



Alberto Bertolini e Angelo Vianello
**Micropropagazione di popolazioni
endemiche di gentiana maggiore del
Friuli Venezia Giulia**

Parole chiave: Micropropagazione, Gentiana lutea, Colture cellulari

Keywords: Micropropagation, Gentiana lutea, Cell cultures

Contenuto in: Sviluppo della filiera produttiva della gentiana maggiore in Friuli Venezia Giulia

Curatori: Romano Giovanardi e Marco Barbaro

Editore: Forum

Luogo di pubblicazione: Udine

Anno di pubblicazione: 2009

Collana: Ambiente e territorio

ISBN: 978-88-8420-606-0

ISBN: 978-88-3283-049-1 (versione digitale)

Pagine: 35-49

DOI: 10.4424/978-88-8420-606-0-04

Per citare: Alberto Bertolini e Angelo Vianello, «Micropropagazione di popolazioni endemiche di gentiana maggiore del Friuli Venezia Giulia», in Romano Giovanardi e Marco Barbaro (a cura di), *Sviluppo della filiera produttiva della gentiana maggiore in Friuli Venezia Giulia*, Udine, Forum, 2009, pp. 35-49

Uri: <http://forumeditrice.it/percorsi/scienza-e-tecnica/ambiente-territorio/sviluppo-della-filiera-produttiva-della-gentiana-maggiore-in-friuli-venezgia-giulia/micropropagazione-di-popolazioni-endemiche-di>

MICROPROPAGAZIONE DI POPOLAZIONI ENDEMICHE DI GENZIANA MAGGIORE DEL FRIULI VENEZIA GIULIA

Alberto Bertolini, Angelo Vianello¹

1. Introduzione

1.1 La micropropagazione

La micropropagazione è una moderna tecnica di propagazione vegetativa, basata sulla capacità di diversi organi, tessuti o cellule di dare origine a nuove piante. Questa tecnica porta all'ottenimento di cloni di piante in modo molto più rapido rispetto alle normali tecniche di propagazione agamica (talea, margotta ecc.). L'obiettivo di tale metodologia è di ottenere in tempi brevi e a costi contenuti un elevato numero di piantine, genotipicamente identiche alla pianta di partenza (pianta madre), precedentemente selezionata per caratteristiche produttive di pregio.

I vantaggi della micropropagazione sono numerosi, come per esempio: la scarsa esigenza di spazio per avviare una coltura cellulare; la possibilità di variare i nutrienti forniti alla pianta e, quindi, di regolarne lo sviluppo; la possibilità di produrre diversi cloni di specie la cui propagazione vegetativa risulta lenta e difficoltosa; l'indipendenza della produzione dal ciclo stagionale; la possibilità di conservare per lungo tempo il materiale propagato; infine, non trascurabili sono i netti vantaggi economici. Tuttavia, vi sono anche diversi svantaggi, alcuni molto significativi, tra cui la necessità di personale specializzato e conoscenze tecniche, indispensabili per avviare una coltura cellulare. Altri appaiono di più facile risoluzione, come la difficoltà nella fase di acclimatazione delle plantule micropropagate, il controllo di possibili contaminazioni e le variazioni genetiche spontanee che il materiale può subire durante la fase di callogenese.

I primi tentativi di realizzare colture di tessuti vegetali *in vitro* risalgono al 1902, quando il tedesco Haberlandt realizzò esperimenti volti a dimostrare la possibilità di coltivare cellule, tessuti e organi di piante a prescindere dall'intero organismo. Il presupposto di questi studi era la totipotenza cellulare, intesa come capacità di una singola cellula di dividersi e differenziarsi producendo tutti i tessuti appartenenti a un dato organismo, compresi i tessuti extraembrionali.

¹ Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante, Sezione di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Udine.

Lo sviluppo di queste tecniche subì una notevole accelerazione con la scoperta di due categorie di fitormoni: le auxine e le citochinine. Il ruolo di auxine e citochinine fu evidenziato da Skoog e Miller nel 1957, i quali osservarono che una forte concentrazione di auxine nel terreno di coltura promuoveva la formazione di radici nella pianta, mentre la presenza di citochinine dava origine a gemme. Grazie a successive ricerche si notò che, se si realizzava un equilibrio fra le concentrazioni di auxine e citochinine, le cellule messe in coltura crescevano sotto forma di un ammasso disorganizzato, denominato callo. Quest'ultimo è un tessuto in grado di proliferare continuamente, dando origine a una massa istologica di forma irregolare, le cui cellule sono del tutto indifferenziate e capaci di moltiplicarsi spontaneamente. Questa condizione può essere mantenuta più o meno indefinitamente, se si effettuano regolarmente trasferimenti su terreno fresco.

Teoricamente ogni tessuto prelevato dalla pianta è capace di proliferare per formare un callo, ma la formazione di quest'ultimo dipende da numerosi fattori, fra cui l'età del tessuto e il grado di differenziazione cellulare. Di conseguenza diventa di primaria importanza, per l'allestimento di una coltura tissutale, la scelta di un adeguato espianto parentale.

Ulteriori progressi nella conoscenza delle tecniche di micropropagazione si ottennero con la messa a punto di terreni nutritivi sempre più complessi, fino ad arrivare alla formulazione di un terreno chimicamente definito, adottato poi nella maggioranza degli esperimenti su colture cellulari (Murashige and Skoog, 1962).

La capacità delle cellule di formare un tessuto calloso è di fondamentale importanza; infatti, dallo stadio di callo è possibile rigenerare un'intera pianta, genotipicamente identica alla madre, grazie alle tecniche dell'organogenesi e dell'embriogenesi somatica.

1.2 L'organogenesi come tecnica di micropropagazione

L'organogenesi è una tecnica che si basa sulla produzione di organi direttamente da un tessuto calloso o a partire da tessuti vegetali quali meristemi apicali, gemme ascellari o segmenti internodali che, posti sul terreno di coltura, crescono e generano direttamente nuovi organi (radici o gemme).

Il tessuto è mantenuto sul terreno d'induzione, da cui si formeranno uno o più germogli; segue la fase di radicazione *in vitro* o *ex vitro* e il successivo trasferimento delle plantule *in vivo*, in condizioni naturali di crescita.

