

Applicazione della coltura *in vitro* per la salvaguardia di *Gentiana pneumonanthe*

Filippa Puglisi*, Rosalia Mantegazza

Laboratorio di Micropropagazione, Istituto Istruzione Superiore Statale "Luigi Castiglioni", Limbiate(MB)

In vitro* propagation to preserve *Gentiana pneumonanthe

Abstract. Our Institute has implemented several different solutions concerning biodiversity research, aimed at preserving rare and vulnerable autochthonous plants, such as Marsh Gentian (*Gentiana pneumonanthe*). This plant is a hemicytrophite scapose plant, which can be found in Italy in places like moors (habitat 4030) and *Molinia* meadows (habitat 6410) with decreasing populations. Moreover, Marsh *Gentiana* is also important for being the only nourishment for *Maculinea alcon*'s larvae. *In vitro* propagation's methods represent a valid alternative for recovering, multiplying and preserving *Gentiana pneumonanthe*. The propagation procedures relating to each phase of Marsh Gentian's reproduction cycle, i.e. seed sterilization, seed germination, seedling development and rooting, acclimatization, have been drawn up and optimized. Results obtained by microcutting propagation are reported as well.

Key words: biodiversity, germination, rooting, substrate, acclimatization.

Introduzione

Nell'ambito di un progetto volto a spiegare la biodiversità a scuola, il nostro Istituto ha attivato una serie di azioni atte alla tutela e salvaguardia del territorio, tra cui uno studio sperimentale che ha previsto la raccolta, moltiplicazione e conservazione di piante autoctone in via di estinzione. Tra le piante da salvaguardare c'è la *Gentiana pneumonanthe*, una specie rara di brughiere (habitat 4030) e molinieti (habitat 6410), presente sul nostro territorio con popolazioni frammentate in continuo calo e formate per lo più da individui adulti. È una pianta entomofila, in grado di autoimpollinarsi ma con ridotta dispersione dei semi, il

che la rende ancora più vulnerabile. Per la preservazione della specie si è pensato alla riproduzione *in vitro*, confidando nella validità di tale tecnica. Dopo le difficoltà iniziali dovute alle dimensioni ridotte dei semi e alla quasi assenza di letteratura in merito (Arcangeli *et al.*, 2012), sono state condotte una serie di esperienze in laboratorio che hanno portato alla formulazione di un protocollo per la riproduzione, moltiplicazione e conservazione di *Gentiana pneumonanthe*.

Materiali e metodi

Come espianti sono stati utilizzati semi di *Gentiana pneumonanthe* (fig. 1) proveniente dalla Banca del Germoplasma di Pavia suddivisi in campio-



Fig. 1 - *Gentiana pneumonanthe*.
Fig. 1 - *Gentiana pneumonanthe*.

* filippapuglisi@gmail.com

ni di 80 semi, metà dei quali sono stati sottoposti a vernalizzazione prima della sterilizzazione (fig. 2). La sterilizzazione superficiale dei semi è stata effettuata con: 1) PPM al 2% per 2-4-6 h (Arcangeli *et al.*, 2012); 2) ipoclorito di sodio (NaClO) al 2,5% e 4,5% per un tempo variabile di 6-12 min. Al fine di avviare la coltura *in vitro* i semi sono stati posti in *tubi-green* contenenti 6 differenti substrati: LV1) MS (Murashige e Skoog 1962) a concentrazione dimezzata, 50 mg^l⁻¹ inositolo, 0,5 mg^l⁻¹ tiamina, 0,01mg^l⁻¹ IBA, 15 g^l⁻¹ saccarosio, 6,5 g^l⁻¹ agar; Sub.2) MS, 2 mg^l⁻¹ BAP, 0,1 mg^l⁻¹ IBA, 1 mg^l⁻¹ GA₃; Sub.3) MS, 0,5 mg^l⁻¹ BAP, 0,05 mg^l⁻¹ IBA (Jomori *et al.*, 1995; Hosokawa *et al.*, 1996; Butiuc-Keul *et al.*, 2005); Sub.4) soluzione acquosa con agar all'1%, 250 mg^l⁻¹ GA₃; Sub.5) macroelementi LP (Lepoivre *et al.*, 1977), microelementi e vitamine MS, 0,01 mg^l⁻¹ NAA, 2 mg^l⁻¹ BAP, 0,1 mg^l⁻¹ GA₃; Sub.6) MS senza ormoni. Il pH di tutti i mezzi nutritivi è stato aggiustato a 5,8 prima di autoclavare a 121°C per 21 minuti.

