

## La micropropagazione oggi

La tecnica della micropropagazione o coltura in vitro rappresenta, da più di trent'anni, il metodo di propagazione più efficiente nella produzione di piante in vivaio.

Rispetto ad altre tecniche di propagazione convenzionali, la micropropagazione riesce a produrre in breve tempo un maggior numero di piante, geneticamente uniformi ed esenti da virus. Quando si parla di coltura in vitro si intende la produzione di piante, a partire da piccolissime parti delle medesime, tessuti o cellule allevate in ambiente asettico (provette o altri contenitori), ove si possono controllare sia i fattori ambientali che nutrizionali.

I vantaggi principali della micropropagazione possono essere così riassunti:

- 1) produzione di un gran numero di piante, utilizzando anche solo una pianta madre, con un notevole risparmio nel mantenimento delle stesse;
- 2) garantire l'uniformità genetica delle nuove piante rispetto alla pianta madre;
- 3) ottenimento di un gran numero di piantine in uno spazio ristretto;
- 4) riprodurre piante virus esenti;
- 5) può costituire un utile strumento per la conservazione del germoplasma di una specie, cioè di quei genotipi che per vari motivi non sono più utilizzati, ma depositari di caratteri genetici molto importanti. Invece di essere raccolti in costose collezioni di pieno campo possono essere conservate in vitro ed in uno spazio piccolo;
- 6) possibilità di propagare specie a basso potenziale rizogeno e quindi difficilmente moltiplicabili con le tecniche più tradizionali (talea, propaggine, margotta).

Gli svantaggi derivanti dalla propagazione in vitro sono rappresentati essenzialmente:

- alti costi per le attrezzature richieste
- richiesta di personale qualificato e specializzato vista l'esigenza di lavorare in ambiente asettico e controllato
- rischi di ottenere variazioni genetiche non controllabili nel materiale di propagazione
- diffusione di patogeni che se non sono subito individuati possono causare problemi molto seri

## Fasi della micropropagazione

La tecnica della propagazione in vitro viene effettuata attraverso diversi passaggi consecutivi, con i quali, dal singolo espianto di partenza, vengono prodotte diverse nuove piante. Le fasi della micropropagazione hanno tutte importanza fondamentale per l'ottenimento di piantine adatte alla fase finale di acclimatazione, che rappresenta il passaggio della pianta dall'ambiente in vitro all'ambiente in vivo. Quindi possiamo dire che tutte le fasi sono correlate tra loro ed eventuali errori operativi si ripercuotono sulle successive fasi.

Le diverse fasi in cui si articola la micropropagazione sono :

- 1) reperimento degli espianti;
- 2) sterilizzazione degli espianti;
- 3) impianto di materiale vegetale sterilizzato;
- 4) proliferazione dei germogli;
- 5) allungamento dei germogli;
- 6) radicazione dei germogli;
- 7) acclimatazione delle piante.

Ciascuna fase, ad eccezione di quella di acclimatazione, viene eseguita sotto cappa a flusso laminare di aria sterile per di garantire le condizioni di sterilità.

### 1) Reperimento degli espianti

La base di partenza del processo di micropropagazione è l'espianto, porzione di pianta che può essere rappresentata dalla sola cupoletta meristematica (0.1-0.2 mm) oppure l'apice vegetativo di un germoglio o una gemma dormiente. Solo prelevando il meristema abbiamo delle probabilità di ottenere piantine virus esenti anche partendo da piante madri virosate; meglio ancora se il materiale è stato sottoposto a termoterapia. L'ipotesi più accreditata a riguardo è che il virus all'interno dei centri meristemati non

riesca ad espletare il proprio processo di replicazione.

Gli espianti possono essere prelevati da piante, dette piante madri, allevate in ambiente controllato dal punto di vista igienico-sanitario, oppure gli espianti si possono reperire da talee immerse in contenitori di vetro con acqua e sali minerali mantenute preventivamente in frigo (forzatura delle talee). La scelta dell'espianto è fondamentale per l'ottenimento di piantine sane e vigorose. In generale i tessuti giovani hanno una capacità di accrescimento maggiore rispetto a tessuti più maturi ed adulti. I tipi di espianto possono essere vari: apici vegetativi di germogli apicali o laterali di ramo, porzioni di ramo con diversi nodi meristemi apicali (piccolissime porzioni di apice caulinare costituiti dalla cupola meristemica e pochi primordi fogliari); inoltre segmenti di infiorescenze immature, pezzi di foglia con le nervature, cotiledoni, ipocotili, scaglie di bulbi, dischi di tessuto di bulbo. Più piccolo sarà l'espianto più accurata deve essere la tecnica e la strumentazione con cui si opera, in particolare se si tratta di meristemi apicali si devono utilizzare il microscopio e ricorrere a personale specializzato.

