

La moltiplicazione del melo con la tecnica della micropropagazione. Variazione del pH in substrati diversi durante la fase di moltiplicazione

A.R. LEVA* M. BARROSO** J.M. MURILLO**

* *Istituto sulla propagazione delle specie legnose* - C.N.R.
Istituto Coltivazioni Arboree - Università di Firenze

** *Centro de Edafologia y Biologia Aplicada del CUARTO*
Sevilla

I numerosi studi condotti in questi ultimi 20 anni sulla applicazione della coltura in vitro a diverse specie coltivate, hanno focalizzato principalmente la messa a punto dei terreni nutritivi, il ruolo dei fitoregolatori nelle diverse fasi di crescita ed il controllo ormonale sulla morfogenesi.

Quasi del tutto trascurata, come appare dai lavori riportati in bibliografia, sono state invece le indagini su altri fattori che probabilmente esercitano un ruolo di primo piano sulla crescita e sui processi morfogenetici che avvengono in vitro.

Infatti molto limitate sono, ad esempio, le conoscenze sulla variazione del pH del substrato nel corso della coltura (*Street*, 1969; *Damiano*, 1979). Questo generalmente viene portato prima della sterilizzazione del terreno entro un intervallo di valori compreso fra 5 e 6, in realtà è soggetto durante la coltura a numerose fonti di variazioni (sterilizzazione, attività enzimatica, assorbimento) che si possono tradurre in notevoli cambiamenti sulle caratteristiche chimiche del mezzo stesso e sull'effetto degli stessi regolatori di crescita.

Quanto sopra esposto ci ha indotto ad impostare delle prove per verificare eventuali modifiche del pH ed influenze correlate durante la fase di proliferazione di espianti di melo in substrati diversi.

Materiale e metodo

Le prove sono state condotte con 2 substrati minerali, l'MS (1962) ed il PM (1981), dei quali il primo è stato utilizzato sia tal quale sia addizionato

con 1 ml/l di tampone molare sodio citrato - sodio idrato (MS +) (secondo S.P. Sørensen) al fine di rendere più stabile il pH. Nei tre substrati così ottenuti, si è aggiunto in egual misura (ppm/l) tiamina 0,1, acido ascorbico 10, mio inositolo 100, piridossina 0,5, saccarosio 30 g/l, agar difco (4,2 g/l) e BAP ($5\mu\text{Mol/l}$). Il pH è sempre stato portato al valore di 5,5 mediante NaOH 1 N prima della sterilizzazione effettuata in autoclave a 120° per 10 min. Sono stati utilizzati vasi di coltura da 100 ml contenenti 20 ml di substrato, per vaso sono stati messi 0,2,4 espianti di "Golden Delicious" provenienti da PM + $5\mu\text{Mol}$ di BAP per un totale di 9 tesi. Il materiale è stato posto in camera di crescita a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ con fotoperiodo di 16 ore di luce (~ 3000 lux).

Si è determinato: 1) la variazione del pH causata dal processo di sterilizzazione; 2) la variazione nel tempo del pH in uno stesso substrato con o senza tampone; 3) la variazione nel tempo del pH in substrati a diversa composizione minerale; 4) la variazione nel tempo del pH in funzione della "densità d'impianto" con rispettivamente 5 o 10 ml di substrato a disposizione di ogni espianto.

Sono stati rilevati: a) il pH dei diversi substrati al momento della preparazione dei vasi di coltura dopo la sterilizzazione; b) la crescita, settimanalmente e per 6 settimane, espressa come numero e lunghezza dei germogli (media di 5 vasi di coltura) determinata con misure dirette, (gli espianti venivano misurati e quindi eliminati); c) il valore del pH rilevato nei substrati relativi al punto B, preventivamente omogeneizzati, prima della misurazione, per eliminare possibili variazioni dovute a gradienti di diffusione; d) il peso secco dei substrati alla fine della prova (sommatoria di 5 vasi, con 4 espianti ciascuno) riferiti ad un peso secco iniziale che non tiene conto dell'NaOH aggiunta per la correzione del pH.

Si è pertanto operato con un totale di 270 vasi escluso il materiale sul quale sono state fatte le determinazioni di partenza.

