



**PAS\_C050: esercitazioni agrarie**



insegnamento

**Laboratorio di biotecnologie e biologia molecolare applicati alle Scienze Agrarie**

a.a. 2013/2014

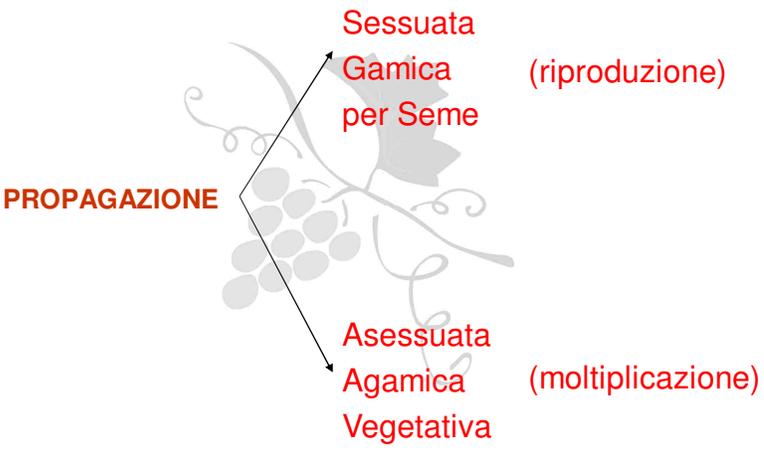
**Colture in vitro e micropropagazione**

docente  
**Claudio D'Onofrio**  
claudio.donofrio@unipi.it

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali  
Università di Pisa

**PROPAGAZIONE (schema generale)**

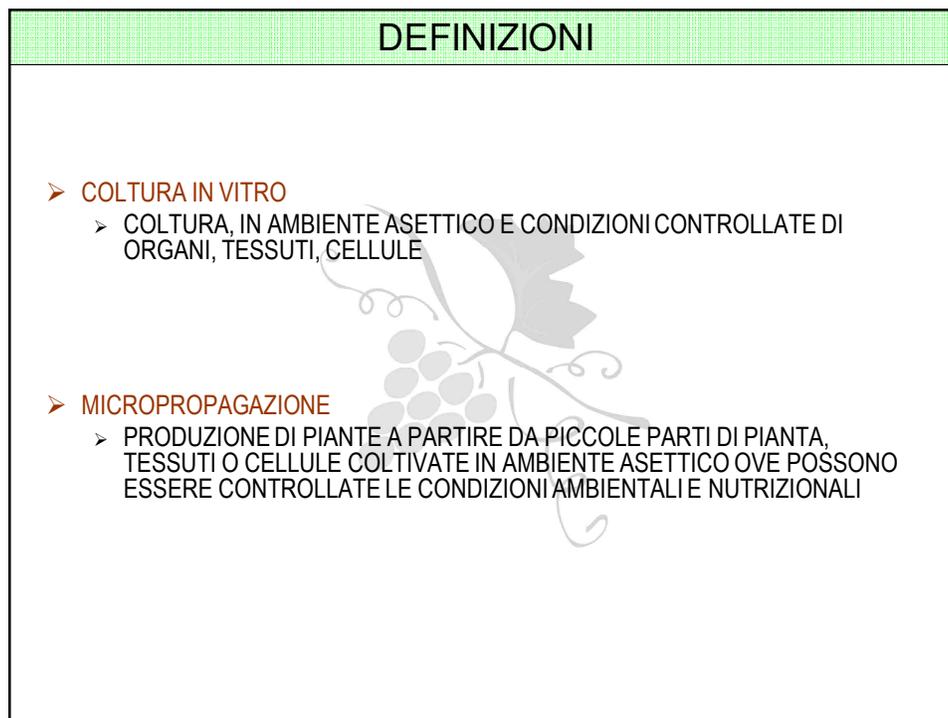
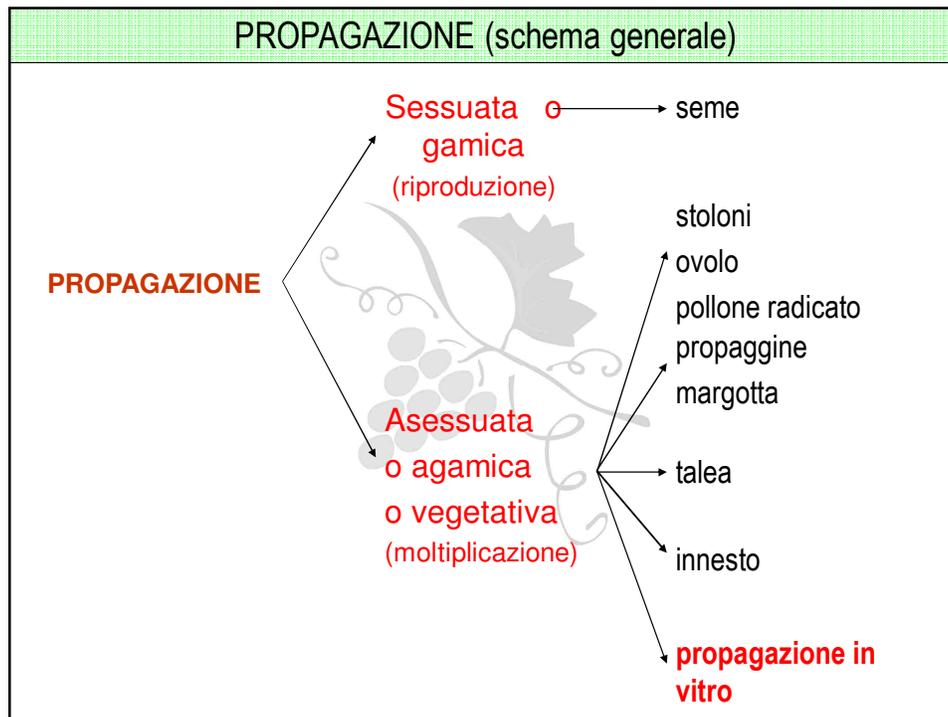
➤ modi in cui le piante possono perpetuarsi nello spazio e nel tempo

