

## Effetti della qualità della luce indotta da lampade a LED sull'accrescimento e la moltiplicazione *in vitro* di diverse specie ornamentali dell'ambiente Mediterraneo

Valeria Cavallaro<sup>1\*</sup>, Giovanni Avola<sup>1</sup>, Giancarlo Fascella<sup>2</sup>, Alessandra Pellegrino<sup>1</sup>, Salvatore La Rosa<sup>1</sup>, Isabella Di Silvestro<sup>3</sup>, Anita Ierna<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (IVALSA -CNR), Catania

<sup>2</sup> Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, Bagheria (PA)

<sup>3</sup> Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB-CNR), Catania

### Effects of the light quality induced by LED lamps on *in vitro* growth and proliferation of different ornamental species for the Mediterranean environment

**Abstract.** LED technology seems to offer interesting prospects for its possible use in confined environment (growth chambers, bioreactors, greenhouses, etc.), since both light quantity and spectrum have a direct effect on growth and development of plants and on the qualitative characteristics of their productions. On the basis of these considerations, the effects of four different light spectra on the *in vitro* growth and development of four ornamental species were tested: 1) fluorescence light (control); 2) white LED (LED<sub>W</sub>-blue 21%; green 38%; red 35%; dark red 6%); 3) predominantly red LED (LED<sub>R</sub>-blue 12%; green 19%; red 61%; dark red 8%); 4) Red/Blue LED (LED<sub>R/B</sub>-67% Red, 33% blue). A light intensity of 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (16 hour photoperiod) was chosen for all experiments. The studied species were: *Ceratonia siliqua* L., *Dianthus caryophyllus* L., *Euphorbia x lomi* Rauh, *Rosa hybrida*-cv. Mayland®. The tested species showed a different morphogenetic response in relation to the different light spectra. As compared to fluorescence, treatment with LED<sub>R</sub> resulted in an increased presence of secondary shoots and callus, while those adopting LED<sub>W</sub> and LED<sub>R/B</sub> determined a lower shoot emission in two of the studied species. A greater leaf surface was ascertained in response to fluorescent light.

**Key words:** Light spectrum, LED light, fluorescence light, *in vitro* culture.

### Introduzione

I sistemi di illuminazione generalmente utilizzati per la crescita delle piante *in vitro* sono basati sull'utilizzo di lampade al sodio o fluorescenti, alogene e a incandescenza, con lunghezze d'onda da 350 a 750 nm (visibile). Queste sorgenti luminose producono radiazioni solo in parte utilizzate dalle piante per la fotosintesi e comportano un notevole dispendio di energia (Kim *et al.*, 2004 a, b). Negli ultimi anni la diffusione sul mercato dei LEDs (Light Emitting Diodes) come fonte di radiazione luminosa sembra aprire interessanti prospettive per il loro possibile utilizzo nelle camere di crescita e nei bioreattori (Yeh e Chung, 2009). Rispetto alle lampade convenzionali, i LED hanno una vita più lunga, sono di minori dimensioni, producono meno energia termica e offrono il vantaggio di poter selezionare la composizione spettrale, la lunghezza d'onda e l'intensità della luce in accordo alle esigenze delle piante, permettendo l'ottimizzazione dei processi produttivi e/o la produzione di metaboliti secondari (Gupta e Jatothu, 2013). Recentemente numerosi sono stati gli studi sugli effetti della qualità della luce sulla crescita e la morfogenesi di piantine allevate *in vitro*: *Brassica napus* L. (Li *et al.*, 2013), *Solanum tuberosum* L. (Ma *et al.*, 2015), *Saccharum* spp. (Ferreira *et al.*, 2017), *Vaccinium corymbosum* (Hung *et al.*, 2016), *Phalaenopsis* orchids (Wongnok *et al.*, 2008), *Bletilla ochracea* (Godo *et al.*, 2011), *Dendranthema grandiflorum* Kitam. 'Cheonsu' (Kim *et al.*, 2004 b), *Tagetes erecta* L. cv. Orange Boy (Heo *et al.*, 2006), *Curculigo orchioides* (Gupta e Jatothu, 2013). Le ricerche hanno evidenziato risposte non sempre univoche in relazione sia all'intensità che allo spettro luminoso testato, nonché alla specie/varietà studiata. Gli effetti indotti dalla

\* valeria.cavallaro@cnr.it

qualità della luce dovrebbero, dunque, essere analizzati di volta in volta per ciascuna specie di interesse in sperimentazioni specifiche (Poudel *et al.*, 2008). Scopo del presente lavoro, pertanto, è stato quello di valutare l'influenza della qualità della luce prodotta da LED a confronto con luci a fluorescenza sulla crescita e lo sviluppo di piantine *in vitro* di alcune specie mediterranee di interesse ornamentale.

