

Contributo della micropropagazione alla valorizzazione del sorbo da legno

Maria Claudia Piagnani^{1*}, Daniele Bassi¹ e Dario Maffi²

¹ Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano

² Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano

Micropropagation as a tool for the exploitation of noble hardwood *Sorbus* spp.

Abstract. *Sorbus* spp. are particularly important for timber production as the price of their good-quality wood is extremely high and its demand is increasing on the European market. The use of *in vitro* propagation allows the large-scale production of interesting accessions as those selected at DIPROVE of Milan University. Whereas rooting was critic for *S. torminalis*, acclimatization appeared critical also for *S. domestica*. *S. torminalis* gave better rooting and *in vivo* survival when preconditioned on BA-free medium. Changes in the morphological and histological features and in the development of the mesophyll layer of persistent (*ex vitro*) leaves as compared to both *in vitro* and new formed ones, were observed.

Key words: *Sorbus* spp, *ex-vitro*, rooting, stomata, BA.

Introduzione

L'interesse verso il sorbo, *S. domestica* e *S. torminalis*, è dovuto soprattutto alle qualità tecnologiche del legno che ne fanno un'essenza da legno preziosa, ben quotata sul mercato internazionale. In Italia non c'è un mercato del legno di sorbo poiché non esistono impianti specializzati che ne garantiscano l'approvvigionamento e nemmeno cloni selezionati. La nostra attività di ricerca, le cui finalità s'inseriscono in questo scenario, ha portato all'individuazione di alcune selezioni di *S. torminalis* e di *S. domestica*, coltivate in campi-collezione. La micropropagazione, come strumento di propagazione massale di materiale selezionato, ha consentito l'ottenimento di piante tuttora impiegate nella valutazione di diversi sistemi di gestione, in particolare a piantagione specializzata e a piantagione mista con SRF. Alcune fasi della micropropagazione del sorbo presentano ancora aspetti problematici: radicazione e allestimento delle colture per

S. torminalis e ambientamento delle piantine per entrambe le specie. Sono qui presentati i risultati delle prove sperimentali volte a valutare l'efficienza di radicazione di *S. domestica* e *S. torminalis* e l'evoluzione dell'apparato fogliare durante la fase di ambientamento di *S. torminalis*.

Materiali e metodi

I germogli di due selezioni di *S. domestica* ('Tosca 3' e 'Tosca 10/13') e sette semenzali di *S. torminalis* ('S0', 'S1', 'S2', 'S5', 'S6', 'S7' e 'S8') sono stati mantenuti in substrato di proliferazione agarizzato MS (Murashige e Skoog, 1962) in presenza di 6-benziladenina (BA) alla concentrazione 2,5 mM, saccarosio al 3% e vitamine Nitsch&Nitsch (1969), a pH 5,5. Per la descrizione dell'origine del materiale vegetale e le condizioni colturali si rimanda a quanto precedentemente pubblicato (Piagnani *et al.*, 2000).

Radicazione e ambientamento

Per l'induzione rizogena i germogli erano trattati con immersione basale in soluzione idroalcolica di IBA a concentrazione di 2000 ppm quindi posti sul terreno MS con la componente minerale dimezzata. Per valutare l'effetto residuo di BA alcuni germogli erano mantenuti, per la durata della subcultura precedente al trattamento rizogeno, su terreno privo di ormoni. I germogli radicati erano trasferiti in vasetti di plastica trasparente, 5 cm in Δ , contenenti torba e agriperlite (50% v/v) e restavano nella stessa cella climatica delle colture *in vitro*, incubati in miniserre di plastica, 57 cm x 38 cm x 32(h) cm, munite di coperchio trasparente.

Preparazione dei campioni per le osservazioni al microscopio ottico.