## **2) Sterilizzazione degli espianti**

Una delle caratteristiche principali della micropropagazione è rappresentata dalle condizioni di asepsi in tutte le fasi di coltura in cui si opera. A tale scopo prima di procedere alla messa in coltura degli espianti, è necessario sottoporre il materiale vegetale ad un' accurata fase di sterilizzazione, poiché gli inquinanti eventualmente presenti troverebbero nei substrati di crescita le condizioni ottimali al loro sviluppo. Per disinfettare gli espianti sono utilizzati diversi principi attivi, la scelta di uno o l'altro dipende dal tipo di espianto (erbaceo o legnoso), dalle condizioni di allevamento della pianta madre e lo stato fitosanitario. Tra i principali principi attivi utilizzati abbiamo l'ipoclorito di sodio (NaClO), il cloruro di mercurio (HgCl<sub>2</sub>), etanolo (EtOH). L'efficacia di un principio attivo dipende dalla sua concentrazione e dal tempo di impiego. Le condizioni di impiego dipendono anche dal tipo di espianto utilizzato e dalla fitotossicità della soluzione. Maggiore è la durata migliore sarà la sterilizzazione, tuttavia tempi di impiego troppo lunghi possono causare danni ai tessuti. L'eliminazione di microorganismi fungini o batterici in coltura, tuttavia, non sempre avviene in maniera ottimale, attraverso questi trattamenti di superficie. Infatti eventuali endofiti possono rimanere latenti per molte sub-colture manifestandosi solo in seguito, spesso in concomitanza con variazioni termiche (stoccaggio in frigo). Per ridurre il potenziale inquinamento da funghi, virus e batteri, è necessaria una tecnica colturale appropriata delle piante madri (farle vegetare in ambiente controllato, effettuare trattamenti fungicidi preventivi). In generale le piante madri devono essere sane e con buon vigore vegetativo.

In una normale procedura di sterilizzazione di apici vegetativi, questi vengono previamente immersi in alcool alimentare al 75-80% per una sterilizzazione preliminare.

Successivamente gli apici verranno trattati con NaClO 5-10% per 15'-30', poi il materiale viene lavato con acqua sterile per eliminare tutte le tracce dei sterilizzanti usati che potrebbero avere un'effetto fitotossico.

I contenitori di vetro, destinati all'inoculo del materiale trattato, devono essere sterilizzati in autoclave (pentola a pressione) insieme al substrato ad una temperatura di 120 °C per un tempo di 20 minuti. Nonostante tutte le attenzioni, comunque, la presenza di patogeni non può essere esclusa totalmente. In particolare la presenza di batteri spesso quiescenti si può notare dopo un po' di tempo che la cultura è già in vitro. Gli espianti che nei giorni successivi al trattamento risulteranno contaminati con funghi o batteri saranno eliminati mentre gli altri saranno trasferiti su mezzo fresco e daranno inizio al processo di propagazione in vitro.

La presenza o meno di agenti patogeni si rileva attraverso l'osservazione del substrato che si presenta opaco ed in superficie si possono notare spesso i miceli già formati di funghi o colonie batteriche che assumono differenti colorazioni.

