

Embriocoltura: uno strumento chiave per i programmi di *breeding* di ciliegio dolce presso il CREA-OFA

Simona Monticelli*, Alisea Sartori, Massimo Terlizzi, Marcello Cutuli

CREA-OFA, Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca per l'olivicoltura, la frutticoltura e l'agrumicoltura, Sede di Roma

Embryo rescue: a key tool for success of sweet cherry breeding program in CREA-OFA Centre

Abstract. In cherry, seed germination is usually poor, even if conveniently stratified and exposed to low temperature. This is a feature of early-ripening stone fruit varieties, due to the incomplete embryo development. However, in cherry, it happens also in mature embryos through the occurrence of a dormant condition. The loss of hybrids due to the germination failure of seeds obtained by crossing is a limiting factor in cherry breeding program. *In vitro* embryo rescue permits to overcome the conditions that cause the block of germination, representing an important tool in increasing the recovery of new hybrid genotypes in breeding program. Some experimental trials were carried out to define a protocol able to increase the germination rate in early and late varieties. Sterilisation, induction of germination, *in vitro* propagation, rooting and acclimatisation procedures were established and applied to seeds obtained from open pollination of the early sweet cherry cv Kronio, cv Cordadda Niedda and cv Temprana de Sot, and from the crossing cv Kronio x cv Brooks and cv Ciliegio d'Ottobre x cv Enrica, these last a late and a mid-ripening sweet cherry. Fruits from early and late varieties or crosses were respectively collected in May and July, and pitted. Dry seeds were sterilised before and after breaking the endocarps and the embryonic axes with cotyledons were cultured on half-strength MS medium supplemented with 4% of sucrose and stored at 4°C in dark after removal of the integuments. After 2-3 months they were transferred to the light at 24°C. The effect of sterilisation with ethanol and of hormones supply in the medium were evaluated relating to contamination and germination rate respectively. Ten minutes ethanol pre-sterilisation of the seeds before the breaking of the endocarps reduced to less than 5% the contamination rate. The best germination results were obtained in hormone free medium. Germination rate was from 35% to 75%. Germinating

embryos with root longer than 10 mm were directly transferred to Jiffy peat pellets and acclimatised, while those without or with little developed roots were micropropagated, rooted and acclimatised. Direct acclimatisation rate represented 82% for the cross cv Ciliegio d'Ottobre x cv Enrica embryos and around 35% for early accession's embryos, for which micropropagation seems crucial.

Key words: acclimation, micropropagation, *Prunus avium*, seed germination rate, sterilisation.

Introduzione

Tipicamente la germinazione dei semi nelle varietà precoci di drupacee è scarsa, a causa dell'incompleto sviluppo dell'embrione. In ciliegio, anche se i semi sono convenientemente stratificati a bassa temperatura, la bassa germinabilità è riscontrabile anche in embrioni maturi, a causa del verificarsi di una condizione di dormienza. Concorrono allo stabilirsi di questa condizione l'endocarpo, i tegumenti del seme, l'endosperma, i cotiledoni, l'embrione, ma anche altri fattori come l'andamento annuale delle temperature (Jensen e Eriksen, 2001). La perdita di genotipi dovuta alla mancata germinazione dei semi ottenuti da incrocio è un fattore limitante nei programmi di miglioramento genetico del ciliegio. L'embriocoltura *in vitro* permette di superare le condizioni che causano il blocco della germinazione (Tukey, 1933; Ivanička e Preťová, 1980) rappresentando uno strumento importante per incrementare l'apporto di genotipi nei programmi di *breeding* (Dulić *et al.*, 2016). Presso il CREA-OFA di Roma negli ultimi anni sono state condotte delle campagne di incrocio per l'introduzione di caratteri di precocità e tardività in ciliegio dolce. Queste hanno fornito materiale per la definizione di un protocollo in grado di incrementare il tasso di germinazione degli embrioni di ciliegio, valutando l'effetto della pre-sterilizzazione in etanolo degli endocarpi, della presenza o meno di ormoni nel terre-

* simona.monticelli@crea.gov.it

no colturale, dell'acclimatazione diretta degli embrioni germinati e del ruolo della micropropagazione per gli embrioni con scarso sviluppo radicale.