Ciascuna foglia basale prelevata da tre germogli *in vitro* di *S. torminalis* 'S2', coltivati su terreno privo di ormoni, era fissata con glutaraldeide al 3% in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,2, quindi conservata a 4°C. Circa un mese dopo l'inizio della fase di ambientamento, foglie di neo formazione (*in vivo*) e quelle persistenti (*ex vitro*), subirono lo stesso trattamento. Il

¹ claudia.piagnani@unimi.it

conteggio degli stomi era eseguito sulla porzione mediana della foglia (~10 x 5mm) dopo chiarificazione in alcool etilico 75% (10-15 min a 60°C) e colorazione con blu di toluidina (0,05%) in tampone fosfato, con microscopio ottico Olympus BX50 (Olympus, Japan) dotato di contrasto interferenziale (DIC). Per ogni foglia furono scelte a caso 10 aree, corrispondenti al campo visivo dell'oculare (325x). I conteggi furono replicati utilizzando anche il microscopio Laborlux D Leitz con 625x. Dalle porzioni mediane delle foglie erano ricavate manualmente varie sezioni trasversali alla lamina e le superfici di taglio, colorate con 0,01% Calcofluor White M2R (Sigma) che evidenzia le pareti cellulari sotto luce UV, previa interposizione di vetrino coprioggetto, erano osservate con un microscopio a fluorescenza in luce riflessa (Leitz Dialux 20EB dotato di illuminatore e sistema di filtri Ploemopak: filtro di eccitazione 340-380 nm). La superficie fogliare era determinata acquisendo l'immagine delle foglie con uno scanner (Epson Perfectio 4490 Photo) ed analizzando l'immagine con il programma Adobe Photoshop 7.0.

Risultati e discussione

La BA impiegata nella fase di proliferazione delle accessioni di *S. torminalis* ha avuto un effetto ritardante sulla successiva fase di radicazione (fig. 1), infatti a 40 giorni dal trattamento rizogeno il 35% dei germogli provenienti da terreno privo di citochinina presentava radici, contro il 14% di quelli provenienti

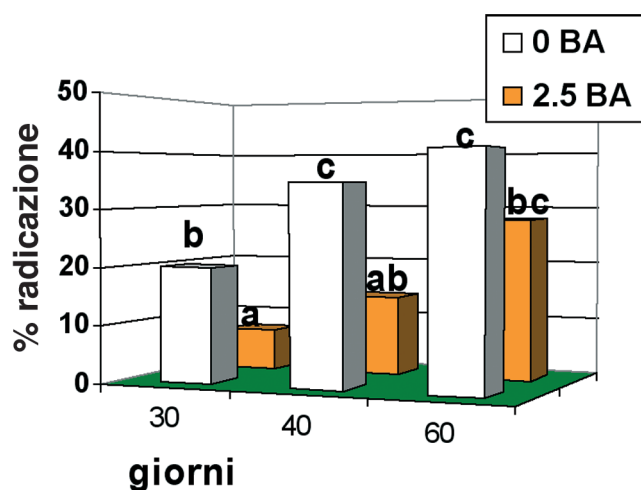


Fig. 1 - Effetto dell'interazione giorni dal trattamento rizogeno x pre-trattamento con BA sulla percentuale di radicazione nelle accessioni di *S. torminalis*. A lettere uguali corrispondono medie uguali secondo l'HSD di Tukey, $P=0,05$. $8 \leq n \leq 62$.

Fig. 1 - Effect of interaction between rooting time and BA pre-treatment on rooting percentage of the accessions of *S. torminalis*. Values with the same suffix letter are not different according to the Tukey's HSD; $P=0.05$. $8 \leq n \leq 62$.

da terreno contenente BA. È stata inoltre osservata un'interazione tra le diverse accessioni di *S. torminalis* e la BA sull'efficienza di radicazione (fig. 2) e, in particolare, 'S1', 'S2' e 'S5' provenienti da terreno contenente il fitoregolatore hanno evidenziato riduzione, sino alla soppressione nel caso di S1, della capacità rizogena. Queste osservazioni sono in accordo con quanto osservato da Ben-Jaacov *et al.* (1991) in merito all'effetto ritardante della citochinina sulla radicazione di specie legnose. Per le altre tre accessioni la presenza della citochinina non ha prodotto effetti significativi. Come evidente in fig. 3, le due selezioni di *S. domestica* 'Tosca 3' e 'Tosca 10/16' conseguivano i loro massimi livelli di radicazione in tempi più rapidi rispetto alle selezioni di *S. torminalis*; in particolare nel caso di 'Tosca 3' il completamento della fase di radicazione si concludeva nel momento in cui le selezioni di *S. torminalis* erano solo all'inizio del processo. La correlazione significativa tra l'entità di sopravvivenza in fase di ambientamento e la BA presente nel terreno antecedente la fase di radicazione evidenzia che, a parte il caso di 'S5' e 'S6', le piante beneficiavano del pre-trattamento su terreno privo di ormoni prima di essere sottoposte all'induzione della rizogenesi poiché conseguivano percentuali di sopravvivenza significativamente maggiori rispetto a quelle che tale pre-trattamento non lo avevano ricevuto e permanevano, invece, su terreno contenente $2,5 \mu\text{M}$ di