## **3) Impianto del materiale vegetale sterilizzato.**

Completata la sterilizzazione, tutte le operazioni successive dovranno essere effettuate sotto cappa a flusso laminare, dispositivo che filtra l'aria due volte e la rimanda verso il piano dell'operatore. Gli espianti sterilizzati verranno posti all'interno di tubi di coltura in vetro, singolarmente ed in condizioni di asepsi, su substrato di crescita. Questa fase ha una durata di 15-30 giorni, successivamente le colture che non hanno manifestato segni di inquinamento verranno sottoposte alla successiva fase di moltiplicazione. I germogli, quindi, verranno posti in camera di crescita ad un'intensità luminosa di 20 μ

molm-2s-1, fotoperiodo di 16 ore di luce su 24 e una temperatura costante di 21-25°C

#### **4) Proliferazione degli espianti.**

Lo scopo di questa fase è quello di aumentare considerevolmente il numero dei germogli attraverso diverse subculture la cui durata dipende dalla specie in esame ma che generalmente prevedono trasferimenti su substrati di crescita freschi con intervalli di 15-30 giorni. In questa fase i germogli vengono suddivisi ed allevati in contenitori da 500 ml di volume (vasi di coltura) nei quali vengono collocati un numero variabile di germogli provenienti dalla fase di impianto. Questa fase porta alla formazione di nuovi germogli in maniera esponenziale che si sviluppano dalle gemme ascellari. Importante in questa fase è la frequenza con cui si rinnova il substrato ed il taglio alla base del germoglio in maniera da massimizzare l'assorbimento dei nutrienti evitando di fare invecchiare i germogli e limitarne la proliferazione. In base al tipo di specie cambia la tecnica con la quale i germogli vengono trasferiti sul nuovo substrato, ed il tasso di proliferazione cioè il numero di germogli che in un determinato periodo di tempo si formano da un germoglio originario.

In generale la fase di moltiplicazione è strettamente correlata alla concentrazione di citochinina nel substrato di crescita, che deve essere elevata allo scopo di favorire la formazione e lo sviluppo di germogli ascellari, senza più compromettere la qualità dei germogli stessi.

#### **5) Allungamento dei germogli.**

È una fase di preparazione dei germogli alla radicazione. In questa fase i germogli vengono trasferiti su substrato di crescita in cui la concentrazione di citochinina viene considerevolmente ridotta per favorire la distensione cellulare e quindi l'allungamento dell'asse dei germogli formati durante lo stadio di moltiplicazione.

Lo scopo è quello di ottenere materiale omogeneo e facilmente manipolabile. La riduzione di citochinina, in alcune specie, può favorire inoltre l'induzione alla radicazione. La fase di allungamento, pur non essendo indispensabile, trova una costante applicazione in molte specie arboree.

#### **6) Radicazione degli espianti.**

La fase di radicazione è l'ultima fase che precede l'acclimatazione delle plantule all'ambiente in vivo. In apposito substrato di crescita, in cui l'ormone principale è l'auxina, i singoli germogli, di lunghezza di circa 15 mm, saranno sottoposti ad un periodo in cui dovranno differenziare radici ed allungarsi. Per favorire la produzione di radici il bilancio ormonale tende a favorire la presenza di auxina (ormone rizogeno) e sfavorire la citochinina, che viene spesso eliminata del tutto. Inoltre anche la componente di nutrienti sarà meno ricca in sali minerali e carboidrati. In *Cryptanthus* (*bromelia* spp.), *Philodendron* (Debergh and Maene, 1981) e *Asparagus* (Chin, 1982) si è potuto notare come la presenza di citochinina inibiva la radicazione ed era necessario un passaggio su mezzo di coltura senza ormone.

La formazione di radici è strettamente dipendente dalla composizione del substrato. Driver e Suttle nel 1987 rilevarono come la bassa concentrazione di saccarosio in alcune specie favoriva la radicazione. Sempre Driver e Suttle nel 1987 hanno notato come l'aumento di saccarosio nel mezzo di crescita, per alcune specie favoriva la formazione di lignina e quindi il processo di radicazione.

La radicazione può essere stimolata anche dall'azione sinergica di più elementi come ad esempio la vitamina D con l'auxina. (Pythoud e Buchala, 1989). Tiburio et al, nel 1989 hanno osservato come l'aumento di putrescina nei germogli abbinato ad un abbassamento di pH nel mezzo di crescita favoriva il differenziamento di radici.

In *Malus domestica* la presenza di antiossidanti nel mezzo di crescita, se da un lato favoriva il differenziamento e l'allungamento delle radici, dall'altro inibiva la fase di induzione. (Standardi e Romani, 1990).

