



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato Scienze Agrarie Forestali e Ambientali
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali
Settore Scientifico Disciplinare AGR/03

TECNICHE INNOVATIVE DI PROPAGAZIONE DI *CAPPARIS SPINOSA L.*

IL DOTTORE
VALERIA GIANGUZZI

IL COORDINATORE
CHIAR. MO PROF. VINCENZO BAGARELLO

IL TUTOR
CHIAR. MO PROF. PAOLO INGLESE

CO TUTOR
CHIAR. MO PROF. FRANCESCO SOTTILE

CICLO XXXI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2019

INDICE

PREMESSA	1
1 Introduzione	2
2 Metodi di conservazione delle risorse genetiche vegetali	5
2.1 Conservazione <i>in situ</i>	7
2.2 Conservazione <i>ex situ</i>	8
2.2.1 Colture <i>in vitro</i>	8
2.3 Sistemi di immersione temporanea	11
2.4 Stato dell'arte dei sistemi di immersione temporanea	17
3 Cappero	19
4 Bibliografia	21

SCOPO DELLA RICERCA	26
----------------------------------	----

ESPERIMENTO 1

Rigenerazione di germogli di *Capparis spinosa* L.: confronto tra sistema di coltura su substrato solido e sistema ad immersione temporanea attraverso l'utilizzo di Bioreattori

Riassunto	28
1 Introduzione	28
2 Materiale e metodi	30
2.1 Mezzi e condizioni di coltura	31
2.1.1 Substrato solido	31
2.1.2 Sistemi a immersione temporanea PlantForm	33
3 Analisi dei dati	37
4 Risultati e discussioni	38
5 Conclusioni	45

6	Bibliografia	46
---	--------------------	----

ESPERIMENTO 2

Effetto della tipologia di produzione *in vitro* sull'induzione alla radicazione di *Capparis spinosa* L.

Riassunto	51
1 Introduzione	52
2 Materiale e metodi	52
3 Analisi dei dati	54
4 Risultati e discussioni	54
5 Acclimatazione	63
6 Conclusione	65
7 Bibliografia	64
 Conclusioni generali	 69
 Bibliografia	 72
 Ringraziamenti	 74

PREMESSA

La ricchezza di specie, varietà, ecotipi, cultivar, ecc. presente all'interno di un Paese è determinata dalla evoluzione del germoplasma locale in relazione alle molteplici attività antropiche di domesticazione, di miglioramento genetico e di coltivazione operata e dalle testimonianze storiche che rimandano alle colture del passato (Fideghelli e Engel, 2011). Da anni, si assiste ad una costante perdita di biodiversità intraspecifica che richiama la comunità scientifica a prestare sempre più attenzione ai fenomeni di “erosione genetica” che sottopongono a rischio di estinzione diverse specie vegetali. L'uomo, nei millenni, ha sempre saputo valorizzare la variabilità genetica, in un primo tempo in modo inconsapevole, successivamente attraverso l'applicazione di principi di selezione. Anche i cambiamenti nell'uso del suolo, nelle scelte varietali, nella commercializzazione dei prodotti agroalimentari e nell'evoluzione delle logiche di mercato globale, hanno contribuito ad avviare una progressiva perdita di biodiversità che si era accumulata nel corso dei secoli (Barbera, 2001). L'agricoltura moderna, quella con maggiore spinta verso l'industrializzazione, ha puntato all'aumento della produzione per mezzo di varietà altamente efficienti, anche se spesso dipendenti da elevati input energetici come meccanizzazione spinta, esigenze idriche, ecc.

Molti genotipi locali sono andati perduti e quelli attualmente utilizzati mantengono solamente una frazione del patrimonio genetico delle specie di appartenenza, per cui è estremamente limitata la loro capacità di adattamento ai futuri cambiamenti ambientali. La variabilità genetica costituisce la base a cui potere attingere per procedere a programmi di miglioramento genetico per l'ottenimento di varietà migliorate, più produttive e idonee a condizioni agro-ecologiche specifiche, ma se il processo erosivo continua a progredire limiterà sempre più questa risorsa. In tal senso è fondamentale operare un'attività che miri alla conservazione della biodiversità per disporre in futuro di risorse fitogenetiche utili alla promozione di uno sviluppo sostenibile.