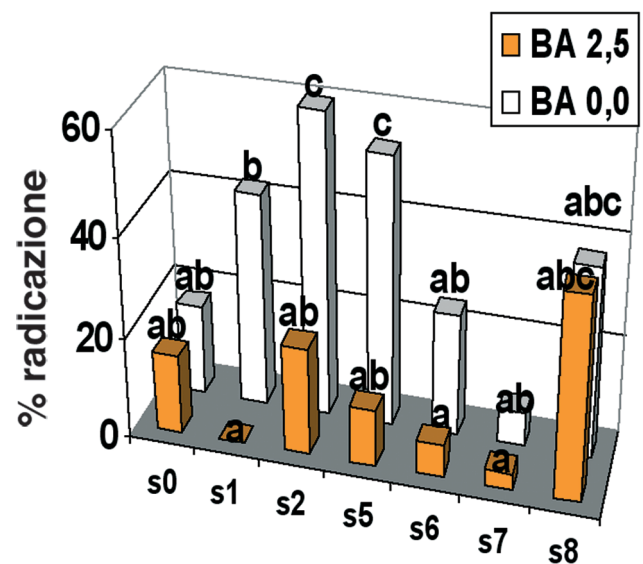


Fig. 2 - Interazione genotipo x pre-trattamento con BA sulla percentuale di radicazione nelle accessioni di *S. torminalis*. A lettere uguali corrispondono medie uguali secondo l'HSD di Tukey, $P=0,05$. $8 \leq n \leq 17$.

Fig. 2 - Effect of interaction between genotype and BA pre-treatment on rooting percentage of the accessions of *S. torminalis*. Values with the same suffix letter are not different according to the Tukey's HSD; $P=0.05$. $8 \leq n \leq 17$.

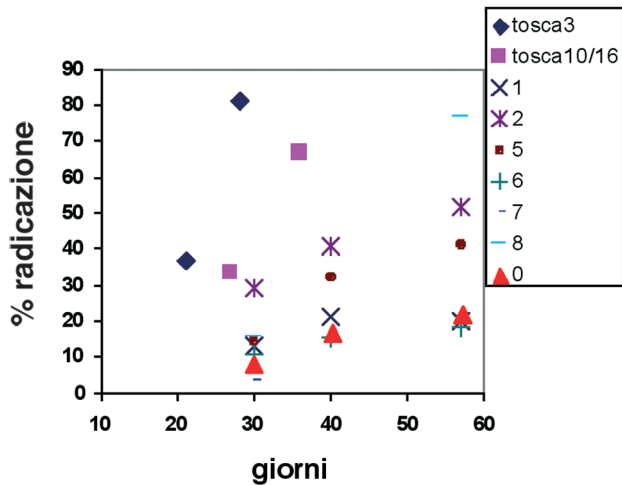


Fig. 3 - Andamento della percentuale media di radicazione nelle accessioni di *S. torminalis* e nelle due selezioni di *S. domestica*. $21 \leq n \leq 28$.

Fig. 3 - Rooting time course for both the accessions of *S. torminalis* and for the two selections of *S. domestica*. $21 \leq n \leq 28$.

