

Propagazione *in vitro* di *Brassica oleracea* subsp. *achephala* DC

Marco Nigro*, Vincenzo Di Michele, Anna Sgarella, Ulderico Bazzan, Angelica Barletta

HortiVeS - Banca semi e laboratori sperimentali di ricerca e conservazione di piante ortive e alimentari, Villa Cortese (MI)

***In vitro* propagation of *Brassica oleracea* subsp. *achephala* DC**

Abstract. In the perspective of the discovery and exploitation of numerous ancient varieties of Italian vegetables, the HortiVeS seed Bank undertook a study aimed to the safeguard of the great national horticultural biodiversity, and to draw up protocols for the *in vitro* propagation of some of the most interesting productive accessions. The first experimental tests were conducted on the Black curly Tuscan kale (*Brassica oleracea* subsp. *achephala* DC.). Starting from selected and pathogen-free seeds, mother plants were produced and used for taking explants (shoot tips), used for the introduction *in vitro*. The decontamination of explants was carried out using a solution of sodium hypochlorite at 1%. The *in vitro* adaptation and establishment of the culture were performed on a MS mineral substrate. The *in vitro* adaptation gave satisfactory results: the explants positively responded after only a 4-day period of culture, giving rise a first multiplication cycle. The buds gave then rise to a pool of material, used to carry out tests of multiplication on MS medium supplemented with 6-benzyladenine (BA) at the concentrations of 1.33, 2.22, 3.55 and 4.44 μM , Best proliferation was achieved with 1.33 μM BA, with a good quality of the shoots. The rooting step was carried out on hormone-free MS medium, observing a spontaneous emission of roots after 5-7 days. In order to maintain the germplasm *in vitro*, with low cost of maintenance and ready to be immediately used when necessary, we will proceed to set up a test of multiplication of Black curly Tuscan kale by identifying the best protocol for the *in vitro* conservation of the germplasm, using the technique of slow growth storage. This approach will be extremely useful for all the sterile or viviparous species or whose seeds cannot be obtained, such as garlic.

Key words: biodiversity, vegetables, germplasm, slowgrowth, seedbank.

Introduzione

Il Cavolo Laciniato Nero Toscano (fig. 1) è una varietà minore (Bianco, 2009) di cavolo da foglia tipica della Toscana. È caratterizzato da foglie lunghe di colore verde intenso (quasi nerastro negli individui adulti) con riflessi bluastrì, superficie bollosa e odore acidulo. È un ingrediente fondamentale della cucina toscana e della famosa “ribollita” (Petroni, 2010), una minestra di fagioli con pane raffermo e verdure. È varietà molto rustica e resistente alle basse temperature ed è pertanto possibile raccoglierne le foglie nei mesi invernali. Questo cavolo è conosciuto con i seguenti sinonimi: «cavolo a penna», «cavolo riccio», «cavolo palmizio» (Nigro *et al.*, 2017; Bianco e Pimpini, 1990).



Fig. 1 - Cavolo Laciniato Nero Toscano.
Fig. 1 - Black curly Tuscan kale.

* marco.nigro@hortives.it

Nell'ottica di riscoperta e valorizzazione delle numerose antiche varietà di ortaggi italiani, la Banca semi di HortiVeS ha intrapreso un piano di studio teso a salvaguardare la grande biodiversità orticola nazionale e a redigere protocolli per la moltiplicazione *in vitro* di alcune delle accessioni di maggior interesse produttivo (Nigro *et al.*, 2017). Le prime prove sperimentali sono state condotte sul Cavolo Laciniato Nero Toscano (*Brassica oleracea* subsp. *achephala* DC.).

Con queste prove, si sono volute selezionare le migliori tecniche di moltiplicazione del Cavolo Laciniato Nero Toscano in un'ottica di conservazioni *in vitro* in crescita rallentata (*Slow Growth Storage*) al fine di ridurre i costi di manutenzione rispetto alla coltura *in vitro* tradizionale (micropropagazione).