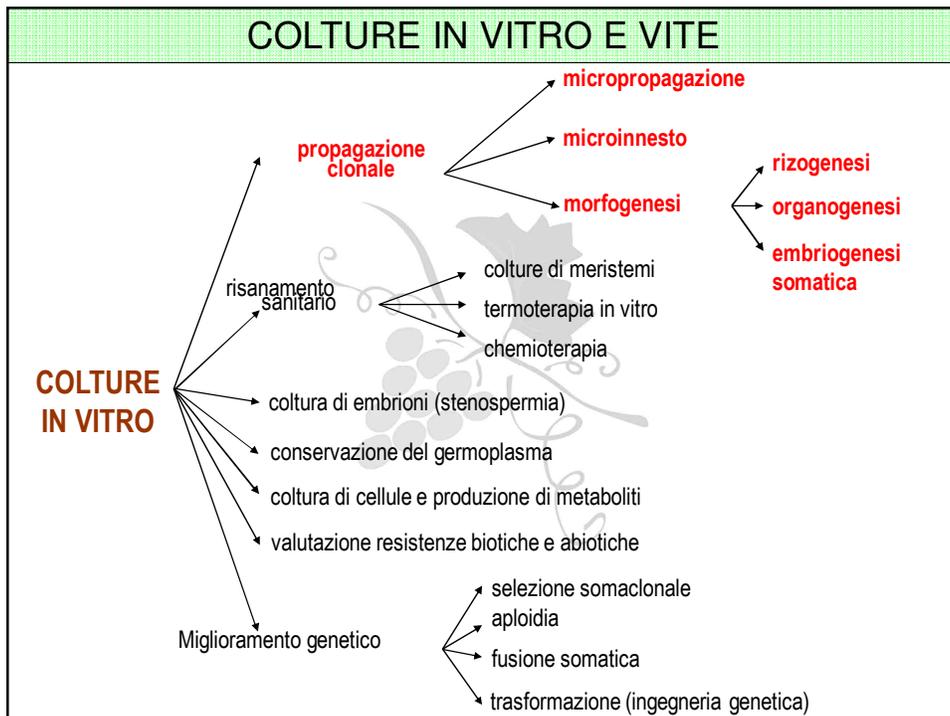
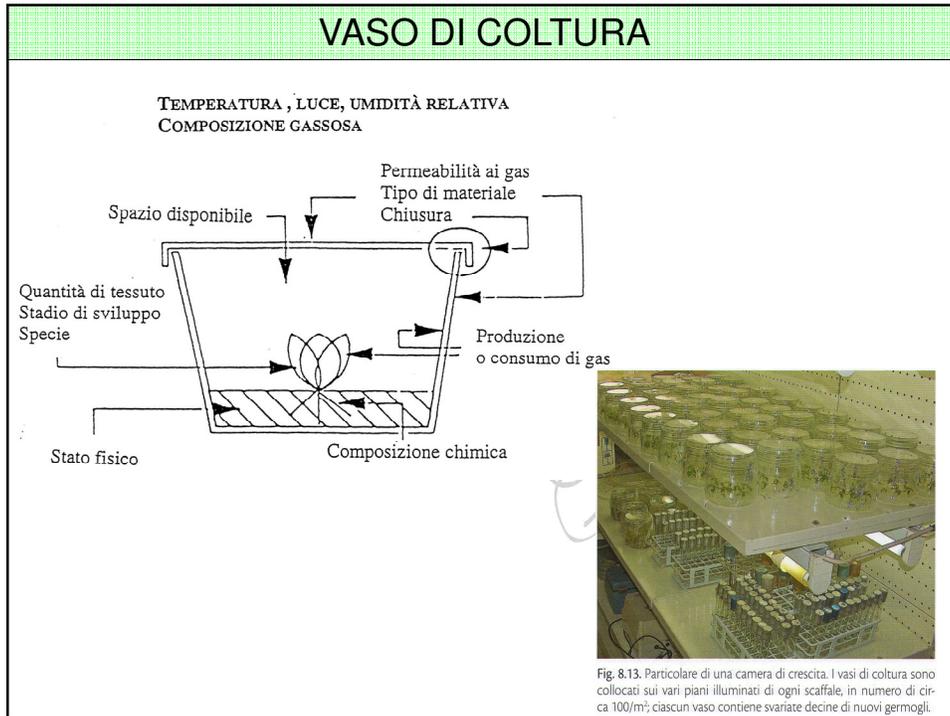


