



“L'utilizzo delle tecniche *in vitro* per le piante succulente”

La possibilità di poter **disporre di prodotti innovativi, risulta fondamentale per mantenere la vitalità del settore delle piante succulente**, soprattutto in questo periodo di crisi generalizzata, dove si registra una pressione competitiva sempre maggiore da parte di paesi in cui la manodopera costa di meno o che presentano condizioni climatiche più favorevoli.

In tale contesto, appare di estremo interesse poter **disporre di sistemi di propagazione rapidi, come la micropropagazione, al fine di poter introdurre velocemente novità in una catena di produzione massale**, sia mediante una diretta produzione *ex vitro*, sia attraverso la costituzione di piante madri *ex vitro* da cui sviluppare successivamente la produzione massale di piante *in vivo*.

L'Istituto Regionale per la Floricoltura di Sanremo e nello specifico il settore Coltura di Tessuti **a partire dal 2011 ha iniziato l'attività di propagazione *in vitro* di piante succulente**, mettendo a frutto l'esperienza già acquisita con

altre piante ornamentali. Su richiesta delle Aziende, le tecniche di coltura *in vitro* sono state applicate per molte piante succulente, ed a fine report è riportato un elenco di alcune delle specie/varietà che sono state propagate in laboratorio in questi anni.

Cos'è la micropropagazione?

Una delle applicazioni più importanti della coltura *in vitro* è la micropropagazione, tecnica di propagazione vegetativa di genotipi selezionati. Allo scopo di ottenere una rapida moltiplicazione partendo da una porzione del vegetale (organo, tessuto, *etc.*), viene indotta la proliferazione di germogli su di un mezzo di coltura idoneo, composto di sali minerali, vitamine, zuccheri e ormoni ed incubato in condizioni di crescita artificiali, lavorando in sterilità.

Questa moltiplicazione può realizzarsi a partire da germogli ascellari o avventizi. Generalmente, il propagatore, al fine di garantire la massima possibilità di propagazione conforme all'originale (ottenimento cloni), preferisce rivolgersi alla proliferazione ascellare, mentre la proliferazione per germogli avventizi può determinare un'elevata instabilità genetica (piante diverse da pianta madre).





Vantaggi

La micropropagazione può permettere:

- **di avviare un ciclo di propagazione a partire anche da una sola pianta o parte di pianta;** questa potenzialità risulta vantaggiosa soprattutto per quegli individui rari o unici, nuovi ibridi o individui frutto di mutazioni che presentano per esempio forme o variegature particolari, sempre molto ricercate dal mercato (es. forme crestate, chimere);
- **di ottenere tassi di moltiplicazione assai elevati, non perseguibili con le tecniche tradizionali di propagazione** (da seme, per talea, innesto) e fondamentali sia per una produzione di tipo massale, sia per incrementare la disponibilità di individui rari, specie a rischio estinzione o specie particolarmente problematiche che presentano capacità riproduttiva limitata e tassi di crescita molto lenti; **questa particolarità è determinata dal fatto che si è svincolati dalle stagioni e dal normale ciclo vitale della pianta (Gonzales and Serpa, 1992) e quindi la moltiplicazione può essere condotta tutto l'anno. Inoltre, l'impiego dei fitoregolatori nel mezzo colturale potenzia il processo di moltiplicazione o lo rende fattibile per le specie recalcitranti;** questa potenzialità risulta vantaggiosa soprattutto per poter moltiplicare e contemporaneamente salvaguardare specie a rischio estinzione (a causa dell'eccessiva raccolta e sfruttamento delle piante madri, distruzione del loro habitat naturale, cambiamenti climatici, etc.) (Fay, 1992; Malda et al., 1999); ne è un esempio *Mammillaria hernandezii*, una specie che nel 1980, grazie all'applicazione di un protocollo di micropropagazione, ha avuto una produzione in grado di soddisfare la richiesta di piante da parte del mercato, ma anche di ridurre il rischio estinzione con la creazione di collezioni fuori dal loro habitat naturale (collezione *ex situ*, Grantham et al., 1999);
- **di essere una valida alternativa quando nella propagazione *in vivo* si osservano marcescenze delle talee durante la radicazione** con conseguente scarso attecchimento;
- di effettuare **semine *in vitro* che portano allo sviluppo della pianta da seme in tempi raccorciati rispetto alla riproduzione sessuale** tradizionale e favoriscono una migliore efficienza nella gestione del materiale vegetale nelle prime fasi di sviluppo;
- di **avere un accorciamento del ciclo, rispetto alla riproduzione per seme, di circa un anno**, come riportato per la moltiplicazione clonale *in vitro* di *Mammillaria woodsii* (Kolar et al., 1976);
- **di moltiplicare piante esenti da patogeni e mantenere in laboratorio stock di piante controllate per gli aspetti fitosanitari;**
- **mediante la coltura di apici meristematici o utilizzando come materiale di partenza il seme è possibile produrre piante esenti da infezioni virali.**