Gli espianti sono stati mantenuti in differenti condizioni di temperatura e luce: 1) 24 ± 1°C e fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio; 2) 5 ± 0,5°C per 1 mese e successivamente 24 ± 1°C, con fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio; 3) a temperatura ambiente al buio per 1 mese e successivamente a 24 ± 1°C in presenza di un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio.

Per ogni substrato e condizione di crescita sono state impiegate 3 repliche di 80 semi, sia freschi che vernalizzati. Dopo un mese di coltura le piantine ottenute sono state trasferite in *linfa-box* su substrato



Fig. 2 - Semi di *Gentiana* osservati al microscopio.
Fig. 2 - *Gentiana* seeds observed under a microscope.

LV2, con gli stessi composti di LV1 a concentrazioni doppie, oppure LV3, composto da WPM (Lloyd e McCown, 1980) modificato con 800 mg^l⁻¹ NH₄NO₃, 0,02 mg^l⁻¹ IBA, 1 mg^l⁻¹ 2iP, 30 g^l⁻¹ saccarosio.

Per le prove di radicazione *in vivo* e di ambientamento sono state utilizzate complessivamente 36 piante ottenute dopo 2 mesi di coltura *in vitro*, le quali sono state suddivise in 3 lotti di 12 piantine ciascuno e trattate come di seguito riportato: I) asportazione totale delle radici e del callo formatosi durante la coltura *in vitro* e successivo trattamento delle microtalee così ottenute (3/trattamento) con NAA in polvere, GA₃ in polvere, IBA in soluzione 0,1 mg^l⁻¹ per 15/20 secondi, assenza di ormoni (controllo); II) mantenimento integro dell'intero apparato radicale formatosi durante i 2 mesi di coltura *in vitro* e immersione della parte basale delle piantine (3/trattamento) in NAA in polvere, GA₃ in polvere, IBA in soluzione 0,1 mg^l⁻¹ per 15/20 secondi, assenza di ormoni (controllo); III) mantenimento dell'intero apparato radicale e assenza di trattamenti ormonali (12 piantine). Tutte le microtalee e le piantine sono state trasferite in vasetti di 6 cm di diametro contenenti un substrato costituito da terriccio di semina, torba acida e agripelite in rapporto 60:30:10, quindi due terzi dei vasetti di ogni lotto sperimentale sono stati disposti in miniserre appositamente attrezzate in condizioni di luce naturale, mentre i restanti vasetti sono stati mantenuti in camera di crescita a 24,0 ± 1°C in presenza di 16h di luce. Tutte le piante sono state sottoposte a nebulizzazione 2 volte al giorno per favorire la radicazione/indurimento e l'ambientamento.

Risultati e discussione

Di seguito sono riportati i risultati relativi ai protocolli che hanno portato alla moltiplicazione *in vitro* di *Gentiana pneumonanthe*.

Riguardo alla disinfezione, il trattamento con PPM ha fornito semi sterili al 100% indipendentemente dal tempo di immersione utilizzato, ma al contrario ha esercitato un effetto negativo sulla successiva germinazione dei semi che è risultata in percentuale molto ridotta. Anche la sterilizzazione con ipoclorito di sodio commerciale al 4,5% per 9 minuti ha dato il 100% di materiale asettico, ma la capacità germinativa dei semi è risultata in media del 30%. Il trattamento con ipoclorito di sodio al 2,5% per 8-9 minuti ha fornito l'85% di materiale non contaminato e i semi così trattati hanno fatto registrare più elevati tassi di germinazione, fino ad un massimo di 54%. La concentrazione ottimale di NaClO è risultata in funzione alla carica patogena presente sui semi ed è stata facil-

mente individuata testando preventivamente piccoli campioni (30-50 semi).