Risultati e discussione

Nelle tabelle 1 e 2 sono riuniti i valori del pH rilevati settimanalmente nei diversi substrati con o senza espianti. Appare evidente l'azione del processo di sterilizzazione che sia nel PM che nell'MS normale determina un abbassamento rispettivamente di 0,30 e 0,20 punti; l'uso del tampone permette di mantenere questo parametro sui valori iniziali anche se ha mostrato una certa tendenza ad elevare il pH nel primo periodo di coltura, nella tesi 0 espianti (controllo).

La conservazione dei substrati non tamponati, in asepsi ed in camera di crescita determina delle alterazioni nella composizione dei mezzi nutritivi, alterazioni che, nel nostro caso, sono quantizzabili con l'acidificazione, di

Tab. 1 - Variazioni nel tempo del pH di diversi substrati con, rispettivamente, n. 0-2-4 espianti/vaso.
Time changes of pH in the various substrates, with 0, 2 and 4 explants per container, respectively.

Substrato	n. espianti	VARIAZIONE pH							
		prima steril.	dopo steril.	1	2	settimane			
						3	4	5	6
PM	0			5,12	4,79	4,93	5,03	4,74	4,84
	2	5,5	5,2	5,00	4,56	4,53	4,79	5,31	5,35
	4			4,92	4,65	5,98	6,62	6,38	5,69
MS	0			5,33	5,37	5,26	5,30	5,21	4,87
	2	5,5	5,3	4,20	4,59	4,42	4,47	4,87	4,83
	4			4,29	4,61	4,42	4,74	5,04	4,73

Tab. 2 - Influenza del tampone citrato sulla variazione del pH nel tempo e con diverso numero di espianti.

Influence of the citrate buffer on the pH changes in the time and with different numbers of explants.

Substrato	n. espianti	VARIAZIONE pH							
		prima steril.	dopo steril.	1	2	settimane			
						3	4	5	6
MS	0			5,33	5,37	5,26	5,30	5,21	4,87
	2	5,5	5,3	4,20	4,59	4,42	4,47	4,87	4,83
	4			4,29	4,61	4,42	4,74	5,04	4,73
MS + tamp.	0			5,73	5,69	5,44	5,50	5,46	5,37
	2	5,5	5,5	4,61	4,50	4,57	4,85	5,06	4,86
	4			4,47	4,71	5,39	6,08	5,83	5,58

media, di circa 0,40 punti dopo un mese e mezzo dalla sterilizzazione e di 0,66 rispetto al valore iniziale di preparazione; questo effetto è ben controllato (sia pure con piccole oscillazioni) dall'aggiunta della sostanza tampone.

La presenza di espianti in coltura induce, nei diversi substrati, alterazioni rapide e profonde che determinano una dinamica notevole del pH, dinamica che è controllata dalla doppia azione: fattore tempo e densità di impianto. In generale vi è un primo periodo (1^o - 2^o settimana) in cui il valore del pH diminuisce in modo più marcato che non nel controllo (0 espianti), successivamente si verifica un innalzamento che riporta i valori di questo parametro a quelli iniziali. I diversi substrati si differenziano principalmente per la quantità di risposta (fig. 1). Nel primo periodo la caduta del valore del pH, rispetto al controllo, è sensibile (indipendentemente dal numero di espianti), soprattutto nel'MS (con o senza tampone), nel secondo periodo l'azione dell'espianto determina un innalzamento, legato alla densità di impianto, molto evidente nei substrati PM ed MS tamponato. E' da mettere in evidenza il comportamento verificato nella variazione di pH in tutti i substrati con 4 espianti iniziali (5 ml/espianto). In questo caso abbiamo due inversioni di andamento della curva, una che si verifica tra la 1^o e 2^o settimana e l'altra che avviene intorno alla 5^o, che tende a far cadere in modo consistente il valore del pH.

Dall'analisi della tab. 3, in cui sono riportate le frazioni percentuali di sostanza secca residua di un substrato alla fine della coltura, si rileva che il valore della sostanza secca è ridotto a circa il 50% del valore iniziale, con piccole differenze nei diversi substrati.

