

Innovazione nella micropropagazione commerciale: la coltura liquida in immersione temporanea

Carla Benelli, Anna De Carlo, Maurizio Lambardi

Consiglio Nazionale delle Ricerche, IBE-Istituto per la BioEconomia, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze).

Email: carla.benelli@ibe.cnr.it, anna.decarlo@ibe.cnr.it, maurizio.lambardi@ibe.cnr.it

La micropropagazione (propagazione *in vitro*) rappresenta oggi una importante tecnica vivaistica commerciale. Oltre 50 milioni di piante di elevato standard qualitativo sono prodotte annualmente in laboratori commerciali italiani, alcuni di rilevanza internazionale. Ciononostante il sistema deve costantemente aggiornarsi per rispondere alla forte concorrenza proveniente da laboratori collocati in Paesi a più basso costo di manodopera. La coltura liquida in immersione temporanea (TIS, Temporary Immersion System) rappresenta l'evoluzione del tradizionale sistema di coltura in substrato gelificato, proponendosi all'attenzione per i suoi vantaggi in termini di qualità delle colture, costi di produzione più contenuti, limitazione nell'insorgenza di comuni patologie delle piante *in vitro*. È noto che la tecnica di micropropagazione tradizionale richiede un elevato numero di contenitori (in vetro o in plastica), una notevole quantità di substrati gelificati e un frequente trasferimento degli espianti in substrato 'fresco' (in genere, ogni 3-4 settimane), necessario sia per permettere un ricambio dell'atmosfera interna, sia per il parziale esaurimento dei componenti nutritivi del substrato, necessari per la crescita delle plantule. La fase di subcoltura incide consistentemente sui costi di produzione, in particolare per il contributo della voce 'manodopera': infatti, si stima che la preparazione dei substrati e la manipolazione degli espianti per il periodico trasferimento delle colture incidano per un 40-60% sul costo finale della pianta micropropagata.

Il requisito fondamentale della coltura in TIS è di permettere l'applicazione di cicli giornalieri di breve coltura in immersione (cioè, col materiale vegetale immerso sul substrato liquido), alternati a periodi più lunghi di coltura in "asciutto", in genere accompagnati dalla periodica ventilazione dei contenitori. I cicli applicati cambiano da coltura a coltura e devono essere definiti sperimentalmente per ottenere le migliori condizioni di coltura. I bioreattori per coltura in TIS si dividono in sistemi ad un solo contenitore (ad esempio, RITA[®], Plantform, ElecTIS) oppure a due contenitori (fiasche gemelle, SETIS[™]; Fig. 1).

Tra i principali vantaggi della coltura in TIS nel processo di propagazione delle piante si ricordano: (i) l'aumento dell'assorbimento dei nutrienti e dei regolatori della crescita grazie al contatto del substrato liquido con l'intera superficie degli espianti, (ii) l'aerazione, che fornisce un eccellente apporto di ossigeno e impedisce l'accumulo di gas (etilene, CO₂) nei contenitori, con conseguente migliore crescita e qualità delle colture, (iii) il movimento degli espianti all'interno del

bioreattore, che determina una ridotta espressione della dominanza apicale, favorendo la proliferazione delle gemme ascellari, (iv) la significativa riduzione della manodopera dovuta alla minore manipolazione del materiale, v) i tempi più lunghi delle subcolture con minore contaminazione quando la coltura risulta stabilizzata, (vi) la possibilità di avere, in alcune specie, la contemporanea proliferazione e radicazione dei germogli, a tutto vantaggio dell'organizzazione del lavoro in vitro, (vii) la comprovata migliore qualità morfo-anatomica delle plantule in coltura che meglio si predispongono alla successiva fase di acclimatazione in serra.



Fig. 1. Diversi tipi di bioreattori per coltura ad immersione temporanea: a, b) germogli binodali di olivo, cv Canino, in coltura in bioreattore RITA[®], con tempi di immersione di 16 min ogni 16 h (Lambardi *et al.*, 2006); c, d) germogli binodali di olivo, cv Canino, in coltura in bioreattore Plantform[™], con tempi di immersione di 8 min ogni 16 h e ventilazione di 15 min ogni 4 h (Benelli e De Carlo, 2108); e, f) germogli di actinidia, cv Hayward, in coltura in bioreattore SETIS[™], con tempi di immersione di 8 min ogni 16 h.