Anche il tipo di auxina utilizzata gioca un ruolo fondamentale in questa fase: IBA in *Castanea sativa* dà risultati migliori rispetto ad NAA, (Vieitez e Vieitez, 1983). In *Malus pumila* la presenza di fluoroglucinololo ha mostrato un effetto positivo sul processo di differenziamento radicale (Zimmermann 1984, Webster e Jones 1989). Interessante è stato l'esperimento effettuato da Rugini e Fedeli su olivo, nel 1990. Si è rilevato come bagnando i germogli di olivo in una soluzione con IBA (100-200 mg/l) per 10-20 secondi e poi collocando gli stessi su substrato senza ormone, la radicazione veniva stimolata. Sempre su olivo (Rugini et al nel 1997) hanno notato che abbinando la putrescina alla soluzione con

auxina, la radicazione aumentava sia come numero di germogli radicati e sia come numero di radici per germoglio. Lo stesso Rugini (1993), consapevole del fatto che il buio ha un effetto stimolante sulla radicazione, evidenziava come l'eziolatura della parte basale del germoglio dava gli stessi risultati del buio, ma con il vantaggio che la parte epigea non subiva alterazione del fotoperiodo.

I propaguli verranno selezionati, scartando i germogli anormali e poco sviluppati.

Le radici neo formate non hanno capacità di assorbimento attivo, ma da queste, in fase di acclimatazione, si formeranno nuove radici funzionali. Dopo un tempo variabile da 2-4 settimane di coltura su substrato di radicazione, i germogli differenziano le radici e potranno essere trasferiti alla successiva fase di acclimatazione.

## **7) Acclimatazione.**

La fase di acclimatazione è sicuramente la fase più delicata per una plantula neoformata in vitro. L'elevata umidità relativa, la temperatura costante e la bassa intensità luminosa presente nei vasi di coltura, determinano sulle piantine la comparsa di alterazioni anatomiche, morfologiche e funzionali tali da comprometterne la sopravvivenza in condizioni naturali. In particolare, la mancanza di un efficiente controllo della perdita di acqua provoca una repentina disidratazione e il disseccamento delle piante al momento del trasferimento dal vaso di coltura all'ambiente esterno. Il meccanismo di chiusura stomatica, infatti, è pressoché nulla, in più le radici neo formate non hanno ancora sufficiente capacità di assorbimento dell'acqua in modo da compensare la domanda traspirativa della plantula. In questo il rischio di stress idrico è elevato. Le foglie formate in vitro presentano un mesofillo con numerosi spazi intercellulari, il tessuto a palizzata è costituito da uno strato di cellule di forma arrotondata e poco compatte.

I cloroplasti sono appiattiti e non presentano la struttura a grana né il caratteristico stroma lamellare. Si può dedurre che la mancanza di organizzazione del cloroplasto, si ripercuota sulla normale attività fotosintetica e quindi sull'attività autotrofa della plantula, abituata ad una nutrizione eterotrofa attraverso i carboidrati somministrati col substrato di crescita. Gli stomi si presentano circolari con le cellule di guardia incapaci di regolare l'attività traspiratoria.

Le fasi più critiche dell'acclimatazione sono essenzialmente due:

- a) fase di attecchimento al nuovo substrato;
- b) fase di ambientamento alle condizioni ambientali esterne.

Nella prima fase gioca un ruolo importante la formazione di nuove radici funzionali in grado di sostenere la domanda evapotraspirativa della plantula. Nella seconda fase, attraverso una graduale diminuzione dell'umidità sarà importante per cercare di reagire ai diversi stress a cui sarà sottoposta, in particolar modo allo stress idrico, attraverso una modificazione anatomica e fisiologica delle proprie attività di crescita che le condizioni microambientali del contenitore in vitro hanno modificato.

L'esecuzione di una efficace fase di acclimatazione richiede, perciò, la presenza di reti ombreggianti, coperture in plastica e sistemi automatici di nebulizzazione attraverso i quali sia possibile modificare le condizioni ambientali (luce, temperatura e umidità relativa).

## **Il substrato di crescita.**

La preparazione del substrato di crescita riveste un'importanza fondamentale in ogni fase in vitro del ciclo di propagazione. Per ogni specie e per ogni fase della coltura in vitro, infatti, vi è uno specifico substrato. La scelta degli elementi che devono far parte del substrato deve essere accurata sia nel tipo che nella concentrazione. Per le specie già conosciute esistono delle formulazioni che portano il nome dei loro scopritori, il più noto dei quali è il Murashige & Skoog (1962) (M&S), mentre per le nuove specie che devono essere micropropagate, si deve procedere empiricamente e mettere a punto un substrato adatto.