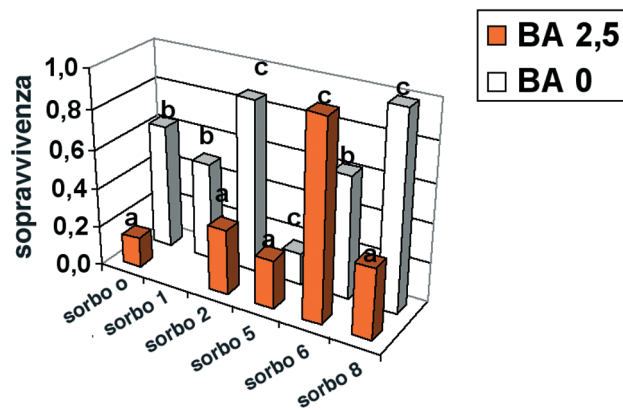


Fig. 4 - Interazione genotipo x pre-trattamento con BA sulla sopravvivenza delle piantine in fase di ambientamento (0=nessuna, 1=tutte). A lettere uguali corrispondono medie uguali secondo l'HSD di Tukey, $P=0,05$, $11 \leq n \leq 24$.

Fig. 4 - Genotype x BA preconditioning interaction on plantlet survival during acclimatization (0=none, 1=all). Values with the same suffix letter are not different according to the Tukey's HSD; $P=0.05$. $11 \leq n \leq 24$.

BA. Le foglie formatesi *in vitro* hanno proseguito ad accrescersi durante la fase di ambientamento conseguendo una superficie media di 293,3 mm², significativamente maggiore rispetto a quella rilevata *in vitro* di 184,3 mm² (tab. 1); tuttavia le foglie di neo formazione (*in vivo*) raggiungevano dimensioni molto maggiori: 874,3 mm². Riguardo al numero di stomi presenti sulla superficie inferiore delle foglie è stato rilevato che la loro densità nelle foglie differenziate *in vivo*, 437,1 mm⁻², era superiore rispetto a quanto riscontrato per quelle originatesi *in vitro*, 371,5 mm⁻² (tab. 1); le foglie *ex vitro* invece mostravano una densità stomatica (243,9 mm⁻²) inferiore alle foglie *in vitro*, ciò a dimostrazione del fatto che esse non ave-

Tab. 1 - Per ciascuna condizione colturale sono riportati: valori medi dell'area fogliare e del numero di stomi e la percentuale di stomi normali, asimmetrici e degenerati come illustrato in fig. 5. Per ciascuna colonna, a lettere uguali corrispondono medie uguali secondo l'HSD di Tukey, $P=0,05$. $n=30$

Tab. 1 - For each culture condition are shown: average leaf area and stomata number and percentage of regular, asymmetric and degenerated stomata (see fig. 5). In each column values with the same suffix letter are not different according to the Tukey's HSD; $P=0.05$. $n=30$.

Condizione colturale	Area fogliare mm ²	Stomi n mm ⁻²	Normali %	Asimmetrici %	Degenerati %
<i>vitro</i>	184,3 a	371,5 b	100	0,0	0,0
<i>ex vitro</i>	293,3 b	243,9 a	55,0±0,6	24,3±0,6	19,7±3,3
<i>vivo</i>	874,3 c	437,1 c	94,0	5,0	1,0

vano operato alcuna differenziazione di nuovi stomi in relazione al cambiamento delle condizioni ambientali, ma erano solamente accresciute in superficie, come dimostrato dai dati relativi a questo parametro. Gli stomi delle foglie persistenti (*ex vitro*), inoltre, presentavano una morfologia peculiare variabile da forme normali ad altre parzialmente o totalmente degenerate (fig. 5, tab. 1). A un mese circa dall'uscita dal *vitro*, nelle foglie di neo formazione, il tessuto a palizzata risultava meglio definito (dati non riportati) e il numero di stomi maggiore rispetto alle foglie *ex vitro* (tab. 1). Tuttavia le foglie *ex vitro*, a differenza di quanto osservato nelle foglie *in vitro*, mostravano cellule di guardia con numerosi cloroplasti ben evidenziati (fig. 5).