## Materiali e metodi

In una camera di crescita appositamente predisposta sono stati valutati gli effetti di 4 diverse sorgenti luminose: 1) luce a fluorescenza (controllo: blu 37%, verde 44% rosso 18%, rosso scuro 1%-MASTER TL-D Super 80 36W/865, Philips); 2) luce LED bianca (LED<sub>w</sub>: blu 21%; verde 38%; rosso 35%; rosso scuro 6%-Grow Light C65 NS12 - Valoya Oy Helsinki, Finland); 3) luce LED prevalentemente rossa (LED<sub>R</sub>: blu 12%; verde 19%; rosso 61%; rosso scuro 8%-Grow Light C65 AP673L- Valoya Oy Helsinki, Finland); 4) luce LED rosso-blu (LED<sub>R/B</sub>: blu 33%; rosso 66%-BS Biosystem, Catania). I genotipi allo studio sono stati: carrubo (*Ceratonia siliqua* L.), garofano (*Dianthus caryophyllus* L.), euphorbia (*Euphorbia x lomi* Rauh) e *Rosa* hybrida cv. Mayland<sup>®</sup>. L'intensità, costante per tutte le tesi (80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), è stata verificata per mezzo di un quantum sensor LI-190R (LiCor, Inc., Nebraska, USA LICOR Biosciences). La temperatura della camera di crescita è stata mantenuta costante a  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , il fotoperiodo è stato 16 ore di luce. Le piantine *in vitro* provenivano tutte da due cicli di moltiplicazione condotti sotto luce a fluorescenza.

Le plantule micropropagate sono state poste in vasi Microbox (Micropoli<sup>®</sup>) in polipropilene autoclavabili e dotati di un coperchio che permette scambi gassosi mediante un filtro HEPA. Il substrato di moltiplicazione, comune a tutte le specie, era composto da macro e micro elementi di Murashige and Skoog (1962), vitamine di Morel (Morel and Wetmore, 1951), 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositolo, 0,3 mg L<sup>-1</sup> BA (6-benzylaminopurina), 30 g L<sup>-1</sup> di saccarosio, 7 g L<sup>-1</sup> di agar. Sono stati predisposti, per ciascuna specie e tipologia di luce, 4 vasi contenenti 5 piantine ognuno.

Fatta eccezione per il garofano, specie a lento accrescimento *in vitro* nel quale i rilievi sono stati effettuati ogni 60 giorni, per le restanti specie allo studio ogni 30 giorni dalla subcoltura e per due cicli successivi sono stati rilevati i seguenti parametri: il numero di germogli di proliferazione, il numero totale di foglie sul germoglio principale, la presenza di callo e l'indice di copertura (su garofano, rosa e carrubo).

Quest'ultimo è stato eseguito mediante rilievo non distruttivo attraverso acquisizione delle immagini e successiva elaborazione tramite il software ImageJ (open source Java image processing program).

I trattamenti sperimentali sono stati distribuiti in un disegno fattoriale completamente randomizzato. I dati sono stati analizzati con ANOVA (CoStat versione 6.003 -CoHort Software, Monterey, CA, USA). Ogni trattamento è stato replicato tre volte ed ogni replica era costituita da 4 piantine. Quando l'*F* risultava significativo, veniva calcolata la differenza minima significativa (DMS) alla probabilità del 5%.