Materiali e metodi

Partendo da semi selezionati ed esenti da patogeni (Franchi Sementi Spa) sono state prodotte le piante madri in ambiente di serra controllato da cui sono stati prelevati gli espianti di partenza (getti terminali di 5-20 mm) utilizzati per la messa in coltura *in vitro*. La sterilizzazione degli espianti scelti è stata condotta utilizzando una soluzione di ipoclorito di sodio (1% di cloro attivo) per 20 minuti, seguita da due risciacqui in acqua distillata sterile da 10 minuti ciascuno. La fase di adattamento e stabilizzazione *in vitro* è stata eseguita su un substrato contenente sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), saccarosio (30 g l⁻¹) e agar (8 g l⁻¹) con un pH di 5,6±0,1 (mod. Metrohm 713 pH Meter). I vasi di coltura contenenti gli espianti sono stati posti in cella termostatica ad una temperatura costante di 24±1°C e fotoperiodo 16/8 h.

I germogli sterili ottenuti hanno dato luogo ad un *pool* di materiale con il quale si sono effettuate prove di moltiplicazione *in vitro*. I substrati utilizzati contenevano sali e vitamine secondo MS, saccarosio (30 g l⁻¹) e agar (8 g l⁻¹) con l'aggiunta di 6-benziladenina (BA) a diverse concentrazioni: 1,33 µM - 2,22 µM - 3,55 µM - 4,44 µM (pH 5,6±0,2) (Bhalla e de Weerd, 1999; Burbulis *et al.*, 2009; Daud *et al.*, 2015; Gerszberg *et al.*, 2015; Bajaj e Nietsch, 1975; Getachew, 2011).

I substrati sono stati sterilizzati in autoclave a 121±1°C per 20 minuti (mod. Asal Vapormatic 770). Come prova in bianco è stato utilizzato un substrato MS base senza l'aggiunta di fitoregolatori (MS0).

Risultati e discussione

L'adattamento al *in vitro* dei getti terminali prelevati dalle piante madri ha dato i seguenti risultati:

- gli espianti hanno risposto positivamente dopo solo 4 giorni di permanenza nel substrato;
- i materiali ottenuti nella fase di adattamento e posti sui substrati MS0 a diverse concentrazioni di BA hanno prodotto una emissione spontanea di radici a partire dai 5 giorni di coltura;
- i migliori risultati in termini di numero di espianti con germogli (fig. 2) si sono avuti a concentrazioni di 1,33 µM (87,5%) e 3,55 µM (93,8) di BA. La prova di controllo su MS ha dato una produzione spontanea di germogli;
- la media di germogli per espianto (fig. 3) migliore (5,8) è stata data dal substrato contenente BA alla concentrazione di 4,44 µM ;
- osservando il grafico con la lunghezza media dei germogli per espianto, influenzata da diverse concentrazioni di citochinina (fig. 4), si nota un calo

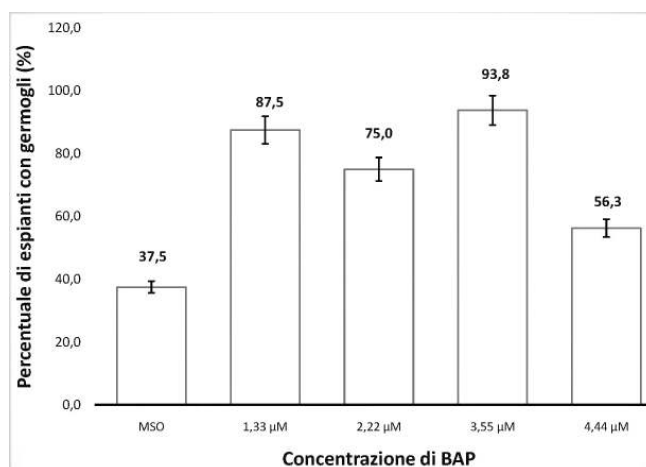


Fig. 2 - Percentuale di espianti con germogli (le barre rappresentano l'errore standard delle percentuali).

Fig. 2 - Percentage of explant with sprouts (bars represents standard errors of percentages).