La diminuzione delle risorse genetiche vegetali ha reso necessario lo sviluppo di diverse metodologie di salvaguardia della biodiversità, basate su tecniche di conservazione *in situ* ed *ex situ*.

Tra queste, la coltura *in vitro*, risulta essere di grande interesse per la raccolta, la moltiplicazione e la conservazione del germoplasma vegetale (Engelmann, 1991) e rappresenta uno dei metodi complementari più ricorrenti.

Le tecniche di conservazione *in vitro* sono, infine, particolarmente utili per la salvaguardia di risorse genetiche appartenenti a specie che producono semi recalcitranti, specie propagate per via vegetativa e specie ritenute rare e ad alto rischio di estinzione (Engelmann, 2011). La recalcitranza, in termini generali, è definita come l'impossibilità o difficoltà ad ottenere un nuovo individuo vegetale attraverso l'applicazione delle più comuni ed innovative tecniche di propagazione in vivaio (Hartmann et al. 1997).

Alla luce del continuo interesse dimostrato nei riguardi di tali tecniche, è auspicabile la messa a punto di protocolli di propagazione applicabili alle diverse specie e varietà vegetali tali da garantire *in primis* la possibilità di conservare il patrimonio vegetale anche quando caratterizzato da fenomeni di recalcitranza e, nello stesso tempo, permettere lo sviluppo di virtuosi processi di propagazione su scala economicamente efficiente.

1. Introduzione

La biodiversità rappresenta una grande risorsa sia dal punto di vista ambientale che da quello economico e socio-culturale; essa è sempre più in pericolo di estinzione a causa dell'omologazione dei consumi e di forme di agricoltura industrializzata, basata sulla coltivazione di poche varietà altamente produttive.

Il termine Biodiversità per indicare la diversità biologica, viene utilizzato per la prima volta nel 1986 al Forum Nazionale sulla Biodiversità tenutosi a Washington (Wilson e Peter, 1988) e comprende l'intera variabilità delle forme di vita. La biodiversità agricola è un sottoinsieme della diversità biologica generale e comprende la biodiversità microbica, animale e vegetale di interesse per l'alimentazione e l'agricoltura. Essa, quindi, riguarda ogni elemento che, già a partire dal suolo e dalla sua fertilità, contribuisce a costruire un legame stretto tra il territorio e la produzione agricola sapientemente mediata dall'attività dell'agricoltore che adotta tecniche di produzione legate a principi di agroecologia.

È noto che la salvaguardia delle produzioni tipiche e tradizionali permette ordinariamente la valorizzazione delle specificità del territorio di origine, in relazione all'elemento culturale, sociale e, non meno importante, quello ambientale.

Queste considerazioni, negli ultimi anni, hanno spinto il mondo scientifico e quello delle amministrazioni locali a focalizzare la propria attenzione su tematiche inerenti alla

biodiversità e la riduzione dell'impatto ambientale delle colture sull'ambiente, cercando di divulgarle il più possibile tra produttori agricoli e consumatori.

L'agrobiodiversità, più comunemente definita germoplasma, rappresenta infatti un sottoinsieme della diversità biologica che ha costituito per secoli un forte legame con la cultura e le tradizioni agroalimentari di un paese.

L'agrobiodiversità può essere considerata come un consistente contenitore di informazioni genetiche e di caratteristiche agronomiche utili nell'attività mirata all'ottenimento di nuove varietà vegetali da coltivare, in grado di adattarsi a specifiche condizioni climatiche e ambientali meglio di altre. Le risorse genetiche hanno, infatti, giocato un ruolo incisivo anche nel miglioramento delle specie coltivate e, tenuto conto dei più recenti orientamenti di settore, continueranno a svolgere in futuro questa loro funzione.