La vernalizzazione non ha stimolato in alcun modo la germinazione dei semi, indipendentemente dal mezzo nutritivo e fotoperiodo utilizzato nelle varie sperimentazioni.

Riguardo ai mezzi nutritivi, il substrato LV1 si è dimostrato valido per la coltura dei semi e la crescita iniziale delle plantule, con tempi di risposta rapidi: le plantule infatti sono risultate ben visibili ad occhio nudo dopo 8-12 giorni dalla messa in coltura (fig 3a, 3b, 3c, 3d), con totale assenza di sintomi di necrosi. In associazione alla disinfezione dei semi con NaClO al 2,5%, questo substrato ha fornito il valore più alto di germinazione, pari al 54%. I semi posti a germinare sui substrati 2, 3 e 5 hanno fornito buone percentuali di germinazione, ma i semenzali ottenuti sono stati soggetti a necrosi con percentuali comprese tra il 40 e 60%. Contrariamente, il processo germinativo è risultato inibito facendo ricorso ai substrati 4 e 6.

Le condizioni più favorevoli per la germinazione dei semi e per lo sviluppo delle plantule in vitro, sono risultate le seguenti: camera di crescita con temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo 16 ore di luce, 8 di buio (fig. 4). I semi incubati in totale assenza di luce non hanno germinato.

Dopo 1 mese dalla messa in coltura, le plantule ottenute su LV1, sono state trasferite in linfa-box contenente il substrato LV2 (fig. 5a, 5b). Tale passaggio ha favorito lo sviluppo successivo delle piantine e dell'apparato radicale, rendendole meno soggette a disidratazione e in grado di adattarsi maggiormente alle condizioni *in vivo* (fig. 5c), esercitando così un effetto positivo sul numero finale di piante ambientate.

Per acquisire un numero maggiore di piante, visto il numero esiguo di piantine ottenute partendo da seme, si è pensato di ricorrere a microtaleaggio e successive subcolture. Il substrato LV3 si è dimostrato ottimale in questa fase, con un notevole grado di proliferazione e tempi di crescita molto rapidi. Tenuto

