

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

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

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

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

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

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

### Introduzione

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

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

### Materiali e metodi

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

### Risultati e discussione

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

\* paolamaria.chiavazza@unito.it

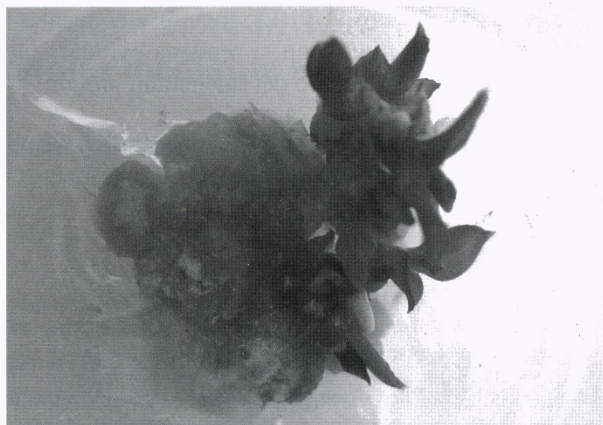


Fig. 1 - Proliferazione di callo in substrato contenente la combinazione NAA 1/BA 5 mg/l.

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

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



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

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

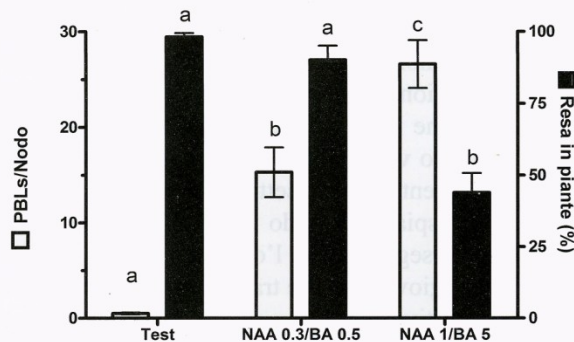


Fig. 3 - Confronto tra induzione di PBLs/nodo e resa in piante trapiantabili.

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

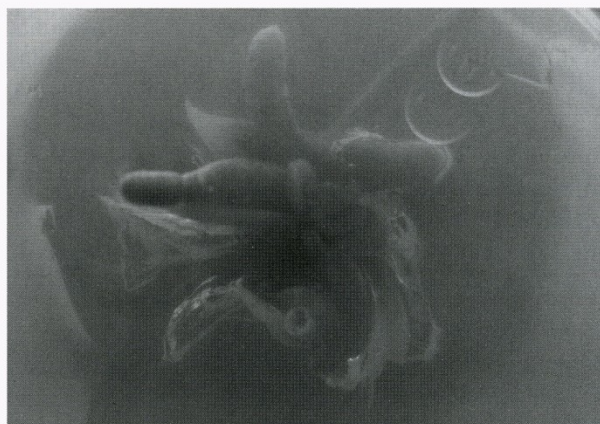


Fig. 4 - Radici in allungamento in substrato MS0.

Fig. 4 - Roots elongation in MS0 medium.

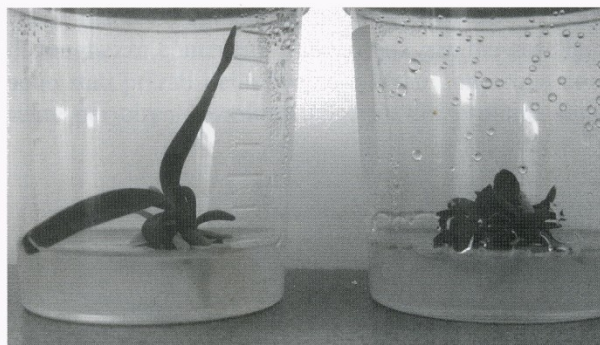


Fig. 5 - Giovani plantule al momento del trasferimento in mezzo base MS (destra) e in stadio finale di accrescimento (sinistra).

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

### Conclusioni

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

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

### Riassunto

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

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

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

### Bibliografia

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