**PROPAGAZIONE**

**Sessuata  
Gamica  
per Seme** (riproduzione)

**A sessuata  
Agamica  
Vegetativa** (moltiplicazione)





## MICROPROPAGAZIONE

### ➤ VANTAGGI

- produzione di un elevato numero di piante in spazi e tempi ridotti partendo da pochi espianti
- condizioni di temperatura e luce controllate e quindi svincolati dall'andamento stagionale
  - massima resa produttiva
  - il materiale permane nelle condizioni sanitarie iniziali
  - programmazione in funzione della richiesta di mercato
- propagazione di piante di difficile radicazione
- facilità di trasporto

### ➤ SVANTAGGI

- aumento dei costi di produzione
- conoscenze specifiche
- manodopera competente
- variabilità somaclonale
- ritorno allo stadio giovanile

## METODI DI PROPAGAZIONE IN VITRO

### ➤ PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI (il sistema più diffuso)

#### ➤ COLTURA DI GERMOGLI

- microgermogli indotti a proliferare (schiusura delle gemme ascellari) per soppressione della dominanza apicale (citochinine)
- i successivi espianti sono i singoli germogli

#### ➤ COLTURA DI SINGOLI NODI

- utilizzata per specie che in vitro hanno una forte dominanza apicale
- i successivi espianti sono microtalee con 1 o 2 gemme

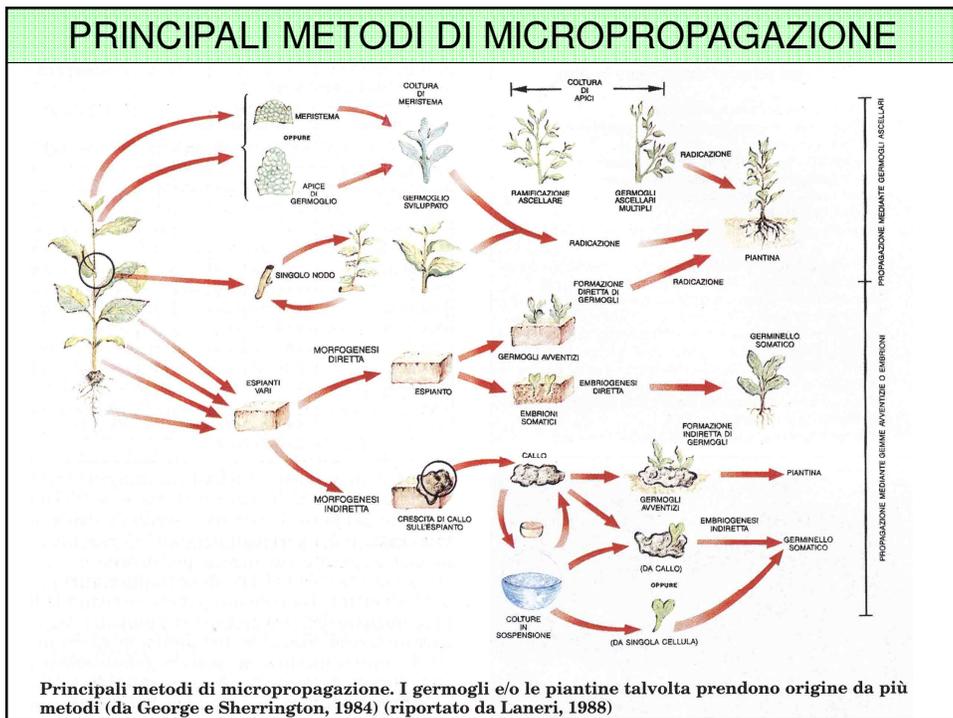
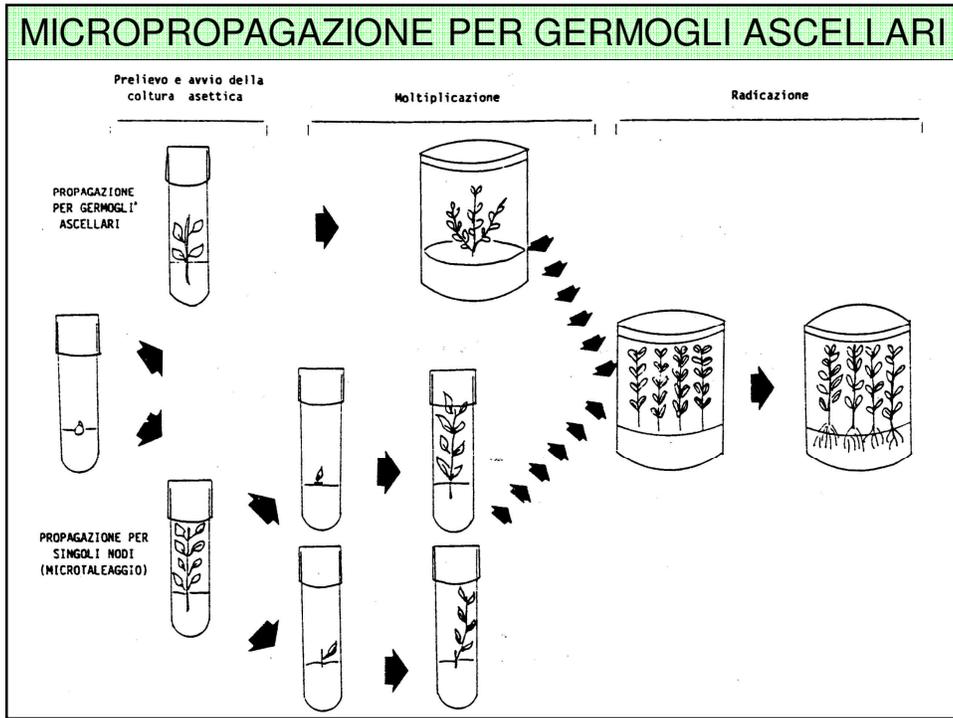
### ➤ PROPAGAZIONE PER GERMOGLI AVVENTIZI E/O EMBRIONI SOMATICI