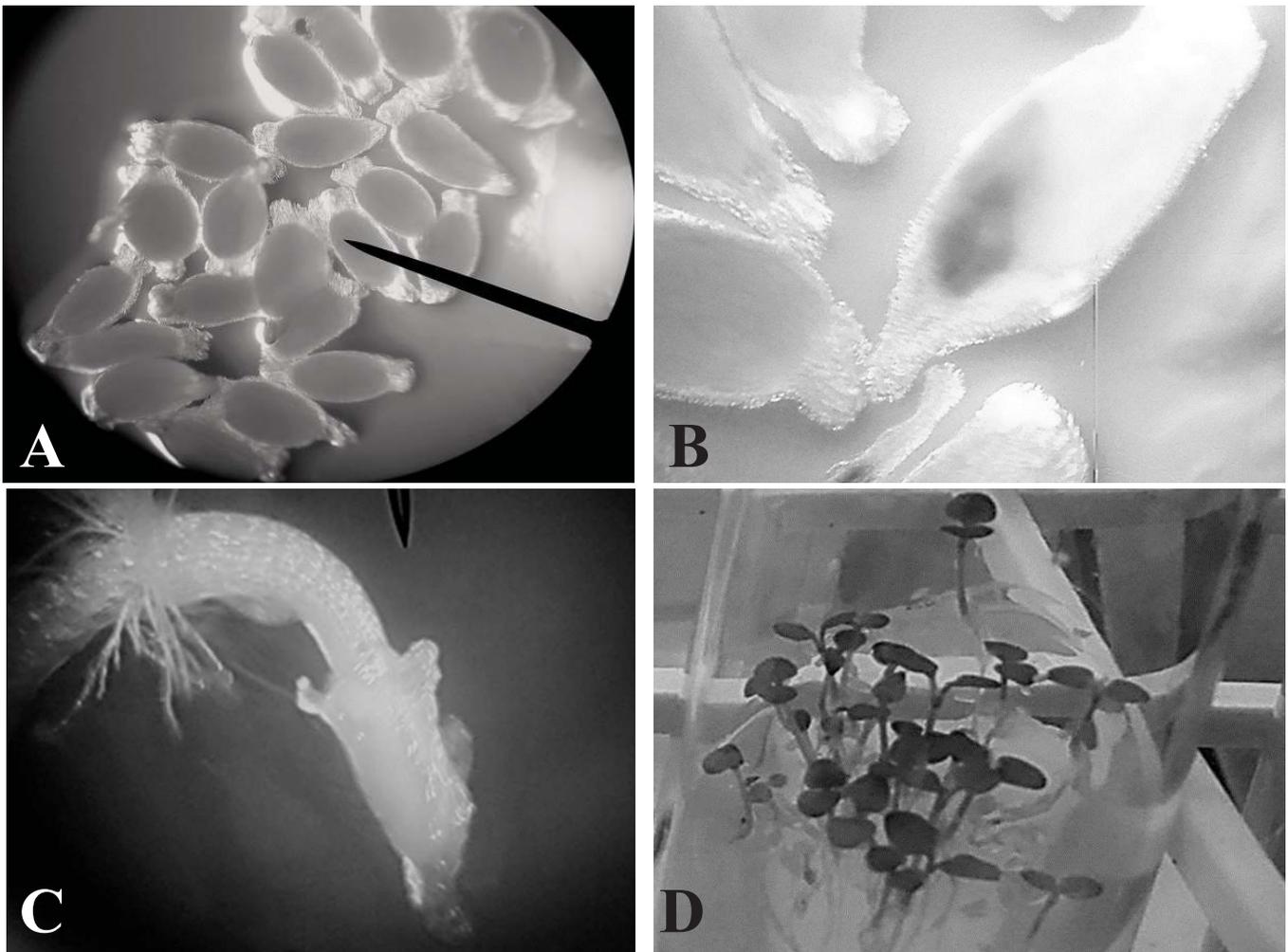


Fig. 3 - Semina *in vitro*: a) semi dopo 1 giorno dalla messa in coltura (osservazione al microscopio); b) semi al terzo giorno dalla messa in coltura; c) sesto giorno dalla messa in coltura; d) plantule dopo 15 giorni dalla messa in coltura.

Fig. 3 - In vitro sowing: a) seeds after 1 day (observation under the microscope); b) seeds on the third day; c) sixth day from cultivation; d) plantules after 15 days from cultivation.

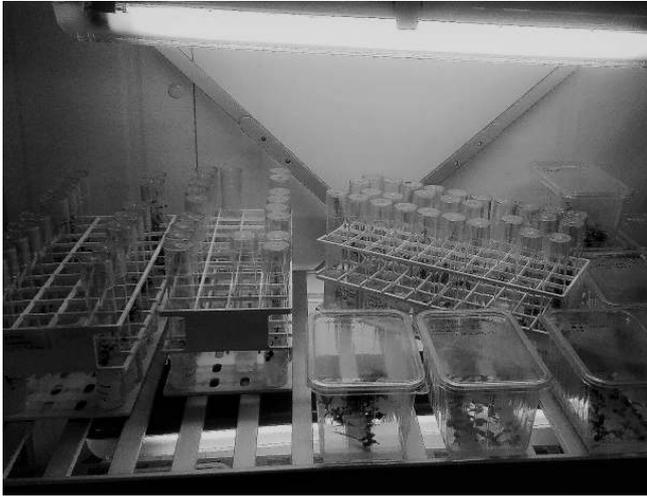


Fig. 4 - Camera di crescita.
Fig. 4 -

conto dell'obiettivo del progetto, ovvero la necessità di ottenere piante con una più ampia variabilità genetica, si è optato per il trasferimento *in vivo* di ogni singola pianta ottenuta *in vitro* da seme. Tuttavia, i risultati ottenuti hanno dimostrato che il substrato LV3 potrebbe rappresentare un valido mezzo per una propagazione massale.

