

Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore ElecTIS

Maurizio Capuana^{1*}, Claudio Depaoli², Elif Aylin Ozudogru³, Maurizio Lambardi^{3*}

¹ IBBR/Istituto di Bioscienze e Biorisorse, CNR, Sesto Fiorentino (FI)

² Laboratorio di Micropropagazione 'Depaoli Claudio', Predaia (TN)

³ IVALSÀ/Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR, Sesto Fiorentino (FI)

Parole chiave: coltura *in vitro*, micropropagazione, TIS

Introduzione

La coltura liquida in immersione temporanea, indicata con l'acronimo TIS (Temporary Immersion System), si sta di recente affermando come l'innovazione più interessante e promettente nel panorama della micropropagazione. Per oltre un trentennio si è tentato di sviluppare sistemi di coltura liquida in bioreattore, con l'obiettivo di evitare la gelificazione del substrato e operare in grandi contenitori che permettessero un elevato grado di automazione del sistema (Mehrotra *et al.*, 2007). Nonostante l'impegno profuso, però, ad oggi la micropropagazione in coltura liquida non è mai realmente uscita dai confini propri della sperimentazione di laboratorio. Le principali applicazioni, in pochissimi casi anche di carattere commerciale, si sono avute per incentivare e automatizzare la proliferazione di colture di callo e linee embrioniche (esempi con colture di carota e talune conifere), bulbilli (*Amaryllis*, *Lilium* spp., ciclamino, giacinto) e microtuberi di patata. Le esperienze relative alla propagazione in bioreattore di colture di germogli sono state, invece, assai sporadiche. Le principali problematiche che si sono evidenziate nell'applicazione della coltura liquida alla micropropagazione classica di germogli sono relative ai danni subiti dal materiale per asfissia, sfregamento in quanto sottoposto ad agitazione nel substrato liquido e insorgenza di anomalie nello sviluppo dei germogli a seguito di iperidricità (Debergh *et al.*, 1992), nota anche come "vitricizzazione" o "vitrescenza". Questa ben nota *in vitro*-patologia che interessa la micropropagazione massale anche in substrato gelificato, in particolare nelle specie da frutto, è amplificata in un sistema che si basa sul continuo contatto con substrato liquido. Inoltre, i sistemi di coltura in biorattore hanno sempre richiesto una straordinaria

attenzione riguardo al controllo delle contaminazioni. Tali problematiche hanno di fatto fortemente ridotto, nel tempo, l'interesse verso la coltura liquida permanente come possibile alternativa alla micropropagazione tradizionale in substrato gelificato. Recentemente, però, l'attenzione si è spostata verso la coltura liquida in TIS che si basa sul concetto di limitare i tempi di contatto delle colture di germogli con il substrato liquido mediante cicli alternanti di immersione dei germogli e di coltura in asciutto (Lambardi, 2012). La periodica immersione dei germogli, peraltro, mantiene i vantaggi propri del sistema liquido che, sostanzialmente, sono (i) un più uniforme contatto tra mezzo di coltura e germogli, rispetto alla coltura in substrato gelificato, (ii) la diluizione dei composti tossici rilasciati dal materiale vegetale (fenoli) che possono determinare ossidazione ed imbrunimento della coltura, (iii) il periodico ricambio dell'atmosfera dei contenitori, fattore che limita l'accumulo di gas (CO₂ ed etilene), tipico dei classici vasi in vetro, (iv) la possibilità, lavorando con contenitori medio-grandi, di allungare consistentemente i tempi di subcoltura, di non dover posizionare con attenzione i germogli nel substrato gelificato e di aggiungere direttamente il substrato liquido man mano che si esaurisce, con conseguente abbattimento dei costi di manodopera in fase di proliferazione, (v) l'ottenimento, con alcune specie, di gruppi di germogli radicati che possono essere mantenuti in proliferazione oppure direttamente inviati alla fase di acclimatazione. Con protocolli ottimizzati di coltura in TIS è possibile, inoltre, incrementare i tassi di proliferazione dei germogli, limitarne i problemi di iperidricità e, in generale, migliorarne le caratteristiche qualitative.

I principali sistemi disponibili a livello commerciale sono a singolo (RITA[®], Plantform[®]) o a doppio contenitore (SETIS[™]). Sebbene la sperimentazione di cui sono stati oggetto sia tuttora piuttosto limitata e spesso sviluppata dalle stesse aziende produttrici, le prove condotte in alcuni laboratori di ricerca ne hanno dimostrato l'efficacia nel promuovere la fase di proli-

* lambardi@ivalsa.cnr.it

ferazione, sia in termini di quantità del materiale che si produce, sia di qualità dei germogli da destinare alle successive fasi del ciclo di micropropagazione. In questi bioreattori è il substrato liquido l'elemento "in movimento", cosa che avviene con l'insufflamento forzato di aria dall'esterno all'interno dei contenitori attraverso filtri per gas. Questo meccanismo rappresenta un punto debole di tali sistemi che spesso vanno incontro a frequenze di inquinamento superiori alla coltura in substrato gelificato.

