

## Applicazioni della tecnologia dell'incapsulamento per la propagazione e conservazione *in vitro* di specie ornamentali

Anna De Carlo\* e Carla Benelli

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

### Application of the encapsulation technology for *in vitro* propagation and conservation of ornamental plants

**Abstract.** The synthetic seed technology, initially developed for the clonal propagation of fruit species through the encapsulation of somatic embryos, is now available for the use with different explants, such as buds and nodal segments. Thus, the technology has been recently applied also to plant species for which somatic embryogenesis is not developed. As for ornamental plants, to date still few are the reports dealing with the production and the utilization of synthetic seeds. The present study was conducted to develop an efficient encapsulation protocol for non embryogenic explants from various ornamental plants: *Photinia x fraseri* Dress., *Syringa vulgaris* L., *Polygala myrtifolia* L. and *Metrosideros excelsa* Soland. ex Gaertn. The technique was then tested in terms of synthetic seed "germination" and average days of synthetic seed germination (TMG). For encapsulation, buds were excised, directly immersed in a sodium-alginate solution, and then released drop wise in 100mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  for bead hardening. With photinia, best results were achieved when the synthetic seeds were prepared by using 3% Na-alginate, beads hardened for 30 min and 30 or 60 g/l sucrose was included in artificial endosperm. This way, 100% of synthetic seeds germinated and converted to shoots in a period of 12-17 days. The synthetic seeds of lilac, containing apical buds, showed a lower germination time (11-12 days) when 10-30 g/l sucrose was included in their artificial endosperm. In *P. myrtifolia* and *M. excelsa*, up to 86% and 93% of synthetic seeds respectively, germinated after 13 and 17 days when 30 g/l sucrose was added to alginate beads. Successful medium-term conservation was then achieved with the storage of synthetic seeds of *Metrosideros* at 10°C in the dark. With this approach, 90% of synthetic seeds still germinated after 2 months and 75% after 4 months of cold storage.

**Key words:** Na-alginate, *in vitro* culture, slow growth storage, synthetic seeds.

### Introduzione

La coltura *in vitro* offre importanti strumenti per la propagazione di massa di piante ornamentali, tuttavia per alcune di queste specie o varietà sono presenti ancora delle difficoltà dovute principalmente ai bassi tassi di proliferazione, alla limitata capacità di adattamento o di radicazione delle piantine durante l'acclimatamento. Tra le biotecnologie vegetali recentemente sviluppate, la tecnologia dell'incapsulamento per la produzione di semi sintetici risulta molto promettente per migliorare la micropropagazione e la conservazione *in vitro* delle piante ornamentali, soprattutto se applicata su larga scala al settore commerciale (Ruffoni *et al.*, 1994; 2002; Lambardi *et al.*, 2006). La tecnologia dell'incapsulamento è stata applicata per la prima volta agli embrioni somatici, come sistema in grado di simulare la formazione e la germinazione dei semi naturali (Murashige, 1977). Più tardi, la tecnologia è stata estesa ad altri propaguli *in vitro*-derivati inclusi in un "endosperma artificiale", quali gemme ascellari, segmenti nodali o porzioni di callo, che, a seguito dello sviluppo, si evolvono in semenzale o in germoglio (conversione) o portano alla proliferazione di nuove cellule (ricrescita). Quindi, nel tempo, la definizione è stata ampliata considerando il seme sintetico come "l'incapsulamento artificiale di embrioni somatici, germogli o di altri tessuti che possono essere utilizzati per la semina *in vitro* o in condizioni di *ex vitro*" (Aitken-Christie *et al.*, 1995) ed inoltre "che possono mantenere la potenzialità germinativa anche dopo la conservazione" (Capuano *et al.*, 1998; Ara *et al.*, 2000). Per un maggiore approfondimento sull'uso di espianti non-embriogenici per la produzione di semi sintetici si rimanda alla *review* di Standardi e Piccioni (1998). I vantaggi offerti dalla tecnologia dell'incapsulamento sono molteplici nel campo della propagazione, del trasporto e della conservazione del materiale (Rai *et al.*, 2009). L'applicazione più recente prevede l'utilizzo del seme sintetico nella conservazione a medio e a lungo termine. La conservazione a medio termine ha come finalità quella di aumentare l'intervallo fra le subcolture riducendo la crescita degli espianti. La conservazione a lungo termine inve-

\* decarlo@ivalsa.cnr.it

ce prevede lo stoccaggio del materiale in azoto liquido (cioè alla temperatura di  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e tra le tecnologie criogeniche oggi disponibili, due prevedono l'utilizzo di semi sintetici: la tecnica dell'incapsulamento-disidratazione e dell'incapsulamento-vitrificazione (Lambardi e Benelli, 2007; Lambardi e De Carlo, 2009; De Carlo *et al.*, 2009).

Nonostante l'utilizzo di espianti non embriogenici per la preparazione dei semi sintetici sia più recente in confronto all'uso degli embrioni, tale tecnologia ha comunque raggiunto interessanti risultati. In questo ambito, per "conversione" si intende lo sviluppo del germoglio, cioè la rottura della capsula di alginato con la fuoriuscita del germoglio, che spesso viene denominata anche "germinazione". Lo sviluppo della piantina prosegue con un successivo step che prevede la radicazione del germoglio in substrato contenente auxina oppure in alternativa trattando gli espianti con promotori della radicazione prima dell'incapsulamento e quindi permettendo lo sviluppo del seme sintetico direttamente in plantule radicate (Welder e Pawlicki, 1993; Capuano *et al.*, 1998; Micheli *et al.*, 2002). Protocolli efficaci di preparazione di semi sintetici con espianti non embriogenici sono stati ottenuti anche recentemente per le specie da frutto (Adriani *et al.*, 2000; Romay Alvarez *et al.*, 2002; Sicurani *et al.*, 2001; Brischia *et al.*, 2002; Nower *et al.*, 2007), mentre ancora limitate risultano le applicazioni della tecnica alla propagazione e conservazione delle specie ornamentali (Pattnaik e Chand, 2000; Lambardi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Daud *et al.*, 2008; Ozden-Tokatli *et al.*, 2008; Taha *et al.*, 2008; Mohanraj *et al.*, 2009; Ozudogru *et al.*, 2010).

La conservazione a medio termine di espianti incapsulati di specie ornamentali è stata condotta generalmente in condizioni di crescita rallentata alla temperatura di  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , per tempi di conservazione che oscillano tra un minimo di 1 mese e mezzo ad un massimo di 1 anno e mezzo e con percentuali di germinazione abbastanza variabili (Lambardi *et al.*, 2006). Pertanto, lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare idonei protocolli di incapsulamento di materiale non embriogenico di 4 specie ornamentali, valutando l'influenza del tipo di espianto, del tempo di scambio ionico e della concentrazione di saccarosio nell'endosperma artificiale sulla germinazione e sul tempo medio di germinazione (TMG) dei semi sintetici. Sono riportati anche i risultati preliminari di germinazione *in vivo* di semi sintetici di fotinia con la prospettiva di un uso pratico della tecnica in campo vivaistico. Infine, è stata valutata la possibilità di conservazione a medio termine in condizione di crescita rallentata i semi sintetici di metrosideros.

## Materiali e metodi

Sono stati utilizzati germogli provenienti da colture *in vitro* di fotinia (*Photinia x fraseri* Dress.), lillà (*Syringa vulgaris* L.), poligala a foglie di mirto (*Polygala myrtifolia* L.) e metrosideros (*Metrosideros excelsa* Soland. ex Gaertn.). I germogli, già stabilizzati *in vitro*, sono stati mantenuti in proliferazione in vasi di vetro da 500 cc a  $23\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo di 16h e intensità luminosa di  $60\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  e subcoltivati ogni 3 settimane (condizioni standard di coltura). I substrati di coltura utilizzati sono stati: QL (Quoirin e Lepoivre, 1977) con l'aggiunta di 4,4 mM 6-benziladenina (BA) per la fotinia; MS (Murashige e Skoog, 1962) contenente 0,88 mM di BA per il metrosideros; DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) per il lillà e per la poligala, contenente 4,4 e 2,2 mM di BA, rispettivamente. Tutti i substrati utilizzati erano addizionati di 30 g/l di saccarosio, gelificati con agar (7 g/l) ed il pH aggiustato a 5,8 prima dell'autoclave.

Per ogni specie, gli espianti prelevati (gemme apicali e/o ascellari e segmenti uninodali) sono stati immersi in una soluzione incapsulante di MS (priva di calcio) contenente 3% Na-alginato. Nel caso degli espianti di fotinia sono state utilizzate diverse concentrazioni di Na-alginato (2, 3 e 4%). Successivamente, gli espianti sono stati prelevati dalla soluzione incapsulante e rilasciati a goccia in una soluzione complessante, composta da MS con 100mM di  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Uno step importante della procedura è quello di valutare il tempo più idoneo di solidificazione della capsula che ne permetta un'opportuna manipolazione senza compromettere la fuoriuscita del germoglio, quindi sono stati testati diversi tempi di indurimento. Inoltre, è stato valutato l'effetto della componente glucidica aggiunta all'endosperma artificiale delle capsule. Gli espianti incapsulati sono stati trasferiti su idonei substrati di ricrescita e mantenuti in condizioni standard di coltura. La germinazione è stata espressa come percentuale di semi sintetici che mostravano la fuoriuscita del germoglio dalla capsula ed il tempo medio di germinazione (TMG) calcolato come segue:  $\Sigma (\text{NxTx}) / \text{n}^{\circ}$  di semi germinati, dove Nx è il numero di semi che germinano in intervalli consecutivi di tempo, Tx il numero di giorni tra l'inizio della prova e la fine dell'intervallo di tempo specifico.

Per la valutazione della germinazione *in vivo*, i semi sintetici di fotinia sono stati posti su substrato sterilizzato di torba e perlite in alveoli all'interno di contenitori in plastica, con aperture regolabili, poi messi in camera di crescita in condizioni standard di coltura. L'umidità all'interno del contenitore è stata mantenuta sempre elevata con innaffiature regolari.

Dopo l'ottimizzazione del protocollo di incapsulamento, sono state condotte delle prove di conservazione in crescita rallentata di semi sintetici di metrosideros. Gemme apicali sono state incapsulate in 3% di Na-alginato e lasciate indurire nella soluzione complessante per 30 min, quindi le capsule sono state poste in conservazione a 4 e 10°C in oscurità. Dopo 2, 4, 6 e 8 mesi di conservazione le capsule sono state trasferite su substrato fresco in condizioni standard per una subcoltura (21 giorni) e quindi ne è stata valutata la capacità di ripresa proliferativa.

Ogni esperimento è stato effettuato con un minimo di 30 gemme e ripetuto almeno due volte. L'analisi statistica dei dati percentuali è stata effettuata mediante il test non parametrico il "Post Hoc Multiple Comparisons Test" (Marascuilo e McSweeney, 1977).

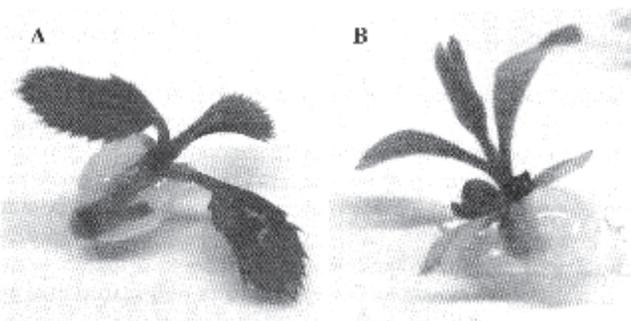
## Risultati e discussione

### *Photinia x fraseri*

Un ottimo scambio ionico  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  con la produzione di capsule idonee per la germinazione è stato ottenuto quando gemme apicali di fotinia sono state incapsulate con una soluzione contenente 3 o 4% Na-alginato e indurite nella soluzione complessante per 30 min. Con questa combinazione oltre l'86% dei semi sintetici sono germinati con un TMG di 10-12 giorni e hanno sviluppato germogli allungati (tab. 1; fig. 1A). Percentuali simili di germinazione sono state ottenute da altri Autori in semi sintetici di orchidee (Saiprasad e Polisetty, 2003) e *Morus* spp. (Patnaik e Chand, 2000). Un'analogia germinabilità, ma con un TMG inferiore è stata ottenuta con capsule di alginato indurite per 20 min; i semi sintetici però, in questo caso, risultavano troppo morbidi e fragili, rendendoli non idonei per la manipolazione durante il trasferimento nel terreno di coltura o per la conservazione. Pertanto, negli esperimenti successivi sono stati utilizzati i semi sintetici con 3% Na-alginato e induriti per 30 min. E' stata valutata l'influenza del tipo di espianto e l'effetto dell'aggiunta di saccarosio. Le gemme

Fig. 1 - Germinazione di gemme apicali di *Photinia x fraseri* (A) e *Syringa vulgaris* (B) incapsulate con 3% di Na-alginato, 60 g/l di saccarosio e indurite per 30 min.

Fig. 1 - Germination of *Photinia x fraseri* (A) and *Syringa vulgaris* (B) apical buds encapsulated with 3% Na-alginate, 60 g/l sucrose and hardened for 30 min.



apicali hanno notevolmente beneficiato dell'aggiunta del saccarosio nell'endosperma artificiale arrivando ad una germinazione totale delle capsule in 12 giorni con l'aggiunta di 60 g/l e in quasi 17 giorni con l'aggiunta di 30 g/l di saccarosio (tab. 2). I segmenti uninodali, al contrario, sono risultati meno idonei all'incapsulamento, mostrando sia una bassa germinazione (47%) sia un TMG più prolungato (20-22 giorni). La prova di germinazione *in vivo* dei semi sintetici di fotinia, sebbene preliminare, ha fornito risultati molto promettenti, con il 63% di germinazione dopo 3 settimane dalla semina. Sono necessarie, ulteriori indagini per migliorare la fase di radicazione e limitare l'inquinamento.

### *Syringa vulgaris*

Con questa specie sono state condotte prove di germinabilità valutando sia l'effetto del tipo di gemma, apicale o ascellare, che dell'aggiunta del saccarosio nell'endosperma artificiale. L'aggiunta di saccarosio ha portato un effetto positivo sulla propagazione dei semi sintetici contenenti gemme apicali di lilla con tutte le concentrazioni testate, mostrando percentuali sempre maggiori dell'81% (tab. 3; fig. 1B). In particolare, in termini di rapidità di germinazione, le gemme apicali incapsulate, contenenti 10 o 30 g/l

Tab. 1 - Germinabilità (GER) e tempo medio di germinabilità (TMG) di semi sintetici di *Photinia x fraseri*, contenenti gemme apicali, preparati con differenti concentrazioni di Na-alginato e induriti per tempi diversi (in ogni colonna, lettere differenti indicano percentuali significativamente diverse,  $p \geq 0,05$ ).

Tab. 1 - Germinability (GER) and germination time (TMG) of *Photinia x fraseri* synthetic seeds, containing apical buds, prepared with different Na-alginate concentrations and hardened for increasing times (in each column, different letters indicate percentages significantly different at  $p \geq 0,05$ ).

Concentrazione di Na-alginato (%)	Durata dello scambio ionico					
	20 min		30 min		40 min	
	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)
2	85,5a	6,8	77,7a	12,1	76,6a	7,0
3	81,8a	8,0	86,1a	10,6	66,7a	7,9
4	84,2a	8,8	86,9a	11,9	75,8a	10,1

Tab. 2 - Germinabilità (GER) e tempo medio di germinabilità (TMG) di semi sintetici di *Photinia x fraseri*, contenenti gemme apicali o segmenti uninodali (in ogni colonna, lettere differenti indicano percentuali significativamente diverse,  $p \geq 0,05$ ).

Tab. 2 - Germinability (GER) and germination time (TMG) of *Photinia x fraseri* synthetic seeds, containing apical buds or uninodal segments (in each column, different letters indicate percentages significantly different at  $p \geq 0.05$ ).

Concentrazione saccarosio (g/l)	Gemme apicali		Segmenti uninodali	
	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)
30	100,0a	16,9	16,7b	20,0
60	100,0a	12,1	46,6a	22,1

di saccarosio, presentano un TMG inferiore, pari a 11-12 giorni, rispetto all'assenza di saccarosio e con la maggiore concentrazione di saccarosio (60 g/l) utilizzata nella prova. Rispetto ai semi sintetici privi di saccarosio nell'endosperma artificiale, anche i semi contenenti le gemme ascellari presentano percentuali maggiori di germinazione aggiungendo 10 o 30 g/l di saccarosio, non superando comunque il 61% di germinazione e registrando un notevole ritardo nel TMG: circa 15 giorni in più rispetto ai semi sintetici contenenti le gemme apicali. La concentrazione di 60 g/l di saccarosio ha determinato la più bassa percentuale di germinabilità (27%) con le gemme ascellari (tab. 3).

### *Polygala myrtifolia*

I semi sintetici di questa specie sono stati preparati utilizzando due diverse concentrazioni di saccarosio ed è stato valutato il tempo idoneo di indurimento della capsula, confrontando 15, 20, 30 e 40 min di immersione nella soluzione complessante. Come per il lillà, anche le gemme di poligala hanno beneficiato dell'incapsulamento mostrando una più elevata percentuale di germinazione rispetto alle gemme non incapsulate (87% vs 60%) (dati non mostrati), mantenendo il TMG costante, pari a circa 13 giorni con l'aggiunta di 30 g/l di saccarosio. La combinazione ottimale è stata ottenuta aggiungendo 30 g/l di sacca-

Tab. 3 - Germinabilità (GER) e tempo medio di germinabilità (TMG) di semi sintetici di *Syringa vulgaris*, contenenti gemme apicali e ascellari, con diverse concentrazioni di saccarosio (in ogni colonna, lettere differenti indicano percentuali significativamente diverse,  $p \geq 0,05$ ).

Tab. 3 - Germinability (GER) and germination time (TMG) of *Syringa vulgaris* synthetic seeds, containing apical or axillary buds, added of various concentrations of sucrose (in each column, different letters indicate percentages significantly different at  $p \geq 0.05$ ).

Concentrazione saccarosio (g/l)	Gemme apicali		Gemme ascellari	
	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)
0	76,0b	21,4	37,8b	31,0
10	81,5a	11,4	61,3a	25,8
30	87,5a	12,2	45,2a	23,7
60	88,0a	16,2	26,9b	25,1

rosio e lasciando indurire le capsule per 15 e 20 min. Aumentando il tempo di indurimento, le percentuali di germinazione diminuiscono. Inoltre, anche con questa specie, come visto per i semi sintetici di lillà, la maggiore concentrazione di saccarosio ha determinato un rallentamento nel TMG, ma ha determinato anche una marcata diminuzione della germinazione, in contrasto con quanto osservato con le capsule di lillà e di fotinia (tab. 4).

### *Metrosideros excelsa*

Le gemme apicali incapsulate di metrosideros sono state utilizzate sia per prove di propagazione che di conservazione a bassa temperatura. La fase di ottimizzazione del protocollo di incapsulamento ha previsto l'individuazione del miglior tempo d'indurimento della capsula e la migliore concentrazione di saccarosio al fine di produrre semi sintetici idonei ad una pronta germinazione, ad un'opportuna manipolazione e conservazione. I semi sintetici contenenti le gemme apicali di metrosideros hanno mostrato un'ottima percentuale di germinabilità (dal 47% al 93%) con entrambe le concentrazioni di saccarosio utilizzate (tab. 5); tali percentuali risultano superiori a quelle osservate da Iapichino e collaboratori (2009) nella stessa specie, sebbene il TMG sia prolungato di qualche giorno. Si evidenzia, infatti, anche per il metrosideros, come visto in poligala e lillà, un moderato ritardo nei tempi di sviluppo con la concentrazione maggiore di saccarosio (tab. 5): il TMG è compreso fra 16 e 22 giorni con 30 g/l di saccarosio, mentre tale valore risulta più elevato e compreso fra 21 e 30 giorni con 60 g/l di saccarosio. Inoltre, utilizzando 60 g/l di saccarosio sono stati sufficienti 20 min di indurimento, mentre con 30 g/l di saccarosio, la durata dello scambio ionico deve essere prolungata di ulteriori 10 minuti per ottenere un'elevata conversione delle capsule.

Dopo l'ottimizzazione del protocollo di incapsulamento, le gemme apicali di metrosideros escisse da germogli in proliferazione *in vitro* sono state incapsulate in 3% di Na-alginato e indurite per 30 min, quindi sono state poste in conservazione in condizione di crescita rallentata. Sono state testate due diverse temperature, 4 e 10 °C, quest'ultima in considerazione della bassa tolleranza al freddo della specie, e in condizioni di oscurità. E' stata valutata la capacità germinativa e il TMG dopo 2, 4, 6 e 8 mesi di conservazione. Con lo stoccaggio a bassa temperatura è stato possibile protrarre la conservazione dei semi sintetici per 8 mesi. Nei semi sintetici conservati in oscurità a 10°C è stata osservata una maggiore percentuale di germinazione, un 90% al ritorno in condizioni standard di coltura

Tab. 4 - Germinabilità (GER) e tempo medio di germinabilità (TMG) di semi sintetici di *Polygala myrtifolia* preparati con differenti concentrazioni di saccarosio e induriti per tempi diversi (in colonna, lettere differenti indicano percentuali significativamente diverse,  $p \geq 0,05$ ).  
 Tab. 4 - Germinability (GER) and germination time (TMG) of *Polygala myrtifolia* synthetic seeds prepared with different concentrations of sucrose and hardened for increasing times (in each column, different letters indicate percentages significantly different at  $p \geq 0,05$ ).