Le prove di radicazione *in vivo* e l'ambientamento hanno evidenziato una scarsa attitudine all'adattamento di questa specie alle condizioni esterne. Nella prova I, solo 2 microtalee hanno superato la fase di ambientamento, le rimanenti sono morte per disidratazione o per marciumi radicali in camera di crescita. Nella prova II, tutte le piantine sono morte nelle prime due settimane di sperimentazione. Nella prova III, invece, 8 piante hanno superato la fase di ambientamento in serra e la successiva fase di acclimatamento esterno, mentre le rimanenti 4 piante sono morte

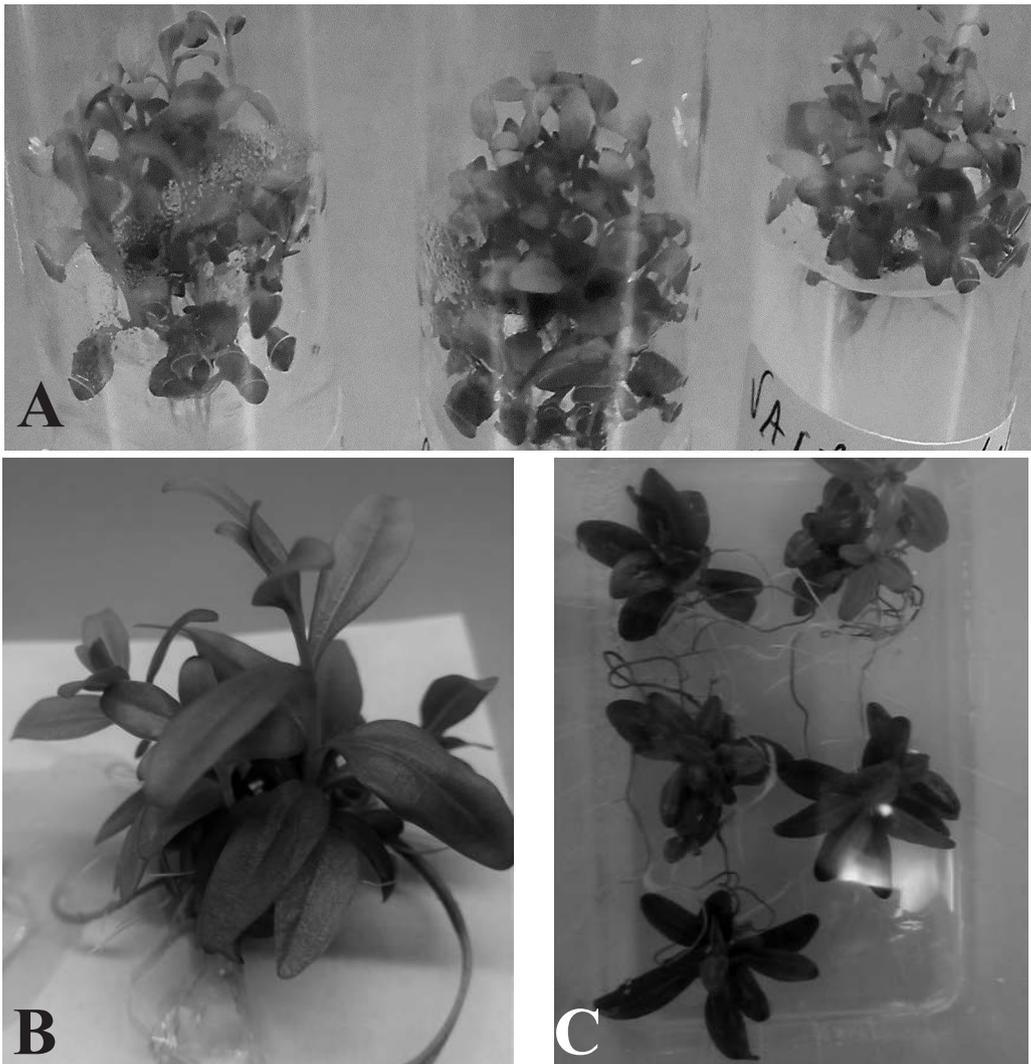


Fig. 5 - Coltura *in vitro*: a) plantule pronte per il passaggio in substrato LV2; b) sviluppo di *Gentiana* in linfabox; c) piantina pronta al passaggio *in vivo*.
Fig. 5 - In vitro culture: a) seedlings ready for passage into LV2 substrate; b) development of *Gentiana* in linfabox; c) seedling ready to in vivo cultivation.

già in camera di crescita (fig. 6a, 6b, 6c). Il periodo più favorevole per il trasferimento *in vivo* è risultato da ottobre a marzo-aprile, infatti dopo tale periodo, all'aumentare delle temperature all'interno della serra si è registrato una consistente riduzione del numero di piante in grado di adattarsi alle nuove condizioni aerobiche. Il periodo ottimale per il trasferimento in pien'aria è risultato l'autunno o l'inizio della primavera in luogo ombreggiato e in presenza di un buon apporto idrico, mentre non sono risultate necessarie particolari cure colturali o interventi di concimazioni.