Momento cruciale per la formalizzazione delle tematiche concernenti la biodiversità è stata la Conferenza dell'Organizzazione delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo svoltasi a Rio de Janeiro nel 1992. Durante questa *convention*, nell'ambito della tematica "sistemi agrari e biodiversità", i Paesi firmatari si assunsero l'impegno di ricercare le condizioni in grado di assicurare la compatibilità tra forme d'uso del suolo e conservazione della biodiversità e sostenibilità.

In quella stessa sede è stata promulgata la definizione attuale di biodiversità intesa come "variabilità tra gli organismi viventi appartenenti a ecosistemi terrestri, marini e acquatici e i complessi ecologici di cui questi sono parte, (...); ciò comprende la diversità all'interno delle specie, tra le specie e tra gli ecosistemi" (Convention on Biological Diversity CBD – art. 2), accezione confermata nel nostro Paese nel 1994.

Tale definizione identifica, quindi, tre ordini gerarchici di diversità biologica – genetica, specifica ed ecosistemica – che rappresentano i diversi aspetti dei sistemi viventi che già erano stati anticipati e declinati da Norse et al. (1986).

La diversità genetica o intraspecifica è intesa come la variazione di geni eterozigoti entro la specie; essa comprende la variabilità all'interno di una popolazione e quella tra popolazioni della stessa specie.

La diversità specifica è riferita alla variabilità ed alla pluralità di specie e genotipi entro un'area, una regione ed alla relazione tra le specie.

La diversità ecosistemica è connessa alla differenziazione di ambienti fisici, di raggruppamenti di specie di piante di animali e microrganismi e di processi ed interazioni che vengono a ristabilirsi di volta in volta tra loro (Scarascia e Mugnozza, 1997).

Applicata al sistema agrario, la diversità intraspecifica viene interpretata come conseguenza dell'interazione tra fattori ambientali e antropici.

L'uomo, per mezzo delle conoscenze tradizionali e intervenendo principalmente tramite selezione massale, ha conservato e coltivato varietà ritenute di una certa utilità, determinando, in questo modo, un aumento netto di diversità (Van de Wouw et al. 2009).

Per comprendere l'importanza della loro tutela e conservazione è sufficiente pensare che la maggior parte dei prodotti agricoli esistenti è stata ottenuta attraverso la selezione e la collezione delle piante (Cohen e Potter, 1993). Poter disporre di una vasta gamma di risorse fitogenetiche permette di selezionare piante in grado di rispondere alle mutevoli condizioni di vita, più resistenti e con un valore nutrizionale più alto, o anche capaci di adattarsi a nuove aree di coltivazione non utilizzate in precedenza. Al contrario l'utilizzo di un numero ridotto di varietà e il diffondersi delle monoculture, riducendo la diversità a livello del sistema agricolo, diminuisce anche la resistenza ai patogeni e agli insetti (Kameri-Mbote e Cullet, 1999). Anche nell'ambito delle risorse geniche di interesse agricolo, però, il rischio di erosione e la conseguente perdita di diversità genetica è molto alta. Per ridurre la perdita di diversità genetica è necessario adottare strumenti di tipo indiretto e di tipo diretto.

La prima categoria di intervento si riferisce alla attività volte a ridurre le cause "antropiche" che minacciano la biodiversità, quali, ad esempio, il controllo dei livelli di emissione di sostanze inquinanti o la tutela della qualità delle acque.

Alla seconda categoria appartengono le strategie di conservazione diretta di specie ed ecosistemi, per mezzo di strategie di conservazione *in situ* e/o *ex situ*.

2. Metodi di conservazione delle risorse genetiche vegetali

Il germoplasma è il materiale vegetale che contiene le informazioni inerenti alla composizione genetica delle diverse specie e può essere conservato attraverso semi o porzioni di pianta (gemme, foglie, fusto ecc.), o anche da gruppi di cellule capaci di dare vita ad una nuova pianta con caratteri ereditari identici alla pianta madre di origine. La conservazione del germoplasma vegetale si realizza attraverso due strategie di intervento: la conservazione *in situ* ed *ex situ*.

