

Innovazione nella propagazione *in vitro* di *Actinidia deliciosa* mediante coltura liquida in immersione temporanea

Cecilia Di Primio^{1*}, Guglielmo Costa¹, Elif Aylin Ozudogru², Maurizio Lambardi²

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Università degli Studi di Bologna

² IVALS/A/Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR, Sesto Fiorentino (Fi)

Parole chiave: bioreattore, kiwi, micropropagazione, Plantform[®], SETIS[™]

Introduzione

Il mercato del kiwi (*Actinidia* spp.) è in continua espansione. L'Italia si colloca al secondo posto a livello mondiale sia come produttore, sia come superficie coltivata, e il settore vivaistico risulta strategico nel garantire la produzione di materiale di elevata qualità e rispondenza genetico-sanitaria. A tale proposito, la propagazione per talea e innesto è stata ormai affiancata dalla micropropagazione, chiamata a sviluppare ed ottimizzare protocolli sempre più efficienti, anche per rispondere alle richieste di piante da un numero sempre maggiore di cultivar di specie diverse di *Actinidia*. Le prime segnalazioni di efficienti protocolli di micropropagazione di kiwi risalgono ad oltre 30 anni fa, grazie anche al contributo di studiosi italiani (Standardi, 1983; Wessel *et al.*, 1984; Monette, 1986). L'odierna richiesta, sempre più diversificata, di cultivar non solo di *Actinidia deliciosa*, ma anche di *A. chinensis* e *A. arguta*, nonché la necessità di produrre piante di elevato standard qualitativo, induce oggi ad esplorare anche tecniche di coltura *in vitro* alternative alla tradizionale micropropagazione in substrato gelificato. Tra queste, la coltura liquida in bioreattore con sistema ad immersione temporanea (TIS, *Temporary Immersion System*) si sta proponendo come un sistema molto promettente che permette un uniforme contatto tra substrato liquido e germogli, un migliore ricambio dell'atmosfera dei contenitori e, in definitiva, una superiore quantità e qualità del materiale prodotto (Lambardi, 2012). La tecnica si basa sull'applicazione ai germogli in proliferazione di cicli di immersione ed emersione dal substrato liquido che si trova nello stesso contenitore ove si colloca il

materiale vegetale (TIS a contenitore singolo), oppure in un contenitore separato (TIS a doppio contenitore). In questo studio si sono utilizzati due bioreattori, uno per tipologia: (i) il bioreattore Plantform[®], costituito da una scatola di policarbonato delle dimensioni di 180x150x150 mm collegata, attraverso tubi di silicone e filtri a gas, a due pompe ad aria, una che permette la periodica risalita del substrato liquido (500 cc) dalla base del contenitore fino al cestello soprastante ove è posizionato il materiale vegetale, una seconda che determina la ventilazione del contenitore. Frequenza di immersione e ventilazione possono così avere regolazioni diverse; (ii) il bioreattore SETIS[™], costituito da un contenitore di 6 litri in cui crescono i germogli, sormontante un contenitore da 4 litri dove è immerso il substrato liquido (750 cc); una pompa invia aria sterile in pressione nel contenitore sottostante, spingendo il substrato liquido nel contenitore superiore. Al termine di ogni ciclo di immersione, il substrato torna per caduta nel contenitore sottostante; anche questo bioreattore può essere collegato ad una seconda pompa che determina cicli di ventilazione.

Nello studio, condotto presso l'azienda Apice Piante di Ripa Teatina (CH), germogli di *A. deliciosa*, cv Hayward, sono stati posti in proliferazione nei due bioreattori e i risultati ottenuti confrontati con la tradizionale coltura in substrato gelificato; in entrambe le forme di coltura è stato impiegato un substrato MS, addizionato di saccarosio (20 g L⁻¹), BA (0,7 mg L⁻¹), IBA (0,1 mg L⁻¹) e, per la coltura in semi-solido, agar-agar (6,2 g L⁻¹); pH 5,7. I contenitori sono stati posti in cella climatica a 23±1°C di temperatura, intensità luminosa di 40 μmol m⁻² sec⁻¹ e fotoperiodo 16 h.

Si sono rilevati i tassi di crescita relativa (TCR) e di proliferazione, nonché la qualità del materiale ottenuto. Il TCR è stato così calcolato: $\ln PF - \ln PI / n^\circ$ giorni di coltura in TIS x 100, dove PF e PI indicano, rispettivamente, il peso iniziale e finale dei germogli nel periodo di coltura considerato. In fase di ambien-

* ceciliadiprimio@gmail.com

tamento in serra si è inoltre valutata l'attitudine alla radicazione *ex vitro* e all'acclimatazione delle piantule provenienti da coltura in bioreattore.