Questi vantaggi introdotti dalla micropropagazione possono, riassumendo, favorire una **rapida introduzione di novità sul mercato.**



Svantaggi

Tuttavia, accanto a questi indiscutibili vantaggi che la micropropagazione può apportare al settore delle piante succulente, bisogna tenere in considerazione anche alcuni fattori limitanti, riscontrati nella sua applicazione, come registrato anche per altre colture:

- **costi maggiori rispetto alle classiche tecniche di moltiplicazione** determinati sia dalla necessità di ammortizzare il **costo elevato iniziale dovuto alla realizzazione del laboratorio commerciale**, sia dal **costo della manodopera** specializzata indispensabile al processo;
- **recalcitranza alla coltura *in vitro* per alcune specie**, seppure selezionate per il particolare interesse economico;
- **possibilità di ottenere varianti somaclonali**; gli elevati tassi di moltiplicazione possono infatti provocare una rapida moltiplicazione di genotipi variati, in particolare in presenza di una moltiplicazione avventizia. La presenza di varianti somaclonali, viceversa, può essere importante per la ricerca di prodotti nuovi rivolti non solo al grande pubblico, ma anche al mondo dei collezionisti che sono sempre alla ricerca di novità, dello 'strano' e non necessariamente del bello.



Le modalità di micropropagazione

La tecnica micropropagazione prevede la realizzazione di diverse fasi:

- **Fase 0 o fase di preparazione della pianta madre**, in cui, dopo la selezione (Fase00) della pianta madre, la medesima pianta da cui inizierà la coltura *in vitro* viene coltivata in condizioni fitosanitarie che favoriscano l'ottenimento successivo di espianti reattivi ed asettici.
- **Fase I o fase d'inoculo *in vitro* e stabilizzazione della coltura asettica**, consiste nel prelievo, disinfezione dell'espianto e stabilizzazione della coltura asettica.
- **Fase II o fase di moltiplicazione**, consiste nella ripetuta moltiplicazione *in vitro* dei germogli, attraverso periodiche subcolture che prevedono la suddivisione dei germogli e il loro trasferimento su un substrato colturale fresco; per ottimizzare questa fase è necessario valutare la composizione del substrato di crescita (fitoregolatori, sali minerali, *etc.*), ma anche altri fattori di crescita come luminosità e temperatura.
- **Fase III o fase di radicazione**, consiste nella formazioni delle radici e quindi nell'ottenimento di una piantina morfologicamente completa; questa fase può essere indotta *in vitro*, tramite l'utilizzo di un appropriato substrato di coltura (utilizzo di auxine, carbone attivo, *etc.*), ma anche direttamente *in vivo*.
- **Fase IV o fase di ambientamento**, prevede l'adattamento progressivo delle plantule alle condizioni di crescita *in vivo*, limitando al massimo lo stress che la pianta deve subire passando dalle particolari condizioni di coltura *in vitro* (temperatura e illuminazione controllata, elevata umidità relativa) a quelle di *vivo*.



La micropropagazione di piante succulente condotta presso il nostro laboratorio di Coltura dei tessuti

Da bibliografia, gli studi condotti sulla micropropagazione delle piante succulente risultano in numero esiguo, soprattutto perchè si tratta di un gruppo di piante estremamente diversificato per cui anche le conoscenze già acquisite non possono essere facilmente generalizzate.

Risulta solitamente necessario, ogni volta che si seleziona una specie di particolare interesse individuare un protocollo con prove sperimentale per valutare le diverse fasi e nello specifico i substrati colturali ottimali, le modalità di lavorazione delle piante, etc.

Presso il nostro laboratorio, su richiesta di Aziende locali e con la loro collaborazione, sono state propagate *in vitro* più di 40 varietà /specie di piante succulente appartenenti a diversi generi e famiglie, per una produzione media annuale di circa 15.000 piante micropropagate.