#### ➤ PROPAGAZIONE PER MORFOGENESI DIRETTA

- germogli (**caulogenesi**) o embrioni somatici (**embriogenesi somatica**) ottenuti direttamente dalle cellule dell'espianto senza la formazione di callo

#### ➤ PROPAGAZIONE PER MORFOGENESI INDIRETTA

- (embriogenesi somatica) ottenuti dalle cellule del callo
- il callo si ottiene con alti livelli di auxina
- dalle sospensioni cellulari avendo una resa in embrioni somatici elevatissima (poinsettia)

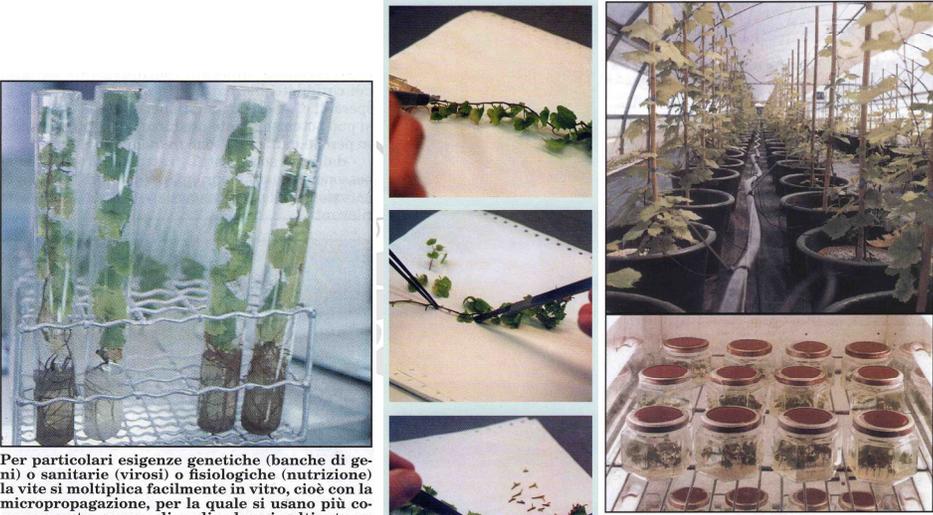


### METODI DI PROPAGAZIONE IN VITRO

- **FORMAZIONE DI ORGANI DI RISERVA**
  - **TUBERI**
    - patata
    - microtuberi
  - **BULLILLI**
    - da germogli, da gemme avventizie o scaglie di bulbo
    - giacinto, amarillis, giglio
  - **PROTOCORMI**
    - per le orchidee
    - protocormi somatici
- **MICROINNESTO**
  - **INNESTO ERBACEO IN VITRO**
    - l'apice della varietà si innesta sul portinnesto coltivato in vitro
    - scarso attecchimento
    - può essere usato per favorire lo sviluppo del meristema nel caso del risanamento



### MICROPROPAGAZIONE DELLA VITE



Per particolari esigenze genetiche (banche di geni) o sanitarie (virosi) o fisiologiche (nutrizione) la vite si moltiplica facilmente in vitro, cioè con la micropropagazione, per la quale si usano più comunemente gemme di nodi erbacei coltivate su appositi substrati.

Fasi della preparazione del materiale per l'innesto erbaceo

Screen-house, 5 ceppi per ogni clone vengono posti in ambiente opportunamente protetto allo scopo di evitare il contatto con qualsiasi vettore di virus. Ai Vivai Coop. Rauscedo oltre a questa riserva genetica se ne sta' costituendo una molto più sicura e sofisticata tramite la micropropagazione: in piccoli contenitori posti in idonee condizioni ambientali si conservano per lunghissimi periodi cloni micropropagati.

