

Effetto dell'illuminazione a LED sulla propagazione *in vitro* di pero cv William

Aniello Luca Pica*, Alberto Iannuzzi, Maria Raffaella Ortolani, Cristian Silvestri, Eddo Rugini, Valerio Cristofori

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

Effects of LED light on *in vitro* propagation of pear cv William

Abstract. Light is one of the most important factor affecting the development of plants, since the photosynthesis and photo-morphogenetic processes are closely light-dependents. The main variables that characterize light are the quality (different wavelengths), the amount (different values of photonic flow density) and the photoperiod. Fluorescent lamps (especially cool-white), which emit in the visible (400-700 nm) and in the invisible (700-850 nm) wavelengths and with a peak emission in the yellow (~589 nm) one, are employed in the growth chambers, and recently the Light Emitting Diodes (LEDs) have been introduced as an alternative to traditional fluorescent lamps since they are smaller, have an average life of 50,000 hours, produce less heat dispersion and allow to save energy by up to 80% compared to traditional lights. The growth, development and quality of shoots by controlling the light quality, in the recent years has attracted the attention of researchers. The purpose of this work was to examine the effects of continuous LED light spectra on the morphological and physiological response of *in vitro* micropropagated pear shoots of cv William, in order to reduce the costs and increase the quality of micropropagated material. The shoots were cultured for 4 weeks in a growth chamber at 22±1°C, with photoperiod 16/8h, under the effect of five different light spectra: 1) Fluorescent (LF) as control, 2) Arch 3) NS2 (characterized by high percentages of green and yellow, and different percentages of red), 4) AP67 (characterized by a high percentage of red and blue) 3) and G2 (characterized by high percentage of red and red distant and one low percentage of blue). In order to evaluate the response of the cultivar studied, the parameters of growth (average number of shoots per explant, average node number, mean shoot length), photosynthetic pigments (total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids), total proteins and malondialdehyde

(MDA) as an index of oxidative stress. The results have shown that some combinations of LED lights are a valid alternative to fluorescent lights in the multiplication phase of pear shoots cv William, resulting in good growth of the explants, as demonstrated by morphological and physiological parameters. Further investigations will be carried out on the *in vitro* rooted plants of pear and in the subsequent acclimatization phase of the young plantlets. The results underline the importance of the modulation of light sources in relation with different species and varieties, allowing to optimize the different steps of micropropagation.

Key words: *Pyrus communis* L., light quality, explants, morphology, physiological parameters.

Introduzione

Un obiettivo della propagazione *in vitro* è quello di ottenere una notevole quantità di individui per ogni singola accessione al fine di disporre di un quantitativo elevato di materiale in poco tempo e poco spazio partendo da un ridotto numero di piante madri, con cicli di propagazione indipendenti dalla stagionalità, con garanzia di sanità e di rispondenza genetica del materiale ottenuto. Tuttavia, per l'allevamento delle piante in camere climatiche fino ad oggi sono state utilizzate lampade fluorescenti, ad incandescenza o ai vapori di sodio che presentano alcuni svantaggi. Attualmente, si stanno sperimentando nuove fonti luminose come i diodi ad emissione luminosa, o LED, che oltre a presentare dimensioni ridotte, una durata più lunga, un basso consumo energetico e una ridotta emissione di calore, possono emettere luce monocromatica generando uno spettro luminoso capace di soddisfare al meglio le esigenze fotosintetiche delle piante (Astolfi et al., 2012). Tuttavia la messa a punto di un protocollo adeguato, che prenda in considerazione esigenze specifiche per ogni singola varietà necessita di continue rielaborazioni e studi. Il lavoro svolto ha riguardato l'ottimizzazione di alcuni parametri per la coltura *in vitro* della varietà di pero "William", attra-

* aniello.pica@unitus.it

verso la valutazione dell'effetto della fonte luminosa durante la fase di crescita, e l'analisi delle risposte morfometriche e fisiologiche delle piante, confrontando i risultati ottenuti con piante allevate utilizzando lampade fluorescenti.