Nelle tab. 4 e 5 (numero e lunghezza media dei nuovi germogli ottenuti) sono riportati i dati di accrescimento per le diverse densità di impianto (2 e 4 germogli/vaso) da cui risulta che, per il melo, il substrato PM è quello che

Tab. 3 - Frazione percentuale della S.S. residua in diversi substrati alla fine della coltura (4 espianti per vaso).

Percentage of residual dry matter in the various substrates at the end of the culture (4 ex- plants per container).

substrati	% S.S.
PM	50,6
MS	45,3
MS + tampone	55,1

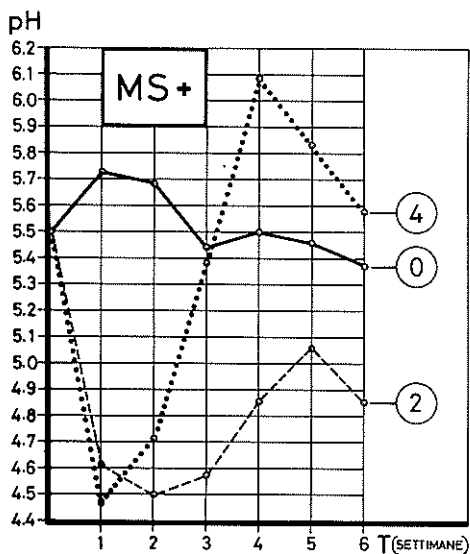
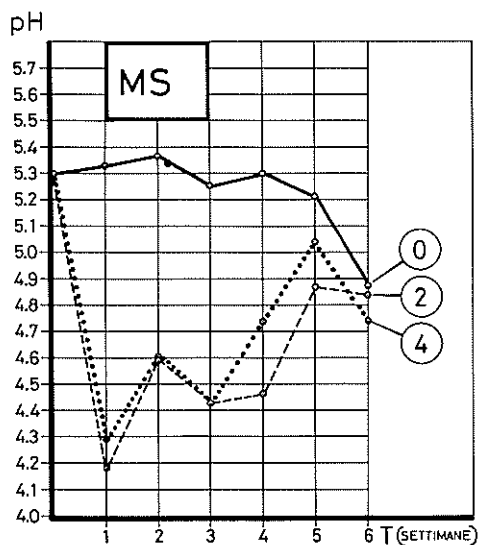
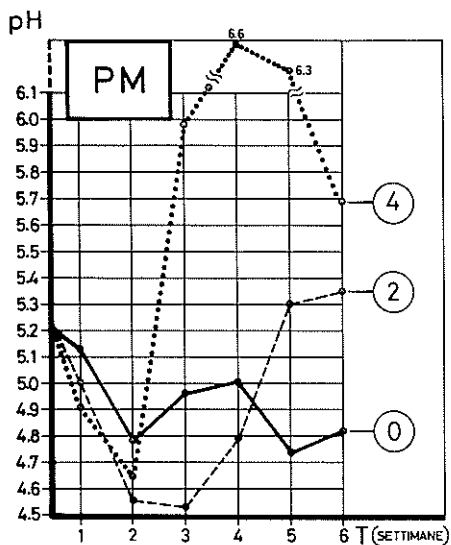


Fig. 1 - Andamento nel tempo del pH nei tre substrati in prova. Il segno + indica la presenza del tampone; il numero gli espianti per contenitore.

Time course of pH in the three tested substrates. The + sign indicates the presence of the buffer; the circled number indicates the number of explants per container.

Tab. 4 - Variazione del numero e lunghezza media dei nuovi germogli in vasi contenenti 2 espianti. I valori contraddistinti con lettere diverse sono tra loro statisticamente diverse per $P = 0,01$.
Average number and length of new shoots in containers with 2 explants.