Concentrazione di saccarosio (g/l)	Durata dello scambio ionico							
	15 min		20 min		30 min		40 min	
	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)
30	86,7a	13,8	80,0a	10,8	66,7a	14,1	73,3a	10,7
60	53,3b	15,2	50,8b	14,3	60,2a	15,6	40,0b	15,5

Tab. 5 - Germinabilità (GER) e tempo medio di germinabilità (TMG) di semi sintetici di *Metrosideros excelsa*, preparati con differenti concentrazioni di saccarosio e induriti per tempi diversi (in colonna, lettere differenti indicano percentuali significativamente diverse,  $p \geq 0,05$ ).

Tab. 5 - Germinability (GER) and germination time (TMG) of *Metrosideros excelsa* synthetic seeds prepared with different concentrations of sucrose and hardened for increasing times (in each column, different letters indicate percentages significantly different at  $p \geq 0,05$ ).

Concentrazione di saccarosio (g/l)	Durata dello scambio ionico							
	15 min		20 min		30 min		40 min	
	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)
30	80,0a	21,2	46,7b	15,7	93,3a	16,8	55,6b	22,1
60	73,3a	23,8	92,8a	20,6	78,6a	25,1	71,4a	29,6

dopo 2 mesi di conservazione, prolungando il mantenimento in crescita rallentata a 4 mesi è stata rilevata una germinazione del 75% (fig. 2), sebbene sia da segnalare un leggero ritardo del TMG (22 giorni) rispetto ai tempi di sviluppo in condizioni standard (17 giorni). Dopo tale periodo, è stato registrato un forte calo della germinazione (tab. 6). La conservazione a 4 °C si è dimostrata meno idonea, con basse percentuali di germinazione (21%) dal primo periodo di rilievo.



Fig. 2 - Germinazione del seme sintetico di *Metrosideros* dopo 4 mesi di conservazione a 10°C in oscurità (A) e ricrescita dopo 4 settimane in condizioni standard di coltura (B).

Fig. 2 - Germination of *Metrosideros* synthetic seed after 4 months conservation at 10°C in the dark (A) and regrowth in standard culture conditions after 4 weeks (B).

Tab. 6 - Conservazione di semi sintetici di *Metrosideros excelsa* a 4 e 10°C in oscurità. Dopo la conservazione, i semi sintetici sono stati trasferiti in condizioni standard di coltura ed è stata valutata la germinabilità (GER) e il tempo medio di germinabilità (TMG) (in ogni colonna, lettere differenti indicano percentuali significativamente diverse,  $p \geq 0,05$ ).

Tab. 6 - Conservation of *Metrosideros excelsa* synseeds at 4°C and 10°C in the dark. After cold storage, the synthetic seeds were transferred to standard culture conditions and evaluated for germinability (GER) and germination time (TMG) (in each column, different letters indicate percentages significantly different at  $p \geq 0,05$ ).

Temperatura di conservazione	Durata della conservazione							
	2 mesi		4 mesi		6 mesi		8 mesi	
	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)	GER (%)	TMG (gg)
4 °C	21,0b	13	21,4b	28	24,0a	28	-	-
10 °C	90,0a	18	75,0a	22	13,3a	23	7	19

## Conclusioni

Anche se di recente sviluppo, la tecnologia del seme sintetico è attualmente uno strumento importante che può essere messo a disposizione degli operatori del settore vivaistico e della ricerca, per la propagazione *in vitro* anche delle specie ornamentali, con particolare riguardo a quelle di difficile propagazione e conservazione. Gli ottimi risultati raggiunti nel presente lavoro confermano l'elevata potenzialità della tecnica applicata alla propagazione di fotinia, lillà, poligala a foglie di mirto e metrosideros. Inoltre, è stata chiaramente evidenziata l'importanza di ottimizzare i vari parametri dell'incapsulamento (quali la concentrazione di alginato, il tempo di indurimento della capsula, la concentrazione di saccarosio nell'endosperma artificiale). I semi sintetici si sono dimostrati un idoneo materiale anche per la conservazione a medio termine. Questo approccio biotecnologicamente avanzato deve essere considerato, quindi, di interesse strategico per la conservazione *ex situ* di germoplasma in via di estinzione e prezioso di specie ornamentali economicamente importanti.

## Riassunto

La tecnologia dell'incapsulamento è un importante strumento per la propagazione e la conservazione *in vitro* di specie vegetali, sebbene risulti ancora limitata la sua applicazione alle specie ornamentali. Pertanto, è stata valutata l'adattabilità di alcune specie ornamentali alla produzione di semi sintetici; in particolare, sono stati sviluppati idonei protocolli d'incapsulamento di fotinia, lillà, poligala a foglie di mirto e metrosideros. Inoltre, il seme sintetico è stato valutato come strumento per realizzare la conservazione in crescita rallentata in metrosideros. Appare evidente che tale tecnologia può rappresentare un valido contributo al settore ornamentale, con particolare riguardo alle specie di difficile propagazione e conservazione.

**Parole chiave:** alginato di sodio, coltura *in vitro*, conservazione in crescita rallentata, semi sintetici.

## Bibliografia

- ADRIANI M., PICCIONI E., STANDARD A., 2000. *Effect of different treatments on the conversion of 'Hayward' kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of in vitro-derived buds*. N Z J Crop Hortic. Sci. 28: 59-67.
- AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., SMITH M.A.L., 1995. *Glossary*. In: Aitken-Christie, Kozai, Smith (eds) Automation and environmental control in plant tissue culture, Kluwer, Dordrecht
- ARA H., JAISWAL U., JAISWAL V.S., 2000. *Synthetic seed: prospects and limitations*. Curt. Sci. 78: 1438-1444.
- BRISCHIA R., PICCIONI E., STANDARDI A., 2002. *Micropropagation and synthetic seed in M.26 apple rootstock (II): a new protocol for production of encapsulated differentiating propagules*. Plant Cell Tiss., Org. Cult. 68: 137-141.
- CAPUANO G., PICCIONI E., STANDARDI A., 1998. *Effect of different treatments on the conversion of M26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds*. J. Hortic. Sci. Biotech. 73: 299-305.
- DAUD N., TAHA R.M., HASBULLAH N.A., 2008. *Studies on plant regeneration and somaclonal variation in Saintpaulia ionantha Wendl. (African violet)*. Pak. J. Biol. Sci. 11 (9): 1240-1245.
- DE CARLO A., BENELLI C., LAMBARDI M., 2009. *La micropropagazione per la salvaguardia della biodiversità vegetale: esperienze condotte presso il CNR-IVALSA*. Italus Hortus 16 (2): 175-179.
- DRIVER J., KUNUYUKI A., 1984. *In vitro propagation of Paradox walnut rootstock*. HortSci. 19: 507-509.
- IAPICHINO G., BENELLI C., AIRÒ M., VITALE A., 2009. *Propagazione in vitro e produzione di semi sintetici di Metrosideros excelsa*. Italus Hortus 16 (2): 132-135.
- LAMBARDI M., BENELLI C., OZUDOGRU E.A., OZDEN-TOKATLI Y., 2006. *Synthetic seed technology in ornamental plants*. In: Teixeira da Silva J. (ed). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, vol II, Global Science Books, UK: 347-354.
- LAMBARDI M., BENELLI C., 2007. *La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree*. Rivista di Frutticoltura e di ortofloricoltura 6: 34-39.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., 2009. *Tecniche ed applicazioni della crioconservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale*. Review n. 9, Italus Hortus 16 (1): 79-98.
- MARASCUULO L.A., MCSWEENEY M., 1977. *Post-Hoc Multiple Comparisons in sample preparations for test of homogeneity*. In: McSweeney M., Marasculio L.A. (eds). Non-Parametric and Distribution Free Methods of the Social Sciences, Books/Cole Publ, Belmont, CA: 141-147.
- MICHELI M., PELLEGRINO S., PICCIONI E., STANDARDI A., 2002. *Effects of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion in M.26 apple rootstock*. J. Microencap. 19: 347-356.
- MOHANRAJ R., ANANTHAN R., BAI V.N., 2009. *Production and storage of synthetic seeds in Coelogyne breviscapa Lindl*. Asian J. Biotechnol. 1: 124-128.
- MURASHIGE T., 1977. *Plant cell and organ cultures horticultural practices*. Acta Hortic. 78: 17-30.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- NOWER A.A., ALI E.A.M., RIZKALLA A.A., 2007. *Synthetic seeds of pear (Pyrus communis L.) rootstock storage in vitro*. Aust. J. Basic. Appl. Sci. 1: 262-270.
- OZDEN-TOKATLI Y., DE CARLO A., GUMUSEL F., PIGNATTELLI S., LAMBARDI M., 2008. *Development of encapsulation techniques for the production and conservation of the synthetic seeds in ornamental plants*. Prop. Orn. Plants 8: 17-22.
- OZUDOGRU E.A., PREVIATI A., LAMBARDI M., 2010. *In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants*. In: Jain S.M., Ochatt S.J., (eds). Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Methods in molecular biology, vol. 589. Humana Press, pp. 303-324.
- PATNAIK S., CHAND P.K., 2000. *Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 177-185.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., 1977. *Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus*. Acta Hortic. 78: 437-442.
- RAI M.K., ASTHANA P., SINGH S.K., JAISWAL V.S., JAISWAL U., 2009. *The encapsulation technology in fruit plants – A review*. Biotechn. Advances 27: 671-679.
- ROMAY ALVAREZ C., GARDI T., STANDARDI A., 2002. *Plantlets from encapsulated in vitro-derived microcuttings of kiwifruit (cv top Star®)*. Agric. Mediterr. 132: 246-252.
- RUFFONI B., MASSABO F., GIOVANNINI A., 1994. *Artificial seed technology in the ornamental species Lisianthus and Genista*. Acta Hortic. 362: 297-304.
- RUFFONI B., GIOVANNINI A., SEMERIA L., SAVONA M., 2002. *Embriogenesi somatica e seme artificiale in alcune specie floreali*. Italus Hortus 9: 84-88.
- SAIPRASAD G.V.S., POLISETTY R., 2003. *Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies*. In Vitro Cell. Devel. Biol.-Plant 39: 42-48.
- SICURANI M., PICCIONI E., STANDARDI A., 2001. *Micropropagation and preparation of synthetic seed in M.26 apple rootstock I: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation*. Plant Cell Tiss., Org. Cult. 66: 207-216.
- STANDARDI A., PICCIONI E., 1998. *Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic in vitro-derived explants*. Int. J. Plant Sci. 159: 968-978.
- TAHA R.M., HASBULLAH N.A., AWAL A., 2008. *Production of synthetic seeds from micro shoots and somatic embryos of Gerbera Jamesonii Bolus Ex. Hook F*. Acta Hort. 829: 91-98.
- WANG W., WANG S., WU X., JIN X., CHEN F., 2007. *High frequency plantlet regeneration from callus and artificial seed production of rock plant Pogonatherum paniceum (Lam.) Hack. (Poaceae)*. Sci. Hortic. 113: 196-201.
- WELANDER M., PAWLICKI N., 1993. *A model system for studying root regeneration in woody species*. Acta Horticulturae 336: 225-230.

## Micropropagazione del *Lilium* in bioreattore: vantaggi e criticità del sistema

Carolina Maria Cardona Suárez, Giuseppe Colla e Mariateresa Cardarelli\*

Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste e l'Energia, Università della Tuscia

### Micropropagation of *Lilium* in bioreactor: advantages and critical points of the system

**Abstract.** Scaling-up in bioreactors and reduction in manual handling provide an efficient and economic system for in vitro multiplication of bulb plants. In vitro bulblet propagation of *Lilium* was studied using an automated balloon type bubble bioreactor. Two different culture methods were compared: continuous immersion and temporary immersion in liquid medium (ebb and flood system). Results revealed that morphological traits and biomass accumulation were more efficient when culturing was performed under continuous immersion. It was found a technique to avoid contamination of the substrate during the cultivation in the bioreactor. This technique includes the sterilization of *Lilium* clusters with sodium hypochlorite for 5-15 minutes before setting up the bioreactor and the use of cefotaxime in the liquid medium.

**Key words:** Liquid culture, ebb and flood, immersion culture.

### Introduzione

L'utilizzo *in vitro* dei bioreattori, poichè prevede l'impiego del mezzo liquido come substrato, oltre a favorire lo scambio di nutrienti fra tessuto vegetale e mezzo di coltura, può agevolare l'automazione delle operazioni manuali e consentire una significativa riduzione dei costi della micropropagazione. Tale tecnologia potrebbe risultare particolarmente vantaggiosa per il *Lilium* il quale è già efficacemente moltiplicato *in vitro* a partire da scaglie per una produzione massale (Han, 2004). Obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'adattabilità del bioreattore e del metodo di coltura (immersione temporanea o immersione continua) alla moltiplicazione del *Lilium* evidenziando potenzialità e difficoltà del sistema.

### Materiale e metodi

L'esperimento è stato condotto ponendo all'interno di bioreattori (*Balloon Type Bubble Bioreactor*) *clusters* (5-7 mm) di germogli dell'ibrido commerciale (LA) Brindisi® sviluppatasi alla base di scaglie incubate per 5 settimane su substrato solido (Cardona Suárez *et al.*, 2010). Per ogni bioreattore (volume 4 l) è stato utilizzato 1 l di substrato contenente 4,4 g l<sup>-1</sup> di sali MS (Murashige e Skoog, 1962), 4,4 µM BA, 1,1 µM NAA, 6% saccarosio (pH 5,8). Sono stati utilizzati 20-30 germogli, corrispondenti a circa 15 g di materiale vegetale, per bioreattore. All'interno dei bioreattori è stata inserita una rete per il sostegno del materiale vegetale. Le condizioni ambientali prevedevano una temperatura di 24±1 °C e buio continuo. Il primo esperimento è stato finalizzato ad individuare una tecnica in grado di evitare possibili contaminazioni a carico del substrato durante la coltura in bioreattore. Per questo, il materiale vegetale (già proveniente da *in vitro*) è stato ulteriormente sottoposto a sterilizzazione con ipoclorito di sodio (2% di cloro attivo) seguito da 3 lavaggi con acqua sterile prima dell'allestimento del bioreattore. I trattamenti previsti erano: ipoclorito per 15 minuti; ipoclorito per 15 minuti e poi aggiunta di cefotaxime 0,50 mg ml<sup>-1</sup> nel substrato liquido; ipoclorito per 5 minuti e poi cefotaxime 0,50 mg ml<sup>-1</sup> nel substrato liquido. Il controllo prevedeva l'allestimento di bioreattori senza alcun trattamento preventivo con ipoclorito e/o antibiotico. I bioreattori sono stati impostati secondo il sistema ad immersione temporanea (TIS) con 30 minuti di immersione ogni 2 ore e mezza per un totale di 8 cicli/giorno. Nel corso del secondo esperimento il sistema ad immersione continua (con 0,1= volume d'aria/ volume totale, minuto) è stato messo a confronto con il sistema TIS; contemporaneamente è stata avviata una prova su substrato solido in barattoli di vetro contenenti 200 ml dello stesso substrato di cui sopra aggiunto di agar allo 0,7%. Anche in questo caso il materiale vegetale è stato preventivamente sterilizzato con ipoclorito per 15 minuti e poi è stato aggiunto cefotaxime 0,50 mg ml<sup>-1</sup> nel substrato liquido. In entrambi gli esperimenti, per cia-

\* tcardare@unitus.it

scun trattamento sono state effettuate 3 repliche. Dopo 4 settimane sono stati rilevati i dati biometrici mentre una parte dei bulbi è stata utilizzata per determinare il peso fresco ed il peso secco (dopo aver essiccato i bulbi ad 80°C per 48 ore). Quindi sono stati calcolati l'indice di crescita (Morán *et al.*, 2003) e la percentuale di sostanza secca. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza, previa trasformazione angolare dei valori percentuali, e le medie delle variabili risultate significative sono state confrontate con il test di Duncan ( $p = 0,05$ ).

## Risultati e discussione

Tutti i trattamenti con ipoclorito e/o con antibiotico hanno determinato una totale inibizione della comparsa di inquinamenti batterici mentre nel controllo, ossia in assenza di trattamenti, già dopo 5-7 giorni il substrato all'interno dei bioreattori appariva irrimediabilmente contaminato impedendo il proseguimento della coltura di germogli. Rispetto al trattamento di sterilizzazione, l'immersione del materiale vegetale con ipoclorito alla più bassa concentrazione e la presenza di antibiotico nel substrato hanno indotto un incremento significativo del numero di germogli prodotti dopo appena 4 settimane da ogni singolo espianato (tab. 1); anche l'altezza e il diametro dei germogli ne sono risultati influenzati positivamente. Per quanto riguarda il peso fresco (sia totale che di ogni espianato) e la formazione di radici tali parametri hanno mostrato valori superiori in presenza di antibiotico così come osservato da precedenti autori (Kaur *et al.*, 2008;

Luna *et al.*, 2009). Per quanto riguarda il metodo di coltura, l'utilizzo di bioreattori ha permesso un incremento della maggior parte dei parametri biometrici osservati rispetto alla propagazione su substrato solido. In particolare l'immersione continua è risultata migliore rispetto al sistema TIS e a sua volta il sistema TIS è risultato più idoneo rispetto al substrato solido per i seguenti parametri: altezza dei germogli, peso fresco totale della massa vegetale prodotta, peso fresco di ogni singolo espianato, indice di crescita. In particolare l'indice di crescita calcolato nel caso dell'immersione continua era almeno 3 volte superiore rispetto al valore riscontrato su substrato solido mentre il peso fresco totale ha evidenziato un aumento superiore di 10 volte rispetto ai germogli in coltura con agar. Il numero di germogli ottenuti dopo 4 settimane da ogni espianato, anche se non significativamente diverso rispetto al tipo di trattamento, è risultato più elevato in bioreattore rispetto al substrato solido e, soprattutto, nel caso del metodo ad immersione continua. Nessuna differenza è stata riscontrata fra i trattamenti per la percentuale di sostanza secca né per la presenza di malformazioni ed inoltre non sono stati osservati fenomeni di vitrificazione (dati non mostrati) a carico dei tessuti vegetali (Lian *et al.*, 2003a). La radicazione è risultata stimolata nel caso del trattamento in bioreattore con immersione temporanea (tab. 2). I risultati trovano conferma con quanto riportato da Lian *et al.* (2003b) secondo i quali la moltiplicazione del *Lilium* in bioreattore ad immersione continua permette una più elevata produzione di biomassa vegetale rispetto al sistema TIS poiché nel primo caso i tessuti restano

Tab. 1 - Effetto di trattamenti per la contaminazione batterica sui parametri morfologici di germogli di *Lilium* ottenuti dopo 4 settimane in bioreattore ad immersione temporanea. Lettere diverse in riga indicano differenza significativa per  $p = 0,05$  (test Duncan).  
Tab. 1 - Effect of treatments for bacterial contamination on morphological traits of *Lilium* shoots obtained after four weeks in a temporary immersion bioreactor. Different letters in a row indicate significant differences at  $p = 0.05$  (Duncan's test).

Rilievi	Trattamento con ipoclorito		
	15 min	15 min + cefotaxime	5 min + cefotaxime
Germogli/espianato (n.)	1,9 b	2 b	2,7 a
Altezza germogli (cm)	8,5 b	9,5 b	11,31 a
Diametro germogli (cm)	0,9 c	1,3 b	1,5 a
Peso fresco totale (g)	60,1 b	102,7 a	113,8 a
Peso fresco espianato (g)	2,2 b	3,9 a	4,4 a
Indice di crescita	5 b	9,3 a	10,4 a
Sostanza secca (%)	9,4 b	11,1 a	10,5 ab
Malformazioni (%)	2,1 n.s.	2,5 n.s.	1,7 n.s.
Radici/espianato (n.)	1,1 b	5,3 a	5,1 a

Tab. 2 - Effetto del metodo di coltura sui parametri morfologici di germogli di *Lilium* ottenuti dopo quattro settimane in bioreattore. Lettere diverse sulla riga indicano una differenza significativa per  $p = 0,05$  (test di Duncan).

Tab. 2 - Effect of culture method on morphological traits of *Lilium* shoots obtained after four weeks in bioreactor. Different letters in a row indicate significant differences at  $p = 0.05$  (Duncan's test).