Essenzialmente in un substrato di crescita bisogna considerare:

- 1) la componente minerale;
- 2) la componente organica;

### **1) La componente minerale**

La componente minerale è costituita da:

- **macroelementi:** rappresentano i principali elementi indispensabili per la crescita delle piante e sono azoto, fosforo, potassio, calcio, magnesio, e zolfo. Le formulazioni con cui si possono utilizzare e le concentrazioni variano tra i vari substrati e dipendono dalla specie utilizzata.
- **microelementi:** sono presenti nei substrati in piccole quantità, sono metalli, e hanno notevole importanza poiché svolgono un ruolo essenziale nei vari processi metabolici e fisiologici della pianta. I microelementi principali utilizzati per la micropropagazione sono ferro manganese, zinco, boro, rame, cobalto e molibdeno . Il ferro viene somministrato in forma di chelato (FeEDTA).

## 2) La componente organica.

La componente organica è rappresentata essenzialmente da:

- 1) carboidrati;
- 2) vitamine;
- 3) regolatori di crescita;
- 4) agar

1) I **carboidrati:** bisogna considerare che nell'ambiente in vitro i germogli non riescono ad espletare la normale attività di fotosintesi sia perché gli scambi gassosi sono ridotti per la presenza del film plastico (tappo traspirante) che riveste il contenitore, quindi non riescono ad avere la giusta quantità di CO<sub>2</sub>, sia perché l'intensità luminosa della camera di crescita è molto bassa. Di conseguenza per ovviare ad una insufficiente attività fotosintetica, si rende indispensabile la aggiunta al substrato di crescita del saccarosio, come sorgente energetica, in concentrazioni che oscillano intorno al 2-4%. L' elevata presenza di zucchero riveste inoltre una notevole importanza anche nella regolazione del potenziale osmotico del mezzo di coltura, condizionando l'assimilazione dell'acqua e degli elementi nutritivi ed influenzando indirettamente la capacità di crescita dei tessuti.

La presenza di zucchero nel mezzo di coltura, può essere rischioso da un punto di vista fitosanitario, creando un ambiente adatto per lo sviluppo di funghi e batteri. Oltre al saccarosio si possono somministrare altri zuccheri semplici come glucosio, fruttosio e maltosio.

2) Le **vitamine:** svolgono, quando presenti, una funzione di cofattore della crescita entrando a far parte di diverse attività cellulari. Le più utilizzate sono tiamina (0,1-0,5 mg/l), mio-inositolo e biotina (0,1mg/l), acido nicotinico e piridossina

3) I **regolatori della crescita:** la presenza dei regolatori della crescita è il fattore che caratterizza la diverse fasi del ciclo di propagazione. Sebbene nelle piante gli ormoni non abbiano un'azione specifica, considerato che uno stesso effetto potrebbe essere stimolato da ormoni diversi, in alcune fasi la presenza di alcuni di essi influisce in maniera marcata sul tipo di risposta dei germogli. Nella micropropagazione gli ormoni più utilizzati sono:

- auxina
- citochinina
- gibberellina .

Oltre agli effetti prodotti dalla concentrazione dei singoli ormoni bisogna considerare il bilancio ormonale, cioè il rapporto tra le concentrazioni dei vari ormoni che in base alla fase in cui si opera, deve essere sbilanciato verso un tipo di ormone rispetto ad un altro, in relazione alle risposte che si desiderano. La concentrazione e le combinazioni in cui vengono utilizzati variano notevolmente in funzione della specie vegetale.

4) L'**agar:** un'altra importante componente organica del substarto di coltura è l'agar che conferisce allo stesso una consistenza gelatinosa; in questo modo è possibile mantenere i germogli in posizione eretta; questi viene aggiunto al substrato prima dell'autoclavazione a concentrazione di 5-7 g/l. Unico svantaggio è che rallenta la diffusione dei nutrienti all'interno del substrato, quindi i germogli possono assorbire solo gli elementi presenti intorno alla loro base. Per questo motivo il rinnovo del substrato si rende necessario e frequente. Altra componente organica che talvolta viene usata nella micropropagazione è la pectina che spesso è aggiunta al mezzo di coltura per ridurre i fenomeni di

vitrescenza.