Materiali e metodi

Per le prove sono stati utilizzati: 151 semi di cv Kronio (varietà precoce, autofertile), ottenuti per libera impollinazione (K-op); 90 semi di cv Kronio, ottenuti per autofecondazione (K-sp); 48 semi di cv Kronio x cv Brooks (varietà intermedia) (KxB); 103 semi di cv Cordadda Niedda, ottenuti per libera impollinazione (CN); 171 semi di cv Temprana de sot, ottenuti per libera impollinazione (T); 282 semi di cv Ciliegio d'Ottobre (varietà tardiva) x cv Enrica (varietà intermedia) (OxE). I frutti sono stati raccolti a maturità.

Gli endocarpi sono stati immersi in candeggina commerciale al 2% di cloro attivo per 25', sciacquati in acqua sterile e, dopo l'apertura degli endocarpi, i semi sono stati nuovamente immersi in candeggina allo 0,8% di cloro attivo per 20'. Dopo il risciacquo i semi sono stati lasciati ad imbibire in acqua sterile per una notte. Metà degli endocarpi sono stati pre-sterilizzati in etanolo 70%, per 10', prima della disinfezione in candeggina al 2%.

I semi sono stati privati dei tegumenti in sterilità sotto cappa a flusso laminare. Gli embrioni sono stati posti in coltura in tubi contenenti terreno costituito da MS (Murashige e Skoog, 1962) con macronutrienti ridotti del 50%, saccarosio 4%, agar 0,6%, (B&V, Parma, Italia) a pH 6, sterilizzato a 121°C per 20'. Gli embrioni di tutti gli incroci sono stati inoculati su terreno privo di ormoni, mentre gli embrioni di K-op, K-sp, KxB sono stati coltivati in presenza di 1 mgL⁻¹ di benzilaminopurina (BAP), oppure di 1 mgL⁻¹ di meta-Topolin (mT). Gli embrioni sono stati mantenuti al buio a 4°C per 2-3 mesi e poi trasferiti a 24±2°C, fotoperiodo di 16h, con intensità luminosa di 37,5 μmol m⁻²s⁻¹ di flusso fotonico fotosinteticamente attivo.

Gli embrioni germinati di CN, T, OxE con radici di lunghezza superiore a 10 mm, sono stati trasferiti direttamente su dischi di torba Jiffy e acclimatati.

Gli embrioni con allungamento della radichetta scarso o nullo sono stati moltiplicati, previa rimozione dei cotiledoni e della radice rudimentale, su terreno contenente macronutrienti QL (Quoirin *et al.*, 1977), micronutrienti e vitamine MS, saccarosio 3%, BAP 0,4 mgL⁻¹, solfato di adenina 3 mgL⁻¹, acido indol-3-butirrico (IBA) 0,06 mgL⁻¹, acido gibberellico (GA₃) 0,03 mgL⁻¹, agar 5,6 gL⁻¹ (B&V, Parma, Italia), a pH 5,6. La radicazione dei germogli propagati è stata indotta su terreno costituito da MS con macronutrienti

ridotti del 50%, saccarosio 2%, agar 0,6%, a pH 5,6, con l'aggiunta di acido α-naftalenacetico (NAA) alla concentrazione di 1 mgL⁻¹. Una volta radicati gli espianti sono stati trasferiti su dischi di torba Jiffy e acclimatati.

I dati sono stati elaborati statisticamente con il software open source 'Past' (Hammer *et al.*, 2001), versione 2.17c, effettuando analisi della varianza tramite test di Kruskal-Wallis, seguita dal test di Mann-Whitney per la verifica della significatività delle differenze tra le mediane per p≤0,05.