Durante l'ambientamento le piante sono entrate in riposo vegetativo con la totale scomparsa della parte aerea della pianta e formazione di nuovi germogli nella stagione vegetativa successiva. Inoltre, è stata osservata una abbondante fioritura immediatamente dopo il passaggio *in vivo*, con una produzione di semi caratterizzati da una capacità germinativa superiore rispetto a quelli prodotti nell'*habitat* naturale.

Sulla base dei risultati ottenuti, è stato deciso di ambientare i restanti 1082 semenzali integri dotati di

apparato radicale in assenza di fitregolatori, raggiungendo in totale un 70% di piante ambientate con successo, mentre il restante 30% delle piante non hanno superato l'ambientamento e sono morte entro due mesi dal passaggio *in vivo*. Le piantine di *Gentiana pneumonanthe* sono state coltivate per ulteriori 5 mesi senza osservare ulteriori perdite, dopodiché sono state messe a dimora sia in *habitat* di brughiera, sia in apposite aiuole ad essa dedicate (fig. 7a, 7b), con percentuali di attecchimento e sopravvivenza rispettivamente del 93% e 100%, dopo il primo inverno trascorso a dimora.

Conclusioni

Dall'insieme delle esperienze condotte in laboratorio emergono conferme, ma altrettanti dati contrastanti tra loro, soprattutto in merito ai valori di germinabilità della specie. Infatti, con l'uso dello stesso protocollo, è stata osservata una variabilità significativa nei valori di germinabilità, con oscillazioni dal 17