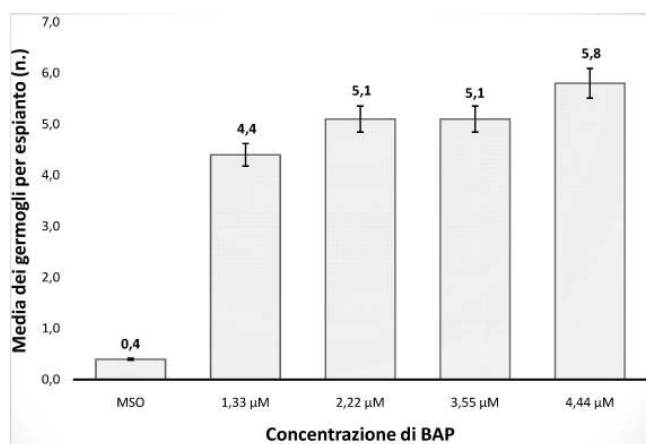


Fig. 3 - Media dei germogli per espianto (le barre rappresentano l'errore standard della media).

Fig. 3 - Shoots media for explant (bars represents standard errors of shoots media).

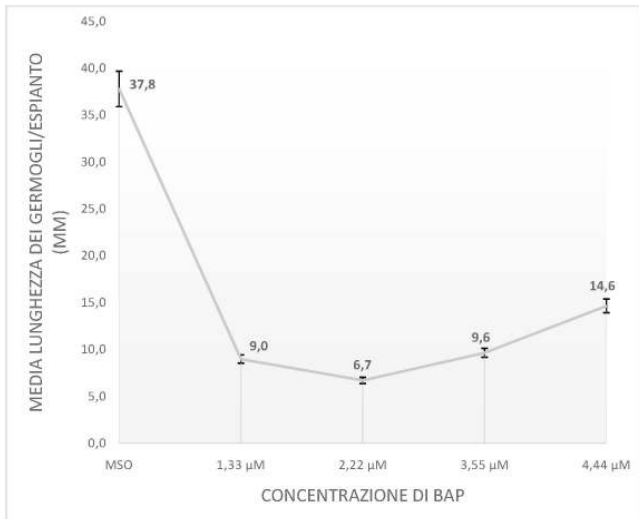


Fig. 4 - Lunghezza media dei germogli per espianto (le barre rappresentano l'errore standard della lunghezza media).

Fig. 4 - Average length of shoot for explants (bars represents standard errors of average length).

della lunghezza da concentrazioni di 1,33 µM e 2,22 µM con una ripresa modesta a concentrazioni superiori (3,55 µM e 4,44 µM). I valori maggiori di lunghezza dei germogli si sono osservati sul substrato di controllo MSO e su concentrazione 4,44 µM di BA;

- il grafico di figura 5 mostra i fenomeni di vitrescenza comparsi nelle diverse prove di moltiplicazione sotto l'influenza delle diverse concentrazioni di BA; i substrati con concentrazione pari a 2,22 µM, 3,55 µM e 4,44 µM, nonostante abbiano dato i migliori risultati in termini di moltiplicazione, sono anche quelli in cui si è riscontrato la maggior percentuale di vitrescenza su espianti, germogli (singoli e in cluster).

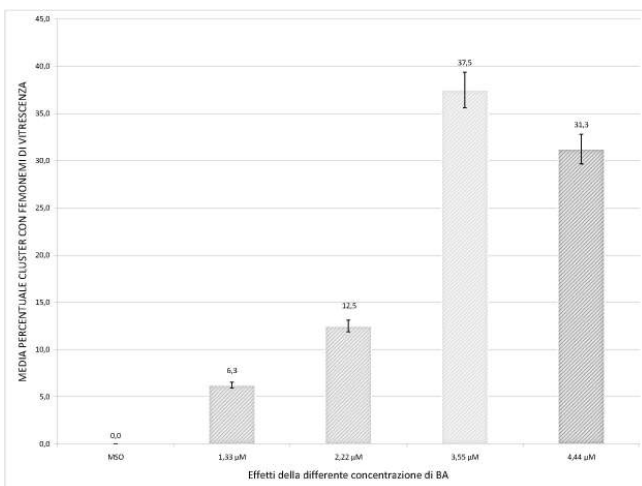


Fig. 5 - Fenomeni di vitrescenza per i diversi substrati utilizzati (le barre rappresentano l'errore standard dei fenomeni di vitrescenza).

Fig. 5 - Vitreous phenomena for the different substrates used (bars represents standard errors of vitreous phenomena).



Fig. 6. Gruppo da proliferazione di *B. oleracea* subs. *acephala*.
Fig. 6. Cluster of *B. oleracea* subs. *acephala*.