Rilievi	Substrato liquido (immersione)		Substrato solido
	Continua	Temporanea	
Germogli/espianato (n.)	2,5 a	2,0 ab	1,8 b
Altezza germogli (cm)	15 a	9,5 b	4,9 c
Diametro germogli (cm)	1 b	1,3 a	0,9 b
Peso fresco totale (g)	131,1 a	102,7 b	9,2 c
Peso fresco espianato (g)	5,1 a	3,9 b	1 c
Indice di crescita	12 a	9,3 b	3,6 c
Sostanza secca (%)	12,3 n.s.	11,1 n.s.	11,9 n.s.
Malformazioni (%)	1,3 n.s.	2,5 n.s.	3,7 n.s.
Radici/espianato (n.)	1,8 b	5,3 a	1,7 b

continuamente a contatto con il substrato liquido con un migliore assorbimento dei nutrienti. Risultati analoghi sono stati evidenziati anche per altre specie vegetali quali *Spathiphyllum cannifolium* (Dewir *et al.*, 2006), *Alocasia amazonica* (Jo *et al.*, 2008), *Allium sativum* (Kim *et al.*, 2004), crisantemo (Hahn e Paek, 2005), *Oncidium* (Yang *et al.*, 2010). Nel caso dell'immersione continua, è interessante evidenziare che si tratta di un sistema di più facile realizzazione rispetto al sistema TIS in quanto non sono necessari temporizzatori e valvole solenoidi per la programmazione del flusso e riflusso; tutto questo fa ipotizzare una più facile gestione del sistema in ambito aziendale con minori criticità di funzionamento (Lian *et al.*, 2003b). I germogli ottenuti sono stati ambientati con una percentuale di sopravvivenza del 100% per entrambi i trattamenti in bioreattore mentre nel caso del substrato solido tale percentuale si è ridotta al 75%. Tale risultato è da ricondurre alle dimensioni dei germogli che, se ottenuti in bioreattore, arrivavano ad un peso di circa 4-5 g ossia ad un valore doppio di quello misurato su substrato solido, garantendo una emergenza ottimale *in vivo* (Lian *et al.*, 2003b).

### Riassunto

Il *Lilium* è stato vantaggiosamente moltiplicato *in vitro* in bioreattore (*Balloon Type Bubble Bioreactor*) con risultati ottimali con il metodo ad immersione continua rispetto al sistema a immersione temporanea per i seguenti parametri: altezza dei germogli, peso fresco totale della massa vegetale prodotta, peso fresco di ogni singolo espianto, indice di crescita. E' stata inoltre individuata una tecnica in grado di evitare possibili contaminazioni a carico del substrato durante la coltura in bioreattore; tale tecnica prevede la sterilizzazione del materiale vegetale con ipoclorito di sodio (2% di p.a.) per 5-15 minuti prima dell'allestimento del bioreattore e l'utilizzo di cefotaxime 0,50 mg ml<sup>-1</sup> nel substrato liquido di coltura.

**Parole chiave:** coltura liquida, flusso e riflusso, immersione continua.

### Bibliografia

- CARDONA SUÁREZ C.M., COLLA G., CARDARELLI M., 2011. *Response to in vitro propagation of different Asiatic hybrids lilies*. Acta Hort. 900: 393-400.
- DEWIR Y.H., CHAKRABARTY D., HAHN E.J., PAK K.Y., 2006. *A simple method for mass propagation of Spathiphyllum cannifolium using an airlift bioreactor*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 42: 291-297.
- HAN B.H., YU H.J., YAE B.W., PAK K.Y., 2004. *In vitro micropropagation of Lilium longiflorum 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium*. Sci. Hort. 103: 39-49.
- HAHN E.J., PAK K.Y., 2005. *Multiplication of Chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81: 301-306.
- JO U.A., MURTHY H.N., HAHN E.J., PAK K.Y., 2008. *Micropropagation of Alocasia amazonica using semisolid and liquid cultures*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 44: 26-32.
- KAUR A., GILL M.S., RUMA D., GOSAL S.S., 2008. *Enhanced in vitro shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime*. Sugar Tech 10 (1): 60-64.
- KIM E.K., HAHN E.J., MURTHY H.N., PAK K.Y., 2004. *Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (Allium sativum L.) in bioreactor systems*. J. Hort. Sci. Biotech., 79 (5): 818-822.
- LIAN M.L., CHAKRABARTY D., PAK K.Y., 2003a. *Bulblet formation from bulb scale segments of lilium using bioreactor system*. Biologia Plantarum 46 (2): 199-203.
- LIAN M.L., CHAKRABARTY D., PAK K.Y., 2003b. *Growth of Lilium Oriental Hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture*. Scientia Hort. 97: 41-48.
- LUNA C., COLLAVINO M., SANSBERRO P., MROGINSKI L., 2009. *Bacterial contamination in Ilex dumosa (aquifoliaceae) cultures: Antibiotic treatment*. Acta Hort. 812: 97-102.
- MORÁN G.P., COLQUE R., VILADOMAT F., BASTIDA J., CODINA C., 2003. *Mass propagation of Cyrtanthus clavatus and Cyrtanthus spiralis using liquid medium culture*. Sci. Hort. 98: 49-60.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- YANG J.F., PIANO X.C., SUN D., LIAN M.L., 2010. *Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of Oncidium 'Sugar Sweet'*. Sci. Hort. 125: 712-717.

## Incremento della proliferazione in un sistema di propagazione industriale indotto da combinazioni di LED emittenti diverse radiazioni spettrali

Antonio Sparacino<sup>1\*</sup>, Fabio Tavaglione<sup>2</sup>, Rita Ferro<sup>2</sup>, Rosario Muleo<sup>3</sup>, Calogero Iacona<sup>4</sup>, Giuliano Dradi<sup>5</sup> e Romano Roncasaglia<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano

<sup>2</sup> ESAE srl, Sesto San Giovanni (MI)

<sup>3</sup> Dipartimento di Produzione Vegetale, Università della Tuscia

<sup>4</sup> Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, Università di Pisa

<sup>5</sup> Vivai Piante Battistini Società Agricola S.S., Cesena (FC)

### Increase in proliferation in a system of industrial propagation induced by combinations of different issuers LED spectral radiation

**Abstract.** The effect of the quality of light, emitted by lamps consisting of various combinations of LEDs, on the proliferation in explants of *Prunus persica* Batsch x *P. amygdalus*, was studied to evaluate the efficiency of production and launch an economic evaluation of the issuer system. The increased rate of proliferation was detected under dichromatic red light (635 nm), with irradiance (at the level of clusters) of  $29.17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + blue light (465 nm) with irradiance of  $4.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , emitted from LEDs arranged linearly equally spaced on a lamp into groups formed each by 3 red and 1 blue LED. A slight decrease in the proliferation rate was found under dichromatic light consistent of LED emitting red light (ranged from 620 nm to 630 nm) + blue light (ranged from 453 nm to 457 nm) at the irradiance of  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The response of the other views was relatively minor, in descending order: 625 nm red LED light (at the irradiance of  $29.17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + 465 nm blue LED light (at the irradiance of  $4.13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); white LED lamp (6000-6400K at the irradiance of  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); 635 nm red LED light (at the irradiance of  $18.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + 470 nm blue LED light (at the irradiance of  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); 635 nm red LED light (at the the irradiance of  $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) + 450 nm blue LED light (at the irradiance of  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); white fluorescent lamp (at the irradiance of  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) approximately, employed as a control. The plant response can be attributable to interactive action between phytochromes (red and red far light photoreceptors) and the blue light photoreceptors on the regulation of the lateral bud differentiation and apical dominance. Results confirm that specific quality of light regulate the outgrowth of lateral buds into new

shoots and the total growth of the initial explant, controlling so the proliferation rate of explants cultured *in vitro*. These experiments validate the role of the lamps consisting of LED, which resulted to the most efficient to carry out the roles of both energy source and light signal with respect to fluorescent lamps, usually used in industrial nurseries. The low heat emitted from the LED lamps also helps to reduce energy costs required to control the temperature inside the growth chamber of the industrial micropropagation farm

**Key words:** *Prunus, persica, Amygdalus*, phytochromes, photoreceptors.

### Introduzione

I LED (*Light Emitting Diodes*) ossia diodi emittenti luce, sono stati impiegati per anni come spie luminose a basso livello di emissione di radiazione. Questi dispositivi a stato solido sono stati migliorati nel corso degli anni e ora emettono, a diverse lunghezze d'onda dello spettro visibile della radiazione, una maggiore intensità di fotoni. Tale caratteristica li rende impiegabili come fonte di luce per la crescita e lo sviluppo delle piante. Il loro utilizzo è favorito dalla possibilità di impiegare diverse combinazioni di diodi per ricostruire idonee qualità spettrali della luce, da quella blu (400-500 nm) a rossa e rossa lontana (610-730 nm) dello spettro luminoso. Nel *range* di queste lunghezze d'onda i fotorecettori delle piante assorbono fotoni sia per fornirsi dell'energia necessaria alla fotosintesi (*Photosynthetic Active Radiation*, PAR, 400-700) sia per percepire l'ambiente circostante. Un'altra caratteristica utile dei LED è il rendimento di conversione ad alta energia luminosa e con bassa produzione di energia termica, particolarmente favorevole in specifiche applicazioni come le fasi della propagazione *in vitro* dei vivai industriali.

\* antonio.sparacino@unimi.it

Le piante per aumentare la loro capacità di adattamento alle condizioni ambientali impiegano una pleora di sensori per monitorare l'ambiente circostante. Tra i fattori ambientali la luce, oltre ad essere la fonte energetica dei processi della fotosintesi, modula lo sviluppo e i ritmi endogeni della pianta (Muleo e Iacona, 2007). La pianta traduce il segnale fisico, intrinseco nella radiazione luminosa, in segnale biochimico, molecolare e fisiologico tramite un discreto numero di piccole famiglie di fotorecettori, quali: il fitocromo, il criptocromo e le fototropine (Smith, 2000; Christie e Briggs, 2001). Il fitocromo è un fotorecettore sensibile alla radiazione rossa (RL) e rossa-lontana (FRL), esso regola le risposte della pianta evocate dalle due fonti luminose. Il fitocromo esiste in due forme discrete: quella assorbente RL (Pr) e quella assorbente FRL (Pfr); le due forme sono fotoreversibili da una forma all'altra. In *Arabidopsis* sono state individuate cinque isoforme di fitocromo da PHYA a PHYE (Clack *et al.*, 1994). I fitocromi inducono una vasta gamma di risposte fotomorfogeniche, come la germinazione dei semi, il de-eziolamento e l'induzione fiorale, e agiscono sia in sinergia sia in antagonismo con i fotorecettori della luce blu (Quail, 2002). I fotorecettori del blu, criptocromi (cry1-3) e fototropine (phot1-2), in *A. thaliana* mediano il fototropismo, l'architettura del sistema radicale e il tasso di crescita della pianta (Liscum e Briggs, 1995; Sakamoto e Briggs, 2002). La fototropina-1 è presente nella zona di allungamento delle radici primarie e laterali, ha un ruolo nella plasticità adattativa della crescita delle radici (Galen *et al.*, 2007). Il sito di segnale del criptocromo è nella parte aerea della pianta ma agisce da antagonista nella regolazione dell'allungamento della radice (Cañamero *et al.*, 2006).

Man mano che le piante crescono, dal meristema apicale si forma una serie di meristemi ascellari che costituiscono le gemme laterali. Dalle gemme ascellari si originano le ramificazioni laterali e tali eventi sono inibiti dall'attività della auxina prodotta dal meristema apicale, fenomeno noto come dominanza apicale (McSteen e Leyser, 2005). Il trasporto polare dell'auxina è il processo mediante il quale l'ormone è mosso dall'apice del fusto verso le radici. L'auxina, nel migrare dall'alto verso il basso, incontra le citochinine e gli strigolattoni (ormoni la cui molecola di base è un carotenoide) che si muovono dalle radici verso l'alto. Le citochinine recano un segnale antagonista a quello delle auxine e gli strigolattoni svolgono un ruolo nella regolazione del trasporto dell'auxina. L'insieme dei segnali determina l'espletamento dei processi fisiologici e biologici inerenti la schiusura delle gemme ascellari e la conseguente ramificazione

(Ljung *et al.*, 2001; Leyser, 2003; Crawford *et al.*, 2010).

Le ricerche svolte negli ultimi anni dimostrano che le qualità della luce regolano molti caratteri delle piantine coltivate *in vitro*, come l'anatomia e la dimensione della foglia in betulla, l'attività fotosintetica, la dimensione e la densità degli stomi; il contenuto di clorofilla in *Cymbidium* e crisantemo (Sæbø *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998); la distensione degli internodi e l'allungamento dello stelo in crisantemo, fragola, pomodoro e *Pelargonium* (Mortensen & Stromme, 1987; Appelgren, 1991; Nhut *et al.*, 2003); la formazione di gemme ascellari e la loro schiusura e sviluppo in germogli in vite (Chéé, 1986), e la rizogenesi in pero (Bertazza *et al.*, 1995). In susino e in melo, la genesi dei meristemi laterali e, successivamente, il loro sviluppo in germogli laterali, sono regolati diversamente dalla luce blu e da quella rossa (Muleo *et al.*, 2001; Muleo e Morini, 2008). La luce blu induce una maggiore formazione di meristemi laterali ma stimola la dominanza apicale che impedisce il loro sviluppo in germogli laterali, mentre la luce rossa induce la riduzione della dominanza apicale e favorisce lo sviluppo delle gemme ascellari in germogli laterali. In melo e susino, la luce rossa ha indotto un maggiore tasso di proliferazione, analogamente a quanto riportato da Norton *et al.* (1988) in *Spiraea*.

Nelle sperimentazioni condotte è stata indagata l'azione che lampade con diverse combinazioni di LED a luce blu e rossa avrebbero sul tasso di proliferazione del GF 677 (*Prunus persica* Batsch *x P. amygdalus* Batsch), in un sistema produttivo di un vivaio di tipo industriale. Lampade al neon e lampade assemblate con LED a luce bianca sono state impiegate come controllo.

## Materiali e metodi

Espianti del portinnesto di GF 677 lunghi 1 cm circa, di vigore uniforme, con tre o quattro gemme laterali, del peso fresco medio di circa 10 mg, sono stati raccolti da ciuffi (cluster) generati in un processo industriale di coltura *in vitro* (8 espianco per vaso, 4 vasi per tesi). Il mezzo di coltura utilizzato è Quoirin & Lepoivre (1977) integrato con 30 g l<sup>-1</sup> di saccarosio, benziladenina 0,3 mg l<sup>-1</sup>, acido indolo-3-butirrico 0,01 mg l<sup>-1</sup>. Il mezzo è stato sterilizzato a 120±1 °C per 20 min dopo l'aggiunta di agar-agar B&V S1000 ed è stato titolato a pH 5,7. Gli esperimenti sono stati condotti ponendo i vasi di coltura su scaffali, posti in una camera di crescita con temperatura di 22±2 °C e a un fotoperiodo di 16 ore di luce, seguendo il normale processo industriale che prevede lo sviluppo di un

cluster in una serie susseguente di subcolture. Ogni 30 giorni al cluster era rinnovato il taglio basale e trasferito su mezzo fresco per la successiva subcoltura. Contenitori di vetro da 500 ml, con 100 ml di mezzo colturale ciascuno, sono stati impiegati come contenitori per la coltura.

Le fonti di luce impiegate nella sperimentazione sono descritte in tabella 1. Tutte le lampade sono state disposte a un'altezza di 25 cm dal mezzo colturale, e l'irradianza è stata rilevata alla medesima distanza, con un radiometro Delta Ohm.

Al termine di ogni subcoltura sono stati rilevati i seguenti parametri: numero di germogli laterali formati per cluster, peso fresco totale di ciascun cluster e lunghezza germogli. Sono stati inoltre calcolati: il numero cumulato di germogli neoformati e peso fresco per cluster in ciascuna delle subcolture precedenti, e la percentuale di germogli per classe di allungamento.

## Risultati

Il peso fresco del cluster è stato fortemente condizionato dal tipo di luce sin dalla prima subcoltura (tab. 2, fig. 2). I cluster esposti alla luce bianca emes-

sa dalla lampada fluorescente e dalla lampada LED BIANCO hanno mostrato un peso fresco inferiore rispetto ai cluster esposti alle lampade LED3, LED4 e LED5. Nelle lampade PIR1 e PIR2, i cluster, alla fine della prima subcoltura, avevano un peso fresco inferiore rispetto a quelli allevati alle lampade LED3-5, e analogo a quello rilevato alle condizioni di luce fluorescente. La crescita, in termini di peso fresco, tra la terza e la sesta subcoltura, in cui (causa problemi di inquinamento) non erano presenti i cluster esposti alla lampada LED BIANCO e alla lampada LED5, è stata inferiore nei cluster esposti alla luce emessa dalla prima lampada, mentre è stata sempre più elevata nei cluster esposti alla lampada LED4.

Lo sviluppo di germogli laterali è stato significativamente maggiore nei cluster allevati alle condizioni di luce LED3 e LED4 (tab. 2, fig. 1). I cluster esposti alla qualità di luce emessa da quest'ultima lampada, a ogni subcoltura, hanno mediamente incrementato la produzione di germogli (fig. 3) del 118,7% rispetto al controllo luce bianca fluorescente emessa dai neon. I germogli esposti alle luci emesse dalle lampade PIR1 e PIR2 hanno prodotto una quantità di germogli intermedia.

Tab. 1 - Descrizione delle caratteristiche costruttive e di emissione della radiazione delle lampade impiegate.

Tab. 1 - Description of the characteristics of construction and emission of radiation from the lamps used.

Lampada PIR1	quadrangolare, posta centralmente nella parte superiore di una camera chiusa, a forma piramidale tronca a base quadrata, avente come fonte di luce 5 LED emittenti RL con picco di emissione a 635 nm e 2 LED da emittenti BL con picco a 450 nm. L'irradianza rilevata a livello dei cluster è stata di $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di RL e di $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di BL.
Lampada PIR2	quadrangolare, posta centralmente nella parte superiore di una camera chiusa, a forma piramidale tronca a base quadrata, avente come fonte di luce 5 LED emittenti RL con picco di emissione a 635 nm e 3 LED da emittenti BL con picco a 470 nm. L'irradianza rilevata a livello dei cluster è stata di $18,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di RL e di $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di radiazione blu.
Lampada LED3	costituita da un dissipatore lineare di 1,5 m sul quale sono disposti 20 LED equamente distribuiti in una fila di 1,2 m. Dei 20 LED, 15 hanno un picco massimo di emissione a 625 nm (RL) e 5 LED hanno un picco di emissione compreso tra 460 nm e 470 nm (BL). L'irradianza a livello dei cluster è di $29,17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di RL e di $4,13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di BL.
Lampada LED4	lineare da 1,5 m costituita da 226 LED equamente disposti su due file lungo la lampada. 134 LED hanno un picco di emissione compreso tra 620 nm e 630 nm e 92 LED hanno un picco di emissione compreso tra 453 nm e 457 nm. L'irradianza a livello dei contenitori delle piante è di $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di RL e di $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di BL.
Lampada LED5	costituita da un dissipatore lineare di 1,5 m sul quale sono disposti 20 LED equamente distribuiti in una fila di 1,2 m. Dei 20 LED, 15 hanno un picco di emissione a 635 nm (RL) e 5 LED hanno un picco di emissione compreso tra 460 nm e 470 nm (BL). L'irradianza a livello dei contenitori delle piante è di $29,17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di RL e di $4,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di BL.
Lampada NEON	fluorescente lineare (Philips) di 1,5 m da 58W ad emissione luminosa bianca, alimentata da ballast elettronico. La radiazione risultante a livello delle piante è di $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ circa. Impiegata come controllo.
Lampada LED BIANCO	lampada lineare tubolare di 1,5 m a LED bianchi, da 6000-6400K. L'irradianza a livello dei contenitori delle piante è di $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Impiegata come controllo.

Tab. 2 - Numero medio cumulato di germogli sviluppati in ciascun cluster e rilevati alla fine di ogni subcoltura, peso fresco medio cumulato del cluster (mg) rilevato al termine di ogni subcoltura. La separazione delle medie è stata fatta con il test di Duncan.

Tab. 2 - Cumulative average number of shoots developed in each cluster identified at the end of each subculture, average total fresh weight of the cluster (mg) detected at the end of each subculture. The separation of the averages was made with the Duncan test.