Frequenza e tempo di immersione

In tutti i sistemi di coltura liquida in TIS, un ruolo fondamentale è ovviamente giocato dalla frequenza dei cicli di immersione e dal tempo di permanenza dei germogli a contatto con il substrato liquido durante ciascuna immersione. Questi parametri sono in grado di influenzare consistentemente i tassi

di proliferazione che si ottengono, il contenimento dell'iperidricità, la percentuale di germogli radicati, i tempi di subcoltura e, in generale, la qualità del materiale prodotto. In tal senso, non si possono dare indicazioni assolute, anche perché i diversi bioreattori danno risposte diversificate, anche quando utilizzati con lo stesso materiale; inoltre, il volume dei contenitori impiegati influisce sulla qualità delle colture. Per chi volesse provare l'applicazione di uno di questi sistemi con una nuova specie o cultivar è consigliabile predisporre una prova preliminare, nella quale comparare frequenze e tempi diversi di immersione. I cicli applicati sono, in genere, costituiti da brevi periodi di immersione (in genere, da un minimo di 2 ad un massimo di 30 minuti), alternati a lunghi periodi di permanenza del materiale vegetale in asciutto (in genere, da 4 a 16 ore). Si riportano di seguito brevi note su tre tipi di bioreattore in TIS, due prodotti industrialmente e un prototipo.

Plantform™

L'efficacia della coltura in TIS in olivo è stata valutata attraverso un confronto tra il bioreattore Plantform™ e la tradizionale coltura semisolida in vaso di vetro (Benelli e De Carlo, 2018). I risultati hanno mostrato che la specie ben si adatta alla crescita in bioreattore (Fig. 2), con tassi di sopravvivenza e qualità dei germogli superiori a quelli ottenuti con la micropropagazione tradizionale. In particolare, la riduzione della concentrazione di zeatina da 10 μM a 5 μM e dei tempi di subcoltura, quindi della manodopera richiesta, possono consentire una riduzione dei costi di produzione finali.

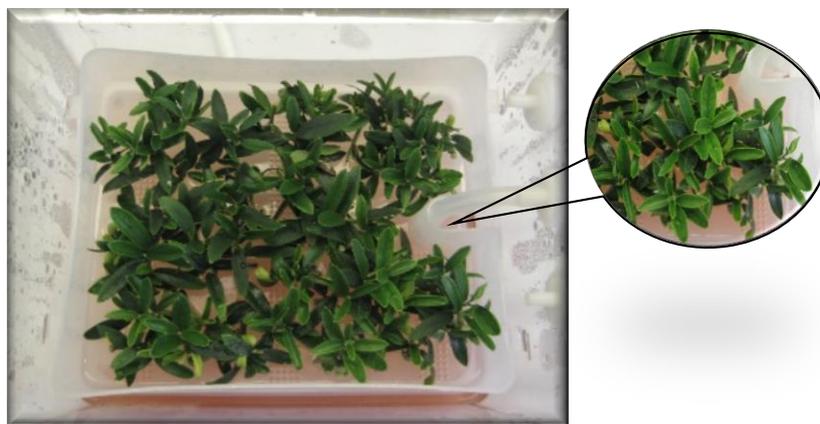


Fig. 2. Germogli di olivo (cv Canino) in bioreattore Planform™ dopo 28 giorni di coltura.

SETIS™

Un bioreattore TIS con notevoli opportunità di applicazione è il SETIS™, per il quale è illustrato lo schema di funzionamento in Fig. 3. Il bioreattore SETIS™ è stato di recente applicato, in via sperimentale, alla micropropagazione del nocciolo (*Corylus avellana*) presso il laboratorio di

micropropagazione dei Battistini vivai di Cesena (Fig. 4), evidenziandone interessanti potenzialità applicative in termini sia di qualità delle colture prodotte con questo sistema, sia di contenimento dei costi di manodopera.