## Risultati

### Numero di germogli di proliferazione

Il numero di germogli di proliferazione ottenuto nei diversi cicli di moltiplicazione è un carattere essenziale per il successo commerciale di un protocollo di micropropagazione. Su carrubo, tutte e tre le sorgenti luminose a LED utilizzate hanno pressoché raddoppiato il numero di germogli di proliferazione (nella media pari a 3,0 germogli pianta<sup>-1</sup>) rispetto agli 1,5 germogli pianta<sup>-1</sup> registrati in condizioni di luce a fluorescenza (fig. 1). Nella stessa specie, tuttavia, a partire dal terzo ciclo di moltiplicazione, si notava il disseccamento dell'apice del germoglio principale, un progressivo declino delle piante a causa della formazione di callo alla base delle stesse e la progressiva riduzione del numero e della dimensione delle foglie (dati non presentati). Su Euphorbia, ibrido con ridotto tasso di moltiplicazione *in vitro*, solo la luce a LED<sub>R</sub> ha determinato un modesto tasso di proliferazione (0,5 germogli pianta<sup>-1</sup>) non significativamente differente da quello indotto dalla luce a fluorescenza (0,4 germogli pianta<sup>-1</sup>). Su quest'ibrido, il trattamento LED<sub>B</sub> e LED<sub>R/B</sub> non ha determinato alcuna comparsa dei germogli secondari. Inoltre, in maniera più accen-

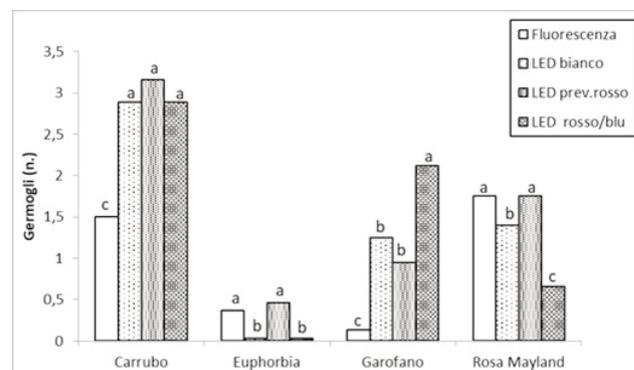


Fig. 1 Numero di germogli secondari in rapporto ai trattamenti luminosi e alle specie studiate.

Fig. 1 Number of secondary shoots in relation to the studied species and light spectra.

tuata rispetto a quanto osservato nel carrubo, già a partire dal primo ciclo di moltiplicazione ed ancor di più nel secondo, questa tipologia di luce ha determinato la formazione di callo alla base delle plantule e successivamente una progressiva disorganizzazione dei loro tessuti (dati non presentati), rendendo necessario lo spostamento delle plantule sopravvissute in condizione di luce a fluorescenza.

Su garofano, tutte le tipologie di LED hanno determinato significativi incrementi nel tasso di proliferazione. In particolare, il trattamento LED<sub>R/B</sub> ha determinato un numero significativamente più alto di germogli secondari (2,1 germogli secondari pianta<sup>-1</sup>). E' da rilevare come in questa specie non sia stata mai osservata la comparsa di callo alla base delle plantule.

Nella rosa Mayland®, infine, solo il trattamento LED<sub>R</sub> ha determinato un tasso di proliferazione più alto, anche se statisticamente non differenziato dalla luce a fluorescenza (1,7 germogli secondari pianta<sup>-1</sup>) mentre i trattamenti LED<sub>B</sub> (1,4 germogli secondari pianta<sup>-1</sup>) e LED<sub>R/B</sub> (0,7 germogli secondari pianta<sup>-1</sup>) hanno prodotto tassi di proliferazione significativamente più bassi.

#### Numero di foglie e indice di copertura

Il numero di foglie sul germoglio principale (fig. 2) e l'indice di copertura (fig. 3) sono apparsi significativamente influenzati dalla specie e dallo spettro luminoso.

Nel carrubo, il trattamento LED<sub>R/B</sub> ha fatto registrare un maggior numero di foglie sul germoglio principale rispetto alla luce a fluorescenza. Nelle altre

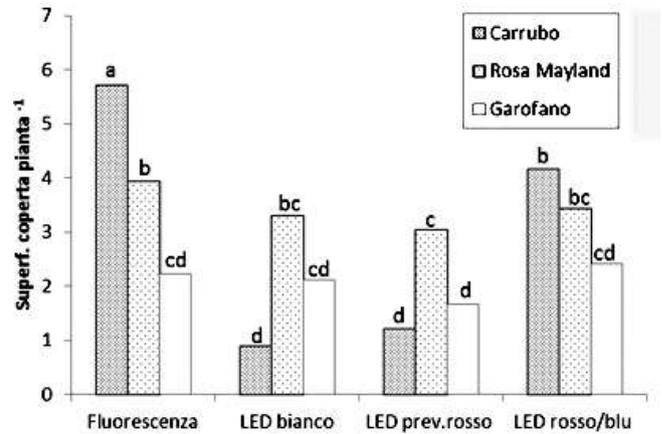


Fig. 3 - Superficie coperta per pianta in rapporto ai trattamenti luminosi in tre delle specie studiate.