### FASI DELLA MICROPROPAGAZIONE

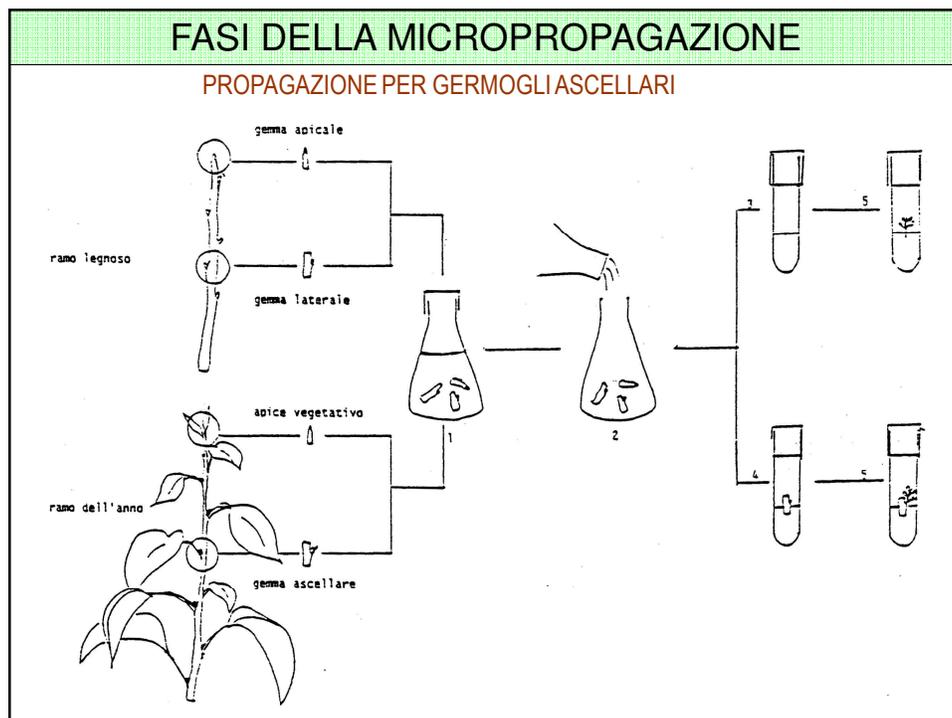
#### PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI

- **FASE 0 (selezione e preparazione della pianta madre)**
  - pianta rispondente allo standard varietale e esente da patogeni (virus)
  - piante vigorose che non hanno subito stress
  - trattamenti antiparassitari per ridurre la presenza dei contaminanti
  - eventuali trattamenti ormonali per favorire la successiva messa in coltura
  - controllare le condizioni ambientali che influiscono sulle riserve di carboidrati e ormoni endogeni
  - nelle specie legnose, favorire il ringiovanimento
  - potatura di ringiovanimento
  - innesto ripetuto su giovani semenzali
    - potatura di ringiovanimento
    - innesto ripetuto su giovani semenzali

### FASI DELLA MICROPROPAGAZIONE

#### PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI

- **FASE I (avvio della coltura asettica)**
  - **raccolta materiale**
    - **apici in attiva crescita: 1-2 cm** (primavera-estate)
    - **meristemi 0.2-1 mm**
    - **gemme** (autunno prima dell'entrata in dormienza, prima della ripresa vegetativa)
    - conservati in sacchetti di plastica per evitare la disidratazione, e in frigo a 4 °C per qualche giorno)
    - sterilizzarli il prima possibile eliminando le parti superflue (lembo fogliare)
  - **Sterilizzazione**
    - eliminare i contaminanti fungini e batterici che in vitro si sviluppano velocemente
    - prelavaggio con acqua e detergente
    - Sterilizzazione
      - **ipoclorito di sodio** (NaOCl), 0,5-2%: 10-30 minuti con soluzione di candeggina (6%) al 10-15% per materiale erbaceo, 20-30% per materiale legnoso
      - **ipoclorito di calcio** Ca(OCl)<sub>2</sub>, 5-10%
      - **cloruro di mercurio** (HgCl<sub>2</sub>), 0,5-2 gr/l
      - **alcol etilico** (70-80%)
      - favorire il contatto tra espianto e agente sterilizzante: veloce immersione in alcol per eliminare le cere, utilizzando qualche goccia di bagnante (Tween), mantenere in agitazione
    - risciacqui con acqua sterile (almeno 3)



## FASI DELLA MICROPROPAGAZIONE

### PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI

- FASE I (avvio della coltura asettica)
  - messa in coltura
    - al momento della messa in coltura l'espianto viene privato delle parti danneggiate
    - le gemme legnose sono ripulite delle perule (contaminanti e sostanze inibenti)
    - mezzo di coltura
    - citochinine a bassa concentrazione
    - per le specie contenenti sostanze tossiche, tipo polifenoli (castagno)
      - rimuovere tali sostanze
        - trasferimenti iniziali frequenti
        - lasciare gli espianti in acqua sterile per qualche ora
        - utilizzare il carbone attivo
      - prevenire l'ossidazione
        - immergendo gli espianti in soluzioni di antiossidanti (ac. Citrico e ac. Ascorbico, 150 mg/l)
        - aggiungere gli antiossidanti nel mezzo di coltura
      - ridurre l'ossidazione
        - diminuendo il pH
        - diminuendo la concentrazione di sali
        - diminuendo l'illuminazione