## **Gli ormoni come protagonisti delle diverse fasi in vitro della micropropagazione.**

Quando si parla di fitoregolatori o regolatori della crescita o più semplicemente di ormoni, ci riferiamo a sostanze che prodotte in piccole quantità stimolano, a distanza dalla zona di produzione, alcune attività fisiologiche della pianta. Nel campo della coltura in vitro la presenza di fitoregolatori nelle diverse fasi di crescita dei germogli, in particolar modo moltiplicazione e radicazione, spesso si rende necessaria per favorire alcuni processi di differenziamento dei tessuti che normalmente non accadrebbero. Gli ormoni più comunemente utilizzati sono le auxine, le citochinine e le gibberelline. Il loro utilizzo, così come le concentrazioni ed il tipo di formulazione, dipende dalla fase del ciclo in cui si opera e dalla specie trattata.

1) Le **auxine**: i primi effetti riconducibili alle auxine furono rilevati da Darwin nel suo "The power of movement in plants" (1880) in cui sottolineò che l'estremità apicale di una graminacea influenzava il movimento della pianta verso la luce.

Went nel 1928 riconobbe che le sostanze che influenzavano il movimento verso la luce delle piante erano le auxine. Nel 1934 Thimann e Went scoprirono l'effetto dell'auxina sulla radicazione delle talee. Sempre nel 1934 alle auxine fu associata la struttura chimica della acido-3-indolacetico IAA (Kogl et al).

All'IAA sono stati associati nel corso degli anni altri composti come ad esempio: l'aldeide-3-indolacetica, l'acido indol-3-piruvico, l'indol-3-etanolo, tutti questi composti per via enzimatica sono convertiti in IAA. La presenza di auxina libera spesso non è rilevabile perché legata a composti proteolitici (chimotripsina) scoperta da Thimann e Skoog nel 1940-42, oppure forma composti di basso peso molecolare con inositolo ed arabinosio. Ad oggi l'IAA rimane l'unica forma di auxina conosciuta in natura.

Vista la sua semplice struttura e l'interesse per gli effetti indotti nelle piante in particolar modo la distensione e duplicazione cellulare, la radicazione delle talee sono state sintetizzate numerose auxine sintetiche molto utilizzate nei laboratori di ricerca. Tra queste abbiamo l'NAA (acido naftalenacetico), l'IBA (acido indolbutirrico). Nel campo della coltura in vitro sicuramente l'effetto stimolante della radicazione è quello maggiormente ricercato nell'utilizzo di questo tipo di ormone. Questo effetto fu scoperto in seguito ad un biosaggio condotto su steli di pisello eziolati. Bisogna comunque precisare che lo stimolo rizogeno dell'auxina dipende molto dal tipo di specie propagata, dall'età, dal vigore. È stato osservato (Morini e Fiaschi, 2000) che su corbezzolo, arbutus unedo L., utilizzando IBA a concentrazioni variabili 1.0-2.0-3.0-4.0 mg/l, senza sottoporre i germogli ad un periodo di allungamento, la radicazione non dava risultati. Anzi concentrazioni di IBA a 4.0 mg/l causavano la necrosi degli apici vegetativi.

Successivamente sottoponendo i germogli ad un periodo di allungamento di una settimana e ripetendo l'esperimento con le stesse concentrazioni di IBA si vide come la radicazione desse risultati soddisfacenti.

Una probabile spiegazione di questi risultati differenti potrebbe essere dovuta alla presenza di concentrazioni elevate di citochinina assorbita durante la fase di moltiplicazione che, senza successivo periodo di allungamento, avevano un effetto negativo sull'induzione radicale.

Risultati ancora migliori si ebbero abbinando al periodo di allungamento e all'utilizzo di IBA, un periodo di buio. L'efficacia di un trattamento auxinico sulla radicazione dei germogli dipende molto dal tipo di specie e dal tipo di auxina utilizzata. Si è osservato che l'IAA (0.1-1.0 mg/l) è molto efficace su *Prunus cerasifera* (Hammerschlag, 1982), NAA (0.5-1.0 mg/l) funziona su *Salpiglossis* e *Prunus avium* (Snir, 1982).