Substrato		SETTIMANE					
		1	2	3	4	5	6
PM	n. germogli	1	3,1 n.s.	4,6 n.s.	12,7 B	18,0 B	18,7 B
	lunghezza mm	5	5,9 n.s.	7,3 n.s.	4,0 A	4,1 A	5,9 A
MS	n. germogli	1	3,6 n.s.	6,5 n.s.	6,9 A	12,8 A	8,4 A
	lunghezza mm	5	7,8 n.s.	11,8 n.s.	7,8 B	11,9 B	14,4 B
MS + tamp.	n. germogli	1	4,8 n.s.	8,1 n.s.	13,3 B	10,5 A	10,4 A
	lunghezza mm	5	6,4 n.s.	7,5 n.s.	7,9 B	12,2 B	15,3 B
MEDIA	n. germogli	1	3,83	6,40	10,97	13,77	12,50
	lunghezza mm	5	6,70	8,90	6,60	9,40	11,90

Tab. 5 - Variazione del numero e lunghezza media dei nuovi germogli in vasi contenenti 4 espianti. I valori contraddistinti con lettere maiuscole diverse sono tra loro statisticamente diverse per $P = 0,01$, quelli contraddistinti con lettere minuscole diverse sono tra loro statisticamente diversi per $p = 0,05$

Substrato		SETTIMANE					
		1	2	3	4	5	6
PM	n. germogli	1	5,35 n.s.	7,45 b	12,1 B	10,65 B	10,65B
	lunghezza mm	5	3,3 a	6,0 A	6,7 A	8,0 A	6,4 A
MS	n. germogli	1	4,65 n.s.	4,65 a	8,0 A	4,85 A	7,65A
	lunghezza mm	5	7,0 b	13,6 B	11,2 B	17,4 B	13,2 B
MS + tamp.	n. germogli	1	5,15 n.s.	5,85 ab	6,75A	5,25 A	7,30A
	lunghezza mm	5	5,8 ab	9,5 AB	11,8 B	17,7 B	13,8 B
MEDIA	n. germogli	1	5,05	5,98	8,95	6,92	8,53
	lunghezza mm	5	5,4	9,7	9,9	14,4	11,1

determina il più alto coefficiente di proliferazione con degli incrementi numerici che tendono a divenire costantemente diversi e superiori nell'ultimo periodo della coltura. Dall'analisi degli incrementi del numero degli espianti si possono notare dei valori fuori sequenza come nella tesi MS 4 espanti in cui il numero di germogli ottenuti sembra scendere da 8,00 a 4,85 tra la 4^o e 5^o settimana. Si deve sottolineare che i rilievi effettuati sono di tipo distruttivo, cioè il numero di germogli riportato in tabella indica un valore medio reale e non stimato di 5 vasi di coltura (Fig. 2).

Questa determinazione mette in evidenza una grande variabilità all'interno dei vasi di coltura; così pure scegliendo per partire campioni visivamente omogenei, nella prova sono stati introdotti germogli caratterizzati da una netta diversa reattività.

Evidentemente con variabili interne di quest'ordine di grandezza occorre procedere con un campionamento molto più ampio selezionando il materiale vegetale utilizzato, in funzione di parametri da meglio definire, ad esempio la posizione misurata secondo un vettore centrifugo del germoglio nell'ambito del "cespuglio" da cui è ricavato o il suo momento di formazione.

Si è accennato a questo aspetto perchè sembra esistere, impressa nei germogli, all'atto della separazione, una certa tendenza a favorire o l'allungamento o la proliferazione; infatti quando si evidenziano delle cadute nel coefficiente di proliferazione si ha, quasi costantemente, un aumento medio della lunghezza dei campioni presi in considerazione. Il confronto fra le tab. 4 e 5 mette in evidenza che, indipendentemente dal substrato utilizzato il coefficiente di proliferazione dipende anche dalla quantità del mezzo nutritivo a disposizione di ogni singolo espianto di partenza. Questo fenomeno è più evidente nel PM mentre si rilevano differenze più ridotte nell'MS con o senza tampone.

Poichè sono stati usati vasi uguali per tutte le prove non è possibile dare indicazioni sull'azione del rapporto superficie/volume nell'influenzare questo aspetto della coltura in vitro.

Conclusioni

L'insieme dei risultati ottenuti nelle prove apre nuovi campi di indagine anche se appare necessaria un'ulteriore ed approfondita verifica per poter spiegare tutta una serie di fenomeni che sono stati, in questa prima fase dello studio, individuati.