Tipo di lampada	I subcoltura		II subcoltura		III subcoltura		IV subcoltura		V subcoltura		VI subcoltura	
	n. germogli	P. fresco cluster (mg)	n. germogli	P. fresco cluster (mg)	n. germogli	P. fresco cluster (mg)	n. germogli	P. fresco cluster (mg)	n. germogli	P. fresco cluster (mg)	n. germogli	P. fresco cluster (mg)
PIR2	6,38 Bd	792,76 Bd	20,38 Bb	2.785,05 Bb	27,50 Cc	3.697,17 Cc	42,80 Cc	5.895,43 Bc	55,63 BCb	7.703,94 Bc	71,67 Ab	10.019,00 ABb
PIR1	4,47 Bd	929,06 Bcd	25,25 Bb	3.554,02 Bb	37,25 Bb	5.232,60 Bb	47,1 Bcc	6.572,60 Bc	65,88 BCb	7.940,16 Bc	87,33 Aab	12.486,19 ABb
LED3	14,13 Bbc	2.013,23 Bb	37,06 Aa	5.414,25 Aa	54,83 Aa	8.001,63 Aa	69,0 ABb	10.021,42 Ab	90,13 ABa	12.127,01 Ab	98,00 Aab	14.165,99 ABab
LED4	13,25 Bbc	1.878,79 Bb	37,13 Aa	5.421,20 Aa	54,58 Aa	8.601,13 Aa	83,8 Aa	12.352,13 Aa	106,5 Aa	15.715,75 Aa	133,67 Aa	19.782,78 Aa
NEON	8,59 Bcd	1.148,89 Bbcd	21,41 Bb	2.971,04 Bb	31,00 Cc	4.248,35 BCc	43,3 Cc	5.974,17 Bc	54,38 Cb	7.507,09 Bc	62,33 Ab	8.549,19 Bb
LED Bianco	12,69 Bbc	1.790,13 Bbc	21,38 Bb	2.916,68 Bb								
LED5	23,00 Aa	3.410,88 Aa										

A lettere uguali corrispondono medie statisticamente non differenti ( $P < 0,05$  lettere minuscole;  $P < 0,01$  lettere maiuscole).

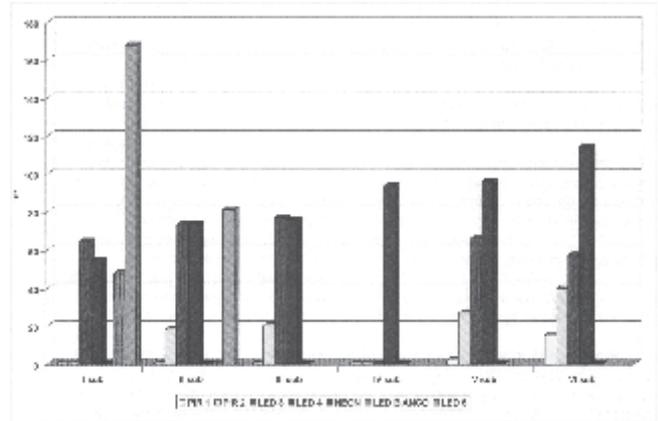


Fig. 1 - Incremento percentuale di germogli neoformati alle condizioni di ciascuna lampada LED calcolato rispetto ai germogli neoformati alle condizioni della lampada fluorescente al termine di ogni subcoltura.

Fig. 1 - Percentage increase of newly formed shoots under the conditions of each LED lamp calculated with respect to the newly formed shoots under the conditions of the fluorescent lamp at the end of each subculture.

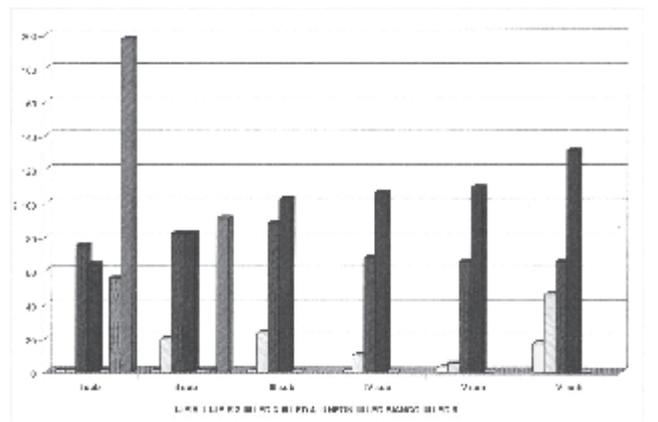


Fig. 2 - Incremento percentuale del peso fresco del cluster calcolato rispetto al controllo luce fluorescente al termine di ogni subcoltura.

Fig. 2 - Percentage increase of the fresh weight of the cluster calculated compared to control fluorescent light at the end of each subculture.

Interessante appare lo sviluppo dei germogli nell'insieme di ciascun cluster. Infatti, nei cluster esposti alla luce emessa alle condizioni di LED3 e LED4 sono stati rilevati i germogli di lunghezza maggiore, mentre nei cluster esposti alla luce bianca emessa dai neon, non sono stati osservati germogli di lunghezza superiore a 2 cm (figg. 4 e 5). Anche per questo carattere sono stati rilevati dati intermedi nei cluster esposti alle condizioni di luce emesse in PIR1 e PIR2.

### Discussione

Recentemente, Kurepin *et al.* (2007) hanno evidenziato che la prolungata esposizione delle piante a specifiche qualità spettrali della luce induce cambia-

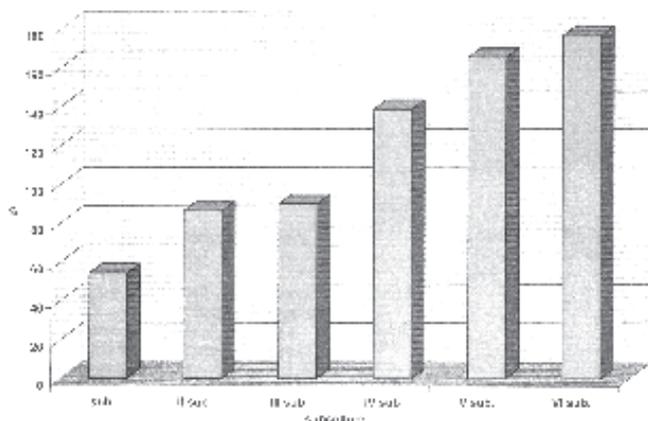


Fig. 3 - Incremento percentuale della produzione di germogli alle condizioni di luce LED4 al termine di ogni subcoltura calcolato rispetto al controllo luce fluorescente.

Fig. 3 - Percentage increase of the production of buds on the lighting conditions LED4 at the end of each subculture calculated comparing to control fluorescent light.

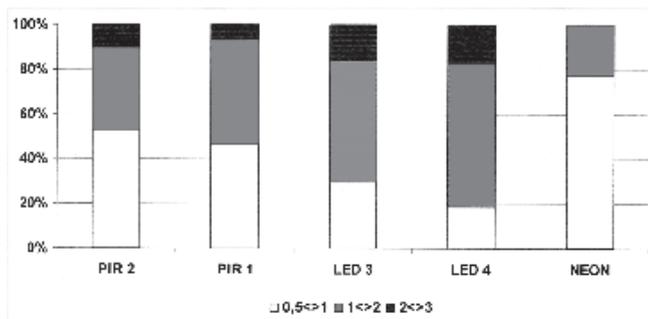


Fig. 4 - Ripartizione percentuale dei germogli sviluppati nelle diverse classi di lunghezza (cm) al termine VI subcoltura.

Fig. 4 - Percentage distribution of the shoots developed in different length classes (cm) after subculture VI.



Fig. 5 - Veduta dell'insieme dei germogli ascellari sviluppati, al termine della quarta subcoltura, in un cluster esposto alle lampade LED3 (a) e in un cluster esposto alle lampade fluorescenti (b).

Fig. 5 - View of the set of axillary shoots developed, at the end of the fourth subculture, in a cluster exposed to the lamps LED3 (a) and in a cluster exposed to fluorescent lamps (b).

menti nei livelli di auxina endogena, influenzando così l'azione dell'ormone. L'auxina partecipa alla regolazione della dominanza apicale e della crescita dei germogli ascellari (Hagen e Guilfoyle, 2002). L'esposizione delle piantine alle diverse luci indurrebbe quindi nelle piantine dello stesso genotipo un equilibrio diverso delle auxine e una regolazione differente di tale ormone. Questa si manifesterebbe con un maggior sviluppo di gemme ascellari e con una loro pronta crescita in un nuovo germoglio, come avviene alle condizioni delle Lampade LED3 e LED4.

Per aumentare l'efficienza delle tecniche *in vitro*, le condizioni di coltura, come temperatura, umidità, illuminazione e ventilazione, devono essere ottimali. Generalmente nel processo di propagazione *in vitro* sono impiegate lampade fluorescenti Coolwhite; tuttavia, il costo operativo di queste lampade incide per il 65% del costo totale dell'elettricità, che rende tale spesa una delle più alte in un laboratorio di colture di tessuti, inferiore solo a quella della manodopera (Kodym e Zapata-Arias, 1999). Il costo dell'energia elettrica se calcolato in percentuale sulla spesa totale della piantina finita, in Italia, nei nostri sistemi produttivi incide per il 25-40% sul costo totale della pianta prodotta *in vitro*. L'utilizzo di lampade costituite da LED, come fonte di luce è attraente a causa del loro vasto potenziale per applicazioni commerciali. Un vantaggio importante è la possibilità di combinare LED con spettri di emissione nei picchi di lunghezza d'onda che coincidono strettamente con quelle assorbite dai recettori della pianta che regolano lo sviluppo del cluster *in vitro* (Muleo *et al.*, 2009). Le caratteristiche uniche dei LED, come quelle di essere una fonte di luce di dimensione e volume piccolo, con un alto grado di sicurezza e longevità li rendono idonei per conseguire un risparmio energetico ed economico nel processo produttivo delle colture *in vitro* (Bula *et al.*, 1991; Nhut *et al.*, 2003).

### Riassunto

L'effetto della qualità della luce, emessa da lampade costituite LED, sulla proliferazione in espianti di *Prunus persica* Batsch x *P. amygdalus* Batsch, coltivati *in vitro*. Il tasso di proliferazione maggiore è stato rilevato sotto luce dicromatica (rossa, 635 nm, + blu, 465 nm), emessa da LED. La risposta è ascrivibile alla regolazione sulla differenziazione di gemme laterali e sulla dominanza apicale dovuta all'interazione tra i fitocromi e i fotorecettori della luce blu. I risultati confermano che specifiche qualità di luce regolino la proliferazione e la crescita degli espianti e che le lampade a LED sarebbero le più efficienti sia come fonte

energetica sia come segnale luminoso rispetto alle lampade fluorescenti.

**Parole chiave:** light emitting diodes, *Prunus*, fotorecettori, fitocromi.

## Bibliografia

- APPELGREN M. 1991. *Effects of light quality in stem elongation of Pelargonium in vitro*. Sci. Hort., 45: 345-351.
- BERTAZZA G., BARALDI R., PREDIERI S. 1995. *Light effects on in vitro rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 41: 139-143.
- BULA R.J., MORROW T.W., TIBBITTS T.W., BARTA D.J., IGNATIUS R.W., MARTIN T.S. 1991. *Light-emitting diodes as a radiation source for plants*. HortScience, 26: 203-205.
- CANAAMERO R., BAKRIM N., BOULY J.P., GARAY A., DUDKIN E., HABRICOT Y., AHMAD M. 2006. *Cryptochromes photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in Arabidopsis thaliana*. Planta, 224(5): 995-1003.
- CHÉÉ R. 1986. *In vitro culture of Vitis: the effects of light spectrum, manganese, and potassium iodide on morphogenesis*. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 7: 121-124.
- CHRISTIE J.M., BRIGGS W.R. 2001. *Blue light sensing in higher plants*. J. Biol. Chem., 276: 11457-11460.
- CLACK T., MATHEWS S., SHARROCK R.A. 1994. *The Phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE*. Plant Mol. Biol., 25: 413-427.
- Crawford S., SHINOHARA N., SIEBERER T., WILLIAMSON L., GEORGE G., HEPWORTH J., MÜLLER D., DOMAGALSKA M.A., LEYSER O. 2010. *Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport*. Development 137: 2905-2913.
- LEYSER O. 2003. *Regulation of shoot branching by auxin*. Trends Plant Sci. 8: 541-5.
- LJUNG K., BHALERAO R.P., SANDBERG G. 2001. *Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth*. Plant J., 28: 465-74.
- GALEN C., RABENOLD J.J., LISCUM E. 2007. *Functional ecology of a blue light receptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in Arabidopsis thaliana*. New Phytol., 173: 91-99.
- HAGEN G., GUILFOYLE T. 2002. *Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters, and regulatory factors*. Plant Mol. Biol., 49: 373-85.
- KODYM A., ZAPATA-ARIAS F.J. 1999. *Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (Musa acuminata cv. 'Grande Naine')*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 55: 141-145.
- KUREPIN L.V., EMERY R.J., PHARIS R.P., REID D.M. 2007. *Uncoupling light quality from light irradiance effects in Helianthus annuus shoots: putative roles for plant hormones in leaf and internode growth*. J. Ex. Bot., 58: 2145-2157.
- LISCUM E., BRIGGS W.R. 1995. *Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropin stimuli*. Plant Cell: 7: 473-485.
- MCSTEEN P., LEYSER O. 2005. *Shoot branching*. Ann. Rev. Plant Biol., 56: 353-74.
- MORTENSEN L.M., STROMME E. 1987. *Effects of light quality on some greenhouse crops*. Sci. Hort. 33: 27-36.
- MULEO R., MORINI S, CASANO S. 2001. *Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems*. In Vitro Cell Dev Biol - Plant, 37: 609-17.
- MULEO R., IACONA C. 2007. *Light perception and timekeeping systems in plants: the biological value of the domain of time*. Riv. Biologia, 100: 16-21.
- MULEO R., MORINI S. 2008. *Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstocks growing in vitro*. J. Plant Physiol., 165: 1838-1846.
- MULEO R., DIODATI A., SGAMMA T., MORINI S. 2009. *Ruolo del fotoperiodo e della qualità della luce nella micropropagazione delle specie arboree da frutto*. Italus Hortus 16(2): 1-4.
- NORTON C.R., HERRINGTON T., PHILLIPS D. NORTON M.E. 1988. *Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants*. Acta Hort., 226:413-416.
- NHUT D.T., TAKAMURA T., WATANABE H., OKAMOTO K., TANAKA M. 2003. *Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs)*. Plant Cell Tiss Org Cult, 73: 43-52.
- QUAIL P.H. 2002. *Phytochrome photosensory signalling networks*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3: 85-93.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE F. 1977. *Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus*. Acta Hort., 78: 437-442.
- SÆBØ A, KREKLING T, APPELGREN M. 1995. *Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 51: 187-93.
- SAKAMOTO K., BRIGGS W.R. 2002. *Cellular and subcellular localization of Phototropin 1*. Plant Cell, 14: 1723-1735.
- SMITH H. 2000. *Phytochromes and light signal perception by plants: an emerging synthesis*. Nature, 407: 585-591.
- TANAKA M., TAKAMURA T., WATANABE H., ENDO M., YANAGI T., OKOMOTO K. 1998. *In vitro growth of Cymbidium plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs)*. J Hort. Sci. Biotech., 73: 39-44.

## Sistema ad immersione temporanea (RITA<sup>®</sup>) per la coltura *in vitro* di una specie acquatica relitta: *Ludwigia palustris* (L.) Ell.

Laura Fontanili<sup>1</sup>, Mariella Lucchesini<sup>2</sup>, Ramón Sánchez Garrido<sup>2</sup> e Anna Mensuali-Sodi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa

### Temporary immersion system (RITA<sup>®</sup>) for *in vitro* culture of an endangered hydrophyte species: *Ludwigia palustris* (L.) Ell.

**Abstract.** *Ludwigia palustris* (L.) Ell. is a small perennial herbaceous hydrophyte. It was impacted by the reduction and transformation of environments suitable for their life and by water pollution, causing its gradual depletion. The present work is part of a large research with the aim to develop a form of *ex situ* conservation, through *in vitro* plant tissue culture, for some of the most endangered or representative aquatic species in wetlands as the Marshes of Fucecchio (PT). We recently developed an *in vitro* protocol for *L. palustris* from axillary and apical buds. The goal of this study is evaluating the adaptation of *L. palustris* in the *in vitro* culture systems using liquid substrate. In particular, we used the RITA<sup>®</sup> temporary immersion system and evaluated the primary metabolism of plantlets in the last phase of *in vitro* culture before *in vivo* acclimatization. The plants grown in mixotrophic conditions resulted the best ones, although they presented a lower photosynthetic activity. They deal with less stress the acclimatization phase. It is then possible to perform the *in vitro* culture of *L. palustris* in a RITA<sup>®</sup> temporary immersion system. This allows, in particular, the induction of photosynthesis modulated by the presence of carbohydrates in the substrate. On the basis of these results non-conventional techniques of *in vitro* culture can be usefully introduced in *ex situ* conservation programs of spontaneous hydrophytes like *Ludwigia palustris*.

**Key words:** biodiversity, tissue culture, *ex situ* conservation, micropropagation.

### Introduzione

*Ludwigia palustris* (L.) Ell. chiamata comunemente “porracchia dei fossi”, è una piccola pianta erbacea

perenne palustre appartenente alla famiglia delle *Onagraceae*. Il nome di questo genere risale a Linneo, che volle onorare in questo modo Ludwig, un naturalista tedesco suo contemporaneo. *L. palustris* possiede fusti striscianti che radicano ai nodi e le sue dimensioni variano da cinque a cinquanta centimetri; i fusti possono anche essere natanti. Le foglie sono opposte, con brevi piccioli, glabre e leggermente carnose, verdi o brunastre. Quelle natanti hanno lamina lanceolata, le altre ellittica oppure ovata. I fiori crescono all'ascella delle foglie, sono piccoli, solitari, poco attraenti, anche perché privi di petali. Vive nelle sfagnete, nei cariceti, nei boschi igrofilo e perfino in acque salmastre. *L. palustris* è distribuita nelle zone umide di tutto il mondo, ma ha risentito, forse più di altre piante acquatiche, della riduzione e della trasformazione degli ambienti adatti alla sua vita e dell'inquinamento idrico. Soprattutto a ciò è dovuta la sua ridotta presenza nell'Italia del Nord e la sua progressiva rarefazione, anche se in alcune zone della Toscana è ancora localmente presente, come ad esempio il Lago di Sibolla (LU), nel Padule di Fucecchio (PT) e nel Padule di Bientina (LU) (Felicioni e Zarri, 2007). Nell'ambito della conservazione *ex situ*, la propagazione *in vitro* trova importanti applicazioni nelle specie a rischio di estinzione (Sarasan *et al.*, 2006) ma mentre sono disponibili numerosi protocolli per le specie terrestri, gli studi sulla micropropagazione delle specie acquatiche sono più limitati. Per quanto riguarda il genere *Ludwigia* è stato realizzato un unico lavoro allo scopo di mettere a punto un metodo standard di propagazione massale su *L. repens*, una specie impiegata per la filtrazione di canali e laghi nel Nord America che viene spesso propagata con metodi amatoriali senza alcun tipo di selezione fenotipica (Öztürk *et al.*, 2004). Il lavoro svolto ha evidenziato l'attitudine della specie ad essere propagata *in vitro* ottenendo alte percentuali di proliferazione con bassi dosaggi di fitoregolatori. Recentemente è stato messo a punto un protocollo per *L. palustris* a partire da gemme ascellari e germogli apicali (Mensuali-Sodi *et al.*, 2011). L'obiettivo del presente lavoro consiste nel valutare l'adattamento di *L. palustris* alla coltura *in vitro* in

\* mensuali@sssup.it

sistemi che utilizzano substrato liquido. In particolare, a questo scopo è stato impiegato il sistema ad immersione temporanea RITA<sup>®</sup> e valutato il metabolismo primario delle plantule nell'ultima fase di coltura *in vitro* che precede l'acclimatazione.

## Materiali e metodi

Il materiale vegetale di partenza proviene dal comprensorio del Padule di Fucecchio (PT), in particolare dall'area umida del SIC/ZPS (Sito di Importanza Comunitaria/Zona di Protezione Speciale) "Bosco di Chiusi e Paduletta di Ramone". Il materiale di partenza è stato trasferito presso il Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie dell'Università di Pisa. Le talee di *Ludwigia palustris* (L.) Elliott prelevate sono state poste in vaso su substrato sabbioso mantenuto costantemente umido. Dopo questa fase di crescita in ambiente controllato, sono stati prelevati, sottoposti a sterilizzazione e posti in coltura germogli apicali, germogli ascellari e segmenti nodali utilizzando un mezzo di coltura (LUDW+S) con 1/3 della concentrazione dei componenti del substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) con 30g l<sup>-1</sup> di saccarosio, 300 mg l<sup>-1</sup> di glutatione ridotto, 500 mg l<sup>-1</sup> di MES, 2 g l<sup>-1</sup> di Gelrite<sup>®</sup> senza fitoregolatori (Mensuali-Sodi *et al.*, 2011). Per valutare l'adattamento di *L. palustris* alla coltura *in vitro* in sistemi che utilizzano substrato liquido, è stato impiegato il sistema ad immersione temporanea RITA<sup>®</sup> (Vitropic, France) (Ø 130 mm x h 150 mm, volume 980 ml). In particolare, germogli ottenuti da plantule moltiplicate in contenitori Magenta<sup>®</sup> su mezzo gelificato sono state poste nei vasi RITA usando il substrato liquido LUDW+S e, per stimolare lo sviluppo di autotrofia, lo stesso mezzo privato del saccarosio (LUDW-S) e non addizionato di altri composti che potessero in alcun modo compensare l'energia non fornita dal saccarosio. I vasi RITA<sup>®</sup> ed i substrati sono stati autoclavati (20 min a 121 °C). le colture sono state posizionate in camera di crescita a 25±1 °C con 16 ore di fotoperiodo ed irradianza di 70 mmol s<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> fornita da tubi fluorescenti non riscaldanti. Il sistema RITA<sup>®</sup> prevedeva un tempo di immersione di 1 min/4 ore.