2) Le **citochinine**: favoriscono la divisione cellulare soprattutto se combinate all'auxina. Skoog per primo nel 1942 ha scoperto l'influenza delle citochinine nel processo di divisione cellulare nella coltura in vitro. Sono utilizzate nella fase di moltiplicazione per l'attività di stimolo della chiusura di gemme ascellari e inibizione della dominanza apicale. Alla classe delle citochinine appartengono la Zeatina e BAP (6-benzilaminopurina), la 2IP e la chinetina.

3) Le **gibberelline**: fra i regolatori di crescita sono le meno usate, sebbene in alcuni casi il loro impiego appaia essenziale. Esse favoriscono l'allungamento degli internodi e possono dare buoni risultati nella fase precedente la radicazione dei germogli. La più utilizzata è la GA3 (acido gibberellico). In generale nella coltura in vitro è il giusto bilanciamento tra citochinina e auxina ad influenzare le fasi di proliferazione e radicazione.

## **Le condizioni ambientali della camera di crescita.**

Oltre ai componenti del substrato di crescita, sono importanti le condizioni ambientali nelle una volta posti nel contenitore in vetro i germogli, devono essere controllati i fattori che determinano l'ambiente di crescita. I contenitori in vetro una volta ricoperti dalla film trasparente sono collocati nella camera di crescita.

All'interno della camera di crescita devono essere create le condizioni ideali per la vita del germoglio in vitro.

I fattori ambientali più importanti che influenzano la vita dei germogli sono:

- 1) Temperatura;
- 2) Umidità relativa;
- 3) Luce.

La temperatura ideale, per le colture in vitro, varia con la specie anche se generalmente si utilizzano temperature costanti di circa 23- 25 °C . A temperature maggiori si ha una maggior accrescimento ma anche problemi di vitescenza.

Inoltre, all'interno l'umidità relativa può raggiungere la saturazione. Questo fenomeno, dovuto al limitato scambio gassoso con l'esterno per la presenza del film plastico che riveste il vaso, comporta una serie di modificazioni fisiologiche ed anatomiche che rendono il germoglio incapace di regolare la traspirazione tramite l'attività stomatica. Per questo si rende necessario il periodo di acclimatazione.

Tuttavia, diminuendo l'umidità relativa si è visto che l'accrescimento dei germogli è consistentemente ridotto.

## **La luce come principale fattore ambientale nella camera di crescita.**

Una trattazione particolare in merito ai fattori ambientali, che influenzano l'attività delle piante allevate in vitro, merita la luce. In vivo ad essa viene riconosciuta una duplice funzione:

- a) **Fonte primaria di energia;**
- b) **Fonte di informazione;**

In vitro, infatti l'attività fotosintetica viene alterata dalle condizioni microclimatiche che si creano nel contenitore di vetro. I ridotti scambi gassosi, e quindi la carenza di CO<sub>2</sub>, dovuti al film trasparente che riveste il vaso e le alterazioni anatomiche e fisiologiche indotte sui germogli da particolari fattori ambientali, non creano le condizioni ottimali per lo svolgimento della normale attività fotosintetica. La fonte di carboidrati per i germogli allevati in vitro deriva, dunque dal substrato, così da considerare le colture eterotrofe e non più autotrofe.

Più che come fonte di energia la luce svolge, per le colture in vitro, una importante funzione di informazione per fenomeni fotomorfogenetici, che si verificano nei diversi stadi della micropropagazione.

I diversi fenomeni fotomorfogenetici dipendono essenzialmente da:

1. fotoperiodo
2. intensità luminosa
3. qualità della luce

### **Il Fotoperiodo.**

Per fotoperiodo si intende il tempo di esposizione alla luce delle piante. In un ambiente come quello della camera di crescita in cui tutti i fattori ambientali sono controllabili, la lunghezza del fotoperiodo risulta fondamentale per le numerose attività dei germogli. Solitamente il fotoperiodo nella camera di crescita è 16 ore di luce e 8 di buio.