Il terreno utilizzato per la fase di moltiplicazione deve essere addizionato con elevate concentrazioni di citochinine (per esempio, benzilamminopurina) e basse concentrazioni di auxine (ad esempio acido indolacetico). Le auxine svolgono il ruolo di favorire l'allungamento delle gemme neoformate. Questi fitoregolatori, inoltre, assicurano lo sviluppo dei tessuti e la conseguente crescita di organi vegetativi specifici. L'obiettivo di questa fase è aumentare il numero di propaguli da far poi radicare allo stadio di plantule. Per ottenere questo risultato si rende necessario trasferire tutte le nuove gemme che si forma-

no su terreni freschi, affinché vi sia la massima disponibilità di nutrienti e un aumento nel numero di plantule in coltura in grado di generare piante intere. Il momento più delicato dell'intero processo di organogenesi è costituito dalla fase di radicazione e, successivamente, di acclimatazione. Il materiale vegetale ottenuto è incapace di sviluppare l'apparato radicale e deve perciò essere trasferito su un terreno con alte concentrazioni di auxine per favorire la crescita delle radici. Questo processo può risultare particolarmente delicato per la pianta, in quanto può causarne addirittura la morte. Se queste fasi hanno avuto esito positivo, si può procedere all'acclimatazione in ambiente naturale.

1.3 L'embriogenesi somatica come tecnica di micropropagazione

Durante il corso dell'evoluzione, diverse specie di piante hanno sviluppato vari metodi di embriogenesi asessuale, fra cui l'embriogenesi somatica, al fine di superare fattori ambientali e genetici che ne impedivano la riproduzione sessuale. Tale tecnica può essere definita come un processo attraverso cui le cellule somatiche danno origine a embrioni. Gli embrioni somatici hanno una forte somiglianza morfologica con quelli zigotici: sono bipolari e presentano i tipici organi presenti nell'embrione stesso; tuttavia, si sviluppano in maniera diversa. L'embriogenesi somatica in condizioni naturali avviene molto raramente, di solito negli ovuli (per esempio *Paeonia*) e ancor più raramente nelle foglie (per esempio *Asplenium*). Fin dalla prima osservazione della presenza di embrioni somatici in sospensioni cellulari di *Daucus carota*, l'embriogenesi somatica si è rivelata come una grande potenzialità per numerose colture cellulari vegetali, tanto che in questi ultimi quarant'anni questa tecnica è stata descritta per un gran numero di specie di piante.

Gli embrioni somatici possono svilupparsi da una singola cellula o da un gruppo di cellule. Le successive divisioni cellulari portano alla produzione di un gruppo di cellule che originano una struttura organizzata, detta embrione globulare (*globular embryo*). Successivi accrescimenti portano a un embrione a forma di cuore (*heart-stage embryo*) e all'embrione a siluro (*torpedo-stage embryo*), da cui la pianta può essere rigenerata.

L'embriogenesi somatica si articola in quattro fasi (fig. 1):

Induzione di una coltura embriogenica. La micropropagazione per embriogenesi somatica segue le fasi generali di tutti i processi di rigenerazione. Partendo, quindi, dalla scelta della pianta madre che deve possedere caratteristiche di interesse, si passa poi a definire le procedure per la realizzazione di una coltura in sterilità. La regressione delle cellule allo stadio indifferenziato (callogenico) avviene attraverso l'utilizzo di terreni addizionati con auxine e citochinine.

Proliferazione. Una volta che le cellule embriogeniche si sono formate, esse continuano a svilupparsi sotto forma di masse con caratteristiche proembriogeniche (*pro-embryogenic masses*, PEM). Le auxine sono necessarie per la formazione di PEM, tuttavia inibiscono lo sviluppo di questo aggregato verso

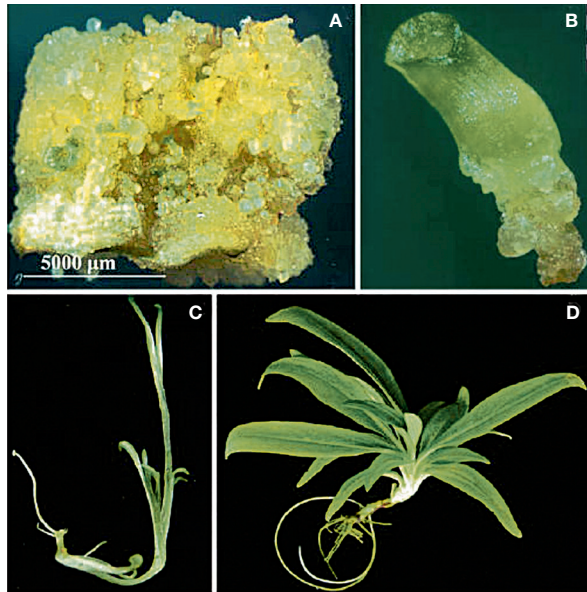


Fig. 1. Sviluppo dell'embriogenesi somatica in *Gentiana kurroo* Royle. (A) Stadio globulare degli embrioni. (B) L'embrione presenta lo sviluppo cotiledonare. (C) L'apparato radicale e i cotiledoni sono sviluppati. (D) La piantula ha foglie e radici ben formate (adattata da Rybczynski *et al.*, 2007).

la formazione di embrioni veri e propri. È utile sottolineare che tanto più le cellule sono mantenute sottoforma di PEM, tanto maggiore sarà la possibilità che esse vadano incontro a variazioni genetiche somaclonali spontanee. Pertanto, già dopo pochi giorni, è indispensabile trasferirle su terreni privi di fitoregolatori della crescita, come le auxine.

Maturazione. Durante la fase di maturazione gli embrioni somatici attraversano cambiamenti morfologici e biochimici responsabili dello sviluppo degli organi cellulari e dei cotiledoni. Tali cambiamenti avvengono in concomitanza con la deposizione di sostanze di riserva, con l'inibizione della germinazione e con l'acquisizione della tolleranza all'essiccazione (Thomas, 1993). La maturazione degli embrioni termina generalmente con un essiccamento che comporta una riduzione graduale delle attività metaboliche. Nel momento in cui le condizioni di concentrazione idrica divengono favorevoli, si ha il passaggio dalla fase di maturazione a quella di germinazione.