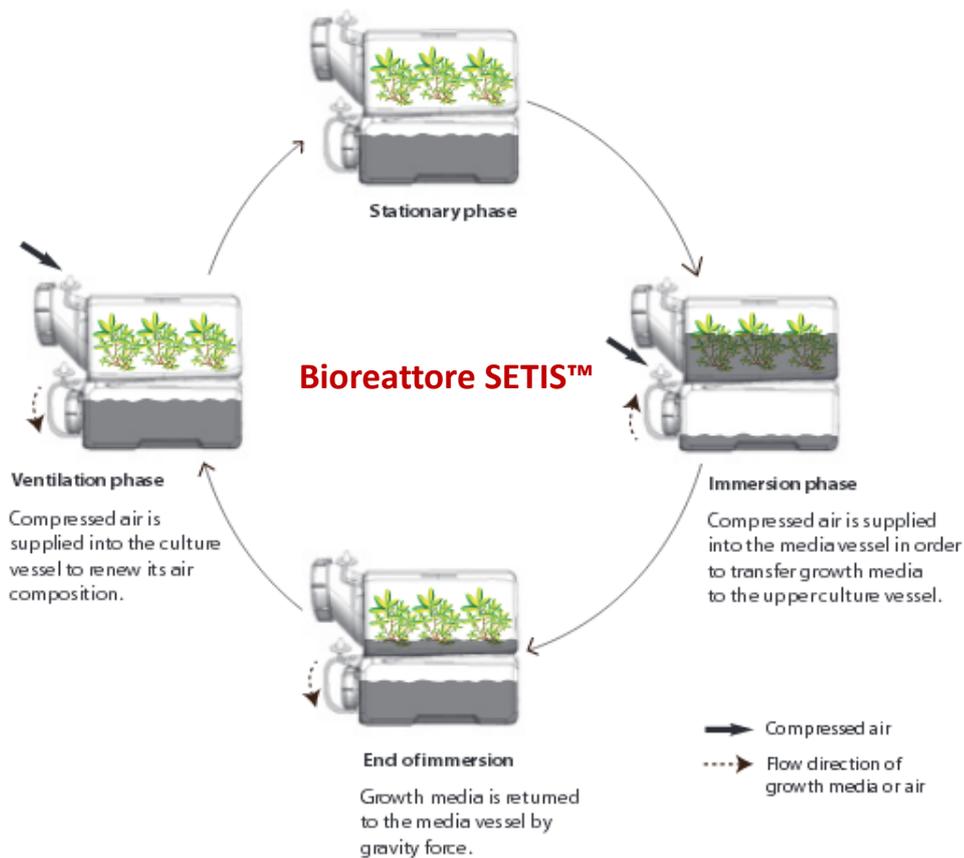


Fig. 3. Il bioreattore SETIS™ è composto da due contenitori sovrapponibili, collegati da tubi di silicone. Durante la fase stazionaria (**Stationary phase**) il substrato liquido permane nel contenitore sottostante e la coltura di germogli nel contenitore in alto; quando una pompa ad aria, collegata ad un timer, entra in funzione spinge il substrato liquido nel contenitore superiore, avviando la fase di immersione del materiale vegetale (**Immersion phase**); trascorso il tempo impostato, la pompa cessa di funzionare e il substrato liquido per caduta torna nel contenitore sottostante (**End of immersion**). E' possibile applicare anche una fase di ventilazione forzata (**Ventilation phase**), indotta da una seconda pompa collegata ad un ulteriore timer. La sterilità all'interno dei contenitori è assicurata da appositi filtri che sono attraversati dall'aria proveniente dalle pompe.



Fig. 4. Batteria di 12 bioreattori SETIS™ per la coltura in TIS di nocciolo (*Corylus avellana*) presso il laboratorio di micropropagazione della Battistini vivai di Cesena (per gentile concessione di Massimiliano Meneghini).

ElecTIS

ElecTIS è una nuova proposta di bioreattore TIS, nato dalla collaborazione di Claudio Depaoli con il CNR-IBE di Sesto Fiorentino (FI). Questo bioreattore consiste in un grande contenitore di plastica (2000 cc), con un coperchio e un cestello che entra nello spazio interno (Figura 5a). Il cestello ha due cilindri (Figura 5b) in cui si inseriscono due pistoni a soffiato attaccati al coperchio. Il cestello viene preparato con la coltura di germogli all'interno e collegato al coperchio, prima di essere inserito nel contenitore (Figura 5c,d). Il coperchio viene quindi collegato ermeticamente al contenitore. La retrazione e l'espansione dei pistoni è consentita da un collegamento con una pompa aspirante e si traduce nel movimento su e giù del cestello. Il flusso d'aria è solo all'interno dei pistoni, mentre l'aria non viene pressata all'interno del contenitore, limitando i rischi di contaminazione che si hanno con i bioreattori ad immissione forzata di aria al loro interno. Il cestello con i germogli viene immerso nel mezzo nutritivo quando i due pistoni sono espansi, mentre è sospeso nel contenitore quando si ritirano. Il ciclo di immersione è controllato da un timer elettronico. Tutte le parti ElecTIS sono realizzate con un materiale in polipropilene trasparente e resistente al calore e possono essere facilmente sterilizzate in autoclave (Capuana *et al.*, 2018).