Considerando la percentuale di vitrescenza, lo sviluppo dei germogli e la proliferazione ottenuta (fig. 6) si può concludere che il substrato addizionato di BA alla dose di 1,33 µM produce complessivamente i migliori risultati.

I futuri sviluppi si incentreranno sull'individuazione del miglior protocollo per la conservazione del germoplasma *in vitro* utilizzando la tecnica della crescita rallentata (*Slow Growth Storage*), tecnica di grande utilità per tutte quelle specie sterili o vivipare o per cui non è possibile ottenere il seme (es. aglio) (Ashmore, 1997; Lambardi e Ozudogru, 2013).

Riassunto

Nell'ottica di riscoperta e valorizzazione delle numerose antiche varietà di ortaggi italiani, la Banca semi di HortiVeS ha intrapreso un piano di studio teso a salvaguardare la grande biodiversità orticola nazionale e a redigere protocolli per la moltiplicazione *in vitro* di alcune delle accessioni di maggior interesse produttivo. Le prime prove sperimentali sono state condotte sul Cavolo Laciniato Nero Toscano (*Brassica oleracea* subsp. *acephala* DC.). Partendo da semi selezionati ed esenti da patogeni, sono state prodotte le piante madri da cui è stato prelevato l'espianto di partenza (getti terminali) utilizzato per la messa in coltura *in vitro*. La decontaminazione del tessuto vegetale è stata condotta utilizzando una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% e la fase di adattamento e stabilizzazione *in vitro* è stata eseguita su un substrato nutritivo MS. I germogli senza contaminazioni invasive ottenuti hanno dato luogo ad un *pool* di materiale per effettuare prove di moltiplicazione su

substrato MS addizionato con 6-benziladenina a concentrazioni diverse che hanno consentito di ottenere una buona proliferazione alla dose di 1,33 μ M con buona qualità dei germogli.

Parole chiave: biodiversità, ortaggi, germoplasma, *slowgrowth*, *seedbank*.

Bibliografia

- ASHMORE ES., 1997. *Status reports on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources*. IPGRI, Rome, Italy
- BAJAJ Y. P. S., NIETSCH P., 1975. *In vitro Propagation of Red Cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata)*. J Exp Bot, 26 (6): 883-890.
- BHALLA P.L., DE WEERD N., 1999. *In vitro propagation of cauliflower, Brassica oleracea var. botrytis for hybrid seed production*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56 (2): 89-95.
- BIANCO V. PIMPINI F., 1990. *Orticoltura*. Ed. Pàtron.
- BIANCO V.V., 2009. *Le specie ortive minori in Italia*. Italus Hortus 16 (1): 1-21
- BURBULIS N., BLINSTRUBIENE A., KUPRIENE R., JONYTIENE V., RUGIENIUS R., STANIENE G., 2009. *In vitro regeneration of Brassica napus L. shoots from hypocotyls and stem segments*. Zemdirbyste-Agriculture, 96 (3): 176-185.
- DAUD N.F.A., HASBULLAH N.A, AZIS N.A, RASAD F.M, AMIN M.A.M, AND LASSIM M.M, 2015. *In vitro Regeneration of Brassica Oleraceae L. var. Capitata through Stems, Roots, Leaves and Petioles Culture*. International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015) in Phuket (Thailand).
- GETACHEW TAFERE ABRAHA, 2011. *In vitro propagation of ethiopian mustard (Brassica carinata A. BRAUN)*. A Thesis Submitted to the School of Natural and Computational Sciences, School of Graduate Studies Haramaya Univeristiy.
- GERSZBERG A., HNATUSZKO-KONKA K., KOWALCZYK T., 2015. *In vitro regeneration of eight cultivars of Brassica oleracea var. capitata*. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 51(1): 80 -87.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2013. *Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature*. Acta Hort., 988: 29-42.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*. Phisiol. Plant., 15: 473-497.
- NIGRO M., DI MICHELE V., SGARELLA A. BAZZAN U., 2017 - *Conservazione ex situ di antiche varietà locali di ortaggi italiani: coltura in vitro e conservazione a bassa temperatura dei semi*. Atti III Convegno Nazione sulla Micropropagazione 29-31 maggio Pescia (PT) – VitroSOI 2017.
- PETRONI P., 2010. *Il grande libro della vera cucina Toscana*. Ed. Giunti.