Germinazione e rigenerazione delle piante. L'embriogenesi somatica è un processo molto complesso in cui la qualità dei prodotti finali dipende dalla bontà dei trattamenti per la formazione e la germinazione degli embrioni. Solamente gli embrioni che hanno accumulato sufficienti sostanze di riserva e acquisito la tolleranza all'essiccazione (al termine della maturazione), possono svilupparsi e diventare piante normali.

1.4 La micropropagazione di *Gentiana* sp.

Le ricerche sulla micropropagazione del genere *Gentiana* hanno seguito diversi protocolli, nessuno dei quali si è rivelato migliore sotto l'aspetto della

semplicità di utilizzo e dell'economicità, oppure nel fornire la maggior garanzia di risultati. La tecnica più diffusa per la rigenerazione di *Gentiana* è sicuramente l'organogenesi (Skrzypczak *et al.*, 1993; Mikuła e Rybczynski, 1999; Momčilovic *et al.*, 2001). Infatti, sono stati messi a punto vari protocolli per lo sviluppo di questa tecnica, in particolar modo sulle seguenti specie: *Gentiana acaulis* L., *Gentiana cerina* L., *Gentiana corymbifera* L., *Gentiana cruciata* L., *Gentiana davidii* Franch., *Gentiana kurroo* Royle, *Gentiana lutea* L., *Gentiana perfoliata* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana purpurea* L., *Gentiana scabra* L. e *Gentiana triflora* L.

Finora la genziana è stata rigenerata per organogenesi da espunti di foglie (Hosokawa *et al.*, 1996), germogli (Sharma *et al.*, 1993; Hosokawa *et al.*, 1996; Momčilovic *et al.*, 1997), radici (Hosokawa *et al.*, 1996), gemme (Yamada *et al.*, 1991), gemme ascellari (Morgan *et al.*, 1997), meristemi apicali (Sharma *et al.*, 1993) e semi germinati (Butiuc-Keul *et al.*, 2005).

Le conoscenze riguardo l'embriogenesi somatica della famiglia delle *Gentianaceae*, che conta più di 360 specie (Mikuła *et al.*, 2001), si riducono a studi su poche specie quali: *Gentiana crassicaulis* L., *Gentiana cruciata* L., *Gentiana kurroo* Royle, *Gentiana pannonica* L., *Gentiana pneumonanthe* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana tibetica* L. Nel 1994 Bach *et al.* hanno rigenerato, via embriogenesi somatica, piantule di *Gentiana pneumonanthe*, a cui sono seguiti studi sull'embriogenesi di *Gentiana cruciata* L., *Gentiana pannonica* Scop. e *Gentiana tibetica* King che hanno dimostrato i vantaggi di una rigenerazione efficace e a lungo termine (Mikuła e Rybczynski, 2001; Mikuła *et al.*, 2001; Mikuła *et al.*, 2002).

Tuttavia, i lavori concernenti le tecniche di micropropagazione della *Gentiana lutea* sono in numero esiguo (4 su un totale di più di 60 articoli analizzati). Per tale ragione questo progetto di ricerca ha previsto la sperimentazione di tecniche di micropropagazione su popolazioni di *Gentiana lutea* endemiche del Friuli Venezia Giulia, al fine di definire un protocollo di propagazione *in vitro*. Tale analisi poi potrà condurre a successivi studi sulla criopreservazione di un *pool* genetico proveniente da popolazioni endemiche di tale specie e, inoltre, potrà servire a sviluppare una piattaforma per la produzione di metaboliti secondari in grandi quantità attraverso l'utilizzo dei bioreattori.

2. Materiali, metodi e risultati

2.1 Ottenimento degli espunti primari

Le popolazioni di *Gentiana lutea* sono state identificate sulla base delle informazioni fornite dalle Stazioni forestali locali. I semi sono stati localizzati in luoghi in cui questa specie era presente con popolazioni più consistenti e significative, individuando complessivamente otto aree di crescita, ad ognuna delle quali è stato assegnato un nome ed una classe di distribuzione dell'area. Fra queste otto classi sono state individuate cinque popolazioni (indicate in

Tab. 1. Lista dei diversi lotti di semi di *Gentiana lutea*, ordinati secondo la località e la data di raccolta.

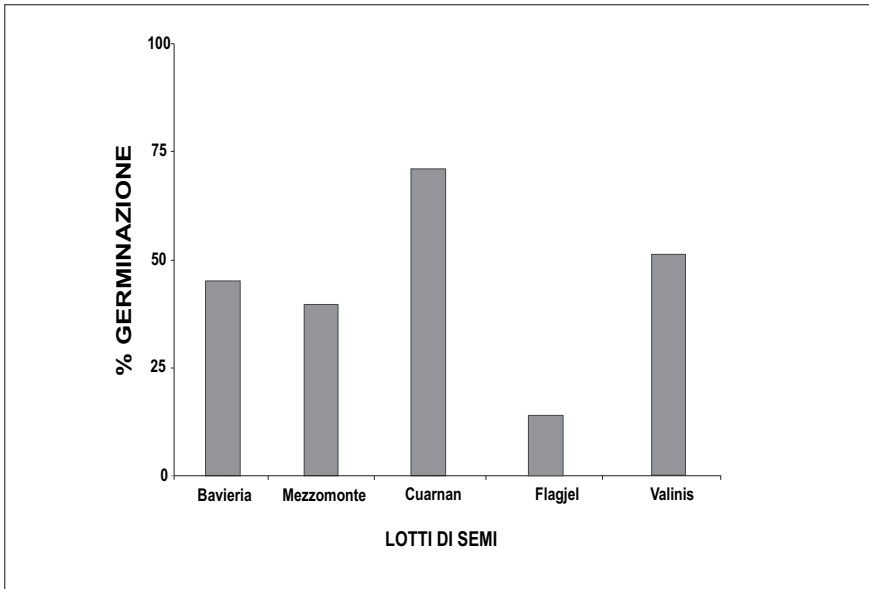
<i>Specie</i>	<i>Località di raccolta</i>	<i>Nome del lotto di semi</i>	<i>Data di raccolta</i>
<i>Gentiana lutea</i> ssp. <i>Symphyantra</i>	monte Flagjel	Flagjel	05/09/2006
<i>Gentiana lutea</i> ssp. <i>Symphyantra</i>	mezzomonte di Piancavallo	Mezzomonte	05/09/2006
<i>Gentiana lutea</i> ssp. <i>Symphyantra</i>	monte Valinis	Valinis	07/09/2006
<i>Gentiana lutea</i> ssp. <i>Symphyantra</i>	monte Cuarnan	Cuarnan	14/09/2006
<i>Gentiana lutea</i> ssp. <i>Lutea</i>	Raccolto da piante nate in coltivazione in Baviera	Baviera	14/08/2006

tab. 1), i cui semi sono serviti per l'ottenimento degli espianti primari. I semi sono stati divisi in lotti da 1000 ed è stato indispensabile lavorare in condizioni di sterilità al fine di evitare la proliferazione di batteri o funghi per garantire il buon esito dell'esperimento.