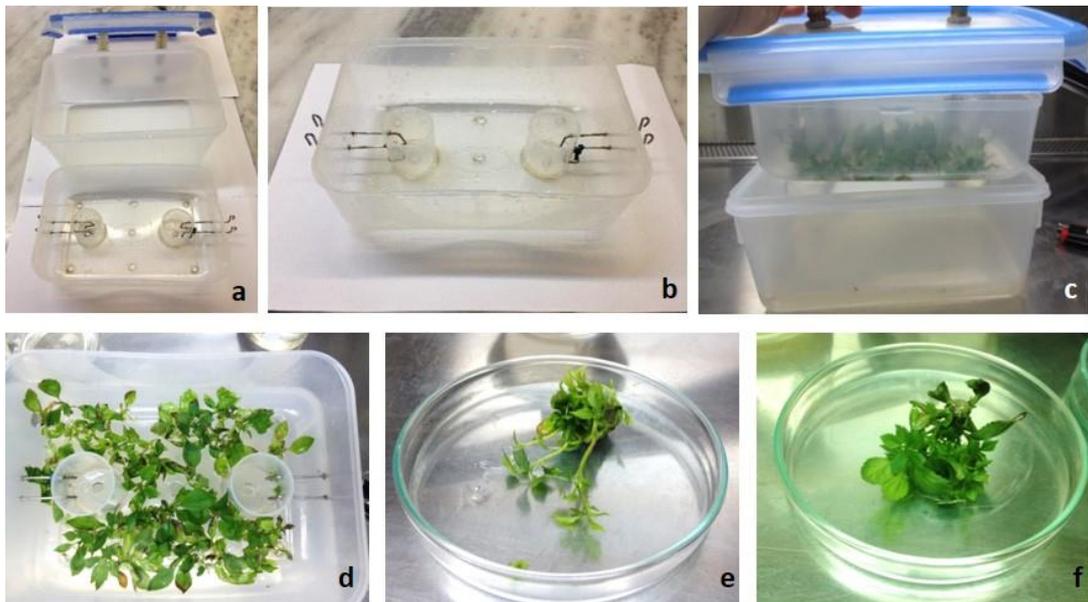


Fig 5. Componenti e assemblaggio del bioreattore ElecTIS. a) i componenti di ElecTIS: coperchio (in alto), scatola (al centro) e cestello (in basso); b) il cestello con i cilindri dove sono allocati i pistoni; c) il cestello con dentro una cultura di germogli di melo (*Malus sylvestris*), prima della chiusura di ElecTIS; d) coltura di *M. sylvestris* con sistema ElecTIS; e) esempio di 'cluster' di germogli cresciuto in mezzo tradizionale gelificato che mostra lunghi germogli e foglie con piccole superfici; f) esempio di 'cluster' di germogli coltivato in ElecTIS che mostra brevi germogli e foglie con superfici più grandi (da Sota *et al.*, 2020).

Letteratura citata

- Benelli C., De Carlo A. (2018) In vitro multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). *3 Biotech* 8(7):317. doi 10.1007/s13205-018-1346-4.
- Capuana M., Depaoli C., Ozudogru A., Lambardi M. (2018) Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore 'ElecTIS'. *Acta Italus Hortus* 21:98-99.
- Lambardi M., Benelli C., Ozden-Tokatli Y., Ozudogru E.A., Gumusel F. (2006). A novel approach to olive micropropagation: the temporary immersion system. Proc. "2nd Int. Seminar OLIVEBIOTEQ 2006", Vol I. Marsala – Mazara del Vallo, Italy, pp. 319-326.
- Sota V., Benelli C., Çuko B., Papakosta E., Depaoli C., Lambardi M., Kongjika E. (2020) Evaluation of ElecTIS bioreactor for micropropagation improvement of *Malus sylvestris* (L.) Mill., an important autochthonous species of Albania. *HORTSCI (in press)*.

Per approfondimenti:

- Carvalho L., Ozudogru E.A., Lambardi M., Paiva L. (2019). Temporary immersion system for micropropagation of tree species: a bibliographic and systematic review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 47(2):269-277. doi: 10.15835/nbha47111305
- Etienne H., Berthouly M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215–31. doi: 10.1023/A:1015668610465
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., Bley T. (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci* 263 14:607-621. doi: 10.1002/elsc.201300166
- Lambardi M. (2012) Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. *Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura* 12:32-38.
- Watt M.P. (2012) The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation *African Journal of Biotechnology* 11(76):14025-14035.