- Realizzata ad IRF la propagazione *in vitro* di circa 40 specie
- Famiglie e Generi maggiormente propagati:
 - » *Crassulaceae* (*Crassule e Echeverie*)
 - » *Liliaceae* (*Aloe, Gasteria e Gasteraloe*)
 - » *Cactaceae* (*Astrophytum, Copiapoa, Opuntia, Notocactus*)
 - » *Agavaceae* (*Agave*)
 - » *Haworthiae* (*Haworthia*)
- Produzione media/annuale di circa 15.000 piante micropropagate
- Produzione richiesta da una 5-8 aziende locali

Di seguito, vi riportiamo uno schema dettagliato delle diverse FASI OPERATIVE previste nel contratto che l' IRF stipula con le Aziende che richiedono la micropropagazione delle piante succulente .



Schema delle FASI OPERATIVE sviluppate nel contratto di micropropagazione delle piante succulente

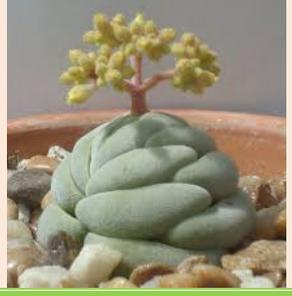
Glossario per i termini tecnici usati nel presente contratto:

- Genotipo= si riferisce all'insieme di tutti i geni che compongono il DNA (corredo genetico) di un organismo o di una popolazione. In questo contratto, si riferisce alla pianta selezionata dall'AZIENDA e di cui si intende procedere alla clonazione
- Micropropagazione= si intende la tecnica di moltiplicazione in vitro che porta a plantule acclimatate alle condizioni di vivo. In questo contratto sono considerate tutte le Fasi operative di un protocollo standard di micropropagazione.
- Plantule *ex vitro*= si riferisce alla pianta micropropagata alla fine del periodo di acclimatazione in vivo, pronta per essere trasferita nell'AZIENDA
- Varietà= si intende una parte ristretta all'interno di una specie biologica, avente caratteristiche in qualche modo distinguibili dalla rimanente popolazione. In questo contratto, il termine si riferisce a varietà per cui l'AZIENDA abbia chiesto la protezione in Europa (PBR) o in altri Paesi

FASE	DESCRIZIONE FASE	TEMPISTICHE
0- Consegna del materiale vegetale ad IRF	L'Azienda dopo aver selezionato il materiale vegetale, lo prepara per la consegna ai laboratori IRF. Garantisce la buona qualità dello stesso e dichiara di essere venuta regolarmente in possesso del materiale vegetale e dichiara, se del caso, la regolare detenzione di diritti di protezione varietale. L'IRF si riserva di non ritirare materiale che non corrisponda a tali requisiti e, se necessario, eseguirà analisi fitopatologiche atte ad escludere la presenza di infezioni patologiche	da concordare tra le Parti
I- Prove preliminari di reattività alla coltura in vitro	Questa fase è a carico del laboratorio IRF. Verifica della reattività in vitro del materiale consegnato (efficacia del processo di sterilizzazione, qualità e tempistiche di crescita dell'espianto, indicazioni sul terreno di coltura e preliminare valutazione del mantenimento di caratteristiche come variegatura, crestatura..). Al termine di questa fase, l'IRF comunicherà all'azienda i risultati ottenuti	entro 6 mesi dalla consegna
II- Messa a punto del protocollo di micropropagazione	Questa fase è a carico del laboratorio IRF. Ricerca bibliografica, prove sperimentali rivolte a definire il miglior protocollo di micropropagazione con definizione di tutte le fasi fino all'acclimatazione del materiale ex vitro. Nel corso di questa fase, potrebbe essere necessario eseguire dei test fitopatologici a garanzia della produzione stessa. Obiettivo della fase II sarà di creare uno stock di plantule in vitro (fino ad un max di 40 piante/genotipo) e una campionatura di piante in vivo (fino ad un max di 100 piante/genotipo). Valutazioni preliminari relative al costo/pianta per una produzione massale. Al termine di questa fase, l'Azienda comunicherà ad IRF la volontà di procedere nella produzione e/o la conservazione in vitro del genotipo clonato	12 -14 mesi
III- Produzione di plantule ex vitro	L'IRF si impegna nella produzione di plantule ex vitro a partire dal materiale vegetale clonato nella fase II e dietro specifica richiesta dell'Azienda. Le Parti convengono di pianificare la produzione in accordo ai parametri di efficienza evidenziati nella fase II e nel rispetto della capacità produttive del laboratorio IRF sia in termini di genotipi che di numero plantule/genotipo. Le plantule micropropagate saranno consegnate già acclimatate e direttamente utilizzabili nelle strutture aziendali	da concordare tra le Parti
IV- Conservazione in vitro del genotipo selezionato e micropropagato	Alla fine della Fase II, IRF ha creato uno stock in vitro del genotipo clonato che sarà utilizzato per la Fase di produzione (Fase III). Qualora l'Azienda, dopo la Fase II non fosse intenzionata a procedere alla Fase III al fine di effettuare verifiche agronomiche e commerciali, l'IRF potrà attivare il servizio di conservazione in vitro (Fase IV) per un anno dalla fine della Fase II. In ogni caso, la Fase IV di conservazione potrà essere confermata per un massimo di due anni dalla fine della Fase II; al termine di tale periodo l'Azienda dovrà confermare definitivamente se è intenzionata ad una produzione (Fase III) o se intende abbandonare la produzione del genotipo clonato	da concordare tra le Parti