Risultati

La percentuale di contaminazione degli embrioni i cui endocarpi non erano stati sottoposti a pre-sterilizzazione si è attestata intorno al 44%, mentre, in seguito a pre-trattamento in etanolo al 70% per 10', il numero di embrioni contaminati si è ridotto significativamente al di sotto del 5% (fig. 1). Nelle prove di germinazione effettuate su K-op, K-sp, e KxB si è osservata una tendenza alla riduzione della percentuale di germinazione in presenza di fitoregolatori, che diventa significativa per p≤0,05, in presenza di meta-Topolin (fig. 2). In assenza di fitoregolatori sono state ottenute le seguenti percentuali di germinazione: 12,9% per K-sp, 34% per K-op e 46,7% per l'incrocio KxB. Gli embrioni di CN, T e OxE sono stati indotti alla germinazione in assenza di fitoregolatori. La percentuale di germinazione è risultata essere compresa tra il 42%, nella cv Temprana de sot, e il 75% nella cv Cordadda Niedda (fig. 3). Gli embrioni sviluppati delle cv Cordadda Niedda e cv Temprana de sot e dell'incrocio di cv Ciliegio d'Ottobre x cv Enrica, con

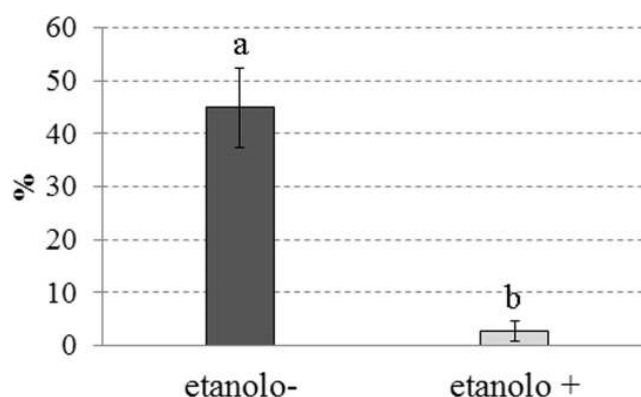


Fig. 1 - Percentuale di contaminazione di embrioni provenienti da endocarpi non trattati con etanolo (Etanolo-) o pre-trattati con etanolo (Etanolo+). Lettere differenti indicano percentuali significativamente differenti per p≤0,05 (test di Mann-Whitney).

Fig. 1 - Contamination percentage of embryos coming from endocarps not treated with ethanol 70% (Ethanol-) or pre-treated with ethanol 70% (Ethanol+). Different letters indicate percentages significantly different at p≤0,05 (Mann-Whitney test).

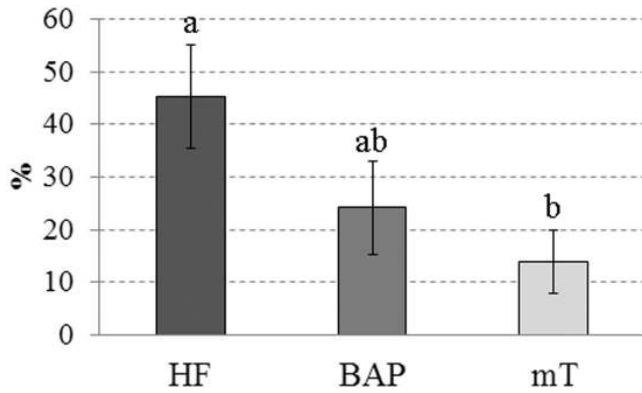


Fig. 2 - Percentuale di germinazione degli embrioni. HF : terreno di germinazione privo di fitormoni; BAP: terreno addizionato con 1 mgL⁻¹ di benzilaminopurina; mT: terreno addizionato con 1 mgL⁻¹ di meta-Topolin. Lettere differenti indicano percentuali significativamente differenti per p≤0,05 (test di Mann-Whitney).
 Fig. 2 - Embryo germination percentage. HF: hormone-free germination medium; BAP: medium supplemented with 1 mgL⁻¹ of benzylaminopurine; mT: medium supplemented with 1 mgL⁻¹ of meta-Topolin. Different letters indicate percentages significantly different at p≤0,05 (Mann-Whitney test).

