasi necessarie all'affermazione di un nuovo prodotto: (1) Selezione di nuovi genotipi; (2) Messa a punto di un efficiente sistema di propagazione; (3) Programmazione e produzione della coltivazione al fine dell'ottenimento del prodotto finale; (4) Trasporto verso i mercati internazionali di riferimento; (5) Vendita e verifica del gradimento del prodotto finale. L'IRF, Istituto Regionale per la Floricoltura, è un Ente di ricerca applicata della Regione Liguria volto a fornire supporto al mondo produttivo ivi operante attraverso la promozione e la realizzazione di ricerche volte all'ottenimento di innovazioni di pro-

dotto e processo. Particolare attenzione è stata riservata allo studio di diverse *Ranunculaceae*, e.g. ranuncolo, anemone, peonia, in quanto tale famiglia presenta numerose specie di alto valore ornamentale e con scarse esigenze di coltivazione, fattore quest'ultimo che riduce i costi di produzione e rende le diverse specie adattabili a diversi ambienti pedoclimatici. *Helleborus* è uno dei generi di questa famiglia più attraente, con circa 20 specie che sono native dell'Europa sud-orientale. Recentemente, il settore del florovivaismo ha mostrato un interesse crescente per tale specie, commercializzata sui mercati olandesi come fiore reciso e vaso fiorito. La ricerca presentata nel lavoro ha lo scopo di sviluppare la coltura dell'elleboro in clima mediterranei, vagliando anche una possibile produzione per foglia recisa. L'IRF dispone attualmente di un campo di piante madri derivate da una primaria serie di linee di incrocio e di diverse campionature di semenzali per un totale di 34 linee in osservazione e relativa progenie. Alcune linee sono state trasferite in campi sperimentali allestiti presso la produzione locale e paiono meritori alla valutazione agronomica-commerciale. E' stato sviluppato un protocollo di micro-propagazione che ha permesso di ottenere cloni in grado di arrivare alla fioritura dopo 10-12 mesi dall'acclimatazione. Nel corso della presentazione verranno illustrate le diverse fasi del processo e saranno presentati i risultati preliminari ottenuti dall'applicazione della tecnica di embryo-rescue utilizzata su 12 linee selezionate per le meritorie caratteristiche.

Lavoro finanziato in ambito del Progetto INNORNA, Bando Florovivaismo, Mi.PAAF, D.M. 11065/7643/09

Micropropagazione da semi germinati *in vitro* di *Rosa hybrida* L.

Fulvio Dente¹, Annalisa Giovannini¹, Arianna Cassetti¹, Gian Guido Ghione², Andrea Mansuino² e Valentina Scariot³

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

² Nirp International di Luciano Ghione e Figli, s.s., Fraz. Bevera, Ventimiglia (IM)

³ Dipartimento Agroselviter, Università di Torino

La micropropagazione di varietà commerciali di *Rosa hybrida* L. al CRA-FSO è iniziata nel 1982, presso l'allora Istituto Sperimentale per la Floricoltura, per valutare la possibilità di propagazione clonale su larga scala, utilizzando espianti nodali. In questo lavoro è stato messo a punto un protocollo di micropropagazione per consentire a semi immaturi di *Rosa hybrida* L., raccolti a tre settimane dall'incrocio e successivamente scarificati allo scopo di accelerarne la germinazione *in vitro* e ridurre i tempi di produzione delle piantine, di crescere e moltiplicare in un substrato artificiale. Due semenzali, A10 e B5, dello stesso incrocio (codice 1308), germinati *in vitro* in presenza di fitoregolatori (Caser *et al.*, questo volume), sono stati trasferiti in un substrato di coltura costituito da sali e vitamine MS Shoot Multiplication Medium, BA 0,3 mg/l, saccarosio 30 g/l, agar 8g/l, con un pH di 5,7 e mantenuti a 23°C, con un fotoperiodo di 16-h luce. Il tasso di moltiplicazione dopo 30 giorni di coltura è risultato pari a 3,2 per il semenzale A10 e di 4 per il semenzale B5. Il numero medio di germogli per espianto è raddoppiato per entrambi i