Foto di alcune delle piante micropropagate nel nostro laboratorio

<i>Abromeitiella sp</i>	<i>Agave pumila</i>	<i>Aloe hawortioidea variegata</i>
		
<i>Crassula alstonii</i>	<i>Crassula 'Budda's temple'</i>	<i>Crassula columella</i>
		
<i>Crassula cornuta</i>	<i>Crassula cornuta minima</i>	<i>Crassula deceptor</i>
		
<i>Crassula fusca</i>	<i>Crassula pyramidalis</i>	<i>Crassula tecta</i>
		



<i>Echeveria 'Compton Carousel'</i>	<i>Echeveria colorata "Mexico Giant"</i>	<i>Echeveria cuspidata var zaragoza</i>
		
<i>Echeveria subrigida</i>	<i>Gasteraloe "Green Ice"</i>	<i>Gasteria batesiana cv barbeton</i>
		

Alcune fonti bibliografiche relative ad applicazioni della coltura *in vitro* alle piante succulente

Abrie AL, Van Staden J (2001) **Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. *Plant growth regul* 33:19.23**

Amoo S, Finnie J.F, Van Staden J (2009) **Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of in vitro propagated *Huernia hystrix*. *Plant cell Tiss Organ Cult* 99:233-238**

Fay MF (1992) **Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods *In vitro cell Dev Biol-Plant* 28:1-4**

Frello S, Venerus, Serek M (2002) **Regeneration of various species of *Crassulaceae*, with special reference to *Kalanchoe*. *J Hort Sci Biotechnol* 77:204-208**

Gonzales M, Serpa M (1992) **Micropropagation de *Neprolepsis exalant* L. *Horti. Science* 27(6); 697**

Grantham K, Klaassen P (1999) **The plantfinder's guide to Cacti&other succulents. Oregon, Timber Press.**

Ivanova M, Novák O (2006) **Endogenous cytokinins in shoot of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents, *Plant growth regul* 50:219.230**

Karpoff AJ (1982) **Hormones and early *in vitro* development of epiphyllous propagules on *Bryophyllum calycinim*. *Am J Bot* 69:348-355**

Khalafalla M.M, Abdellatif E., Mohamed M.M, Osman M.G (2007) **Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool combat desertification in arid and semi arid regions. *Int. J.Sustain. Crop Prod.* 2(4):1-8**

Kolar Z, Bartek J, Viskot B (1976(1976) **Vegetative propagation of cactus *Mamillaria woodsii* trough tissue cultures. *Experientia* 32: 668-669**



Malda G, Suzàn H, Backhus Ret (1999) ***In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism.** *Sci Hort* 81:71-87

Perez Molphe Balch E, Perez Reyes M E, Villalobos Amador E, Meza rangel E (1998) **Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation.** *In vitro Cell. Dev. Biol- Plant* 34:131.135

Saifullah K, Sheeba N, Kashif A, Samreen Z (2006) **Direct organogenesis of *Kalankoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot-tips.** *Pak.J. Bot.* 38(4) : 977-981

Salazar E, Gonzales P, Hernández C (2009) ***In vitro* multiplication of *Agave cocui* Trelease through axillary buds.** *Agronomia Trop.* 59(2): 129-135

Sanchez-Urbina A, Ventura-Canseco L.M.C., Ayora-Talavera T, Abud-Archila M, Pérez-Ferrera M.A., Dendooven L, Gutiérrez Miceli F.A (2008) **Seed Germination and *in vitro* Propagation of *Agave grijalvensis* an Endemic Endangered Mexican Species.** *Asian Journal of Plant Science*

Sawsan S, Sayed S, Abou-Dahab T.A., Youssef E.M.A (2004) ***In vitro* propagation of cactus (*Cereus peruvianus* L.).** *Arab J. Biotech.*, 8(1):169-176

Shagufta N, Sumera J, Saiqa I, Aamir A (2009) **An efficient protocol for rapid multiplication of *Bryophyllum pinnatum* and *Bryophyllum daigremontianum*.** *Pak.J. Bot.* 41(5):2347-2355