Materiali e Metodi

Il materiale utilizzato (germogli di pero della cv William) è stato subcolturato su un substrato contenente macronutrienti, micronutrienti e vitamine di Murashige & Skoog (1962), aggiunto di saccarosio (3%), 6-benzilaminopurina (BAP - 1 mg/L), acido naftalenacetico (NAA - 0,1 mg/L) e Plant Agar (0,6%). Le prove sono state condotte sotto differenti lampade (fig. 1), e le indagini sono state effettuate dopo 4 settimane. In particolare, la lampada AP67 è composta per la maggior parte da luce rossa, con percentuali di verde, blu e rosso lontano. È uno spettro già impiegato con successo nella propagazione di specie ortive ed ornamentali, oltre che per l'allevamento di piantine di limone; la lampada ARCH, rispetto alla AP67, comprende radiazione verde supplementare per rendere la luce bianca all'occhio umano e non include nessuna luce UV; NS2 è uno spettro costituito principalmente dalla luce verde, rossa e blu, a forte intensità luminosa, ed è lo spettro che più si avvicina alla luce solare; G2 è uno spettro che si differenzia da tutti gli altri per la forte presenza di rosso e rosso lontano, con basse percentuali di blu e verde. Sono stati condotti

	Lunghezza d'onda (nm)	AP67	NS2	ARCH	G2
Ultravioletto	<400	0%	0,5%	0%	0%
Blu	400-500	14%	21%	14%	8%
Verde	500-600	16%	38%	31%	2%
Rosso	600-700	53%	35%	43%	65%
Rosso Scuro	700-800	17%	6%	12%	25%

Fig. 1 - Valori medi dei rilievi morfologici e biochimici eseguiti a carico dei germogli di pero cv William in funzione delle sorgenti luminose impiegate. Lettere differenti sul grafico indicano differenze significative per $P < 0.01$ (Duncan's test).

Fig. 1 - Average values of morphological and biochemical traits carried out on pear shoots cv William according to the light sources used. Different letters on the graph indicate significant differences $P < 0.01$ (Duncan's test).

rilievi morfologici (numero medio dei germogli neoformati, numero medio di nodi per espianto, lunghezza del germoglio principale) e biochimici (proteine totali, malondialdeide, clorofilla totale, clorofilla a, clorofilla b, carotenoidi) (Ortolani, 2016). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) mediante il pacchetto DSAASTAT (Onofri, 2007). La separazione delle differenze statistiche significative è stata effettuata mediante il test di Duncan ($P < 0,05$).

Risultati e discussioni

L'analisi dei parametri morfologici e biochimici è descritta in figura 2. Per quanto riguarda i germogli

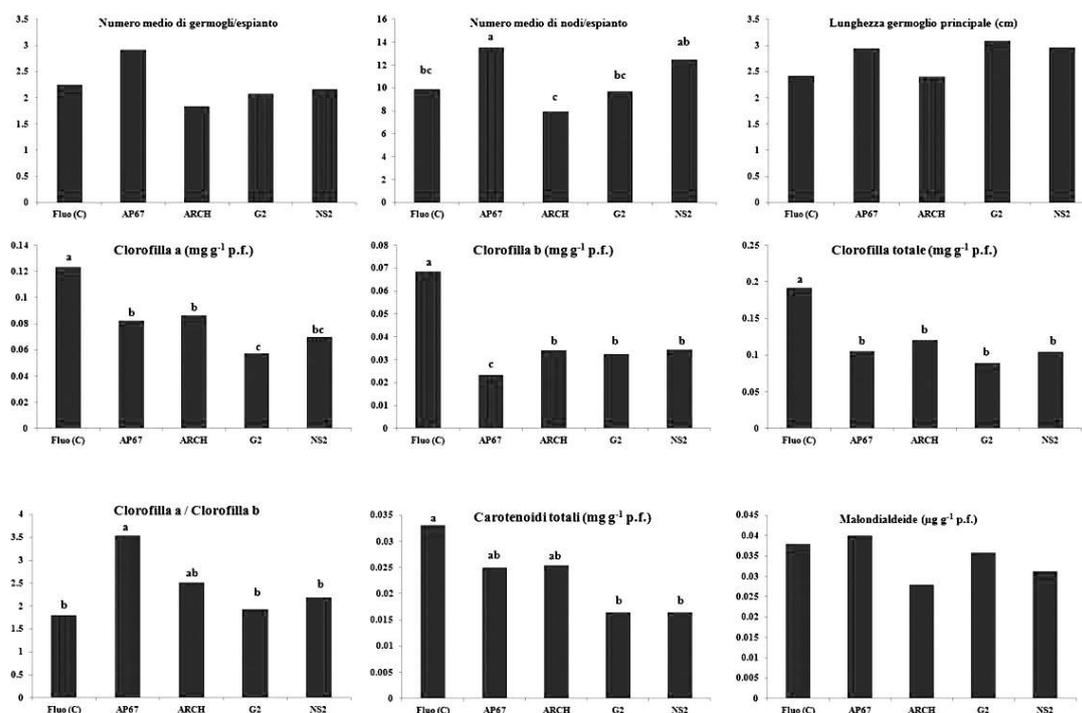


Fig. 2 - Composizione spettrale delle sorgenti luminose impiegate nell'esperimento.
Fig. 2 - Relative spectral distribution of the light treatments used in the experiment.

neo-formati, l'analisi statistica ha evidenziato un significativo effetto dello spettro AP67, che mostrava un aumento del numero medio di nodi e del numero medio di germogli per espianto. In particolare, la cv Williams mostrava una diminuzione del contenuto di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi, in tutte le tesi con lampade a LEDs. Interessante è il dato che deriva dal rapporto clorofilla a/clorofilla b, superiore per lo spettro AP67. Alti valori di questo rapporto, associati a bassi livelli di clorofilla totale, sono indice di stress che si riflette direttamente sulla capacità fotosintetica delle piante (Spiller e Terry, 1980).