Le variazioni del pH, infatti indicano che nel mezzo sono avvenute delle profonde alterazioni sulle cui cause si può, per ora, avanzare solo alcune ipotesi. La brusca caduta iniziale potrebbe essere dovuta ad una intensa re-

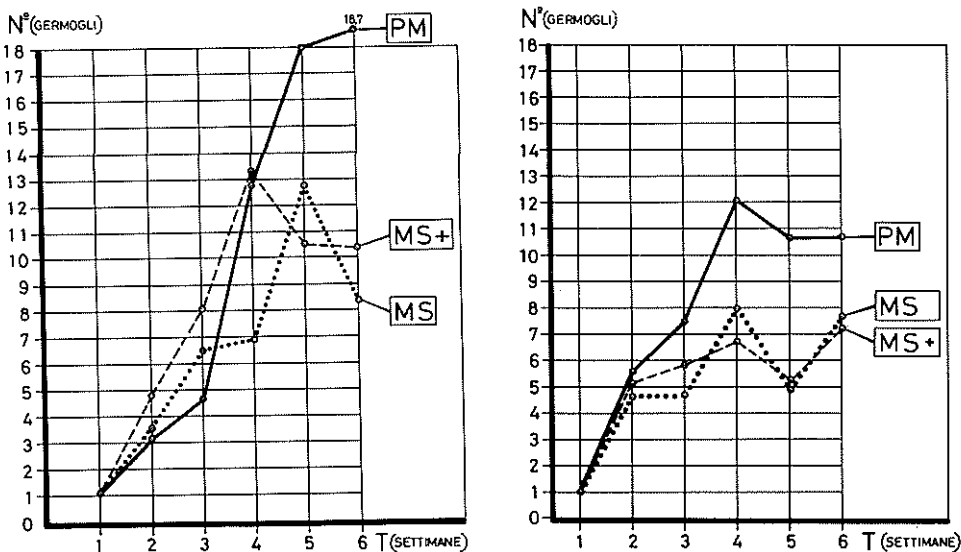


Fig. 2 - Andamento nel tempo del numero dei germogli formati da ogni espianto di partenza. A sinistra con 2 espianti per vaso; a destra con 4; le lettere incluse nel rettangolo indicano il substrato + indica la presenza del tampone.

Time course of the shoots formed by each explant. On the left are the values with 2 explants per container; on the right with 4 explants. The letters within the rectangle indicate the substrate; the '+' sign indicates the presence of the buffer.

spirazione che porterebbe ad un accumulo di CO_2 nel mezzo e relativa acidificazione. Il successivo innalzamento potrebbe essere determinato da un assorbimento preferenziale di anioni, ad esempio l' NO_3^- che è l'anione più rappresentato nei substrati saggiati; come prova indiretta, per avallare la ipotesi della variazione della composizione del substrato per respirazione ed assorbimento, può essere portato il fatto che in tutti e tre i mezzi colturali alla 6^o settimana, la sostanza secca è caduta in media del 50%; questo valore indica sicuramente una utilizzazione del saccarosio che da solo costituisce l'80% della sostanza secca di un substrato prima della coltura.

Rimane da verificare se variazioni del pH di questa entità possono modificare nel tempo l'assorbimento in genere e l'azione dei regolatori di crescita. E' stato inoltre riscontrato un diverso comportamento dei substrati risultando quello con più elevata concentrazione salina più "stabile" per l'aspetto considerato; è evidente pertanto che tale fenomeno deve essere studiato e quantificato per ognuno di essi.

Inoltre è stata messa in luce anche un'influenza del rapporto tra volume substrato e numero di espianti (densità) per contenitore.

Le prove evidenziano che il coefficiente di proliferazione per espianto è legato anche se in maniera meno che lineare al volume di mezzo colturale disponibile per ogni espianto in coltura.