## FASI DELLA MICROPROPAGAZIONE

### PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI

- FASE II (moltiplicazione)
  - raggiunta la crescita desiderata si può:
    - avviare un nuovo ciclo di moltiplicazione su mezzo fresco (SUBCOLTURA)
    - passare alla fase di radicazione
  - coefficiente di moltiplicazione: numero germogli finali/numero germogli iniziali
    - dipende dalla specie e dalle condizioni di coltura
  - substrato
    - va adattato caso per caso
    - ormoni
      - alta concentrazione di citochinine
      - bassa concentrazione di auxine
      - importante è il rapporto citochinine/auxine
      - il rapporto ottimale è quello che permette la massima proliferazione senza ottenere però germogli troppo piccoli
    - temperatura: 18-25 °C
    - luce: 50-100 µE
      - la luce ha solo effetti morfogenici
      - fotoperiodo: 16/8
      - si usano generalmente tubi fluorescenti a luce bianca
    - contenitore: composizione atmosferica (umidità, etilene)
    - durata della subcoltura: 20-30 gg

## FASI DELLA MICROPROPAGAZIONE

### PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI

- **FASE III (radicazione)**
  - generalmente seguita da una **FASE DI ALLUNGAMENTO** (15-20 giorni)
    - germogli più sviluppati e uniformi
    - ridotta concentrazione di citochinine, presenza di GA<sub>3</sub>
  - **RADICAZIONE IN VITRO**
    - elementi minerali ridotti al 50%, eccetto il Fe, ridotto al 50% anche il saccarosio
    - si eliminano le citochinine
    - si aggiunge 0.5-3 mg/l di **auxine**
    - il trattamento auxinico non deve essere troppo energico per evitare la formazione di callo
    - le radici non devono essere fatte allungare troppo
    - il **BUIO** favorisce la radicazione
      - 1-2 settimane di buio
      - aggiunta di carbone attivo (0.1-3 gr/l)
  - **RADICAZIONE IN VIVO**
    - germogli trattati con soluzioni auxiniche concentrate, come le talee
    - radicazione in condizioni ambientali e quindi apparato radicale più funzionale
    - tempi ridotti
    - non vi sono i danni da trapianto
    - in torba o lana di roccia

## FASI DELLA MICROPROPAGAZIONE

### PROPAGAZIONE PER GERMOGLI ASCELLARI

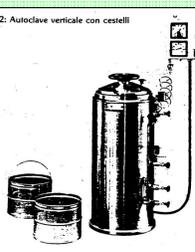
- **FASE IV (acclimatazione o ambientamento)**
  - le piantine radicate sono prelevate dai vasi di radicazione, sciacquate con acqua per eliminare i residui di mezzo agarizzato e trapiantate
  - contenitori alveolari con torba o perlite sterile
  - trattamenti fungini
  - pianta poco adatta all'ambiente esterno: attività fotosintetica ridotta, cere epicutcolari ridotte, apparato radicale poco funzionante
  - mantenute in condizioni di alta umidità relativa (nebulizzazione) e bassa intensità luminosa
  - gradualmente si portano alle condizioni ambientali
  - dopo un mese portate in vivaio

## LABORATORIO DI MICROPROPAGAZIONE

- **AREA LAVAGGIO**
  - lavello, scolavetreria
  - demineralizzatore
  - lavastoviglie
  - spazzola rotante
  - stufa termostatica
  - vetreria
    - vasi di coltura generalmente in vetro da mezzo litro con tappo in vetro, talvolta anche in policarbonato
- **AREA PREPARAZIONE SUBSTRATI**
  - banco di lavoro
  - bilancia analitica elettronica (0.0001)
  - bilancia tecnica elettronica (0.01)
  - agitatore magnetico con piastra riscaldante
  - agitatore ad asta
  - pHmetro
  - agarizzatore
  - pellicola trasparente
  - autoclave (verticale o orizzontale)
  - filtro con pompa a vuoto, filtri sterili