semenzali utilizzando il substrato di moltiplicazione arricchito con BA 1 mg/l e GA₃ 0,25 mg/l. I germogli sono stati coltivati sul substrato di radicazione contenente ½ sali e vitamine MS Shoot Multiplication Medium, IBA 0,1 mg/l, saccarosio 30 g/l e agar 8g/l, con un pH di 5,7. La percentuale di radicazione dopo 30 giorni è stata del 75% per A10 e del 100% per B5 e sono stati valutati il numero di radici e la lunghezza dell'apparato radicale per espianto. Le plantule radicate *in vitro*, con il germoglio di almeno 1 cm di lunghezza, sono state ambientate in serra in condizioni di elevata umidità e la percentuale di sopravvivenza è stata del 100%. Le piante sono fiorite dopo due mesi dall'ambientamento *in vivo* e ne sono state esaminate le caratteristiche del primo fiore (colore, diametro e numero di petali). La germinazione assistita, seguita da un'efficace micropropagazione, si è dimostrata uno strumento a supporto del miglioramento genetico per ottenere, dopo circa 340 giorni dall'incrocio, piante fiorite di *Rosa hybrida* L. Le piante micropropagate da semi immaturi sono in corso di valutazione presso l'Azienda Nirp.

Costituzione, selezione e propagazione di ibridi interspecifici in *Lilium*

Sara Lazzereschi, Beatrice Nesi, Simona Pecchioli e Antonio Grassotti

CRA-VIV Unità di Ricerca Vivaismo e la Gestione del Verde Ambientale ed Ornamentale, Pescia (PT)

Il *Lilium* è la bulbosa più importante in termini di valore economico tra quelle utilizzate per la produzione di fiori recisi. Di recente introduzione sul mercato sono gli ibridi OT, caratterizzati da una gamma di colori molto più ampia rispetto al colore rosa e bianco tipico degli Orientali e con una fragranza minore rispetto ad essi. Per ampliare la variabilità genetica e per rispondere alle richieste di novità del mercato, l'ibridazione interspecifica è uno strumento importante per il miglioramento genetico del *Lilium*. Presso il CRA-VIV di Pescia, è in atto un programma di miglioramento genetico con lo scopo di ottenere nuovi ibridi interspecifici di *Lilium* con caratteri interessanti dal punto di vista commerciale (es. colore, forma e dimensione del fiore, assenza di polline, etc.). A tal fine si rende necessario superare le barriere sessuali esistenti tra i parentali, e verificare l'effettiva natura ibrida degli individui ottenuti. L'utilizzo della tecnica *embryo rescue* e le potenzialità della coltura di ovari ed ovuli si sono dimostrate un valido strumento per superare tali barriere. Durante l'estate 2010 su boccioli fiorali prossimi alla fioritura, si è proceduto ad incroci diretti e reciproci tra ibridi Asiatici ('Gironde'), ibridi Orientali ('All is all', 'Nova zembla', 'Mother's choice'), ibridi di *Longiflorum* ('White haeven' e 'White triumph'), ibridi interspecifici LA ('Courier' e 'Brindisi'), alcune specie selvatiche (*L. regale*, *L. pink perfection*, *L. kiwi fanfare*) e

cloni di ibridi Asiatici selezionati da un precedente programma di miglioramento genetico. L'impollinazione è stata eseguita seguendo la tecnica del *cut-style method*, cioè praticando un taglio dello stilo a 2 mm al di sopra dell'ovario. Gli ovari, raccolti dalla pianta madre 14 giorni dopo l'impollinazione, sono stati coltivati, previa sterilizzazione, su 2 mezzi di coltura differenti denominati IAA0,5 e NAA1. Dopo 50-60 giorni, gli ovari risultati particolarmente rigonfi sono stati estratti dall'ovario e trasferiti su terreni di coltura, IBA0,5 e NAA0,1, e coltivati in cella climatica per 180 giorni al buio ad una temperatura di 21-22 °C, allo scopo di promuovere l'accrescimento degli embrioni presenti all'interno degli ovuli fecondati. La frequenza di ingrossamento degli ovari e la germinazione degli ovuli, dipendono in larga misura dall'incrocio effettuato. Per verificare la natura ibrida degli individui ottenuti, nella seconda fase del lavoro, il DNA dei nuovi individui è stato comparato con quello dei rispettivi parentali utilizzando marcatori molecolari RAPD, di semplice applicazione e già utilizzati allo stesso scopo su *Lilium* con risultati positivi, e microsatelliti (SSR), marcatori co-dominanti largamente utilizzati in molte specie per l'identificazione degli ibridi; per questi ultimi sono stati testati *primer* ottenuti per specie affini afferenti al genere *Lilium*, che hanno dimostrato un buon potere discriminante.