I riferimenti bibliografici relativi al rapporto luce buio sono diversi e spesso contrastanti. Tra i primi

studiosi ad osservare gli effetti del fotoperiodo furono Chè e Pool nel 1989, i quali su vite rilevarono che 10 ore di luce rispetto alla luce continua favoriva la moltiplicazione dei germogli. Economou e Read (1986) lavorando su rododendro rilevarono che con 16 ore di luce i germogli erano qualitativamente migliori e più numerosi della luce continua. Wang nel 1992 osservò lo stesso risultato su portinnesto di pero BP10030.

Lo stesso Wang affermò che l'esposizione dei germogli a luce continua, rispetto ad un fotoperiodo di 16 ore, rendeva migliore l'assorbimento dei nutrienti con aumento in peso fresco e peso secco. Tuttavia, notò che la formazione di nuovi germogli era inibita rispetto all'esposizione al buio. Morini et al (1990) osservavano che sui portinnesti di colture arboree GF677 e MRS 2/5, il peso fresco ed il peso secco era migliore con un rapporto luce- buio di 4/2 rispetto al 16/8 classico.

Alcuni studi sono anche stati condotti sull'incidenza del fotoperiodo sulla radicazione. Notoriamente l'esposizione al buio abbinata a trattamenti auxinici favorisce la rizogenesi. Le ipotesi che la luce inibisca la rizogenesi sono numerose ma talvolta contrastanti. Lovell nel 1972 affermò che la rizogenesi dipendeva dalla concentrazione di carboidrati. Considerando lo scarso apporto che la fotosintesi ha sulla produzione di questi composti in vitro, pochè quelli presenti derivano principalmente dal substrato di crescita, questa ipotesi fu abbandonata.

Più probabile è l'ipotesi secondo la quale la luce determina l'ossidazione dell'IAA in presenza di luce e di altri composti fenolici essenziali per la rizogenesi (Eliasson , 1980; Mosella et al, 1980, Druart et al 1982).

### **Intensità luminosa.**

Si intende la quantità di energia luminosa che viene somministrata alla coltura. La radiazione elettromagnetica visibile per l'uomo varia tra 400 nm e 700 nm, mentre la radiazione fotomorfogenicamente attiva varia tra 200 e 800 nm Lercari 1990. L'intensità di luce si misura come quantità di energia radiante, che le colture intercettano ,ovvero il flusso radiante per unità di superficie, che viene definito irradianza e si esprime come  $\mu \text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

In generale maggiore è l'irradianza migliore è lo sviluppo dei germogli, ma oltre una certa quantità di luce fornita, i germogli subiscono un calo della crescita con chiari segni di senescenza e ingiallimento delle foglie.

La soglia limite dipende comunque dal tipo di specie trattata e dallo stadio del ciclo di propagazione. Si suppone che un'irradianza minore si utile nelle fasi di impianto e moltiplicazione, mentre un'irradianza maggiore sia preferibile per la radicazione.

Numerose sono le contraddizioni riguardo la relazione tra intensità luminosa e presenza di IAA nei germogli. Economou e Read osservò che la concentrazione di IAA, in germogli di azalea, aumentava progressivamente passando da  $25 \mu \text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a  $80 \mu \text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Weige et al (1984) riscontrò l'inverso nei germogli di *Chrysanthemum morifolium*.

Secondo Wang (1992) un rapporto cit/aux era sbilanciato a favore delle citochinine diminuiva la dominanza apicale con conseguente schiusura delle gemme ascellari. Infine l'intensità della luce può svolgere un importante effetto sulla acclimatazione delle piantine. Infatti con l'aggiunta di CO<sub>2</sub> nei vasi si migliorerebbe l'attecchimento delle medesime. (Grout e Millian, 1985; Desjardinet al., 1987).

### **Qualità della luce.**

L'effetto della luce sull'accrescimento dei germogli in vitro è uno degli aspetti meno conosciuti ed i riferimenti bibliografici a riguardo sono scarsi. Le cause risiedono probabilmente nel fatto che in passato non era disponibile una strumentazione adeguata per questo tipo di ricerca. Comunque se si considera che per la coltura in vitro, l'aspetto energetico della luce è secondario rispetto all'effetto che ha sulla fotomorfogenesi, si evidenzia quindi l'elevata importanza di questo fattore sui processi di accrescimento delle colture.