Fig. 3 - Cover index per plant in relation to light spectra in three of the studied species.

specie allo studio, non è emersa differenza alcuna nel numero di foglie registrato nei trattamenti LED rispetto a quello osservato nel trattamento con fluorescenza, fatta eccezione per il numero più basso di foglie registrato in LED<sub>R/B</sub> nel garofano e della luce LED<sub>W</sub> nella rosa.

Il maggiore indice di copertura per pianta è stata rilevato in corrispondenza della luce a fluorescenza nel carrubo (5,7 cm<sup>2</sup>) e nella rosa (3,9 cm<sup>2</sup>); il minore in relazione al trattamento LED<sub>R</sub> (1,2 cm<sup>2</sup>) e LED<sub>W</sub> (0,9 cm<sup>2</sup>) nel carrubo e solo in relazione alla luce LED<sub>R</sub> nella rosa (3,0 cm<sup>2</sup>). Nel garofano non sono state riscontrate differenze significative nel parametro in esame in relazione alle sorgenti luminose.

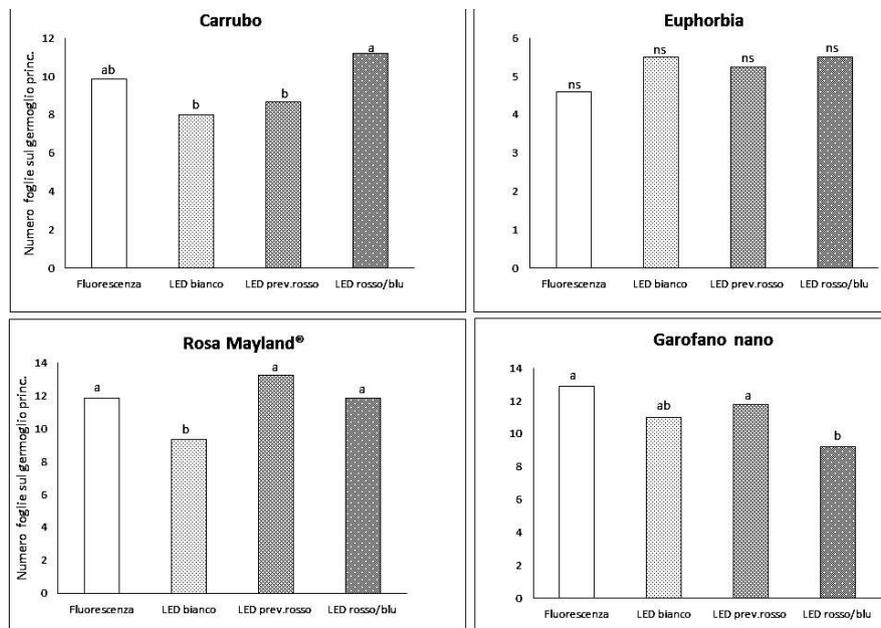


Fig. 2 - Numero di foglie sul germoglio principale in rapporto ai trattamenti luminosi nelle diverse specie studiate.

Fig. 2 - Leaf number on the main stem in relation to light spectra in the studied species.

## Discussione e conclusioni

Uno dei segnali più importanti ai fini del recepimento da parte della pianta dei mutamenti ambientali che ne condizionano l'ontogenesi è indubbiamente la luce che, oltre a fornire l'energia necessaria per condurre la fotosintesi, si comporta anche come segnale morfogenetico.

Anche nelle piante *in vitro* è stata accertata una differente risposta morfogenetica delle specie alle variazioni nello spettro luminoso. La luce a LED<sub>R</sub> ha determinato un significativo miglioramento della proliferazione dei germogli in carrubo e garofano e, non ha influenzato il tasso di proliferazione rispetto alla luce a fluorescenza nella rosa e nell'Euphorbia. Tuttavia, questo tipo di luce ha successivamente prodotto in Euphorbia e in carrubo la formazione di callo alla base del germoglio e un progressivo declino delle piante. L'effetto dei LED a luce rossa, o come nel nostro caso della luce arricchita nell'area del rosso, sull'incremento del tasso di proliferazione potrebbe essere ricondotto ad un effetto di inibizione della dominanza apicale, come dimostrato anche dal progressivo disseccamento del germoglio principale osservato in carrubo. Questi risultati concorderebbero con quanto dimostrato in precedenza sull'azione della luce rossa da Muleo e Morini (2006) nel genotipo di melo MM6 e da Fukuda *et al.* (2016) in plantule *in vitro* di Petunia.