La sterilizzazione del materiale vegetale è stata ottenuta procedendo come segue: una prima fase di risciacquo con acqua sterile è stata effettuata per rimuovere i residui di polvere e di materiale vegetale grossolano estraneo; in seguito si è preparata una soluzione di etanolo al 70% nella quale sono stati immersi i semi per 2 minuti; si è poi proceduto con una seconda fase di risciacquo con acqua sterile, ed a un lavaggio del materiale vegetale in una soluzione di sodio ipoclorito (5%) per 15 minuti; infine si sono effettuati 3 risciacqui consecutivi lasciando in ammollo i semi per 5 minuti in acqua sterile.

È necessario sottolineare che questo procedimento di sterilizzazione è poco dannoso per la germinabilità del seme. Per il lotto di semi *Flagjel*, invece, si è utilizzata una soluzione 0,1% di $HgCl_2$ (ipoclorito di mercurio), al posto della soluzione di candeggina. Questo trattamento, seppur dannoso per il seme (il mercurio è un metallo molto tossico per l'uomo e le piante) si è rivelato estremamente efficace nella sterilizzazione, sebbene sia da evitare nel caso si stia trattando materiale vegetale destinato ad uso alimentare.

Dopo la sterilizzazione, i semi sono stati disposti in gruppi di 20 in piastra Petri e numerati per seguirne lo sviluppo. Sono stati effettuati controlli con cadenza settimanale, per eliminare le piastre completamente contaminate, per trasferire i semi sani di piastre contaminate in piastre sterili e per valutare i tempi e modi di sviluppo dei cotiledoni, degli ipocotili e delle radici, oltreché per stabilire il tasso di germinabilità. Un valore di germinazione dei semi considerevole era, infatti, indispensabile per ottenere una quantità sufficiente di materiale vegetale (espanti primari), necessario per il prosieguo dell'esperimento. I dati relativi alla germinazione, riportati nel grafico 1, si riferiscono



Graf. 1. Percentuale di germinazione dei 5 lotti di semi di *Gentiana lutea* dopo 35 giorni di coltivazione sul terreno MS.

alla media delle percentuali di semi germinati dopo 35 giorni, durante le due ripetizioni dell'esperimento.

I lotti che hanno dato i risultati migliori sono stati: *Cuarnan* con il 72% di semi germinati, *Valinis* con il 58%; *Baviera* con il 48% e *Mezzomonte* con il 43%; i semi del lotto *Flagjel* hanno espresso la peggior capacità di germinazione (17%).

2.2 Induzione dell'organogenesi

In seguito alla germinazione graduale dei semi in condizioni sterili (fig. 2 A, B, C), le plantule sono state divise in 3 tipi di espianti primari: cotiledoni, ipocotili e radici. È stata poi osservata la capacità degli espianti primari di svilupparsi tramite organogenesi: i dati sono stati riassunti in tabella 2. Le valutazioni sono state eseguite ad intervalli di 20 e 45 giorni dopo la messa a coltura. Nella maggior parte dei lotti in esame e negli espianti primari analizzati, è possibile notare un incremento nella capacità di sviluppo dell'organogenesi col passare del tempo. Lo sviluppo è avvenuto nella maggior parte dei casi durante gli ultimi 25 giorni, tranne che per i cotiledoni del lotto *Flagjel* e gli ipocotili *Baviera*.

I valori di sviluppo dell'organogenesi ottenuti dai 3 differenti espianti primari, analizzati dopo 45 giorni, sono espressi nell'istogramma del grafico 2. Nel lotto *Baviera*, i segmenti più reattivi sono stati i cotiledoni, di cui il 40% degli espianti ha reagito positivamente al terreno.