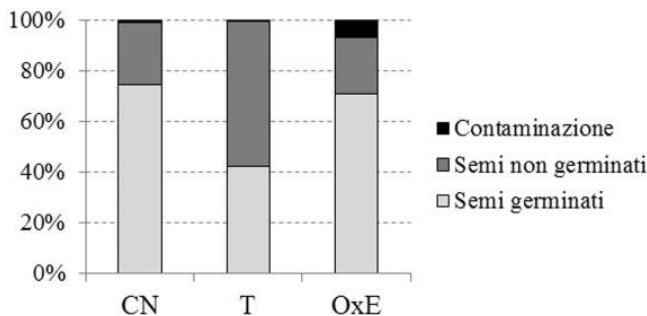


Fig. 3 - Percentuali relative di germinazione, assenza di germinazione e contaminazione degli embrioni. CN: cv Cordadda Niedda; T: cv Temprana de sot; OxE: incrocio cv Ciliegio d'Ottofre x cv Enrica.
 Fig. 3 - Embryo germination (light grey), embryo germination failure (dark grey), embryo contamination (black) percentages. CN: cv Cordadda Niedda; T: cv Temprana de sot; cross OxE: cv Ciliegio d'Ottofre x cv Enrica.

radici di lunghezza superiore a 10 mm, sono stati trasferiti direttamente su dischi di torba Jiffy e acclimatati. Gli embrioni con allungamento della radichetta scarso o nullo sono stati micropropagati, radicati e acclimatati. In alcuni casi gli embrioni micropropagati possono andare incontro a necrosi o vitrificazione. Fenomeni di questo genere, con relativa perdita di materiale, hanno interessato il 13% degli embrioni micropropagato di 'Temprana de sot' e il 22% degli embrioni micropropagati di 'Ciliegio d'Ottofre' x 'Enrica', mentre non hanno riguardato gli embrioni coltivati *in vitro* di 'Cordadda Niedda'. Il tasso di acclimatazione diretta dei semi germinati è stato dell'82% per l'incrocio cv Ciliegio d'Ottofre x cv Enrica e di circa il 35% per gli embrioni delle accessioni precoci (fig. 4).

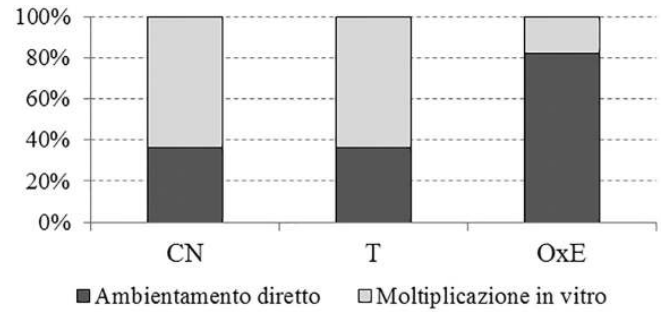


Fig. 4 - Percentuali relative di embrioni ambientati direttamente dopo la germinazione ed embrioni micropropagati, radicati e successivamente ambientati. CN: cv Cordadda Niedda; T: cv Temprana de sot; OxE: incrocio cv Ciliegio d'Ottofre x cv Enrica.
 Fig. 4 - Relative percentages of embryos directly acclimatized (dark grey) or micropropagated, rooted and then acclimatized (light grey). CN: cv Cordadda Niedda; T: cv Temprana de sot; OxE: cross cv Ciliegio d'Ottofre x cv Enrica.

Discussione e conclusioni

La coltura *in vitro* degli embrioni è attualmente il metodo più frequentemente utilizzato per superare i problemi legati alla bassa germinabilità di molte specie da frutto (Reed, 2005). Alla criticità della scarsa germinabilità va aggiunta quella della perdita di materiale per contaminazione. L'isolamento dell'embrione dai tegumenti può ridurre il potenziale d'infezione (Dulić *et al.*, 2016), purché ne sia garantita l'integrità fino al momento della rimozione. Ridurre il potenziale contaminante è fondamentale dal momento che i semi sono sottoposti a manipolazioni che possono danneggiarli. La doppia sterilizzazione adottata prima e dopo l'apertura degli endocarpi sembrerebbe non essere sufficiente a garantire una bassa percentuale di contaminazione. Viceversa, la pre-sterilizzazione degli endocarpi in etanolo ha consentito di minimizzare la perdita di materiale germinabile, al di sotto del 5%. L'uso dei fitoregolatori, come benziladenina e acido gibberellico, per l'induzione della germinazione dei semi è riportato in letteratura (Dulić *et al.*, 2016; Ivanička e Preťová, 1980). Negli esperimenti qui descritti l'uso del meta-Topolin (Aremu *et al.*, 2012), ha portato ad un significativo decremento della percentuale di germinazione, favorita invece dal trattamento con BAP e tendenzialmente ancor più in assenza di fitoregolatori. Il tasso di germinazione delle varietà e degli incroci considerati non supera il 10% con le tradizionali tecniche di stratificazione e *chilling*. L'embriocoltura ha consentito di ottenere tassi di germinazione comunque superiori, fino al 75% della cv Cordadda Niedda, che è varietà precoce. L'embriocoltura consente quindi di ottenere una elevata germinabilità a prescindere dalla precocità della varietà. Tuttavia, si è osservato uno sviluppo non sempre bipolare degli embrioni, con la radice a volte