LED<sub>W</sub> ha migliorato il tasso di proliferazione nel carrubo e nel garofano, mentre lo ha peggiorato in Euphorbia e Rosa, probabilmente in conseguenza della maggiore sensibilità di queste specie alla bassa intensità di luce rossa e blu percepita. Nei LED<sub>W</sub> utilizzati in questa prova infatti, la percentuale di luce rossa era il 35% e quella blu 21%. L'aumento della dominanza apicale e quindi la minore formazione di germogli laterali, per favorire una maggior accrescimento dell'apice, è una delle strategie adottate dalle piante in pieno campo quando sperimentano una riduzione della quantità di luce non solo rossa, ma anche blu a causa dell'assorbimento di queste radiazioni utili alla fotosintesi da parte delle foglie sovrastanti. Sembrerebbe pertanto che, in queste specie, ulteriori miglioramenti nei tassi di propagazione sia in condizione di illuminazione a LED a luce bianca che LED a luce arricchita nel rosso, potrebbero essere conseguiti utilizzando intensità luminose maggiori di quelle utilizzate nella presente prova (80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

La luce LED<sub>R/B</sub> ha fornito risultati contrastanti, in quanto ha positivamente influenzato la comparsa dei germogli secondari nel carrubo e nel garofano, ma non in Euphorbia e Rosa. Questi risultati concordano

con quanto ottenuto da Ramírez-Mosqueda *et al.* (2017) in *Stevia rebaudiana*.

Per quanto riguarda la morfologia fogliare, i risultati relativi al numero e alla copertura fogliare non sono stati univoci in quanto strettamente specie-specifici. Nel complesso, il numero di foglie neo formate nei trattamenti a LED non si differenziava da quello ottenuto con le lampade a fluorescenza, fatta eccezione per il maggior numero di foglie riscontrato nel carrubo sotto i LED<sub>R/B</sub> e il minor numero di foglie riscontrato con LED<sub>W</sub> nella rosa. La fluorescenza ha determinato un maggior sviluppo della superficie fogliare *in vitro* (i.e. maggior indice di copertura) nel carrubo e nella rosa. Nelle stesse specie, la luce arricchita nel rosso e, solo relativamente al carrubo la luce bianca a LED, ha determinato, di contro, una minor espansione della superficie fogliare.

In conclusione, i primi risultati ottenuti sembrano indicare che la luce arricchita nella banda del rosso potrebbe contribuire ad aumentare i tassi di moltiplicazione anche di specie recalcitranti alla coltivazione *in vitro*. Tuttavia, sono necessarie specifiche prove di ottimizzazione dei protocolli di coltivazione in condizioni di luce arricchita nell'area del rosso, per quanto riguarda in particolare l'apporto di sostanze fitoregolatrici, quali le citochinine, atteso che esse esercitano un ruolo promotore della proliferazione e interagiscono con la luce rossa (Norton *et al.*, 1988; Herrington e McPherson, 1993), e lo studio dei tempi di permanenza delle plantule nella banda del rosso per indurre la proliferazione dei germogli ed evitando la comparsa di callo o la riduzione dell'apparato fogliare.

Ulteriori studi condotti con gli stessi spettri luminosi ad intensità maggiori e minori di luce potranno servire a verificare le ipotesi in precedenza discusse e, quindi, ottimizzare i livelli di illuminazione considerando la decisiva importanza che la qualità della luce esercita sui processi di accrescimento e sviluppo *in vitro*.