Durante il periodo di moltiplicazione (4 settimane) sono stati effettuati 2 rilievi (14° e 25° giorno di coltura) relativi al numero di germogli per pianta, lunghezza dei germogli, peso fresco e secco di ogni espianto. Inoltre, sono stati analizzati campioni di tessuto vegetale fresco allo scopo di quantificare il contenuto di clorofille, carotenoidi e xantofille delle piantine prodotte *in vitro*. I campioni sono stati prima pesati, poi addizionati di un volume di etanolo al 95%

pari a 0,1 ml/mg ed infine incubati per una notte a 4 °C al buio. Il giorno seguente il materiale vegetale, immerso in etanolo, è stato centrifugato per 3 minuti a 5.000 rpm. L'analisi quantitativa dei pigmenti contenuti negli estratti di foglie di *L. palustris* è stata effettuata allo spettrofotometro Lambda 35 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer Instruments, Shelton-CT-U.S.A. alle seguenti lunghezze d'onda: 666,2 nm (Chl-a), 654,6 nm (Chl-b) e 470 nm (carotenoidi e xantofille). Il contenuto totale dei suddetti pigmenti è stato calcolato come descritto da Lichtenthaler (1987) e la loro concentrazione è stata quindi espressa come mg/g di peso fresco di campione.

Per effettuare la stima dell'attività fotosintetica in relazione con il peso secco (g) delle plantule per unità di vaso, è stata usata l'equazione modello:  $(CO_2\text{in}-CO_2\text{out}) * E * V * K$  (μmol sec<sup>-1</sup>) (Fujiwara *et al.*, 1987; Lucchesini *et al.*, 2006) in cui sono immessi i dati dell'andamento diurno della CO<sub>2</sub> all'interno e all'esterno del contenitore (ml/l), il numero (E) di scambi di aria orari, il volume V (l) del vaso e il fattore di conversione K (41\*10<sup>3</sup>mmol/l) per la CO<sub>2</sub>. La concentrazione di CO<sub>2</sub> all'interno e all'esterno dei vasi è stata misurata dopo 14 e 25 giorni dalla messa in coltura degli espianti campionando manualmente l'aria con una siringa ipodermica. Sono stati presi campioni all'ultima ora di buio (0 h), alla prima ora di fotoperiodo (1 h), e alla sesta ora del fotoperiodo (6 h) e sottoposti ad analisi gascromatografica (Lucchesini *et al.*, 2006). Per effettuare i prelievi di gas all'interno dei vasi di coltura, sono stati applicati dei tubi supplementari ai vasi RITA<sup>®</sup> ai quali si adattava perfettamente un raccordo tipo «Swagelok», comunemente impiegato in gas-cromatografia (Lucchesini *et al.*, 2004, 2006).

Il disegno sperimentale è stato completamente randomizzato e consisteva di 3 unità con mezzo LUDW+S e 3 con mezzo LUDW-S contenenti ciascuno 20 espienti di *Ludwigia palustris*. La determinazione del grado di crescita della *L. palustris* è avvenuta attraverso misure del peso fresco e secco per i 6 vasi RITA<sup>®</sup> prelevando campioni di cinque plantule per vaso cresciute sui due diversi mezzi di coltura (LUDW+S e LUDW-S). Le misurazioni di tipo morfologico e del contenuto di pigmenti e le analisi relative all'attività fotosintetica sono state sottoposte al test di Student. Nelle figure, i valori sono riportati come medie ± ES (n = 15 e 6 rispettivamente per i dati di crescita e per le misure gassose).

## Risultati e discussione

Dopo 14 giorni dall'inizio della coltura è stato osservato che le plantule avevano complessivamente

un buon aspetto con radici lunghe in media 0,5 cm, e ciò potrebbe indicare il corretto funzionamento del sistema ad immersione temporanea già nel primo periodo di coltura. Un aspetto degno di nota è la differenza di colore delle piantine cresciute sul mezzo (LUDW+S) contenente saccarosio che assumevano una tinta rossastra nella pagina inferiore delle foglie e verde scuro nella pagina superiore rispetto a quelle cresciute senza saccarosio, che erano di un colore verde chiaro. Queste pigmentazioni si accentuano (rosso scuro e verde chiaro) con il passare del tempo e con la crescita delle piante (fig. 1).

La differenza di peso delle piantine tra i due tipi di colture, entro i primi 14 giorni di coltivazione, non è significativa, probabilmente a causa dell'adattamento delle plantule alla subcoltura. Tuttavia rispetto al peso secco iniziale, il guadagno della biomassa è circa 20 e 10 volte maggiore rispettivamente per le colture con e senza saccarosio (dati non mostrati).

Alla fine della coltura si osserva invece una differenza significativa sia nel peso fresco che secco a

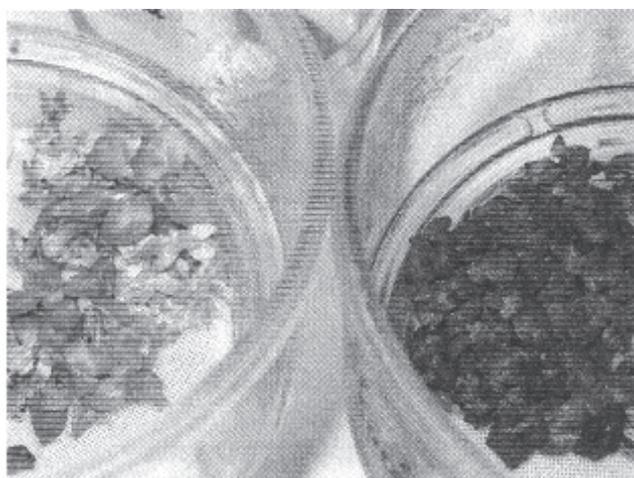


Fig. 1 - Sinistra: *Ludwigia palustris* coltivata nel mezzo senza saccarosio; destra: *L. palustris* coltivata nel mezzo con saccarosio.

Fig. 1 - On the left: *Ludwigia palustris* cultured on sucrose free medium. On the right *L. palustris* cultured on the sucrose medium.

favore delle piante cresciute sul mezzo contenente saccarosio (tab. 1). Rispetto all'inizio della coltura, le plantule cresciute con e senza saccarosio guadagnano rispettivamente circa 50 e 10 volte più sostanza secca. La crescita delle radici ha raggiunto lunghezze fino a 4 cm a prescindere dalla diversa composizione del mezzo di coltura. In particolare l'ammasso delle radici superava la barriera del vassoio di contenimento del sistema RITA®.

Si può quindi concludere che, una volta raggiunti i 25 giorni di sviluppo nel sistema ad immersione temporanea, le piante sono riuscite ad assorbire i nutrienti dalla soluzione nutritiva con un conseguente aumento di peso fresco e secco. È da sottolineare l'aspetto sano che mostrano le plantule in entrambe le colture, soprattutto per quanto riguarda il vigore e la quantità di radici.

Per quanto riguarda l'effetto del saccarosio sulla morfologia delle plantule, e sul tasso di moltiplicazione i risultati non indicano differenze significative dovute alla presenza di saccarosio nel mezzo (tab. 1) Osservando la figura 2 (a e c) si può seguire l'andamento del rapporto tra CO<sub>2</sub> interna ed esterna nei vasi con i due mezzi di coltura. Durante il periodo di buio e fino alla prima ora del fotoperiodo, la CO<sub>2</sub> interna è maggiore della CO<sub>2</sub> esterna dimostrando che le piante hanno accumulato anidride carbonica durante il periodo di buio. Non si riscontrano nella prima fase della coltura (fig. 2a) differenze significative fra le due tesi. Dopo la prima ora del fotoperiodo fino alla sesta ora, la discesa dovuta al consumo di CO<sub>2</sub> da parte delle plantule è simile nelle plantule cresciute con e senza saccarosio dimostrando che già alla seconda settimana di coltura le piantine di *Ludwigia* sono in grado di assorbire attivamente anidride carbonica. Per quanto riguarda l'attività fotosintetica al 14° giorno di coltura non si è riscontrata una differenza significativa tra le colture con e senza saccarosio (fig. 2c). Nell'ultima fase della coltura, si può osservare che il rapporto

Tab. 1 - Rilievi dei parametri di crescita, dei pigmenti fogliari e degli scambi gassosi effettuati al 25° giorno di coltura *in vitro* di *L. palustris*. NS (non significativo); P≤0.05 \*; P≤0.01 \*\*; P≤0.001\*\*\*.

Tab. 1 - Surveys of the growth parameters, leaf pigments and gas exchanges made at the 25th day of *in vitro* culture of *L. palustris*. NS (not significative); P≤0.05 \*; P≤0.01 \*\*; P≤0.001\*\*\*.

Parametri morfofisiologici	LUDW+S	LUDW-S	Significatività
Peso fresco (g/plantula)	0,1507 ± 0,0072	0,0653 ± 0,0067	***
Peso secco (g/plantula)	0,0216 ± 0,0013	0,0053 ± 0,0008	***
N°germogli per plantula	2,52 ± 0,2497	2,06 ± 0,133	NS
Lunghezza germogli (cm)	1,392 ± 0,1113	1,03 ± 0,0929	NS
Altezza della plantula (cm)	0,891 ± 0,04609	1,013 ± 0,0480	NS
Clorofilla a+b (µg/mg)	0,306 ± 0,0190	0,2144 ± 0,0320	NS
Clorofilla a/b	0,071 ± 0,0006	0,0746 ± 0,0009	*
Carotenoidi (µg/mg)	0,532 ± 0,037	0,4114 ± 0,0633	NS

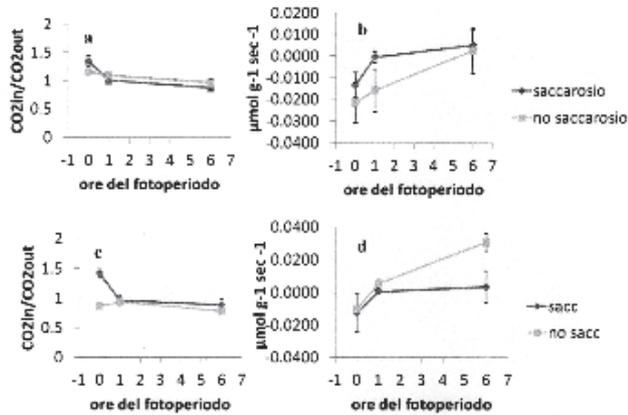


Fig. 2 - Andamento della  $CO_2$ in/ $CO_2$ out in vasi RITA contenenti gli espanti di *Ludwigia palustris* al 14° (a) e al 25° giorno di coltura (b). Fotosintesi netta espressa per peso secco al 14° (c) e al 25° giorno di coltura (d). I valori riportati sono medie dei valori  $\pm$  errore standard raccolti alla fine del periodo di buio (0), alla prima (1) e sesta (6) ora del fotoperiodo.

Fig. 2 - Time course of  $CO_2$ in/ $CO_2$ out in RITA vessels with *Ludwigia palustris* at the 14th (a) and 25th (b) day of culture. Net photosynthetic rate per dry weight at the 14th (c) and 25th (d) day of culture. Values are means  $\pm$  standard error (SE) recorded after the dark period (0), at the first (1), and sixth (6) hour of the photoperiod.

$CO_2$  in/ $CO_2$  out delle piantine cresciute sul mezzo con saccarosio è elevato a seguito dell'effetto dei carboidrati sulla attività respiratoria (Lucchesini *et al.*, 2006). Le plantule cresciute senza saccarosio in condizioni di autotrofia mostrano un livello di  $CO_2$  in equilibrio con l'esterno (fig. 2 b).

Dalla figura 2 (d) è possibile osservare che le piante cresciute in presenza di saccarosio fra la prima e la sesta ora del fotoperiodo riescono a raggiungere un punto di compensazione tra la  $CO_2$  utilizzata e quella introdotta nel vaso dall'esterno. Le plantule che crescono in assenza di saccarosio hanno un'attività fotosintetica significativamente più elevata alla sesta ora del fotoperiodo dimostrando che il sistema di coltura nel vaso RITA® abbinato all'assenza del saccarosio riesce a portare la coltura verso lo sviluppo di autotrofia. I valori osservati in colture senza saccarosio sono sempre stati superiori per tutto il periodo della coltura, che conferma la correlazione inversa tra saccarosio e attività fotosintetica (Langford e Wainwright, 1987). Un possibile ruolo del saccarosio sulla repressione della ribuloso-1,5-bifosfato carbossilasi (Rubisco) è stato suggerito in colture con un ridotto numero di scambi gassosi (Desjardin, 1995). I germogli che derivano dal sistema con saccarosio mostrano però un maggior accumulo di biomassa indicando un metabolismo mixotrofico così come osservato in altri sistemi culturali (Kozai e Iwanami, 1988).

In base ai risultati ottenuti, il contenuto di clorofilla a e b mostra valori non significativamente diversi tra i due tipi di colture (tab. 1). È da sottolineare come

il rapporto clorofilla a/b sia minore di 1 in entrambe le colture. Questo è dovuto all'aumento della clorofilla b rispetto alla clorofilla a, fenomeno tipico delle coltivazioni in condizioni di ombra o di scarsa illuminazione. In aggiunta, questo rapporto mostra valori significativamente più elevati per le colture autotrofe, rivelando un ruolo minore della clorofilla b nei processi fotosintetici di questo tipo di piante. L'analisi di carotenoidi e xantofille ha dimostrato che a livello quantitativo non ci sono differenze significative tra i due tipi di colture ma che il contenuto di carotenoidi e xantofille è sempre più alto di quello delle clorofille. Il basso contenuto di clorofilla per peso fresco e il basso rapporto di clorofille rispetto ai carotenoidi è una caratteristica generale delle idrofite se paragonata a quella delle piante terrestri delle medie latitudini (Ronzhina *et al.*, 2004). In questo caso i valori riscontrati dei pigmenti sono influenzati sia dall'adattamento del complesso clorofilliano tipico delle piante acquatiche sia dalle caratteristiche ambientali della coltura in vitro che fa uso di contenitori che escludono alcune lunghezze d'onda e di sistemi di illuminazione a tubi fluorescenti. I valori più elevati dei carotenoidi sono molto probabilmente dovuti al fatto che la loro funzione principale è di garantire l'assorbimento della luce (irraggiamento in  $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$  forniti da tubi fluorescenti  $70^{-1}$ , luce fredda) nelle regioni spettrali non adeguatamente coperti dalle clorofille.

## Conclusioni

*Ludwigia palustris* (L.) Ell. è una piccola idrofita erbacea distribuita nelle zone umide di tutto il mondo, ma ha risentito, forse più di altre piante acquatiche, della riduzione e della trasformazione degli ambienti adatti alla sua vita e dell'inquinamento idrico (Felicioni e Zarri, 2007). Per tale ragione rientra in una ricerca che prevede la messa a punto di strategie di conservazione *ex situ* per piante acquatiche a rischio nella Riserva Naturale del Padule di Fucecchio (PT) basate sul mantenimento delle piante in vegetazione. In particolare, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'adattamento di piante acquatiche alla coltura *in vitro* in sistemi che utilizzano substrato liquido. I risultati hanno dimostrato che è possibile eseguire la coltura *in vitro* di *L. palustris* in un sistema di immersione temporanea RITA®.

Questo consente:

- il rinnovamento costante dell'atmosfera interna dei contenitori;
- la regolazione della concentrazione di  $CO_2$ ;
- l'induzione di fotosintesi modulata dalla presenza di carboidrati nel substrato.

In conclusione è quindi possibile che tecniche non convenzionali di colture in vitro siano introdotte per programmi di conservazione ex situ di specie spontanee idrofite come *L. palustris*.

### Riassunto

*Ludwigia palustris* (L.) Ell., piccola pianta erbacea perenne palustre che ha risentito della riduzione e della trasformazione degli ambienti adatti alla sua vita e dell'inquinamento idrico, causandone la sua progressiva rarefazione. Il presente lavoro si inserisce in una ricerca più ampia avente lo scopo di sviluppare una forma di conservazione ex situ per mezzo di sistemi di coltura in vitro di tessuti vegetali, per alcune specie autoctone maggiormente minacciate o rappresentative in zone umide come il Padule di Fucecchio (PT). Recentemente è stato messo a punto un protocollo per *L. palustris* a partire da gemme ascellari e germogli apicali. L'obiettivo del presente lavoro consiste nel valutare l'adattamento di *L. palustris* alla coltura in vitro in sistemi che utilizzano substrato liquido. In particolare, a questo scopo è stato impiegato il sistema ad immersione temporanea RITA® e valutato il metabolismo primario delle plantule nell'ultima fase di coltura in vitro che precede l'acclimatazione. Nel presente studio sono risultate migliori le piante cresciute in mixotrofia, anche se presentavano una minor attività fotosintetica. Esse affrontano con minor stress la fase di acclimatazione. E' possibile eseguire la coltura in vitro di *L. palustris* in un sistema di immersione temporanea RITA®. Questo consente in particolare l'induzione di fotosintesi modulata dalla presenza di carboidrati nel substrato. Tecniche non convenzionali di colture in vitro possono essere introdotte per programmi di conservazione ex situ di specie spontanee idrofite come *L. palustris*.

**Parole chiave:** biodiversità, conservazione ex situ, micropropagazione.

Lavoro cofinanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Pistoia e Pescia nell'ambito del progetto "Il Padule di Fucecchio: strategie di conservazione delle risorse genetiche e possibile impiego delle specie vegetali conservate e domestiche" per gli anni 2010-2011 e dalla Provincia di Pistoia "Strategie di conservazione delle piante acquatiche di interesse regionale e comunitario del Padule di Fucecchio" per gli anni 2011-2012.

### Bibliografia

- DESJARDIN Y., 1995. *Carbon nutrition in vitro-regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems*.-In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.A.L. (ed.): Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 441-471.
- FELICIONI S., ZARRI, E. (a cura di), 2007. *Le zone umide della Toscana settentrionale. Dispense didattiche, schede su flora e fauna*. Quaderni del Padule di Fucecchio 5. Centro di Ricerca, Documentazione e Promozione del Padule di Fucecchio.
- FUJIWARA K., KOZAI T., WANABE I., 1987. *Measurements of carbon dioxide gas concentration in stoppered vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of plantlets*. J. Agriculture Meteorology 43: 21-30.
- KOZAI T., IWANAMI Y., 1988. *Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlets in vitro and changes in nutrient composition of the medium*. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 25: 107-115.
- LANGFORD P.J., WAINWRIGHT H., 1987. *Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots in vitro*. Ann. Bot. 60(6): 633-640.
- LICHTENTHALER H.K., 1987. *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*. Methods in Enzymology 145(34): 350-382.
- LUCCHESINI M., MENSUALI-SODI A., 2004. *Importanza delle condizioni di crescita in vitro per la successiva acclimatazione di microtalee di Myrtus communis L. e Fillirea latifolia L.* Acta Italus Hortus 11: 324-327.
- LUCCHESINI M., MONTEFORTI G., MENSUALI-SODI A., SERRA G., 2006. *Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions*. Biol. Plant. 50(2): 161-168.
- MENSUALI-SODI A., LUCCHESINI M., FONTANILI L., BARTOLINI A., 2011. *La conservazione di alcune specie acquatiche a rischio di estinzione nel Padule di Fucecchio*. Acta Italus Hortus 2: 31-35.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant 15: 473-493.
- ÖZTÜRK M., KHAWAR K.M., ATAR H.H., SANCAK C., ÖZCAN S., 2004. *In vitro micropropagation of the aquarium plant Ludwigia repens*. Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech. 12: 21-25.
- RONZHINA D.A., NEKRASOVA G.F., P'YANKOV V.I., 2004. *Comparative characterization of the pigment complex in emergent, floating, and submerged leaves of hydrophytes*. Russian J. of Plant Physiol. 51(1): 27-34.
- SARASAN V., CRIPPS R., RAMSAY M. M., ATHERTON C., MCMICHEN M., PRENDERGAST G., ROWNTREE J. K., 2006. *Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 42: 206-214.