Lo stress ossidativo dei tessuti, misurato attraverso la determinazione della MDA, non ha fatto registrare alcun aumento con l'impiego di lampade a LED ad esclusione dello spettro AP67, rispetto ai valori del controllo.

Il contenuto di MDA nei tessuti delle piante è considerato un marker biochimico della perossidazione lipidica e del danneggiamento delle membrane cellulari (Bacelar et al., 2006; Sochor et al., 2012), essendo uno dei prodotti finali della perossidazione degli acidi grassi insaturi in fosfolipidi. La riduzione del contenuto di MDA nelle piante allevate con luci LED potrebbe indicare, quindi, che i diodi ad emissione luminosa non incrementano il danno ossidativo alle membrane causato dalla perossidazione lipidica.

Conclusioni

I germogli di pero cv William hanno mostrato una risposta positiva all'illuminazione a LED. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere le complesse relazioni tra il tipo di radiazione luminosa e lo sviluppo degli individui vegetali. In particolare, è auspicabile identificare una luce LED in grado di emettere uno spettro che possa riprodurre la qualità della luce tipica dell'areale di accrescimento, rendendola un parametro definibile nella crescita e nell'ambientamento di specie frutticole così come già viene fatto per gli altri parametri ambientali (p.e. la temperatura) e per la tipologia di terreno utilizzato. In questo modo si potrebbero ulteriormente migliorare le caratteristiche del materiale ottenuto e la capacità di attecchimento delle piante nella successiva fase di trasferimento *ex-vitro*. I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia delle luci LED nella micropropagazione del pero, tanto che una loro più diffusa applicazione con-

sentirebbe di ridurre considerevolmente i costi energetici nelle diverse fasi per le caratteristiche di ridotto consumo energetico, di elevato numero di ore di funzionamento e di bassa emissione di calore.

Riassunto

Lo scopo del lavoro era di esaminare gli effetti di spettri continui di luce LED sulla risposta morfologica e fisiologica di pero cv. William allevato *in vitro*, al fine di ridurre i consumi ed aumentare la qualità degli espianti. I risultati hanno evidenziato che alcune combinazioni di LED rappresentano una valida alternativa alle luci fluorescenti nella fase di propagazione dei germogli, determinando una buona crescita degli espianti, sia a livello morfologico che fisiologico. Ulteriori indagini saranno condotte a carico dei germogli radicati *in vitro* e nella successiva fase di acclimatazione delle giovani piantine.

Parole chiave: *Pyrus communis* L., qualità della luce, espianti, morfologia, parametri fisiologici.

Bibliografia

- ASTOLFI S., MARIANELLO C., GREGO S., BELLAROSA R., 2012. *Preliminary investigation of LED lighting as growth light for seedlings from different tree species in growth chambers*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(2), 31-38.
- BACELAR E.A., SANTOS D.L., MOUTINHO-PEREIRA J.M., GONÇALVES B.C., FERREIRA H.F., CORREIA C.M., 2006. *Immediate responses and adaptive strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage*. Plant Sci., 170: 596-605
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiology Plant: 473-497.
- SOCHOR J., RUTTKAY-NEDECKY B., BABULA P., ADAM V., HUBALEK J., KIZEK R., 2012. *Automation of methods for determination of lipid peroxidation, lipid peroxidation*. In: Catala A (ed), ISBN: 978953-51-0716-3, InTech, DOI: 10.5772/45945.
- ONOFRI A., 2007. *Routine statistical analyses of field experiments by using an Excel extension*. Proc. 6th National Conference Italian Biometric Society: "La statistica nelle scienze della vita e dell'ambiente", Pisa, 20-22 June 2007, 93-96.
- ORTOLANI M.R., 2016. *Studio delle variazioni morfometriche e biochimiche di alcune specie forestali mediterranee sottoposte a differenti tipologie di diodi ad emissione luminosa*. Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie per la Gestione Forestale ed Ambientale.
- SPILLER S. TERRY N., 1980. *Limiting factors in photosynthesis: II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units*. Plant Physiol. 65: 121_125.