assente o rudimentale, in particolare nelle varietà precoci. La micropropagazione risulta perciò un ottimo strumento laddove l'incompleto sviluppo dell'embrione non consentirebbe l'acclimatazione diretta. Nel caso delle cv Cordada Niedda e cv Temprana de sot, dove solo il 35% dei semi germinati può essere avviato all'ambientamento, la coltura *in vitro* permette di propagare gli epicotili, indurne la radicazione e trasferirli successivamente *in vivo*, con limitata perdita di materiale.

L'embriocoltura si conferma uno strumento fondamentale per incrementare il numero di semenzali nei programmi di miglioramento genetico in una specie a bassa germinabilità come il ciliegio dolce, consentendo di ottenere un più alto tasso di germinazione rispetto alla tradizionale stratificazione. Il ricorso alla micropropagazione, pur richiedendo più tempo, diventa necessario e cruciale laddove lo sviluppo degli embrioni è incompleto, e consente di avviare alle successive fasi di valutazione genotipi che andrebbero altrimenti persi.

Riassunto

Prove di embriocoltura condotte su materiale diverso per precocità, hanno consentito di individuare un protocollo per migliorare la percentuale di germinazione in ciliegio dolce. Gli embrioni germinati, con radici lunghe almeno 10 mm, sono stati trasferiti direttamente su dischi di torba Jiffy e acclimatati. Gli embrioni con allungamento della radichetta scarso o nullo sono stati micropropagati, radicati e acclimatati.

Il tasso di germinazione si è attestato tra il 35% e il 75%. Il tasso di acclimatazione diretta è stato dell'82% per un genotipo e di circa il 35% per altre accessioni: per queste la micropropagazione è un passaggio cruciale.

Parole chiave: ambientamento, germinazione, micropropagazione, *Prunus avium*, sterilizzazione

Bibliografia

- AREMU A.O., BAIRU M.W., DOLEŽAL K., FINNIE J.F., VAN STADEN J., 2012. *Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges?* Plant Cell Tissue and Organ Culture, 108:1–16.
- DULIĆ J., OGNJANOV V., ERCISLI S., MIODRAGOVIĆ M., BARAĆ G., LJUBOJEVIĆ M., DORIĆ D., 2016. *In vitro germination of early ripening sweet cherry varieties (Prunus avium L.) at different fruit ripening stages.* Erwerbs-Obstbau, 58:113-118.
- HAMMER Ø., HARPER D.A.T., PAUL D.R., 2001. *Past: paleontological statistics software package for education and data analysis.* Palaeontologia Electronica, vol. 4(1):1-9.
- JENSEN M., ERIKSEN E.N., 2001. *Development of primary dormancy in seeds of Prunus avium during maturation.* Seed Science & Technology, 29:307-320.
- IVANIČKA J., PREŤOVÁ A., 1980. *Embryo culture and micropropagation of cherries in vitro.* Scientia Horticulturae, 12:77-82.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures.* Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., BOXUS P., 1977. *Un premier bilan de 10 années de recherche sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux.* In: "Compte Rendu des Recherches". Station des cultures fruitières et maraichères, Gembloux, Belgium: 93-117.
- REED S.M., 2005. *Embryo rescue.* In: Trigiano e Gray eds, Plant development and biotechnology, CRS Press: 235-239.
- TUKEY H.B., 1933. *Artificial culture of sweet cherry embryos.* Journal of Heredity, 24(1):7-12.