## Uso del biochar nella micropropagazione del pioppo bianco (*Populus alba* L.)

Sara Di Lonardo<sup>1</sup>, Francesco Primo Vaccari<sup>1</sup>, Silvia Baronti<sup>1</sup>, Maurizio Capuana<sup>2</sup>, Laura Bacci<sup>1</sup>, Francesco Sabatini<sup>1</sup>, Maurizio Lambardi<sup>3</sup> e Franco Miglietta<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> CNR IBIMET, Istituto di Biometeorologia, Firenze

<sup>2</sup> CNR IGV Istituto di Genetica Vegetale, Sesto Fiorentino (FI)

<sup>3</sup> CNR IVALSIA Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Sesto Fiorentino (FI)

<sup>4</sup> FoxLab (Forest and Wood), Fondazione E. Mach - Iasma, S. Michele all'Adige (TN)

### Use of biochar for the micropropagation of white poplar (*Populus alba* L.)

**Abstract.** Biochar is a product rich in carbon, resulted from the pyrolysis of biomass. As demonstrated by many studies, the addition of biochar to soil increases crop yields in the open field. Up to now the effects of biochar in tissue cultures as a substitute of activated charcoal are not yet available. The results of an experiment carried out on two clones of white poplar (*Populus alba* L.) grown *in vitro* with addition of different amounts of biochar (0.5 g/l and 1.5 g/l) showed that it did not damage the plants and behaves as activated charcoal, since no significant differences have been observed when data were compared at the same concentrations. Both biochar and activated charcoal addition increased root dry biomass and number of roots per shoot and these effects appeared to be independent of genotype and concentrations used.

**Key words:** black carbon, rooting.

### Introduzione

L'aggiunta del biochar, un prodotto ricco di carbonio, risultato della pirolisi di biomasse vegetali, al terreno è stata proposta recentemente come pratica utilizzabile per mitigare il riscaldamento globale e per migliorare le caratteristiche di alcuni tipi di suolo (Yamato *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2011). Grazie ai miglioramenti dovuti all'interramento di biochar, si possono avere rese agricole maggiori (Lehmann *et al.* 2003; Chan *et al.*, 2007; Rondon *et al.*, 2007; Baronti *et al.*, 2010; Vaccari *et al.*, 2011) in quanto la maggior fertilità si traduce in una mag-

gior efficienza fotosintetica, in un maggior sviluppo della biomassa per l'apporto di nutrienti ed una minore lisciviazione. Ad oggi, le informazioni sugli effetti del biochar riguardano solo colture in pieno campo o in vaso e non si hanno notizie dei suoi effetti su espianti *in vitro*. Nel presente lavoro sono illustrati gli effetti del biochar sull'accrescimento di due cloni di pioppo bianco (*Populus alba* L.) *in vitro* e la possibilità di usarlo come sostituto del carbone attivo.

### Materiali e metodi

Per gli esperimenti sono state utilizzate colture *in vitro* di due cloni di pioppo bianco (*Populus alba* L.):

- il clone Villafranca (Vil), selezione commerciale ampiamente diffusa nella pioppicoltura italiana;
- il clone Querce (Qrc), selezionato nel comune di Greve in Chianti (Firenze).

Le colture sono state ottenute dalla moltiplicazione per gemme ascellari degli espianti di partenza, con ripetute subculture in mezzo nutritivo *Woody Plant Medium* (WPM; Lloyd e McCown, 1980) addizionato di benziladenina (0,15-0,25 mg/l) per incrementare la consistenza numerica del materiale sperimentale. Prima di iniziare gli esperimenti con biochar e carbone attivo, il materiale vegetale è stato sottoposto ad una subcultura di quattro settimane in substrato privo di benziladenina, allo scopo di eliminare un possibile effetto *carry-over* della citochinina e quindi impedire la formazione di nuove gemme ascellari a discapito dell'allungamento del fusto. Trascorso questo periodo, le piantine sono state prelevate ed è stata eliminata la parte radicale, lasciando i germogli ad una lunghezza di circa 1,5 cm (due internodi). I germogli sono poi stati sistemati nei mezzi di coltura previsti dal piano sperimentale. Le tesi prevedevano la valutazione di terreni di coltura con biochar, derivato dalla pirolisi di potature di pioppo (in tabella 1 sono riportate le carat-

\* s.dilonardo@ibimet.cnr.it

Tab. 1 - Caratteristiche chimiche del biochar utilizzato.  
Tab. 1 - Chemical characteristics of biochar used.

Elemento	Unità	Valore
C	%	78,7
N	%	0,1
Al	mg kg <sup>-1</sup>	561,2
Be	mg kg <sup>-1</sup>	0,0117
Ca	mg kg <sup>-1</sup>	7.534
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	27,6
Fe	mg kg <sup>-1</sup>	<0,005
K	mg kg <sup>-1</sup>	1.584
Mg	mg kg <sup>-1</sup>	714
Mn	mg kg <sup>-1</sup>	140
Mo	mg kg <sup>-1</sup>	1,046
Na	mg kg <sup>-1</sup>	3.368
P	mg kg <sup>-1</sup>	405,2
Zn	mg kg <sup>-1</sup>	<0,0002
pH	-	7,0

teristiche chimiche) e carbone attivo (Carlo Erba Reagenti S.p.A., Italia) a due concentrazioni per ciascun clone:

- (C) controllo (solo WPM);
- (B1) WPM + biochar (0,5 g/l);
- (B2) WPM + biochar (1,5 g/l);

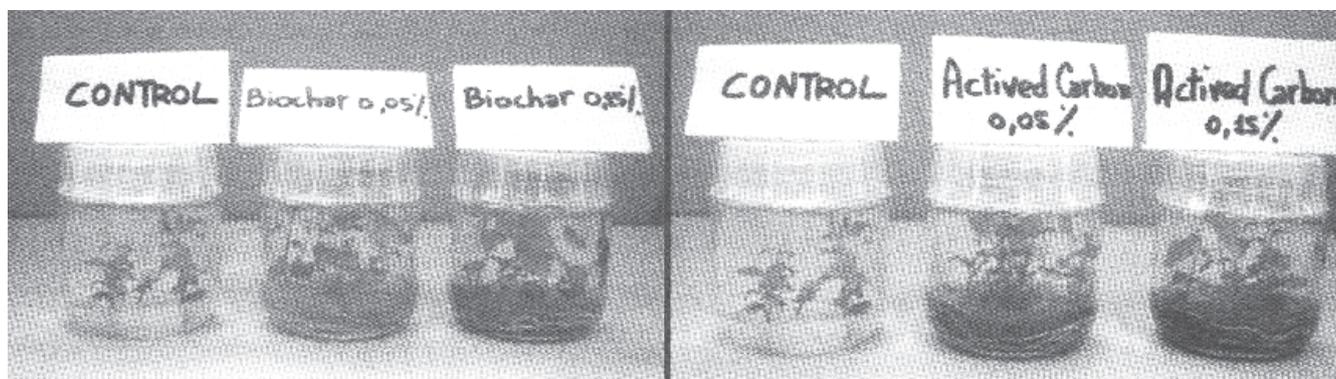
- (AC1) WPM + carbone attivo (0,5 g/l);
- (AC2) WPM + carbone attivo (1,5 g/l).

Per ciascun clone ogni tesi è stata replicata quattro volte (ogni replica era costituita da un vasetto con cinque germogli). Le colture sono state incubate in camera di crescita ad una temperatura di 23±1 °C con fotoperiodo di 16 h (40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

## Risultati e discussione

Dopo 30 giorni di coltura tutti i germogli hanno radicato (fig. 1). In tabella 2 vengono riportati i dati relativi ai pesi secchi di parti aeree e radici nonché il numero delle radici. Relativamente al peso secco del fusto, l'aggiunta del carbone attivo o del biochar ha comportato un effetto positivo sull'accrescimento di questo organo quasi esclusivamente nel caso del clone Qrc; in Vil un effetto significativamente positivo è stato ottenuto solamente per la tesi che prevedeva l'aggiunta di 0,5 g/l di biochar (B1). Al contrario è stato sempre registrato un incremento significativo della biomassa secca radicale dei trattati rispetto ai controlli del +156,6% in media per le tesi con biochar e del +141,2% per le tesi con carbone attivo. Anche per quanto riguarda il numero delle radici è stato osservato un incremento significativo medio dei due

Fig. 1 - Piante di *Populus alba* L. cresciute su diversi mezzi di coltura dopo 30 giorni di trattamento.  
Fig. 1 - Shoots of *Populus alba* L. clones grown on different media after 30 days of culture.



Tab. 2 - Peso secco del fusto e delle radici e numero di radici medio per pianta dei due cloni di *Populus alba* L. cresciuti su diversi terreni di coltura. I valori sono presenti nella forma "media ± errore standard": lettere diverse in colonna indicano differenze significative tra le tesi di ciascun clone (almeno P≤0,05).

Tab. 2 - Root and shoot dry biomass (mg) and number of roots of two *P. alba* clones grown on different media. Values are means ± standard error; different letters in column represent significant differences among the means (at least P≤0.05, according to ANOVA).

Substrato	Peso secco fusto (mg)		Peso secco radici (mg)		Numero di radici	
	Qrc	Vil	Qrc	Vil	Qrc	Vil
C	10,1±0,9a	10,7±0,8a	5,6±1,4a	7,6±1,5a	2a	3a
B1	20,1±1,2b	16,1±0,7b	16,4±1,1b	18,1±1,1b	4b	6b
B2	19,1±1,2b	14,2±0,6a	15,9±1,7b	16,3±1,9b	5b	5b
AC1	18,5±0,8b	12,4±0,8a	14,5±1,5b	15,6±1,5b	4b	6b
AC2	22,3±1,6b	13,2±0,6a	15,8±2,3b	16,9±2,2b	4b	5b

Qrc, clone Querce; Vil, clone Villafranca; C, controllo; B1, mezzo di coltura con 0,5 g/l di biochar; B2, mezzo di coltura con 1,5 g/l di biochar; AC1, mezzo di coltura con 0,5 g/l di carbone attivo; AC2, mezzo di coltura con 1,5 g/l di carbone attivo.

cloni del +76,0% per le tesi con biochar e del +81,6% per le tesi con carbone attivo. Relativamente a questi due parametri, non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra le tesi con diversa concentrazione di biochar o di carbone attivo, tra le tesi con biochar e quelle con carbone attivo e tra i due cloni.

## Conclusioni

Il terreno di coltura con biochar (0,5 e 1,5 g/l) non ha effetti negativi sulla crescita di cloni di pioppo bianco *in vitro* (effetto indipendente del genotipo). I mezzi di coltura addizionati di biochar inducono la radicazione ed incrementano la biomassa radicale ed il numero di radici rispetto a quelli che non ne contengono. Gli effetti sono confrontabili con quelli ottenuti per i mezzi addizionati con carbone attivo.

## Riassunto

Il biochar o carbone vegetale, un prodotto ricco di carbonio, è il risultato della pirolisi delle biomasse. Come dimostrato da molti studi, l'aggiunta di biochar al suolo può aumentare la resa delle colture in campo, tuttavia non ci sono informazioni, fino ad ora, dei suoi effetti sulle colture *in vitro* come sostituto del carbone attivo, abbondantemente utilizzato in micropropagazione. I risultati di una prova svolta su due cloni di pioppo bianco (*Populus alba* L.) utilizzando mezzi di coltura addizionati di due concentrazioni di biochar (0,5 g/l e 1,5 g/l) hanno dimostrato che non danneggia gli espianti e non ci sono differenze significative con i trattati con uguali concentrazioni di carbone attivo. Sia l'aggiunta di biochar che di carbone attivo ha migliorato il radicamento, in termini di aumento di biomassa secca radicale e del numero di radici per

espianto, e questi effetti sembrano essere indipendenti dal genotipo e dalle concentrazioni utilizzate.

**Parole chiave:** carbone vegetale, radicazione.

## Bibliografia

- BARONTI S., ALBERTI G., DELLE VEDOVE G., DI GENNARO F., FELLET G., GENESIO L., MIGLIETTA F., PERESSOTTI A., VACCARI F.P., 2010. *The biochar option to improve plant yields: first results from some field and pot experiments in Italy*. Ital. J. Agron. 5: 3-11.
- CHAN K.Y., VAN ZWIETEN L., MESZAROS I., DOWNIE A., JOSEPH S., 2007. *Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment*. Aust. J. Soil Res. 45: 629-634.
- LEHMANN J., DA SILVA JR. J.P., STEINER C., NEHLS T., ZECH W., GLASER B., 2003. *Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments*. Plant Soil 249: 343-357.
- LLOYD G., MCCOWN B.H., 1980. *Commercially feasible micro-propagation of mountain laurel Kalmia latifolia by use of shoot-tip culture*. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30: 421-427.
- MEYER S., GLASER B., QUICKER P., 2011. *Technical, economical, and climate-related aspects of biochar production technologies: a literature review*. Env. Sci. Techn. 45 (22): 9473-9483.
- MOLINA M., ZAELEKE D., SARMA K.M., ANDERSEN S.O., RAMANATHAN V., KANIARU D., 2009. *Reducing abrupt climate change risk using the Montreal Protocol and other regulatory actions to complement cuts in CO<sub>2</sub> emissions*. Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (49): 20616-20621.
- RONDON M.A., LEHMANN J., RAMÍREZ J., HURTADO M., 2007. *Biological nitrogen fixation by common beans (Phaseolus vulgaris L.) increases with biochar additions*. Biol. Fert. Soils 43: 699-708.
- VACCARI F.P., BARONTI S., LUGATO E., GENESIO L., CASTALDI S., FORNASIER F., MIGLIETTA F., 2011. *Biochar as a strategy to sequester carbon and increase yield in durum wheat*. Eur. J. Agron. 34: 231-238.
- YAMATO M., OKIMORI Y., WIBOWO I.F., ANSHORI S., OGAWA M., 2006. *Effects of the application of charred bark of Acacia mangium on the yield of maize, cowpea and peanut, and soil chemical properties in South Sumatra, Indonesia*. Soil Sci. Plant Nutr. 52: 489-495.

## Osservazioni dell'effetto della qualità della luce a LED sulla crescita di piante micropropagate di *Myrtus communis* subsp. *tarentina*

Marco Savona\*, Carlo Mascarello, Ermanno Sacco e Barbara Ruffoni

CRA-FSO, Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

### Effect of LED light on micropropagation of *Myrtus communis* subsp. *tarentina*

**Abstract.** The LED technology appears as an efficient alternative for the lighting of the growth chambers during micropropagation owing to the high energy saving possibility (over 70% respect to incandescence lamps). In order to apply this technology routinely it is necessary to understand the effect on different aspects of the plant micropropagation. In order to set up a culture protocol considering this alternative lighting, trials with a laboratory LED instrument have been carried out using *Myrtus communis* subsp. *tarentina* explants. The shoots were cultured in MS medium added with BA 0.5 mg/L and IAA 0.2 mg/L for 60 days under red (122  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  PAR), blu (283  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) or white (109  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). In *Myrtus*, the red light induced a significant increase of the height and weight of shoots but decreased the leaf dimensions (area, length and width). The chlorophyll content (a or b and a+b) was also determined. These preliminary results could be useful to understand the efficiency of these lamps in order to set up a productive micropropagation protocol.

**Key words:** *in vitro* propagation, energy saving, wavelength, chlorophyll a and b.

### Introduzione

Uno dei costi principali della coltura *in vitro* è l'energia per il mantenimento della temperatura costante e per l'illuminazione ciclica della camera di crescita. Le fonti di illuminazione oggi utilizzate sono essenzialmente lampade al neon che garantiscono un ampio spettro luminoso. Entro settembre 2012 dovranno essere progressivamente eliminate le normali lampade a incandescenza (legge EUP 2005/32/EC); si potranno scegliere lampade fluorescenti compatte o lampade ad incandescenza efficienti (alogene), che hanno qualità di illuminazione equivalente a quelle tradizionali, ma permettono risparmi tra il 25% e il 50%. Esistono tec-

nologie alternative che possono essere prese in considerazione: le lampade a basso consumo e i LED (*Light Emitting Diode*). Il diodo è un dispositivo semiconduttore che emette luce al passaggio della corrente elettrica attraverso una giunzione di silicio, opportunamente trattata. A differenza delle normali lampade, il LED è privo di filamento interno. Sono notevoli i vantaggi che l'adozione di questa tecnologia porterà nel nostro prossimo futuro. I LED hanno un'alta efficienza di conversione energetica e pertanto consentono un risparmio energetico di circa il 70% rispetto alle lampade tradizionali e allo stesso tempo emettono una maggiore e precisa illuminazione con una luce bianchissima e scarsa produzione di calore che, tra l'altro, è un aspetto favorevole anche per le plantule durante l'allevamento *in vitro* (Jordan *et al.*, 2001). Le lampade a LED hanno inoltre una vita media superiore alle lampade tradizionali e non danno inquinamento atmosferico. È possibile avere LED a luce bianca o a luce diversamente colorata con differenti indicazioni sulle fasi e sul materiale in crescita. I pigmenti delle piante infatti assorbono fotoni di energia a diverse lunghezze d'onda che possono essere ottenute da una combinazione di luce a LED e consentono la crescita normale delle piante (Jordan *et al.*, 2001). Non molti lavori sono stati pubblicati sulla micropropagazione con fonte luminosa a LED, essenzialmente su orchidacee (Wongnok *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2001), *Spathiphyllum* (Tan Nhut *et al.*, 2005) e calla (Chang *et al.*, 2003). Con l'avvicinarsi della scadenza prevista dalla EC risulta importante verificare la fattibilità della sostituzione delle fonti luminose nei laboratori di micropropagazione. Obiettivo del lavoro è valutare la crescita di germogli di una specie mediterranea già soggetta a moltiplicazione *in vitro* (Ruffoni *et al.*, 2010) sottoposti a sorgente luminosa LED al fine di determinare la possibilità di usare queste lampade di illuminazione mantenendo efficiente il sistema di propagazione.

### Materiali e metodi

Espianti di *Myrtus communis* subsp. *tarentina* sono stati presi in considerazione per valutare l'efficienza

\* marco.savona@entecra.it

propagativa in fase di moltiplicazione *in vitro* seguendo il protocollo proposto da Ruffoni *et al.* (1994) per cui il terreno di coltura era composto da sali e vitamine secondo Murashige e Skoog (1962) addizionati con BA 0,5 mg/l e 0,2 mg/l di IAA, agar 8 g/l e pH 5.7. Tale mezzo di coltura è stato inserito in contenitori brevettati per la coltura *in vitro* resistenti alla sterilizzazione in autoclave dotati di coperchio dotato di diverse lampade LED ad alta efficienza che emettevano luce bianca, rossa e blu. È stato utilizzato l'apparecchio da sperimentazione: Mini E-light system 18 (Nano bio light - OSHINO LAMP) (fig. 1a) costituito da elementi autoclavabili completati da un secondo coperchio contenente LEDs a diversa emissione luminosa: rosso (lunghezza d'onda da 600 a 700, picco a 650 nm); blu (da 390 a 530, picco a 470 nm) bianco caldo (da 400 a 700 nm). Sono stati usati 9 contenitori, funzionanti in modo indipendente. Valutando una distanza tra i LED e i germogli pari a 7 cm, la luce bianca mostrava un PAR di 109  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , la luce rossa di 122  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  mentre la luce blu di 283  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Come prima fase di indagine si è scelto di valutare le lunghezze d'onda rossa e blu.

L'esperimento è stato impostato secondo uno schema a blocchi randomizzati con 30 espianti per tipo di luce con 3 ripetizioni (10 espianti/luce). Gli espianti sono stati mantenuti per due cicli (60 giorni consecutivi) alle condizioni sopra riportate per verificarne la possibilità di conservazione. Trascorsi 60 giorni sono stati valutati: l'altezza e il peso degli espianti, il tasso di moltiplicazione, la superficie e la dimensione fogliare (lunghezza e larghezza) ed il contenuto di clorofilla (a, b, a+b). L'area fogliare è stata misurata tramite scanner (fig. 2), mentre il contenuto in clorofilla mediante analisi spettrofotometrica (secondo il protocollo indicato da Lichtenthaler e Buschmann, 2001). I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente con analisi della varianza tramite test ANOVA e confronto tra le medie con il test SNK per  $p < 0,5$ .

## Risultati e discussione

Dopo 60 giorni le piantine hanno mantenuto una ottima vitalità e proliferazione ad ogni tipo di emissione luminosa, con caratteristiche e prestazioni differenti (fig. 3).