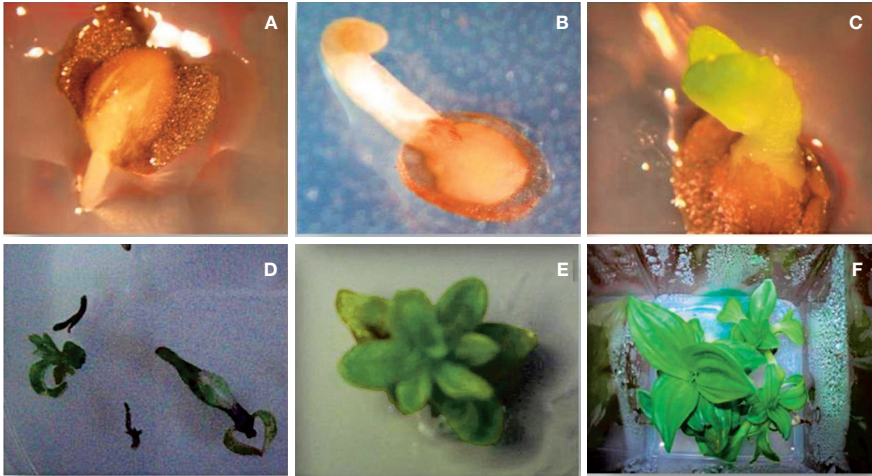


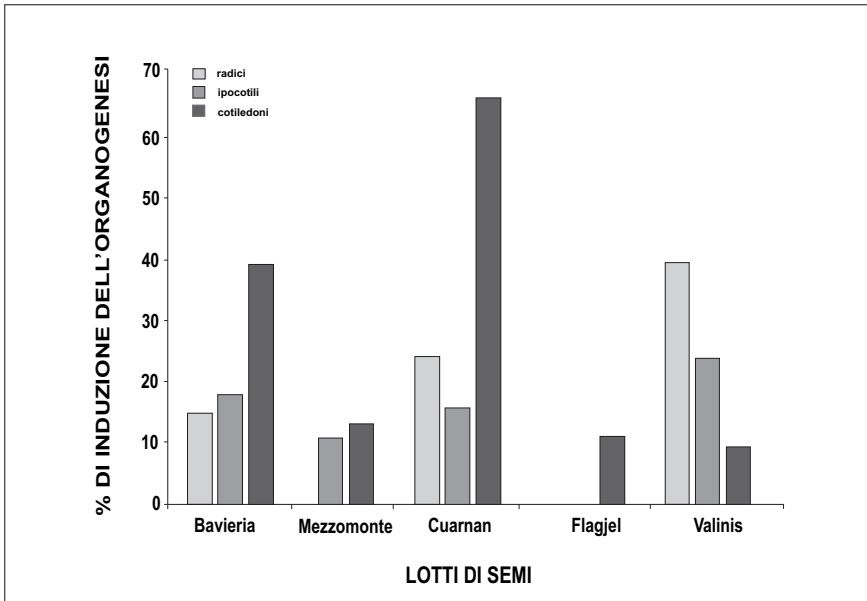
Fig. 2. Sviluppo di un seme del lotto Cuarnan attraverso le fasi di germinazione e di sviluppo dell'organogenesi. (A) Il seme dopo 6 giorni emette l'apice della radichetta. (B) Dopo 10 giorni la radichetta è ormai formata, ma i cotiledoni sono ancora racchiusi dal tegumento. (C) Dopo 15 giorni i cotiledoni si sono aperti rompendo il tegumento che li circondava. (D) I cotiledoni sono stati trasferiti sul terreno di coltura per l'induzione dell'organogenesi e la conseguente formazione di nuovi germogli. La risposta al trasferimento è ancora scarsa (25 giorni dopo la messa a dimora). (E-F) Dopo 45 giorni si sono sviluppati i nuovi germogli.

Il valore più elevato lo si è ottenuto con i cotiledoni del lotto *Cuarnan* in cui l'organogenesi è stata indotta nel 66% dei casi, mentre solamente il 14% degli ipocotili ha fornito reazioni positive. La formazione dei nuovi germogli a partire dai cotiledoni del lotto *Cuarnan* si può osservare nella figura 2 (D, E, F). All'interno del lotto *Flagjel* solamente i segmenti della radice hanno dimostrato capacità di sviluppo per quanto riguarda l'organogenesi.

I risultati più negativi sono stati ottenuti con il lotto *Mezzomonte*, in cui si sono riscontrati valori di sviluppo dell'organogenesi dello 0% nelle radici e dell'11,1% e del 14,3%, rispettivamente negli ipocotili e nei cotiledoni.

Tab. 2. Confronto tra le capacità di induzione dell'organogenesi con riferimento ai differenti lotti e agli espianti primari (cotiledoni, ipocotili e radici). Le valutazioni sono state effettuate dopo 20 e 45 giorni e i dati sono espressi in percentuale.

Lotto di semi	Espianti vegetali					
	Radici		Ipicotili		Cotiledoni	
	Periodo di valutazione					
	20 gg.	45 gg.	20 gg.	45 gg.	20 gg.	45 gg.
Baviera	0,0	14,0	16,6	16,6	20,0	40,0
Mezzomonte	0,0	0,0	0,0	11,1	14,3	14,3
Cuarnan	0,0	25,0	0,0	14,0	22,0	66,0
Flagjel	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	12,5
Valinis	0,0	14,0	0,0	16,6	20,0	40,0



Graf. 2. Confronto fra le capacità di risposta dei 5 lotti di *Gentiana lutea* e degli espianti al terreno d'induzione dell'attività organogenica.

2.3 Induzione dell'embriogenesi somatica

Così come descritto per la sezione riguardante l'organogenesi, i semi germinati sono stati divisi in tre espianti primari (radici, ipocotili e cotiledoni) e posti sul terreno d'induzione dell'embriogenesi somatica.

Gli espianti primari sono stati sottoposti a valutazione riguardo l'induzione dell'attività embriogenica i cui risultati sono espressi in tabella 3. Le valutazioni sono state effettuate dopo 20 e 45 giorni dalla messa a dimora sul terreno.

Tab. 3. Confronto tra le capacità di induzione dell'embriogenesi con riferimento ai differenti lotti di semi e agli espianti primari (cotiledoni, ipocotili e radici). I dati sono espressi in percentuale.

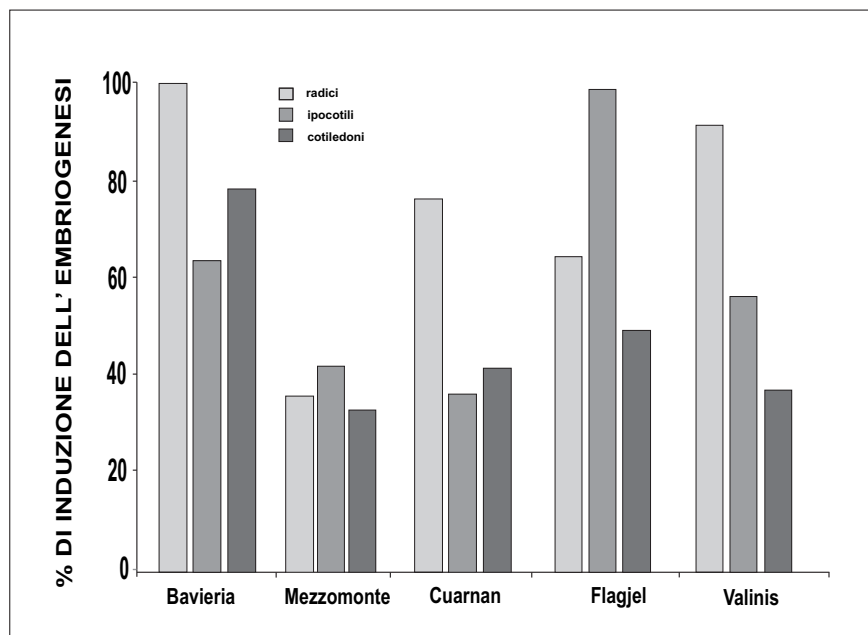
Lotto di semi	Espianti vegetali					
	Radici		Ipocotili		Cotiledoni	
	Periodo di valutazione					
	20 gg.	45 gg.	20 gg.	45 gg.	20 gg.	45 gg.
Baviera	68,9	100,0	31,6	66,1	53,5	78,5
Mezzomonte	36,4	36,4	42,6	42,6	13,8	33,3
Cuarnan	47,3	78,5	10,0	37,1	18,3	43,6
Flagjel	66,7	66,7	66,9	100,0	50,0	50,0
Valinis	47,2	91,6	39,3	59,3	25,6	39,3