## LABORATORIO DI MICROPROPAGAZIONE

Fig. 12: Autoclave verticale con cestelli



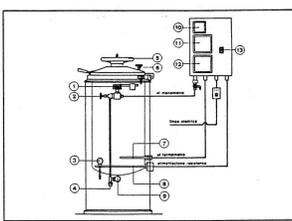
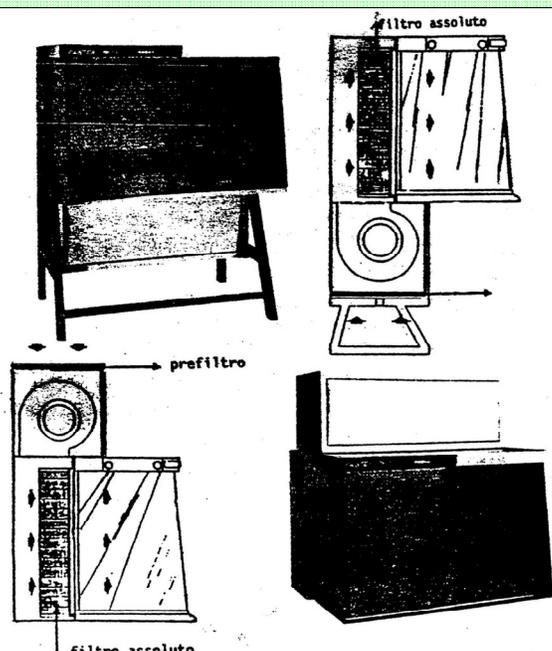


Fig. 13a: Autoclave verticale a parete semplice

1. valvola di sicurezza
2. rubinetto di sfogo vapore
3. rubinetto di livello acqua
4. connessione di scarico
5. volantino di apertura / chiusura
6. rubinetto di sfogo aria
7. sonda termometrica
8. resistenza riscaldante
9. rubinetto di scarico camera
10. temporizzatore
11. manometro di regolazione e controllo
12. termometro di controllo
13. interruttore con lampada spia



prefiltro

filtro assoluto

## LABORATORIO DI MICROPROPAGAZIONE

### ➤ AREA PRELIEVO E TRASFERIMENTO

- are il più possibile sterile
- cappe a flusso laminare (orizzontali o verticali)
  - dotate di lampade a UV
- stereomicroscopio
- bunsen o bactocinerator
- pinze in acciaio inox
- bisturi e lame
- vaschette di appoggio sterili o fogli di carta sterilizzati con raggi ☐
- vetreria
  - vasi di coltura generalmente in vetro da mezzo litro con tappo in vetro, talvolta anche in policarbonato

### ➤ CAMERA DI CRESCITA

- area il più possibile pulita
- ripiani con impianto di illuminazione
- impianto di condizionamento

## MEZZI DI COLTURA

- ACQUA
- MACROELEMENTI
- MICROELEMENTI
- VITAMINE
- ZUCCHERI
- ORMONI
- AGENTI SOLIDIFICANTI
- ALTRI COMPOSTI
- VARIE FORMULAZIONI
  - nome di chi l'ha sperimentata per la prima volta
    - MS (Murashige and Skoog)
    - QL (Quoirin e Lepoivre)
    - WHITE (White)
    - WPM (Lloyd e Mc Cown)
    - B5 (Gamborg)
  - specifiche per specie e tipo di coltura
- STATO FISICO DEL MEZZO DI COLTURA
  - solido
  - semisolido
  - liquido

### MEZZI DI COLTURA

➤ **MACROELEMENTI: ELEMENTI NECESSARI IN GRANDE QUANTITÀ PER LA CRESCITA DELLE PIANTE**

- N, P, K, Ca; Mg, S
- sottoforma di sali
- formulazioni specifiche
  - tipo di sale
  - concentrazione
  - rapporto tra gli elementi



**Tab. 1 - Macroelementi presenti in alcuni terreni di coltura espressi in mg/l**

	M.S. (1962)	QUORIN e LEPOIVRE (1977)	GAMBORG (B5) (1968)	LLOYD e MC COWN (WPM) (1981)	WHITE (1963)
KNO <sub>3</sub>	1900	1800	2500	/	80
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	400	/	400	/
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	/	1200	/	556	300
Ca Cl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	440	/	150	96	/
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	370	360	250	370	720
KCl	/	/	/	/	65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	270	/	170	/
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	/	/	150	/	16,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	/	/	/	/	200
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	/	/	134	/	/
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	/	/	/	990	/

### MEZZI DI COLTURA

➤ **MICROELEMENTI: ELEMENTI NECESSARI IN PICCOLE QUANTITÀ PER LA CRESCITA DELLE PIANTE**

- CATIONI: Fe, Cu, Zi, Mn, Co, Ni, Al, Na
  - il ferro è utilizzato in forma chelata: sale sodico idrato dell'EDTA (acido etilendiamminotetracetico)
- ANIONI: Bo, Mo, I, Cl



**Tab. 2 - Microelementi presenti in alcuni terreni di coltura espressi in mg/l**

	MS (1962)	QUORIN e LEPOIVRE (1977)	GAMBORG (B5) (1968)	LLOYD e MC COWN (WPM) (1981)	WHITE (1963)
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	/	/	10	22,3	/
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	22,3	1	/	/	7
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	2	8,6	3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	3	6,2	1,5
KI	0,83	0,08	0,75	/	0,75
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,25	0,013
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	/
Co Cl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	/	/
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	/	27,8	/
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	/	37,3	/
Fe DTPA *	/	/	28	/	/
Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	/	/	/	/	2,5