## Riassunto

La tecnologia LED (Light Emitting Diodes) rappresenta un elemento chiave nei sistemi colturali in ambiente confinato (serra, camera di crescita, bioreattori, etc.) nei quali sia la quantità che la qualità della luce hanno un effetto diretto sulla crescita e lo sviluppo degli organismi vegetali e le caratteristiche qualitative delle relative produzioni. Sulla base di queste considerazioni, su quattro specie ornamentali (carrubo, garofano, Euphorbia, rosa) allevate *in vitro* sono stati valutati, ad una intensità di 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , gli effetti di diverse sorgenti luminose: 1) luce a fluore-

scenza (controllo); 2) luce LED prevalentemente bianca (LED<sub>W</sub>); 3) luce LED prevalentemente rossa (LED<sub>R</sub>); 4) luce LED rosso /blu (LED<sub>R/B</sub>: 67% rosso, 33% blu). Le specie studiate hanno evidenziato una differente risposta morfogenetica in rapporto alle diverse qualità di luce. Rispetto alla luce a fluorescenza, il trattamento con LED<sub>R</sub> ha determinato una maggiore presenza di germogli secondari e di callo, mentre LED<sub>W</sub> e LED<sub>R/B</sub> una minore emissione di germogli in due delle specie studiate. Inoltre, una maggiore superficie fogliare è stata rilevata in corrispondenza dell'illuminazione a fluorescenza.

**Parole chiave:** spettro luminoso, luce a LED, luce a fluorescenza, coltura *in vitro*.

## Bibliografia

- FERREIRA L. T., DE ARAÚJO SILVA M.M., CLÁUDIA ULISSES C., RANGEL CAMARA T., WILLADINO L., 2017. *Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 128: 211-221.
- FUKUDA N., AJIMA C., YUKAWA T., OLSEN J.E., 2016. *Antagonistic action of blue and red light on shoot elongation in petunia depends on gibberellin, but the effects on flowering are not generally linked to gibberellin*. Environ. Exp. Bot., 121: 102-111.
- GODO T., FUJIWARA K., GUAN K., MIYOSHI K., 2011. *Effect of wavelength of LED-light on in vitro asymbiotic germination and seedling growth of Bletilla ochracea Schltr. (Orchidaceae)*. Plant Biotechnol., 28: 397-400.
- GUPTA S.D., JATOTHU B., 2013. *Fundamentals and applications of light-emitting diodes LEDs in in vitro plant growth and morphogenesis*. Plant Biotechnology Reports, 7: 211-220.
- HEO J.W., SHIN K.S., KIM S.K., PAEK K.Y., 2006. *Light quality affects in vitro growth of grape 'Teleki 5BB7'*. J. Plant Biol., 49: 276-280.
- HERRINGTON E., MCPHERSON J.C., 1993. *Light quality growth promotion of Spirea nipponica: the influence of a low photon fluence rate and transfer time to a higher fluence rate*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 32: 161-167.
- HUNG C.D., HONG C., KIM S., LEE K., PARK J., NAM M., CHOI D., LEE H., 2016. *LED light for in vitro and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.)*. Acta Physiol. Plant, 38: 152.
- KIM H.H., GOINS G.D., WHEELER R.M., SAGER J.C., 2004a. *Green-light supplementation for enhanced growth under red- and blue-light emitting diodes*. Sci Hort., 39: 1617-1622.
- KIM S.J., HAHN E.J., HEO J.W., PAEK K.Y., 2004b. *Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro*. Sci Hort., 101: 143-151.
- LI, H., TANG C., AND XU Z., 2013. *The effects of different light qualities on rapeseed (Brassica napus L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro*. Sci Hort., 150:117-124.
- MA X., WANG Y., LIU M., XU J., XU Z., 2015. *Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis of potato (Solanum tuberosum L.) plantlets in vitro*. Sci Hort., 190: 104-109.
- MOREL G., WETMORE R.H., 1951. *Fern callus tissue culture*. American Journal of Botany, 38: 141-143.
- MULEO R., MORINI S., 2006. *Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype in in vitro culture*. Sci Hort., 108: 364-370.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol Plant., 15: 473-497.
- NORTON R.C., NORTON E.M., HERRINGTON T., 1988. *Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants grown in vitro*. Acta Hort., 227: 453-456.
- POUDEL P.R., KATAOKA I., MOCHIOKA R., 2008. *Effect of red- and blue-light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 92: 147-153.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA M.A., IGLESIAS-ANDREU L.G., BAUTISTA-AGUILAR J.R., 2017. *The effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of Stevia rebaudiana Bertoni*. Sugar Tech., 19 (3): 331-336.
- YEH H., CHUNG J.P. 2009. *High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation*. Renew Sust. Energ. Rev., 13: 2175-2180.
- WONGNOK A., PILUEK C., TECHASILPITAK T., TANTIVIVAT S., 2008. *Effect of light emitting diodes on micropropagation of Phalaenopsis orchids*. Acta Hort., 788: 149-156.