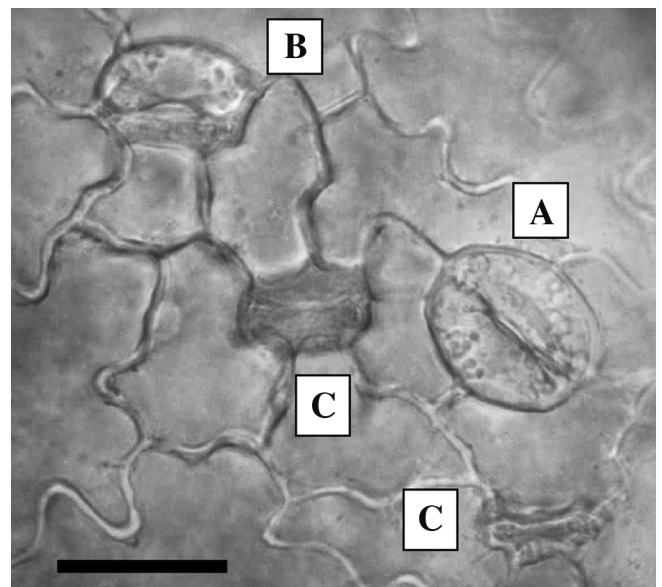


Fig. 5 - Tipi di stoma di una foglia *ex vitro* (A, normale; B, asimmetrico; C, degenerato). Barra=20 μm.

Fig. 5 - Stomata types of an *ex vitro* leaf (A, regular; B, asymmetric; C, degenerated). Bar = 20 μm.

Conclusion

Le accessioni di *S. torminalis* hanno mostrato risposte genotipo-dipendenti in relazione ai trattamenti finalizzati all'espressione della capacità rizogena e, inoltre, la loro attitudine alla radicazione è povera rispetto alle selezioni di *S. domestica*. Nella maggior parte delle accessioni di *S. torminalis* l'assenza della BA ha favorito la sopravvivenza delle piantine in ambientamento, ma i dati in nostro possesso non ci permettono di stabilire se tale condizione sia da riferirsi, ad esempio, agli effetti della BA sulla regolazione dell'apertura stomatica (Diettrich *et al.*, 1992) o ad altro. Le foglie *ex vitro*, che persistono più o meno a lungo, contribuiscono in diverso grado alla crescita della pianta o a garantirne la sopravvivenza nella fase *post vitro* (Hazarika, 2006). Considerato che nelle accessioni di *S. torminalis* le foglie *ex vitro* persistono fino a diversi mesi dal trasferimento in terra, secondo il modello proposto dall'Autore, sarebbe da ipotizzare che il loro ruolo non sia esclusivamente di tipo pseudo-cotiledonare, cioè di riserva, ma che, compatibilmente con la presenza di alcuni elementi strutturali atipici (stomi e mesofillo), potrebbero invece contribuire attivamente alla crescita della pianta, come le cellule di guardia ricche in cloroplasti sembrerebbero suggerire.

Riassunto

Nell'attività di micropropagazione di selezioni autoctone da legno di *S. torminalis* e *S. domestica*, la fase di radicazione si è rivelata critica per *S. torminalis* e quella d'ambientamento per entrambe. Nel presente lavoro si evidenzia l'influenza del genotipo e della citochinina sulla fase di radicazione di *S. torminalis* e si descrive l'evoluzione dell'apparato fogliare durante la fase di ambientamento delle colture.

Parole chiave: *Sorbus* spp., *ex vitro*, radicazione, stomi, BA

Bibliografia

- BEN-JAACOV J., ACKERMAN A., TAL E., JACOBS G. 1991. *Vegetative propagation of Alberta magna by tissue culture and grafting*. Hort Science, 26: 74-75.
- DIETRICH B., MERTINAT H., LUCKNER, M. 1992. *Reduction of water loss during ex vitro acclimatisation of micropropagated Digitalis lanata clone plants*. Biochem. Physiol. Pflanz., 188: 23-31.
- HAZARIKA B.N. 2006. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants*. Sci. Hortic., 108:105-120.
- MURASHIGE T., SKOOG, F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. - Physiol. Plant. 15: 473 - 497.
- NITSCH J.P., NITSCH C. 1969. *Haploid plants from pollen grains*. Science, 163: 85-87
- PIAGNANI C., BASSI D., PINNASAVAIA S. 2000. *Prove di micropropagazione di Sorbus domestica e S. torminalis*. Atti 'V Giornate Scientifiche S.O.I.', Sirmione, 26-28 marzo: 605-606.