Lo sviluppo embriogenico più pronunciato fra i vari segmenti vegetali è stato ottenuto con le radici, in particolar modo quelle del lotto *Baviera* (valore medio fra le due valutazioni di 84,4%) e *Flagjel* (valore medio di 66,7%). I risultati peggiori sono stati ottenuti con il lotto *Mezzomonte* (valore medio di 36,4%). È interessante notare che solo in due casi si sia ottenuto il 100% di sviluppo embriogenico, e cioè negli ipocotili del lotto *Flagjel* e nelle radici del lotto *Baviera*, gli stessi lotti che peraltro hanno fornito i risultati più elevati nella risposta da parte dei cotiledoni, senza però raggiungere la totalità di riscontri positivi.

Generalmente gli espianti hanno indicato uno sviluppo di strutture riconducibili all'attività embriogenica (come descritto da Mikula *et al.*, 2005) in maniera proporzionale al passare del tempo. Questo è il caso di *Baviera*, in cui si è notato un raddoppio nei segmenti vegetali degli ipocotili che hanno risposto positivamente dopo 20 e 45 giorni (si è passati dal 31,6% al 66,1%), e di *Cuarnan*, che ha quasi raddoppiato la percentuale di risposta delle radici (passando dal 47,3% al 78,5%).

Lo sviluppo complessivo di maggior entità riguarda il lotto *Baviera*, seguito da quello del lotto *Flagjel*, che in tutti i segmenti vegetali ha fornito percentuali di sviluppo superiori al 50%. Questi dati sono illustrati nell'istogramma del grafico 3.

Il lotto *Mezzomonte* ha esibito uno sviluppo pressoché identico in radici, ipocotili e cotiledoni, seppur in percentuali piuttosto limitate (30-40%). Analiz-



Graf. 3. Percentuale di risposta dei 5 lotti e degli espianti al terreno di induzione dell'attività embriogenica.

zando l'intero campione, i segmenti vegetali che hanno fornito risultati migliori sono stati le radici, poi gli ipocotili e infine i cotiledoni.

Le tre parti della plantula che sono state poste sul terreno di coltura sono illustrate nella figura 3 (dal basso verso l'alto: radice, ipocotile e cotiledone). La foto è stata scattata dopo 25 giorni dalla messa a coltura. La radice e l'ipocotile (fig. 3, C e B) hanno perso la loro conformazione e consistenza originaria, evolvendo verso un colore giallo-arancio, assumendo una consistenza granulosa e aumentando di superficie. I due cotiledoni (fig. 3, A) non hanno subito grandi modificazioni, mentre la parte apicale fra i cotiledoni ha cambiato colore diventando giallognola e gonfiandosi.

La figura 4 descrive lo sviluppo temporale di un seme proveniente dalla

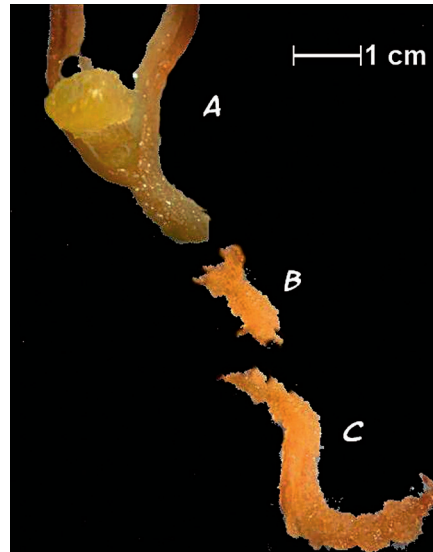


Fig. 3. Reazione di differenti espianti (radici, ipocotile e cotiledoni) del lotto *Baviera* durante la permanenza sul terreno d'induzione dell'embriogenesi somatica. (A) i due cotiledoni, (B) l'ipocotile, (C) la radice.