Il bioreattore ElecTIS

ElecTIS è un bioreattore a singolo contenitore (brevetto di Claudio Depaoli n° 2617282) che nasce dall'idea di eliminare l'insufflamento forzato di aria, rendendo invece mobile la coltura di germogli e stazionario il substrato liquido. Il movimento temporizzato di salita e discesa del cestello contenente la coltura assicura il contatto periodico col substrato liquido, posizionato alla base del contenitore (fig. 1a). Il movimento del cestello è dovuto ad una pompa aspirante che, quando in funzione, fa ritrarre i pistoncini ai quali si aggancia il cestello, facendolo salire, con conseguente emersione del materiale vegetale; il ciclo di immersione è regolato da un timer. Le prove preliminari in corso presso il CNR di Sesto Fiorentino (IVALSA e IBBR) hanno al momento riguardato 3 specie: (1) germogli di paulownia che hanno tratto grande beneficio dalla coltura in substrato liquido in TIS, regolato dal sistema ElecTIS con cicli di immersione di 16 minuti ogni 8 ore, con una qualità elevata del materiale vegetale e nessun segno di iperidricità (fig. 1b). Il tasso di crescita relativo (RGR, Relative Growth Rate) della coltura [calcolato come: $RGR = (\ln \text{ peso finale} - \ln \text{ peso iniziale}) \times 100 / \text{n° di giorni di coltura}$] ha evidenziato dopo 3 settimane una superiore proliferazione in ElecTIS (13,6), rispetto alla coltura tradizionale in substrato gelificato (9,8); (2) germogli di crisantemo che si avvantaggiano della coltura in TIS con ElecTIS; dopo 3 settimane di coltura, i valori di RGR sono passati da 6,1 in substrato gelificato, a 10,0 in ElecTIS; anche in questo caso è risultata elevata la qualità del materiale a fine subcoltura; (3) germogli di eucalipto, ove la coltura in ElecTIS con un ciclo di 4 minuti di immersione ogni 6 ore è risultata molto più efficiente che in Plantform®, con RGR rispettivamente di 14,0 e 6,2 dopo 3 settimane di coltura.

In conclusione, il sistema di coltura liquida in TIS si sta confermando un sistema di micropropagazione molto promettente ed è auspicabile uno sviluppo di bioreattori sempre più efficienti ed affidabili, con l'o-

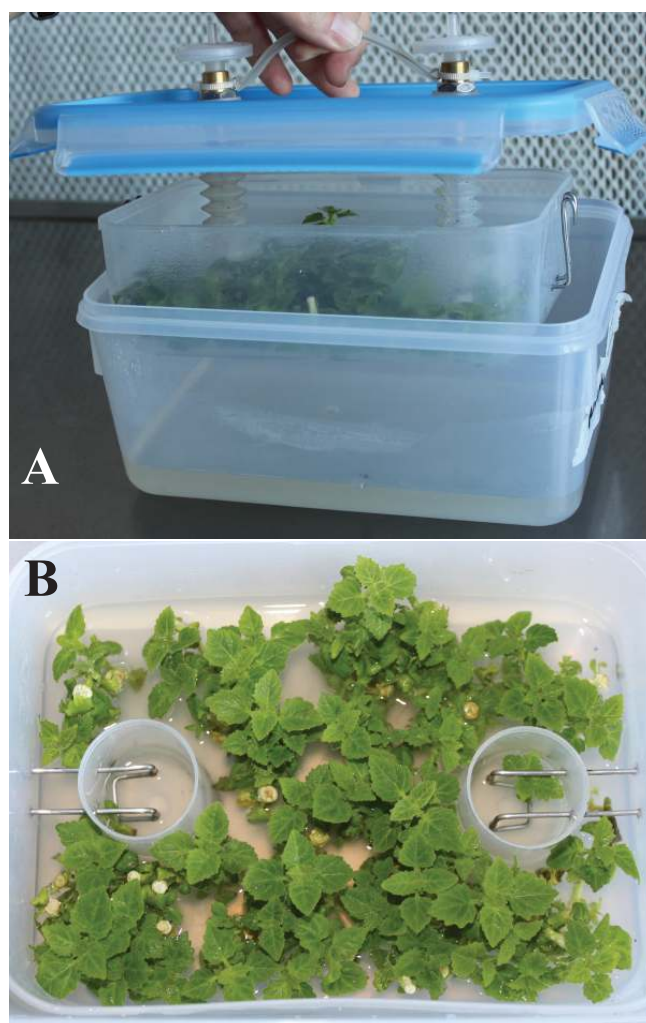


Fig. 1 - a) le diverse parti che compongono il bioreattore ElecTIS. Dall'alto: il coperchio, surmontato dai filtri a gas e sotto il quale si inseriscono i pistoncini di movimento, il cestello e il contenitore, nel quale si colloca il substrato liquido di coltura; b) germogli di paulownia, dopo 3 settimane di coltura.

biiettivo di una pratica applicazione alla produzione commerciale. In tal senso, ElecTIS si pone all'attenzione per i suoi aspetti innovativi che riducono fortemente i rischi di inquinamento, tipici dei sistemi che si basano sull'insufflamento di aria all'interno dei contenitori. I risultati preliminari fin qui ottenuti sono di assoluto interesse pratico.

Bibliografia

DEBERGH P., AITKEN-CHRISTIE J., COHEN D., GROUT B., ARNOLD S. VON, ZIMMERMAN R., ZIV M., 1992. *Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 30 (2): 135-140.
 LAMBARDI M., 2012. *Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea*. Frutticoltura, 12: 32-38.
 MEHROTRA S., GOEL M.K., KUKREJA A.K., MISHRA B.N., 2007. *Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization*. African J. Biotech., 6 (13): 1484-1492.