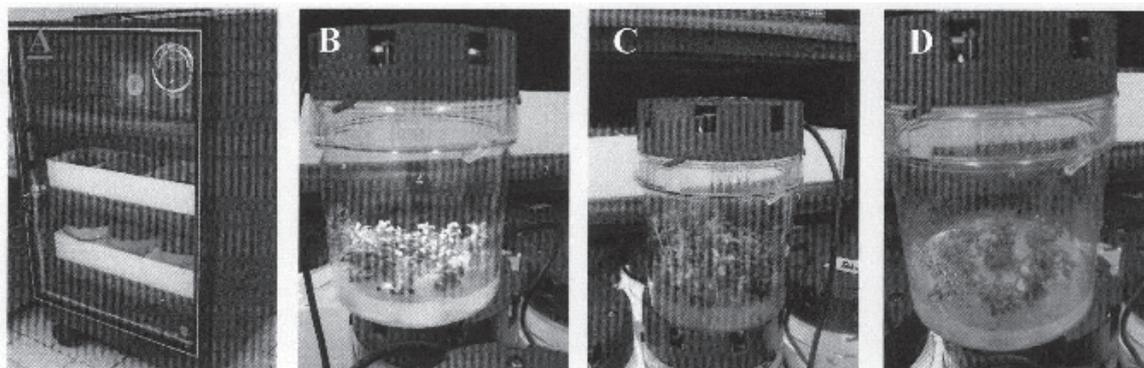


Fig. 1 - A: Apparecchio Mini E-light utilizzato per la sperimentazione contenente i vasi di coltura; Aspetto degli espianti coltivati in B: LED bianco, C: LED rosso, D: LED blu.

Fig. 1 - A: Mini E-light instruments combined with three LED lamps; Behavior of the explants cultured with B: LED white, C: LED red, D: LED blue.

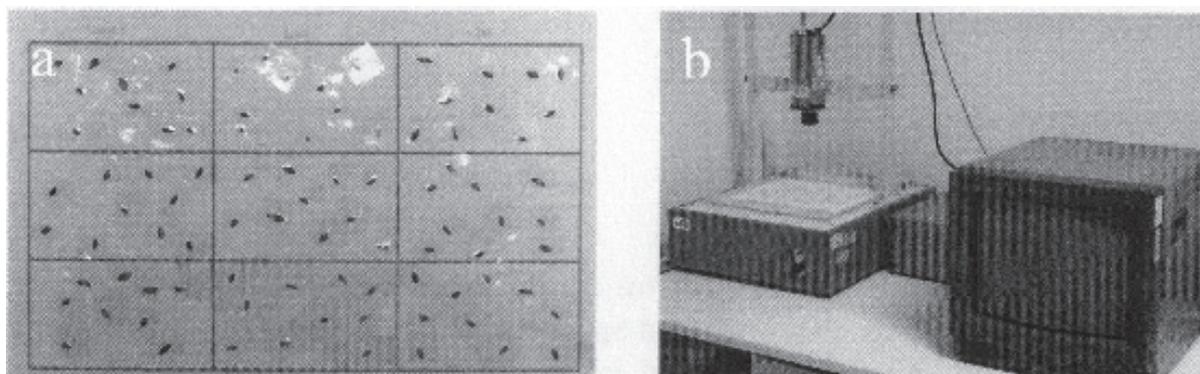


Fig. 2 - Analisi della dimensione fogliare. a: foglie ben distese applicate ad un foglio per il calcolo dell'area fogliare, b: scanner impiegato per il rilievo della superficie e dimensione fogliare.

Fig. 2 - Evaluation on leaves size. a: leaves applied to a sheet for calculating leaf area, b: scanner applied for the measurements.



Fig. 3 - Aspetto generale degli espianti allevati alle differenti qualità di luce: a: LED bianco, b: LED rosso, c: LED blu.  
Fig. 3 - General aspects of the explants cultured under different light quality: a: LED white, b: LED red, c: LED blue.

Tab. 1 - Analisi morfologica fogliare in relazione alle tre differenti emissioni luminose.

Tab. 1 - Morphological analysis of the leaves developed under three different light emission.

Parametri	Luce		
	Bianca	Rossa	Blu
Area fogliare (cm <sup>2</sup> )	0,12 b	0,09 a	0,13 b
Lunghezza della foglia (cm)	0,65 b	0,54 a	0,68 b
Larghezza della foglia (cm)	0,28 b	0,25 a	0,28 b

Dal punto di vista della morfologia fogliare (tab. 1) emerge che la qualità della luce LED produce alterazioni significative determinando, nel caso di quella rossa, una generale riduzione delle dimensioni (area, lunghezza e larghezza).

Anche analizzando altri parametri morfometrici, come altezza e peso, sono emerse differenze significative sotto luce LED rossa (tab. 2) che risulta promuovere, in mirto, crescita e peso degli espianti. Ciò conferma quanto già verificato da altri autori (Chang *et al.*, 2003; Wongnok *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2011) che hanno osservato che a luce rossa si ha aumento della crescita delle piante. La luce LED rossa, applicata a semenzali di specie orticole, ha indotto una risposta inversa a seconda della specie (Tadayoshi *et al.*, 2006). I tassi di moltiplicazione sono stati elevati e paragonabili a quelli che sono stati ottenuti per la stessa specie in luce a fluorescenza (Cervelli e Ruffoni, 2000); essi però non sono tra loro significativamente diversi in relazione al tipo di luce anche se con luce rossa sembra esserci una maggiore stimola-

Tab. 2 - Parametri quantitativi in funzione del LED testato per un periodo di 60 giorni.

Tab. 2 - Quantitative parameters related to LED applied for 60 days.

Parametri	Luce		
	Bianca	Rossa	Blu
Altezza (cm)	2,3 a	3,7 b	2,1 a
Peso (g)	0,41 a	0,75 b	0,46 a
Tasso di moltiplicazione germogli/espianto	10,6 a	12,1 a	9,8 a
Radicazione (%)	0,0 a	0,0 a	0,0 a

zione (12,1 germogli per espianto) (tab. 2). Alle condizioni saggiate non è stata osservata alcuna emissione radicale in nessuno dei trattamenti.

L'analisi della quantità di clorofilla può essere un valido marker per la qualità degli espianti e varia in funzione dell'intensità luminosa (Mascarello *et al.*, 2009; Ruffoni *et al.*, 2010); dai dati della prova emerge che gli espianti allevati sotto luce LED rossa, pur non presentando differenze significative nel valore totale, hanno una maggiore quantità (se pur non significativa) di clorofilla b rispetto alle altre luci (fig. 4).

A seguito di queste prime osservazioni è possibile affermare che, in mirto, con tecnologia LED si può ottenere una buona proliferazione di germogli, la luce rossa incrementa altezza e peso e quindi, di conseguenza, gli espianti sviluppano un maggior numero di foglie di ridotte dimensioni. E' da valutare inoltre se la concentrazione di clorofilla nei tessuti può, come in altri casi (Ruffoni *et al.*, 2012), avere effetto sull'ambientamento e sulla ripresa vegetativa a seguito di trasferimento in serra. Visto che comunque la risposta alla qualità della luce risulta specie-specifica (Tadayoshi *et al.*, 2006) sarà probabilmente necessario per avere un protocollo produttivo e ripetibile, come altri autori hanno dimostrato (Tan Nut *et al.*, 2005; Wongnok *et al.*, 2008), creare delle combinazioni luminose adatte.

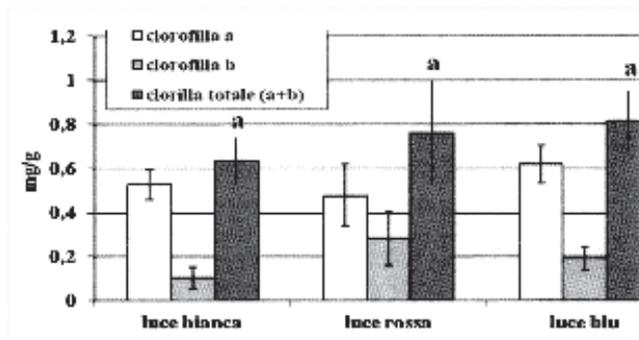


Fig. 4 - Analisi della quantità di clorofilla nei tessuti fogliari di mirto in relazione alla qualità della luce.

Fig. 4 - Chlorophyll contents in the leaf tissue related to light quality.

## Riassunto

Uno dei costi principali della coltura *in vitro* è l'energia per il mantenimento della temperatura costante e l'illuminazione ciclica della camera di crescita. In alternativa alle lampade al neon, ci sono sul mercato le lampade a LED. Dal punto di vista dei costi di produzione, le lampade a LED permettono un risparmio energetico di circa il 70% rispetto alle lampade tradizionali con scarsa produzione di calore. Con un clone di *Myrtus communis* subsp. *tarentina* è stata impostata una prova con luce LED rossa, blu e bianca utilizzando un apparecchio da sperimentazione della ditta Nano Bio Light. Gli espianti sono stati allevati sul mezzo base MS addizionato con BA 0,5 mg/l + IAA 0,2 mg/l per 60 giorni. Dai risultati è emerso che il tipo di luce rossa influisce significativamente: si ha incremento in altezza e in peso degli espianti e riduzione della dimensione fogliare mentre non ha effetto significativo sul tasso di moltiplicazione e sul contenuto in clorofilla. I dati preliminari riportati in questo lavoro permettono di avere qualche iniziale indicazione sull'effettiva possibilità di utilizzare la tecnologia LED durante le fasi di coltura *in vitro*.

**Parole chiave:** propagazione *in vitro*, risparmio energetico, area fogliare, clorofilla.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto VITROFLOR, Bando "Imprese Florovivaistiche" (D.M. 186/2007)

## Bibliografia

- CERVELLI C., RUFFONI B., 2000. *Myrtus communis* L.: micropropagazione come salvaguardia ambientale e prospettiva di sviluppo della coltivazione per fronda recisa. Atti del IV Convegno Nazionale Biodiversità, Alghero (SS) 8-11 Settembre 1998: 705-708.
- CHANG H.S., CHARKABARTY D., HAHN E.J., PAEK K.Y., 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In vitro cell. Dev. Biol.*, 39(2): 129-134.
- JORDAN K.A., ONO E., NORIKANE J., TAKAKURA T., 2001. Control of LED to achieve light quality and intensity in tissue culture and micro-propagation studies. *Acta Hort.*, 562: 135-140.
- LICHTENTHALER H.K., BUSCHMANN C., 2001. Chlorophylls and carotenoids - Measurement and characterisation by UV-VIS. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley&Sons, Madison, pp. F4.3.1-F4.3.8. Nr. 107.
- MASCARELLO C., MELIS R., MANTOVANI E., RUFFONI B., 2009. Evaluation of the role of light intensity and hormonal treatments during *in vitro* rooting of *Myrtus* micropropagated plantlets related to acclimatization performances. *Acta Hort. (ISHS)*, 812: 379-385.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- RUFFONI B., GAZZANO A., COSTANTINO C., 1994. *Myrtus communis* micropropagation: indolacetic acid effect on rooting. *Italus Hortus*, 1: 8-12.
- RUFFONI B., MASCARELLO C., SAVONA M., 2010. *In vitro* propagation of ornamental *Myrtus* (*Myrtus communis*). In: Mohan Jain S., Ochatt S.J., 2010. *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Humana press: 257-269.
- TADAYOSHI H., WAKANORI A., HIROYUKI W., 2006. Effects of monochromatic light irradiation by LED on the intermodal stem elongation of seedlings in eggplant, leaf lettuce and sunflower. *J. Soc. High Techn. Agr.*, 18(2): 160-166.
- TAN NHUT D., TAKAMURA T., WATANABE H., TANAKA M., 2005. Artificial light source using light-emitting diodes (LEDS) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. *Acta Hort. (ISHS)*, 692: 137-142.
- WONGNOK A., PILUEK C., TECHASILPITAK T., TANTIVIVAT S., 2008. Effects of light emitting diodes on micropropagation of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Hort. (ISHS)*, 788: 149-156.
- YEN H.C., LIU S.Y., HSIEH Y.C., 2011. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata by combining fluorescent lamp and R-LEDs as light sources. *Industrial electronics and applications*: 312-315.

## Studio *in vitro* del rilascio graduale del complesso nanospugna/fitoregolatore sulla comparsa dei primi apici radicali in *Passiflora amalocarpa*

Paola Chiavazza, Andrea Faggio, Valentina Polin e Marco Devecchi

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università di Torino

### ***In vitro* study of nanosponge/growth regulator complex gradual release on the onset of the first root tips in *Passiflora amalocarpa***

**Abstract.** With the aim to increase multiplication rate, aseptic culture protocol using explants of various origin are known. In more recent times, studies were undertaken on the complex nanosponge/plant growth regulator activity to stimulate *in vitro* rhizogenesis of passiflora microshoots with different attitude to the adventitious roots. Nanosponges are obtained through a newly established hyper-cross-linking of beta-cyclodextrin, with respect to which, depending on the crosslinker used, enhance the ability to include stable inorganic and organic molecules. They are experienced in the chemical-pharmaceutical like solubilizing agents and as nanovectors of poorly soluble active molecules, whom they are able to promote the gradual release and the effectiveness. Recently in the medical, numerous studies try to evaluate toxicity decrease of chemotherapeutic principles (hemolysis experiments conducted on human erythrocytes) and their efficiency increase even at lower doses, effects mainly due to the gradual release that occurs when active ingredient is complexed with nanosponge. In this paper we reported the first results, within the plant, of a study that aims to demonstrate that included growth regulator release (IBA, IAA) occurs in a gradual way, by simply delaying but not in any way inhibiting the onset of the first *Passiflora amalocarpa* root tips, which presents no difficulty to adventitious roots.

**Key words:** solubilizing agents, nanovectors, IBA, IAA.

### Introduzione

Le interazioni fra molecole in grado di determinare complessi aventi caratteristiche chimico-fisiche innovative e brevettabili, sono oggetto di studio da parecchi anni. Sono numerosi i composti che hanno la

capacità di includere altre molecole nella loro struttura mutandone, in questo modo, le proprietà. Ad esempio le ciclodestrine (CD), oligomeri del D-glucopiranosio ottenute mediante degradazione enzimatica degli amidi, sono utilizzate da tempo per il lento rilascio e la veicolazione di molecole utili. In campo agrario le prime applicazioni, in tempi recenti, riguardano l'inclusione di regolatori di crescita come acido indolbutirrico (IBA) e acido naftalenacetico (NAA) allo scopo di stimolare la radicazione sia di talee legnose che di microgermogli *in vitro* (Mura *et al.*, 1995; Brutti *et al.*, 2000). A loro volta, le CD sono state utilizzate per la sintesi di composti costituiti da macromolecole ramificate a struttura tridimensionale, insolubili in acqua, dove danno origine a sospensioni di tipo colloidale (Cavalli *et al.*, 2006). In questo tipo di struttura sono incluse cavità di varia grandezza, che si vanno ad aggiungere a quelle presenti nella CD di base e che danno origine a un composto chiamato nanospugna (NS). Questa ha la caratteristica di poter includere simultaneamente sia molecole lipofile (nelle cavità idrofobiche delle CD), che molecole idrofile (nelle cavità che si vengono a creare fra gruppi base di CD) (Mhanga *et al.*, 2007).

Lo studio del rilascio graduale di composti tossici a livello cellulare, possibile attraverso l'uso di queste strutture di recente costituzione, da tempo si avvale di sperimentazione a livello clinico. Pazienti oncologici, dopo l'assunzione di farmaci veicolati con NS, vengono periodicamente monitorati con esami di laboratorio allo scopo di valutare il rilascio rallentato dall'inclusione del chemioterapico (Swaminathan *et al.*, 2010).

### Materiali e metodi

Dovendo evidenziare il fenomeno già abbastanza complesso di gradualità del rilascio di sostanze, la scelta della specie vegetale da utilizzare è caduta su una pianta con buona competenza, in assenza di stimolazione esogena, sia alla produzione di nuovi germogli che all'emissione di apici radicali.

A partire da gemme ascellari di *Passiflora amalocarpa* Barb. Rodr., si è ottenuta una produzione di

\* paolamaria.chiavazza@unito.it

microgermogli, ottenuti mediante subcolture di nodi nel substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) in assenza di fitoregolatori. Per gli studi di rizogenesi sono stati utilizzati germogli costituiti da due nodi, di circa 2 cm di lunghezza. Il mezzo di radicazione era costituito da MS con aggiunta di IBA e acido indolacetico (IAA), entrambi a dosi di 0,5 e 5 mg/l. I due principi sono stati complessati a concentrazione equimolare con nanospugna derivata da beta-ciclodestrina, con modalità di formazione del complesso già oggetto di pubblicazione (Chiavazza *et al.*, 2009). Debite quantità della soluzione contenente il complesso NS/regolatore di crescita sono state aggiunte al mezzo di coltura prima della solidificazione.

Le condizioni sperimentali prevedevano:

- MS + nanospugna (5mg/l)
- MS + IBA (0,5 e 5 mg/l)
- MS + NS/IBA (0,5 e 5 mg/l)
- MS + IAA (0,5 e 5 mg/l)
- MS + NS/IAA (0,5 e 5 mg/l)

Ogni trattamento è stato replicato in 5 vasi di coltura e in ognuno sono stati trapiantati 5 microgermogli. L'emissione di radici avventizie/microtalea è stata osservata nei due schemi sperimentali (IBA, IAA) con una frequenza settimanale. I dati sono stati sottoposti ad ANOVA seguita dal test di Tukey per la verifica della significatività delle differenze fra le medie, utilizzando il software Graph Pad Prism.

## Risultati e discussione

A conferma di quanto osservato in prove precedenti (dati non riportati), la presenza di NS non ha alterato significativamente la capacità di regolazione induttiva a livello radicale (fig. 1). Per quanto riguarda il

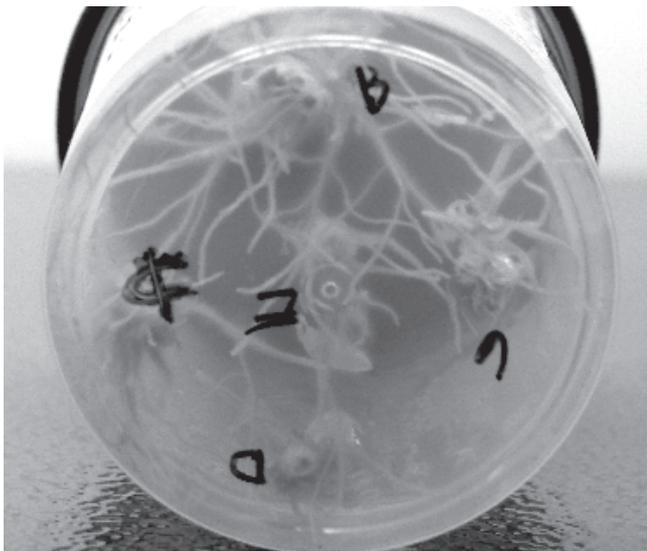


Fig. 1 - Allungamento di apici radicali in NS a fine ciclo di coltura.  
Fig. 1 - Root tips elongation in NS at the end of culture

fenomeno del rilascio graduale, oggetto del nostro studio, non è stata osservata differenza significativa fra i trattamenti con e senza NS in presenza di entrambi i regolatori di crescita alle dosi minori (0,5 mg/l).

Prendendo invece in considerazione i trattamenti con IAA e IBA a concentrazione maggiore, l'entità del numero di radici emesse da ogni germoglio non differiva a fine trattamento, ma era diversa la velocità con la quale esse comparivano durante il ciclo di subcoltura in esame. Il risultato ottenuto verso il 30° giorno, testimonia che il fitoregolatore complessato nella NS non è ancora disponibile per la pianta, se non in minima parte (figg. 2 e 3). La disponibilità è, invece, pressoché totale verso il 60° giorno, quando non si riscontrano differenze significative tra i trattamenti con i regolatori di crescita allo stato libero e complessati alla fine del periodo di osservazione (fig. 4). In generale, la capacità della nanospugna di incorporare all'interno



Fig. 2 - Numero di radici/microtalea nei trattamenti con IBA 5 mg/l allo stato libero (sinistra) e complessato (destra) al 30° giorno di coltura.

Fig. 2 - Number of roots/microshoot with free (left) and complexed (right) IBA 5 mg/l at 30<sup>th</sup> day of culture.