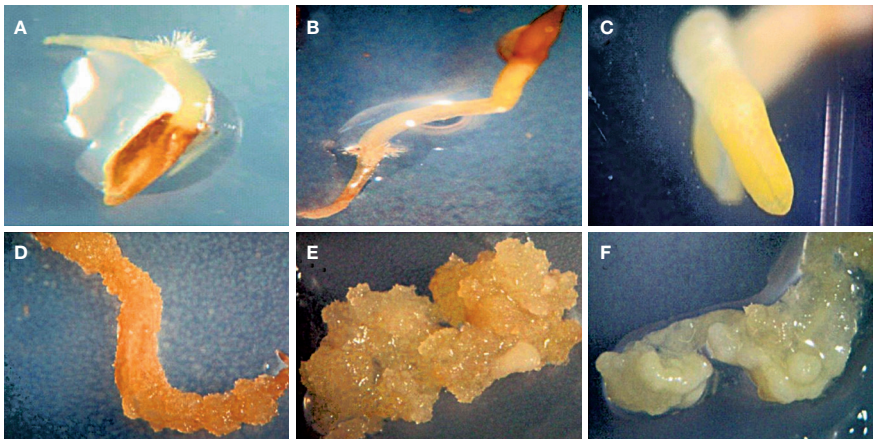
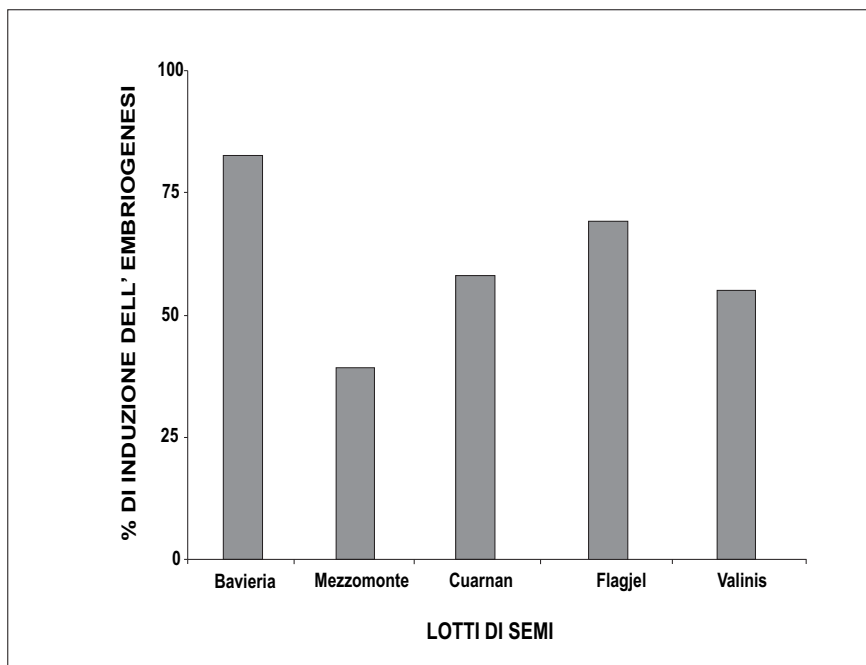


Fig. 4. Sviluppo temporale di un seme del lotto *Valinis* posto su terreno di germinazione e successivamente su quello per lo sviluppo dell'embriogenesi somatica. (A) Il seme dopo 5 giorni emette la radichetta. Si può notare la distinzione fra radice e ipocotile. I cotiledoni sono ancora chiusi dentro il tegumento. (B) La radice si allunga e la linea che demarca l'ipocotile dalla radice si fa più evidente, ma dopo 8 giorni i due cotiledoni sono ancora racchiusi dal tegumento del seme. (C) Dopo 10 giorni i cotiledoni si stanno aprendo. (D) Dopo 20 giorni, la radice viene isolata dall'ipocotile e dai cotiledoni e messa a dimora sul terreno per lo sviluppo dell'embriogenesi somatica. Dopo una settimana si osserva un colore ambrato e un rigonfiamento. (E) Dopo 35 giorni la radice ha perso la sua forma e colore originali. (F) Dopo 45 giorni si nota uno sviluppo più regolare, con la tendenza alla formazione di aggregati di cellule proembriogeniche di forma tubulare.



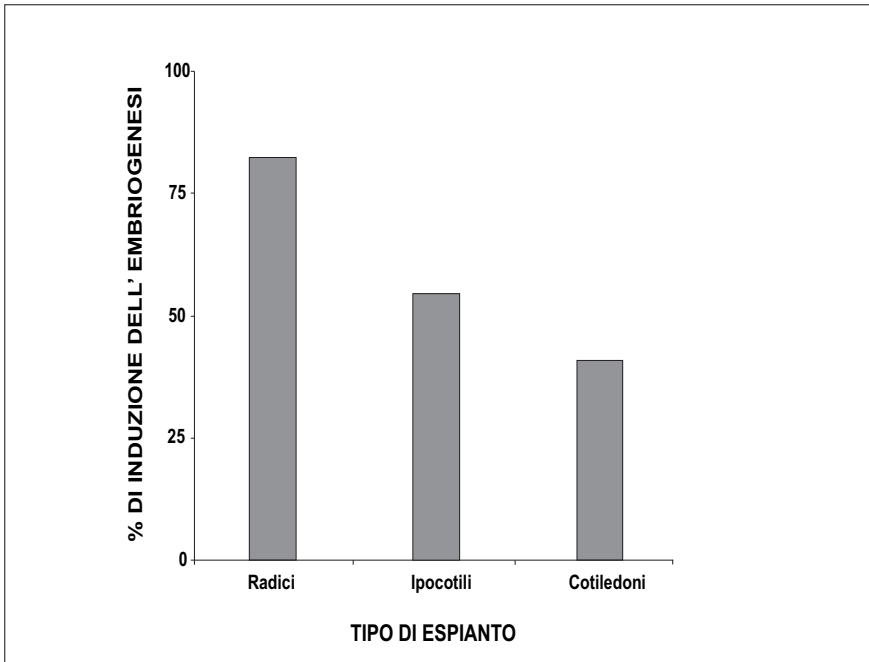
Graf. 4. Confronto fra le capacità di risposta dei 5 lotti di *Gentiana lutea* al terreno di induzione dell'attività embriogenica.

località di raccolta *Valinis* nel terreno di germinazione, seguito dal periodo d'induzione dell'embriogenesi somatica.

Le medie delle percentuali d'induzione dell'organogenesi in ciascun lotto dei tre espianti primari analizzati sono riportate nel grafico 4. Le medie più alte sono quelle del lotto *Baviera* (82%) e dei lotti *Flagjel* (72%) e *Valinis* (63%). Le medie più basse sono quelle di *Cuarnan* (53%) e di *Mezzomonte* (37%). Le medie delle percentuali d'induzione dell'organogenesi fra i lotti analizzati sono invece presentate nel grafico 5. Il valore più alto di sviluppo dell'organogenesi è fornito dalle radici (74,6%), seguito dagli ipocotili (61%) e dai cotiledoni (49%).

3. Conclusioni

L'analisi delle fonti bibliografiche ha suggerito la possibilità di ricorrere alla micropropagazione per ottenere plantule di genziana, in particolare di *Gentiana lutea* L., le cui popolazioni in Friuli Venezia Giulia, data la loro drastica riduzione, richiedono programmi di reintroduzione nell'habitat di origine. A tal fine si è ricorsi sia all'organogenesi, sia all'embriogenesi somatica come potenziali metodologie da impiegare per generare plantule su larga scala, partendo da ecotipi provenienti da cinque località della Regione.



Graf. 5. Confronto fra le capacità di risposta degli espianti di *Gentiana lutea* al terreno di induzione dell'attività embriogenica.