Purtroppo nelle prove, delle quali si riferisce, si avevano due soli punti di riferimento. Si vuole tuttavia richiamare l'attenzione su questo aspetto solo perchè del rapporto espianto/volume substrato si dovrà tener conto ogni volta che si opera, sia quando si confrontano substrati o cultivar tra loro, sia in prospettiva per una ottimizzazione della tecnica attraverso l'individuazione per ogni combinazione forma/volume, della densità di impianto per l'ottimizzazione del coefficiente di proliferazione in funzione del tempo necessario o dello spazio disponibile.

Riassunto

Sono state condotte delle prove per controllare l'andamento nel tempo del pH del substrato su colture in vitro di melo.

Sono stati utilizzati espianti della cv "Golden Delicious" già condizionati in vitro e sono state rilevate le variazioni del pH su substrati a diversa composizione minerale (PM, MS normale e MS addizionato con sostanza tampone) in presenza di un numero diverso di espianti (0-2-4) per contenitore.

I rilievi sono stati effettuati settimanalmente per tutto il tempo di una coltura (6 settimane). Sono state evidenziate ampie oscillazioni del valore del pH con discesa nella 1^o e 2^o settimana e successiva risalita alla 5^o settimana. Tali variazioni sono indotte in piccola misura direttamente dalla sterilizzazione, diventano più consistenti in presenza di espianti in crescita. Le oscillazioni si sono diversificate a seconda del substrato e del numero di espianti per vaso di coltura. Contenitori senza materiale vegetale hanno egualmente mostrato una leggera variazione del pH nel tempo.

Vengono avanzate alcune ipotesi su le cause del fenomeno. Si suppone una prima fase di attiva respirazione con accumulo di acido carbonico ed una seconda di assorbimento preferenziale di anioni.

Summary

Investigations to check the time course of substrate pH carried out on in vitro cultures of apple.

Previously in vitro conditioned "Golden Delicious" explants were used, and pH variations were detected on substrates with a different mineral composition (PM, normal MS and MS added with a buffer substance), in the presence of varying numbers of explants (0-2-4) per container.

The measurements were made each week, in the total course of culture duration (6 weeks). Wide fluctuations of the pH values were detected, with a reduction in the first and second week, followed by a recovery in the fifth week. Such fluctuations are to a small extent caused by sterilization, and become more marked in the presence of growing explants. The fluctuations differ according to the substrate and to the number of explants per container.

Containers with no vegetal material have likewise shown in the time a slight pH variation.

Some hypotheses are made concerning the causes of the phenomenon. A first phase of active respiration with accumulation of carbonic acid would be followed by a second phase, of a preferential anions absorption.

Bibliografia

- DAMIANO C., LANERI U., ARIAS E.J., 1979 - *Nota preliminare sull'utilizzazione dell'azoto nitrico ed ammoniacale in colture in vitro di fragola*. Ann. Ist. Sperim. Frutticoltura, vol. 10.
- DAMIANO C., LANERI U., ARIAS E.J., 1979 - *Differenti effetti del nitrato e dell'ammonio da soli e con insieme di acidi citrico e succinico nella propagazione in vitro della fragola*. Ann. Ist. Sperim. Frutticoltura, vol. 10.
- DE FOSSARD R.D., 1976 - *Tissue culture for plant propagators*. University of New England Armidale.
- FIORINO P., LEVA A.R., 1981 - *La moltiplicazione del melo con la tecnica della micropropagazione. I. Indagine sulla ottimizzazione dei substrati nutritivi durante la fase di moltiplicazione*. Atti del Congresso su "I fitoregolatori in agricoltura", 26-27 novembre.
- GREGORINI G., ANDREUCCI E., TOGNONI F., 1972 - *L'importanza dei componenti minerali del substrato per la coltura dei meristemi apicali del garofano*. Riv. Ortoflorofrutt. Ital., vol. 2.
- MARTIN S.M., ROSE D., 1976 - *Growth of plant cell (ipomaea) culture at controlled pH levels*. Canadian J.Bot., 54:1264-1270.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - *A revised for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue*. Physiol. Plant., 15, 473-79.
- STREET H.E., 1969 - *Growth in organized and inorganized system*. Plant Physiology, Academic Press, New York, 24.
- VASIL I.K., 1980 - *Perspectives in plant cell and tissue culture*. International review of cytology - Supplement 11 A chapter 4^o - Academic Press.