(\*) Sequestrene 330 Fe

## MEZZI DI COLTURA

- **VITAMINE:** le piante sono generalmente in grado di sintetizzarle, ma non sempre in vitro
  - mioinositolo, tiamina, acido nicotinico, piridossina, acido pantotenico o pantotenato di Ca, biotina, acido folico, riboflavina, cianocobalamina, colina, acido p-amminobenzoico

Tab. 4 - Vitamine presenti in alcuni terreni espresse in mg/l

	M.S. (1962)	GAMBORG (B5) (1968)	IACQUIOT	LLOYD e MC COWN (WPM) (1981)	VITAMINE di Staba (1979)
Mioinositolo	100	100	50	100	100
Tiamina - HCl	0,1	10	1	1	1
Acido Nicotinico	0,5	1	1	0,5	/
Piridossina-HCl	0,5	1	/	0,5	2
Ca Pantotenato	/	/	0,5	/	1
Biotina	/	/	0,1	/	1
Acido folico	/	/	0,01	/	0,5
Colina Cloruro	/	/	/	/	1
Acido p-amminobenzoico	/	/	1	/	0,5
Riboflavina	/	/	0,1	/	0,5
Nicotinamide	/	/	/	/	2
Cianocobalamina	/	/	/	/	0,0015

## MEZZI DI COLTURA

- **ZUCCHERI**
  - nelle condizioni di coltura in vitro l'attività fotosintetica è molto ridotta, per cui è necessaria una fonte di carbonio
  - generalmente si utilizza il saccarosio nella concentrazione del 2-3%
- **AGENTI SOLIDIFICANTI**
  - **agar (alghe)**
    - fonde a circa 100 °C e solidifica a 45 °C
    - non è digerito dalle piante
    - non reagisce con i costituenti del mezzo di coltura
    - tipi commerciali: Difco Bacto Agar, agar meno puri
  - **pectine (frutta)**
    - molto meno costose dell'agar
- concentrazione (0,4-0,8%):
  - troppo bassa: vitrescenza
  - troppo alta: impedisce la diffusione degli elementi e favorisce l'accumulo dei metaboliti in prossimità dell'espianto

### MEZZI DI COLTURA

- **ORMONI**
  - **AUXINE (radicazione)**
    - inducono la formazione di radici e callo,
    - in piccole concentrazioni usate in combinazione con le citochinine
    - l'auxina naturale più nota è **IAA** (acido 3-indolacetico), è anche di sintesi
    - auxine di sintesi
      - **IBA** (acido 3-indolbutirrico)
      - **NAA** (acido naftalenacetico)
      - **2,4-D** (acido 2,4-diclorofenossiacetico)
  - **CITOCCHININE (proliferazione)**
    - stimolano la divisione cellulare e la formazione di germogli avventizi, inducono lo sviluppo di germogli ascellari, inibiscono la formazione delle radici
    - citochinine naturali
      - **zeatina** (4-idrossi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina)
      - **2iP** (N-(2-isopentenil adenina), N-(D-isopentenil)adenina, 6-(Y,Y-dimetilalilamino)purina)
    - citochinine di sintesi
      - **kinetina** (6-furfurilaminopurina)
      - **BA o BAP** (6-benzilaminopurina), è la più usata
      - **TDZ** (thidiazuron): è un derivato dell'urea con attività citochinica molto forte

### MEZZI DI COLTURA

- **ORMONI**
  - **GIBBERELLINE (allungamento)**
    - in vivo utilizzate per aumentare la lunghezza degli internodi e stimolare fioritura e fruttificazione
    - in vitro utilizzate per favorire la crescita dei germogli già formati (allungamento)
    - **GA<sub>3</sub>** (acido gibberellico)
  - **ANTIAUXINE**
    - inibiscono il trasporto delle auxine
    - **TIBA**
  - **ANTIGIBBERELLINE**
    - bloccano la biosintesi delle gibberelline (brachizzanti)
    - Cloromequat (CCC o Cycocel); Ancymidol
- **ALTRI COMPOSTI**
  - **AMMINOACIDI**
    - fonte di azoto organico (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)
    - glicina, asparagina, glutammina, metionina, prolina, ecc

## MEZZI DI COLTURA

- **ALTRI COMPOSTI**
  - **COMPOSTI COMPLESSI**
    - caseina idrolizzata; peptone; estratto di lievito; estratto di malto; latte di cocco
  - **ADENINA**
    - stimola la crescita degli apici e la formazione di gemme avventizie
  - **COMPOSTI FENOLICI**
    - stimolano la radicazione, la produzione di callo e talvolta la proliferazione
    - fluoroglucinolo è il più conosciuto
  - **ANTIOSSIDANTI**
    - evitano l'imbrunimento degli espianti e del mezzo di coltura
    - sono aggiunti al mezzo o vi sono temporaneamente immersi gli espianti
  - **PVP (polivinilpirrolidone)**
    - adsorbe i fenoli
  - **CARBONE ATTIVO** (carbone di legno finemente macinato)
    - adsorbe le sostanze tossiche
    - riduce l'effetto delle auxine
    - evita la formazione indesiderata di callo
    - promuove la morfogenesi in generale e la formazione di radici impedendo la penetrazione della luce nel mezzo di coltura