Sintesi dei risultati nella proliferazione di germogli di 'Hayward' in Plantform® e SETIS™

Sono state necessarie alcune colture iniziali, durante le quali si è pervenuti ad un impiego ottimizzato dei bioreattori, con bassa insorgenza di contaminazione (fungina e batterica) e di vitescenza dei germogli. In generale, la coltura liquida in TIS ha stimolato una buona proliferazione dei germogli di 'Hayward'. E' da rilevare che, in entrambi i bioreattori, la ripresa della proliferazione degli espianti si è evidenziata già dopo 10 giorni di subcoltura, rispetto ai 20 giorni che sono stati necessari nella coltura in substrato gelificato. I principali risultati ottenuti possono essere così sintetizzati:

- dopo due settimane di coltura liquida in TIS, applicando un ciclo di immersione di 12 minuti ogni 6 ore (più efficiente del ciclo di 16 minuti ogni 8 ore che produceva maggiore vitescenza dei germogli) si sono ottenuti valori di TCR di rilievo, sia in Plantform® (17,7), sia in SETIS™ (18,3); nell'arco delle 4 settimane di coltura il parametro si è poi attestato su di 8,5 (Plantform®; fig. 1a) e 9,6 (SETIS™; fig. 1b), significativamente più elevati rispetto alla coltura in substrato gelificato (6,0) di pari lunghezza di tempo;
- il tasso di proliferazione ha confermato la più veloce ripresa delle colture in bioreattore, rispetto a quella in substrato gelificato. Dopo 2 settimane di coltura, i germogli coltivati in substrato gelificato si presentavano ancora scarsamente o per

niente proliferanti; molto diversa la situazione riscontrata per le colture in entrambi i bioreattori TIS che, già dopo 2 settimane, presentavano un'accentuata ripresa della proliferazione. Dopo 4 settimane di coltura, i germogli di 'Hayward' in bioreattore SETIS™, con ciclo di 12 minuti di immersione ogni 6 ore, hanno denotato il tasso di proliferazione più elevato (superiore a 2,5), mentre quello dei germogli in substrato gelificato è sempre stato intorno al valore di 2;

- con entrambi i bioreattori è stata rilevata un'elevata qualità dei germogli prodotti in coltura in TIS, come denotato dalle elevate percentuali di "materiale lavorabile" (il materiale, cioè, a disposizione per la subcoltura, dopo eliminazione dello scarto), sempre superiori al 90%;
- il trasferimento *ex vitro* del materiale proveniente da coltura liquida in TIS è avvenuto in modo molto efficiente (fig. 1c): le percentuali di radicazione e acclimatazione in contenitori alveolari 'Ellepot' da 390 fori sono risultate sempre comprese tra l'81% e l'86%, del tutto comparabili con quanto ottenuto con germogli provenienti da coltura in substrato gelificato (90%).

In conclusione, i risultati di questo studio confermano le potenzialità che ha la coltura liquida in immersione temporanea nella micropropagazione commerciale. Entrambi i bioreattori testati si sono dimostrati validi e capaci di introdurre dei miglioramenti nella propagazione *in vitro* della cv Hayward di kiwi. Tra i due bioreattori oggetto della prova, sebbene i risultati di proliferazione e la qualità dei germogli non abbiano denotato differenze consistenti, la preferenza va al bioreattore SETIS™ in quanto di assemblaggio più semplice e con una maggiore superficie a disposizione della coltura. E' da sottolineare, peraltro, che ogni bioreattore richiede una fase di adattamento alla coltura e prove preliminari, atte a selezionare il più idoneo ciclo di immersione.

Bibliografia

- LAMBARDI M., 2012. *Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea*. Riv. Frutticoltura, 12: 32-38.
- MONETTE P.L., 1986. *Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 6: 73-82.
- STANDARDI A., 1983. *La micropropagazione nella moltiplicazione dell'actinidia*. Frutticoltura, 45: 17-22.
- WESSEL E., NEL D.D., VON STADEN D.F.A., 1984. *In vitro propagation of Actinidia chinensis Pl., cultivar Hayward*. Deciduous Fruit Grower, 34: 453-457.



Fig. 1 - Coltura liquida in bioreattori TIS. Germogli di kiwi, cv Hayward, dopo 4 settimane in Plantform® (a, vista dall'alto) e in SETIS™ (b, vista frontale). Piantula radicata e acclimatata in alveolare da 390 fori, proveniente da coltura liquida in SETIS™ (c).