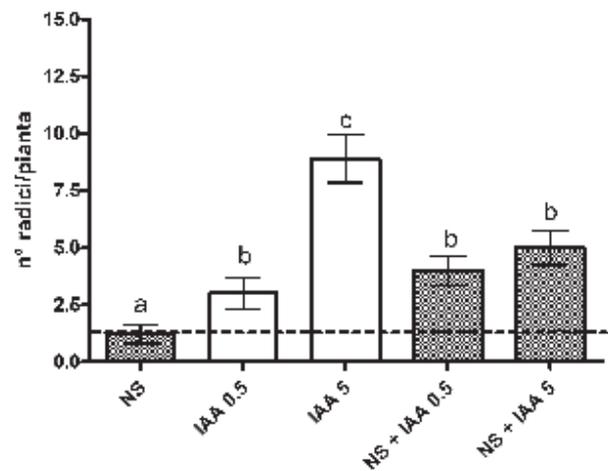


Fig. 3 - Risposta ai trattamenti con IAA allo stato libero e complessato con NS in *Passiflora amalocarpa*  
Fig. 3 - Rooting response to free and complexed IAA treatments in *Passiflora amalocarpa*

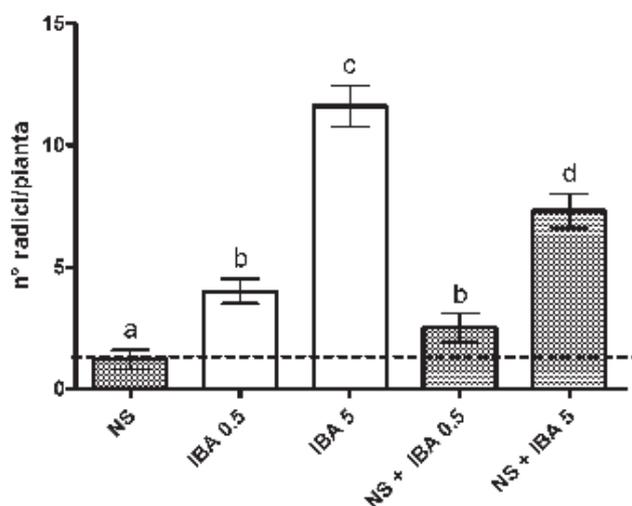


Fig. 4 - Risposta ai trattamenti con IBA allo stato libero e complessato con NS in *Passiflora amalocarpa*.

Fig. 4 - Rooting response to free and complexed IBA treatments in *Passiflora amalocarpa*.

della sua struttura molecole utili, è ancora da ottimizzare in quanto studi recenti sembrano testimoniare che l'entità della complessazione è strettamente dipendente dal tipo di legame chimico che si viene a formare tra le ciclodestrine che la costituiscono.

## Conclusioni

Con questo studio si è voluto iniziare ad indagare se anche in sistemi vegetali è possibile osservare un rilascio di tipo graduale mediante l'utilizzo di complessi con NS; mentre la capacità delle nanopugne di incorporare molecole all'interno della loro struttura e di veicolarle lentamente è stata valutata ampiamente in campo chimico-farmaceutico, in ambito vegetale sono noti solamente lavori che riguardano esclusivamente la migliorata solubilità di composti a difficile dissoluzione. Ulteriori accertamenti dovranno riguardare affinate caratteristiche specifiche quali l'effettiva migliorata solubilità delle molecole complessate, la loro stabilità chimica nonché la permanenza a livello radicale di composti utili in agricoltura, ad elevata biodisponibilità, determinate da rallentata distribuzione.

## Riassunto

In tempi più recenti, sono stati intrapresi studi riguardanti l'attività del complesso nanopugna/fito-regolatore per stimolare la rizogenesi *in vitro* di microgermogli di passiflora a diversa attitudine alla radicazione avventizia. Le nanopugne sono materiali di recente costituzione ottenuti tramite iper-reticolazione della beta-ciclodestrina, rispetto alla quale, a seconda del reticolante utilizzato, incrementano la capacità di includere stabilmente molecole organiche ed inorganiche. In questo lavoro sono riportati i primi risultati in campo vegetale di uno studio che ha come obiettivo la dimostrazione che il rilascio del regolatore di crescita complessato (IBA, IAA) avviene in modo graduale, semplicemente ritardando ma non inibendo in alcun modo la comparsa dei primi apici radicali in *Passiflora amalocarpa*, la quale non presenta difficoltà alla radicazione avventizia *in vitro*.

**Parole chiave:** agenti solubilizzanti, nanotrasportatori, IBA, IAA.

## Bibliografia

- MURA P., CECCARELLI L., FAUCCI M.T., RINALDELLI E., MANCUSO S., 1995. *Improvement of solubility of indolbutyric acid by complexation with alpha-cyclodextrin and rhizogenic activity in Olea europea L. cv. Leccio del Corno*. Sci. Hort., 9: 119-121.
- BRUTTI C., APOSTOLO N.M., FERRAROTTI S.A., LLORENTE B.E., KRYMKIEWICZ L., 2000. *Micropropagation of Cynara scolymus employing cyclodextrins to promote rhizonegenesis*. Sci. Hort., 83: 1-10.
- CAVALLI R., TROTTA F., TUMIATTI W., 2006. *Cyclodextrin-based Nanosponges for Drug Delivery*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 56: 209-213.
- MHLANGA S.D., MAMBA B.B., KRAUSE R., MALAFETSE T.J., 2007. *Removal of organic contaminants from water using nanosponge cyclodextrins polyurethanes*. J. Chem. Tech. Biotech. 82: 328-388.
- SWAMINATHAN S., PASTERO L., SERPE L., TROTTA F., VAVIA P., AQUILIANO, TROTTA M., ZARA G., CAVALLI R., 2010. *Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity*. Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics 74: 193-201.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant 15: 473-497.
- CHIAVAZZA P., LAVA C., TROTTA F., DEVECCHI M., 2009. *Attività di complessi nanopugna-regolatori nella radicazione di microgermogli di Passiflora spp*. Italus Hortus, 16(2): 258-262.

## Multioperational culture processing possibilities of micropropagation bioreactors: new steps from tis-systems toward the artificial plant ovary concept (APO)

Fári Miklós Gábor

Orsós Ottó Laboratory, Department of Plant Biotechnology, University of Debrecen (Ungheria)

The increasing demand for sustained economic activities in every habitats has to be supported by available agricultural and other natural resources, that generates basic challenge for the science and technology in the first half of the 21 century. Responsible professionals and non-professionals agree that the natural resources accumulated during millions of years cannot be further destroyed. Agro-economists drew the attention of the scientific world to the fact, i.e. that the further demolition of natural vegetation can only be avoided if the world's bio-energy request is produced on only the 320-702 million hectares of marginal agro-ecosystems. For this purpose, as stated some scientists, the most effective biological, genetic and other breeding methods should be used and new and adequate agricultural cultivation and biomass processing methods should be developed. Therefore, plant biotechnologists have been challenged by the urgent need of cost effective new propagation technology for special elite crop plant lines. The predictions is that breeding, generative and vegetative propagation and growing of the future crops in the next fifty years will be done by applying the combination of the most modern techniques, among which the plant biotechnology underwent a rapid development utilizing more and more sophisticated tools provided by cutting edge sciences.

Automatic and robot systems could greatly improve the time and cost effectiveness of the micropropagation technologies, however, there has not been much progress in this area. The artificial seed ("syn-seed") is a promising further special application of the micropropagation technologies, has also not been widely applied. More recently, researches have been

initiated to produce clonally propagated species based on multioperational culture processing possibilities of micropropagation bioreactors.

The synthetic plant or "syn-plant" is our own terminology based on multioperational culture processing method of specific plant propagules produced from synchronized sustained embryogenic callus cultures. The development of the industrial scale multioperational culture processing technology for syn-plants has been only a theoretical possibility, approached by several laboratories. Here we report a major break through, the creation of the "Artificial Plant Ovary" (APO) system (patent application P 09 00018, 2009. 01. 20, HPO, Hungary). In the Orsós Ottó Laboratory of the University of Debrecen, Hungary the first experimental APO instrument has been completed started to work in 2009. The new approach, the APO, allowed the synchronized conversion of somatic embryos into functional plantlets, in one step, time efficiently with minimal loss, without encapsulation/artificial seed production. The obtained acclimatized syn-plants can be treated just like other field ready propagules used in the horticulture or forestry. Te first APO has been set up to produce syn-plants from *Arundo donax* sustained embryogenic cultures originated from University of South Carolina (LM). Out of our investigations the presentation will summarize some promising old and new phyto-bioreactor approach investigated by different research teams.

The research has been supported by the "Új Magyarország Fejlesztési Terv" project No. GOP-1.3.1.-08/2-2009-007 and by the National Research and Technology Bureau (NKTH), project No. EA-2044-010/2009 and Ereky Foundation, Hungary.

## Supporti biodegradabili per la coltura *in vitro*

**Marco Savona<sup>1</sup>, Ezio Mantovani<sup>1</sup>, Giuliano Dradi<sup>2</sup>, Romano Roncasaglia<sup>2</sup>, Carlo Mascarello<sup>1</sup> e Barbara Ruffoni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CRA-FSO, Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

<sup>2</sup> Vivai Piante Battistini, Martorano di Cesena (FC)

Al fine di mantenere la competitività del materiale micropropagato, oltre alla riduzione del costo della mano d'opera, è necessario diminuire l'elevata onerosità delle fasi di avvio, stabilizzazione e moltiplicazione delle colture, non dal punto di vista del materiale vegetale e della sue performances, ma dal punto di vista dei supporti utilizzabili e delle operazioni tecniche necessarie.

L'impossibilità di ridurre i costi, da questo punto di vista, è principalmente da ascrivere alla scarsa automazione delle operazioni di autoclavaggio e di riempimento dei vasi di coltura. In tal senso, si ritiene innovativo e molto promettente approfondire lo studio di sistemi alternativi all'uso di substrati agarizzati e promuovere anche la ricerca di alternative all'uso del vetro, sperimentando contenitori monouso di nuova concezione, economici e biodegradabili. A tale fine sono stati impostati degli esperimenti con materiale monouso biodegradabile come test per verificare sia la validità come contenitore per la crescita del materiale vegetale, sia per studiare le caratteristiche strutturali e tecniche nel momento dell'inserimento del substrato agarizzato ad elevate temperature.

La prova è stata svolta utilizzando espianti di *Zantheschia aethiopica* allevati su terreno di coltura composto da sali e vitamine MS addizionato con 3 mg/l di BA e 8 g/l di agar; il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 120 °C ed 1 atm di pressione per 20

minuti in una beuta di vetro borosilicato. È stata valutata, quindi, la curva di raffreddamento del terreno che è stato versato nei contenitori sterili monouso biodegradabili di acido polilattico derivato dal mais che mantiene caratteristiche di trasparenza (Ditta Amprica-Sirap-Group) a diverse temperature (da 45 a 90 °C). Sono state effettuate delle valutazioni visive sulla struttura dei contenitori a seconda della temperatura del terreno.

Si è verificato che sino a 65 °C è possibile riempire i contenitori senza che si deformino e perdano caratteristiche tecniche e di sterilità per i successivi 30 giorni di allevamento del materiale vegetale. Con temperature superiori si hanno danni strutturali che impediscono una corretta coltivazione *in vitro*. Le prove di crescita del materiale micropropagato in questi contenitori hanno dimostrato una conformità con i controlli effettuati nei vasi di vetro borosilicato, sia dal punto di vista qualitativo sia moltiplicativo. È stata inoltre verificata la buona risposta della radicazione degli espianti di *Zantheschia* in questi contenitori, permettendo quindi un comodo trasferimento del materiale in serra di ambientamento. I contenitori sono stati utilizzati per altre specie e per altre fasi di crescita (germinazione di semi *in vitro*) e si sono dimostrati affidabili, leggeri e di facile utilizzo. Sono stati altresì usati per lo stoccaggio di materiale vegetale in slow growth garantendo buone percentuali di asepsi fino a 3 mesi.

## Impiego di antibiotici nelle biotecnologie vegetali

**Frank Kors**

*Duchefa Biochemie, Haarlem (Olanda)*

Several antibiotics are frequently used in Plant Biotechnology to eliminate endogenous infections in plant tissue culture, as well as to eliminate *Agrobacterium* after transfection and selection of transgenic plants. A group of very successfully applied antibiotics in Plant Tissue Culture to eliminate bacteria are “Bacterial Cell Wall Inhibiting antibiotics”, such as Carbenicillin, Cefotaxim, Vancomycin and Ticarcillin/Clavulanic acid.

The bacterial cell wall is a three-dimensional network of linear polymers cross linked up with peptide bonds. The cell wall provides mechanical strength to the bacterial cell membrane to protect it against rupturing by an osmotic shock in the hypotonic plant culture medium.

The main sites of action of Cell Wall Inhibiting antibiotics are enzymes and molecules playing a vital role in the synthesis of the bacterial cell wall. By targeting these molecules and enzymes, the production of the bacterial cell wall is effectively blocked.

Bacteria can be divided in gram positive bacteria, like *Bacillus* species, and gram negative types, like *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* and *Agrobacterium* species.

To eliminate bacteria in plant tissue culture, the most used Bacterial Cell Wall inhibiting antibiotics

are Cefotaxime and Vancomycin. Cefotaxim very efficiently kills gram negative bacteria by inhibiting transeptidase enzymes. Transseptidase plays a major role in crosslinking the linear polymers present in the bacterial cell wall. Vancomycin is very effective against gram positive bacteria. Its antimicrobial activity is caused by binding to the individual building blocks that finally form the linear polymers. As a result, the enzyme peptidoglycan synthetase cannot link anymore to its substrate binding site, present at the building blocks. This blockade finally results in a halt of the synthesis of the bacterial cell wall. Above mentioned targeted enzymes and building blocks are not present in plant cells being the reason why Cell Wall Inhibiting antibiotics are not toxic to plant cells.

By of the production of beta-lactamase, bacteria can become resistant against Cell Wall inhibiting antibiotics. Gram negative bacteria have the extra defence of an outer membrane, which is difficult to pass for several antibiotics. Structure, size and charge of the antibioticum play an important role to inactivate these bacterial defence systems. Especially in the case of *Agrobacterium* species, several options, such as beta-lactamase inhibitors as present in the combination of Ticarcillin/Clavulanic acid, are available for sufficient elimination of these bacteria.

## Influenza di substrati solidi e liquidi sulla proliferazione *in vitro* di *Arundo donax* L.

Valeria Cavallaro<sup>1</sup>, Simona Tringali<sup>1</sup>, Cristina Patanè<sup>1</sup> e Salvatore Luciano Cosentino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CNR-ISAFO, Istituto per i sistemi agricoli e forestali del Mediterraneo, UOS di Catania

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania

La canna comune (*Arundo donax* L.) è considerata una delle più promettenti specie da bioenergia nelle regioni dell'Europa meridionale, grazie alla sua capacità di assicurare alte produzioni di biomassa e di sopravvivere per lunghi periodi in condizioni estreme di contenuto idrico del terreno.

La moltiplicazione di questa specie è al momento attuale, esclusivamente vegetativa attraverso porzioni di rizoma o di culmo. La coltura *in vitro* potrebbe consentire il superamento di taluni inconvenienti legati a questo tipo di propagazione (onerosità delle operazioni di prelievo degli organi vegetativi e d'impianto, ridotto numero di espunti per pianta, difformità d'insediamento). Per questo motivo nell'ambito del progetto 'Filiera Agroenergetiche nel Sud Italia' (FAESI) del MIPAAF, è stata condotta una ricerca volta a valutare l'influenza sul tasso di proliferazione *in vitro* di *A. donax*, di un mezzo liquido a immersione temporanea (RITA<sup>®</sup>) con 10 minuti di aerazione ogni 4 ore e di uno solidificato con gelrite (Duchefa, 2,5 g l<sup>-1</sup>) a confronto con un substrato gelificato con agar (Lickson, 7,0 g l<sup>-1</sup>).

Il clone di *A. donax* utilizzato per questa prova, Fondachello, appartiene alla collezione del DISPA dell'Università agli Studi di Catania. Per iniziare la coltivazione *in vitro*, nodi con una gemma dormiente situati nella parte mediana dello stelo, sono stati sterilizzati e posti nel substrato d'inizializzazione della coltura secondo quanto descritto da Cavallaro e coll. (2011). Dopo 20 giorni, i germogli sviluppati sono

stati accuratamente separati dal nodo e trasferiti nei substrati di moltiplicazione allo studio. La soluzione nutritiva base utilizzata comprendeva: macro e microelementi di Murashige e Skoog (1962), vitamine di Morel, 100 mg l<sup>-1</sup> di mioinositolo, 3 mg l<sup>-1</sup> di 6-benzylaminopurina (BA), 1 mg l<sup>-1</sup> di acido indole-3-acetico (IAA), 0,05 mg l<sup>-1</sup> di acido gibberellico (GA<sub>3</sub>), 30 g l<sup>-1</sup> di saccarosio.

Il numero di germogli differenziati sul substrato gelificato con gelrite<sup>®</sup> (6,1 germogli per espunto) è risultato circa doppio rispetto a quello differenziato su agar (3,3 germogli per espunto) e su substrato liquido a immersione temporanea (3,6 germogli per espunto). Il peso fresco dei germogli secondari in quest'ultimo substrato è stato significativamente più alto (0,23 g per germoglio) rispetto a quello registrato negli altri due (0,16 e 0,12 g per germoglio rispettivamente in gelrite e agar). La coltivazione su mezzo liquido a immersione temporanea inoltre, ha permesso l'utilizzo dello stesso substrato per tre cicli successivi di moltiplicazione senza significative diminuzioni del numero di germogli differenziati.

La coltura *in vitro* di *A. donax* su mezzo liquido a immersione temporanea o su mezzo solidificato con gelrite, può garantire pertanto un significativo aumento dell'efficienza del processo di micropropagazione rispetto alla gelificazione con agar, permettendo un miglior utilizzo delle sostanze nutritive nel primo caso e aumentando il tasso di proliferazione dei germogli nel secondo.

## Ambientamento *ex vitro* sotto reti fotoselettive

Andrea Vitale<sup>1</sup>, Michele Bravetti<sup>2</sup>, Giuliano Dradi<sup>1</sup>, Romano Roncasaglia<sup>1</sup>, Fabio Mainardi<sup>2</sup>, Stefano Vocca<sup>3</sup> e Davide Neri<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Vivai Battistini f.lli, Martorano di Cesena (FC)*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche*

<sup>3</sup> *Agritenax Srl, Eboli (SA)*

Le reti foto selettive modificano l'intensità e lo spettro del flusso luminoso accentuando l'incidenza percentuale nella luce trasmessa di alcune bande del visibile, da cui dipende il loro colore (rosso, giallo, blu nella presente prova), oppure incrementano il quantitativo di luce diffusa senza cambiare lo spettro (rete perla). Spettri luminosi diversi possono svolgere un ruolo importante sulla fisiologia della pianta agendo direttamente sulla fotosintesi oppure sui processi fotomorfogenici (distensione degli internodi, ramificazione).

Per le prove di ambientamento sono state utilizzate plantule radicate provenienti da colture in vitro di GISELA 5<sup>®</sup> e COLT, varietà con necessità agronomiche e ambientali molto diverse (più debole ed esigente in termini di fertilità e di regime idrico il primo, più vigoroso e rustico il secondo) ma entrambe apprezzate a livello commerciale. Le plantule all'uscita dal vitro sono state trapiantate su substrato GEOTEC composto da torba baltica, cocco fine (20%) e perlite (15%) in contenitori da 60 fori, posti all'interno di un tunnel basso di polietilene entro una serra in policarbonato di metile. Sopra il tunnel è stata collocata una rete Iridium<sup>®</sup> (AGRITENAX Srl, Eboli, SA) in polietilene ad alta densità (HDPE), con maglie di 2,4x4,8 mm, costituita da 4 colori - rosso, giallo, blu e perla - in successione che assicuravano ciascuno la copertura di un'area pari a 10 m<sup>2</sup>. E' stata prevista un'area di controllo di pari dimensione, priva di rete.

I parametri considerati sono stati quelli di interesse vivaistico: attecchimento, uniformità, calibro, altezza

internodi, numero di foglie, area fogliare, peso fresco e peso secco delle radici e della parte aerea. I prelievi sono stati effettuati in entrambe le colture dopo 25 giorni di ambientamento nei periodi di fine primavera (Aprile-Maggio) e di piena estate (Luglio-Agosto). Le prove hanno evidenziato una interazione fra le reti fotoselettive e la varietà ambientata, Infatti i risultati migliori su GISELA 5<sup>®</sup> non sono sempre coincisi con quelli ottenuti su COLT. La rete gialla ha avuto generalmente una influenza positiva sullo sviluppo epigeico, soprattutto su GISELA 5<sup>®</sup>, dove il peso fresco e il peso secco sono stati superiori a quanto rilevato sotto rete rossa e perla. Con queste ultime reti l'accumulo di sostanza secca si è avuta soprattutto nelle radici. L'altezza delle colture è stata maggiore sotto rete gialla per le piante di GISELA 5<sup>®</sup>, mentre per le piante di COLT si è avuto il massimo allungamento sotto rete perla e blu, quest'ultima risultata tra l'altro la migliore, insieme alla rete rossa, nel favorire l'incremento del calibro.

Dalla sperimentazione effettuata sulle reti fotoselettive Iridium<sup>®</sup> è dunque emerso che se si vuole determinare un maggiore ingrossamento del calibro bisogna utilizzare il colore giallo o il rosso nel caso del GISELA 5<sup>®</sup>, il blu o il rosso nel caso del COLT. Lo sviluppo della parte aerea può essere promosso dalla rete gialla su GISELA 5<sup>®</sup>, mentre la rete perla è più attiva su COLT. Infine la radicazione è stata promossa dalla rete perla su GISELA 5<sup>®</sup>, mentre per questo singolo parametro su COLT non sono stati rilevati cambiamenti attribuibili all'utilizzo delle reti fotoselettive.