Al momento, tra le due tecniche utilizzate, l'organogenesi sembra presentare maggiori potenzialità di successo rispetto all'embriogenesi somatica. Essa risulta di più facile applicazione, soprattutto in relazione al suo impiego per fini vivaistico-commerciali. È stato, infatti, possibile sviluppare un protocollo di facile applicazione per l'ottenimento di plantule sane da utilizzare successivamente in pieno campo.

L'embriogenesi somatica di *Gentiana lutea* ha, ciò nonostante, rivelato altre potenziali applicazioni. Questa tecnica si è dimostrata efficace nella fase di formazione del tessuto calloso per tutti i lotti di semi saggiati. Tali risultati potranno così essere utilizzati per successivi studi sia sulla criopreservazione delle specie provenienti da popolazioni autoctone, sia per sviluppare una piattaforma per la produzione di metaboliti secondari in grandi quantità, attraverso l'utilizzo di bioreattori.

Bibliografia

- Aeschimann D., Lauber K., Moser M., Theurillat J.P. (2004). *Flora Alpina*. Zanichelli, Bologna.
- Aiello N., Bezzi A. (1998). *Genziana maggiore (Gentiana lutea L.): aspetti biologici, qualitativi e produttivi*. «Agricoltura Ricerca», n. 176, pp. 8-17.

- Aiello N., D'Andrea L., Scartezzini F., Vender C. (1998). *Rimozione della dormienza dei semi di Gentiana lutea L. attraverso la prerefrigerazione e le gibberelline e durata dell'effetto stimolante*. «Agricoltura Ricerca», n. 176, pp. 18-22.
- Bach A., Pawłowska B. (2003). *Somatic embryogenesis in Gentiana pneumonanthe L.* «Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica», n. 45, pp. 79-86.
- Butiuc-Keul A., Şuteu A., Deliu C. (2005). *In vitro organogenesis of Gentiana punctata*. «Notulae Botanicae Horti Agrobotanici. Cluj/Napoca», XXXIII.
- Gobbo G., Poldini L. (2005). *La diversità floristica del Parco delle Prealpi Giulie - Atlante Corologico*. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Parco Naturale delle Prealpi Giulie, Università degli Studi di Trieste - Dipartimento di Biologia, Arti Grafiche Friulane, Udine.
- Hosokawa K., Nakano M., Oikawa Y., Yamasura S. (1996). *Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of Gentiana*. «Plant Cell Reports», n. 15, pp. 578-581.
- Mikuła A., Rybczyński J. (1999). *Present status of Gentiana taxa biotechnology*. (Annual review). «Biotechnologia», n. 4, pp. 1-16.
- Mikuła A., Rybczyński J. (2001). *Somatic embryogenesis of Gentiana genus L. The effect of the precultural treatment and primary explants origin on somatic embryogenesis of Gentiana cruciata L., G. pannonica (Scop.), and G. tibetica (King)*. «Acta Physiologiae Plantarum», vol. 23, n. 1, pp. 15-25.
- Mikuła A., Niedzielski N., Rybczyński J., Kuras M. (2001). *Somatic embryogenesis of gentiana genus. Scanning and ultrastructural analysis of early stages of somatic embryogenesis in liquid medium*. «Biological Bulletin of Poznan», n. 38, pp. 47-53.
- Mikuła A., Tykarska T., Zielinska M., Kuras M., Rybczyński J. (2002). *Ultrastructural analysis of initial stages of dedifferentiation of root explants of Gentiana cruciata seedlings*. «Acta Societatis Botanicorum Poloniae», vol. 71, n. 4, pp. 287-297.
- Mikuła A., Tykarska T., Kuras M., Rybczyński J. (2005). *Somatic embryogenesis of Gentiana cruciata: histological ultrastructural changes in seedling hypocotyl explants*. «Cell. Dev. Biol. Plant», n. 41, pp. 686-694.
- Momčilović I., Grubišić D., Nešković M., Kojić M. (1997). *Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation and plant regeneration of four Gentiana species*. «Plant Cell, Tissue and Organ Culture», n. 50, pp. 1-6.
- Momčilović I., Grubišić D., Nešković M., Kojić M. (2001). *Transgenic Gentiana species (Gentian)*. In Bajaj YPS [ed.], *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 48, Transgenic crops III, pp. 123-138.
- Morgan E.R. (1997). *In vitro propagation of Gentiana cerina and Gentiana corymbifera*. «New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science», Vol. 25, pp. 1-8.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. «Physiologia Plantarum», n. 15, pp. 473-497.
- Poldini L. (1991). *Atlante corologico delle piante vascolari nel Friuli-Venezia Giulia*. Inventario floristico regionale. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia - Azienda Parchi e Foreste Regionali, Università degli Studi di Trieste - Dipartimento di Biologia, Udine.
- Poldini L., Oriolo G., Vidali M. (2002). *La flora vascolare del Friuli Venezia Giulia*. Catalogo annotato ed indice sinonimico. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia - Azienda Parchi e Foreste Regionali, Università degli Studi di Trieste.
- Rybczyński J., Borkowska B. (2007). *Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of in vitro cultures Gentiana kurroo (Royle) germlings*. «Acta Physiologiae Plantarum», n. 29, pp. 445-453.
- Sharma N., Chandel K.P.S., Paul A. (1993). *In vitro propagation of Gentiana kurroo – an indigenous threatened plant of medicinal importance*. «Plant Cell, Tissue and Organ Culture», n. 34, pp. 307-309.

- Skrzypczak L., Wesolowska M. & Skrzypczak E. (1993). *Gentiana Species: In vitro culture, regeneration and production of secoiridoid glucosides*. «Biotechnology in Agriculture and Forestry», n. 21, Medicinal and Aromatic Plants IV, pp. 172-186.
- Thomas T.L. (1993). *Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview*. «Plant Cell 5», pp. 1401-1410.
- Yamada Y., Shoyama Y., Nishioka I., Kohda H., Namera A., Okamoto T. (1991). *Clonal micropropagation of Gentiana scabra Bunge var. buergeri Maxim. and examination of the homogeneity concerning the gentiopicoside content*. «Chemical Pharmaceutical Bulletin», n. 39, pp. 204-206.