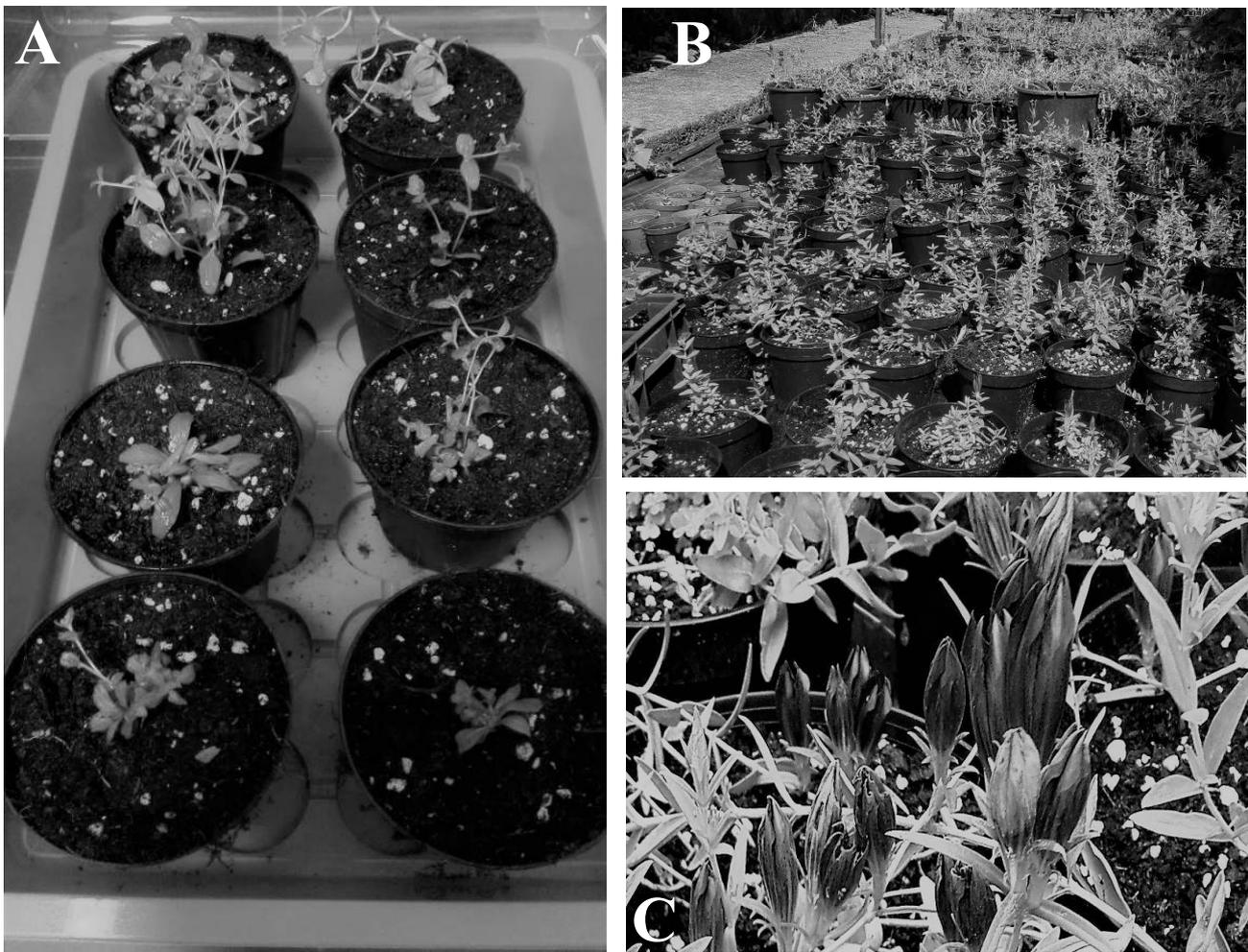


Fig. 6. Ambientamento: a) piantine trasferite in vasetti con torba e agri-perlite; b e c) piante in fase di acclimatamento in serra.
 Fig. 6 - Acclimatization: a) seedlings transferred into jars with peat and agri-perlite; b and c) plants undergoing greenhouse acclimatization.



Fig. 7 - Piantumazione di piante di *G. pneumonanthe* ottenute *in vitro* in un'area dell'Istituto 'Luigi Castiglioni'.

Fig. 7 - Planting of *in vitro* produced *G. pneumonanthe* plantlets in an area of the "Luigi Castiglioni" Institute.

al 36%. In particolare, sono state osservate notevoli variazioni in funzione del variare dell'anno di raccolta (da 27% al 54%) e del sito di provenienza dei semi (dal 2% al 37%). Tuttavia, i protocolli di germinazione *in vitro* di *Gentiana* hanno permesso di ottenere buone percentuali di germinazione e un ottimo sviluppo delle plantule con conseguente adattabilità alla condizione *in vitro* e *in vivo*, contribuendo quindi alla conservazione e salvaguardia della specie.

Ringraziamenti

La Dirigente Scolastica, Dott.ssa M. Costanza Scarpini, per avermi permesso in tutti questi anni di lavorare in piena autonomia all'interno del Laboratorio di Micropropagazione.

La Prof.ssa Rosalia Mantegazza, insegnante di Biologia del nostro Istituto, che coinvolgendo il laboratorio nel progetto di Biodiversità a Scuola, mi ha dato la possibilità di lavorare con i semi di una pianta le cui osservazioni mi stupiscono ancora adesso.

Il personale della scuola che ha collaborato e contribuito al raggiungimento degli obiettivi del progetto stesso.

Le guardie G.E.V del Parco delle Groane, in particolare P. Ventura e A. Pezzota, per il loro costante impegno verso tutto ciò che è "biodiversità".

La Dott.ssa Roberta Ceriani del Parco Monte Barro C. F. A. Regione Lombardia, e il Dott. Simon Pierce U.N.I.M.I di Milano per aver formulato, attorno ai suddetti protocolli, un progetto (*FraGenziane*) di notevole rilevanza restituendo *Gentiana pneumo-*

nthe all'habitat di origine. Gli stessi ringraziamenti a tutti i partner coinvolti nel progetto.

Monica Falorni e la Prof.ssa A. Chiara Minotti per la traduzione in inglese.

Un ringraziamento speciale a Valentina per i preziosi suggerimenti nella stesura del testo.

Riassunto

Allo scopo di recuperare, moltiplicare e conservare *ex situ* e *in situ* la *Gentiana pneumonanthe*, una rara pianta di brughiera e prati umidi in via di estinzione, si è formulato e ottimizzato un protocollo relativo alle diverse fasi di propagazione *in vitro* a partire dal seme. A questa pianta, così come a *Myrmica scabrinodis* è strettamente legata la sopravvivenza di un altro essere vivente, la *Maculinea alcon*, una farfalla anch'essa in via di estinzione.

Parola chiave: biodiversità, germinabilità, mezzi nutritivi, ambientamento

Bibliografia

- Agricoltura Ricerca – numero 189- 2002, P. Fusani, F. Scartezzini: Micropropagazione della genziana maggiore: 107-112
- ARCANGELI C., BIONDINI S., MENCACCINI S., MICHELI M., SABBIONI A., 2012: Atti del 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione, Edizione SOI, p. 265-269
- Atti del Progetto ITA-Net P04: I laboratori di moltiplicazione *in vitro* degli Istituti agrari 2005 Coordinatrice dott.ssa M.C. Scarpini - coordinamento redazione Dott. Nicola Noè
- BUTIUC-KEUL ET AL., 2005 In Vitro Organogenesis of *Gentiana punctata*. 33: 38-41
- DEBERGH P.C., MAENE L., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.* 14: 335-345
- DE PAOLI G., ROSSI V., SCOZZOLI A., 1994. Micropropagazione delle piante ortofrutticole, Edizioni Edagricole, p. 1-245
- HOSOKAWA et al., 1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root ex-plants of commercial cultivars of *Gentiana* *Plant Cell Rep.* 15: 578-581
- JOMORI et al., (1995) Systems of Plants Regenerations in *Gentiana* *in Vitro Cultures* 392:81-86
- LLOYD G., MC COWN B. (1980), Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. 30: 421-427
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) medium: A revised medium for rapid growth and biossysis with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant* 15: 473-497
- Plants From test Tubes di L.Kyte and J. Klein, Editore Timber press Potland (Oregon)
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp.. *Acta Horticulture*, 78: 437-442.
- ROBERT N. TRIGIANO, DENNIS J. GRAY (2000), La coltura di tessuti vegetali, Ediz. Edagricole.
- RUSMINI B., BERETTA D. (1992) Propagazione di piante ornamentali per mezzo di talea e micropropagazione, Edizioni Ace International
- TAIZ L., ZEIGER E., 2013. Elementi di Fisiologia Vegetale, Edizioni Piccin, p. 282-346