Queste due metodiche, distinte principalmente per il luogo dove avviene la conservazione delle risorse genetiche di specie vegetali (di interesse agronomico e facente parte della flora spontanea), presentano caratteristiche differenti e, auspicabilmente, devono essere tra loro complementari. La differenza fondamentale consiste nel fatto che, mentre la conservazione *in situ* comporta la designazione delle accessioni da preservare e la loro gestione e monitoraggio all'interno dell'ambiente naturale di origine, nel caso della conservazione *ex situ* il materiale vegetale deve essere campionato, trasferito e salvaguardato in apposite strutture e aree di raccolta. Nel caso di varietà a forte rischio di erosione, la conservazione *ex situ* permette quindi una più rapida azione di salvaguardia. Un'altra differenza riguarda la natura della conservazione *in situ*, definita dinamica, rispetto a quella dell'*ex situ*, definita statica. La strategia *in situ*, infatti, mira a conservare le dinamiche evolutive delle specie (mutazioni, deriva genetica, selezione, ecc.) per mezzo dell'interazione con l'ambiente naturale che viene rispettata e garantita; al contrario, la strategia *ex situ*, punta a conservare l'integrità genetica delle specie e dei genotipi in conservazione. Se da un lato la conservazione *in situ* favorisce l'insorgenza di nuova naturale variabilità, è pur vero che questo sistema presenta anche alcuni aspetti negativi: difficile accesso al materiale vegetale da parte dei ricercatori, complessa gestione e controllo delle accessioni, possibile perdita di risorse genetiche dovuta a circostanze impreviste, impossibilità di operare scientificamente confronti e comparazioni tra materiale diversi sul piano produttivo, qualitativo, nutrizionale e nutraceutico soprattutto per via dell'impossibilità di fare valutazioni al netto dell'influenza dell'ambiente di coltivazione. Per tali ragioni, è auspicabile che alla conservazione *in situ* si integrino, ove possibile, iniziative complementari di conservazione *ex situ*.

Le strategie *ex situ* ed *in situ*, si compongono di diverse metodologie di conservazione e la scelta di una metodologia di conservazione rispetto ad un'altra, dipende dalle esigenze, dalle possibilità (per lo più economiche), dalla tipologia della specie e dalle sue peculiarità biologiche.

2.1 Conservazione *in situ*

La conservazione *in situ* si riferisce alla protezione degli ecosistemi e degli habitat naturali, ed al mantenimento e recupero di popolazioni vitali di specie all'interno del loro ambiente naturale (CBD, 1992). Tale conservazione è utile per conservare i processi evolutivi e di adattamento delle colture all'interno del loro ambiente. In questo modo, infatti, non si preserva solo il germoplasma della varietà in oggetto, ma anche le condizioni che consentono a quella varietà di svilupparsi con dei tratti distintivi.

La modalità di conservazione *in situ* della flora spontanea si avvantaggia della designazione, creazione e gestione di aree protette, quali parchi nazionali, parchi naturali, riserve e ecc., e può comprendere sia la salvaguardia degli ambienti naturali e semi-naturali, sia la conservazione della biodiversità agricola. Nel primo caso l'obiettivo è quello di mantenere la diversità degli ecosistemi e la biodiversità al suo interno, fornendo in questo modo le condizioni affinché le specie in via di estinzione presenti possano continuare a proliferare. In alcuni casi può accadere che l'interesse sia rivolto alla tutela ed il mantenimento di particolari specie, piuttosto che all'intero ecosistema di origine.

Nel secondo caso si procede con il mantenimento dell'intero agroecosistema, o con la conservazione di varietà locali o coltivate *on farm*. La conservazione *on farm* riguarda il mantenimento delle specie coltivate (spesso in associazione con i loro parentali selvatici che possono essere presenti nel medesimo campo coltivato) nella medesima area di coltivazione in cui hanno sviluppato le loro caratteristiche intrinseche (Altieri e Merrick, 1987; Jarvis e Hodgkin, 2000) e nella quale continuano ad evolversi grazie al lavoro degli agricoltori (Frankel et al. 1995). In questa tipologia di conservazione si attribuisce, evidentemente, un ruolo fondamentale agli agricoltori che coltivano, gestiscono e condizionano le popolazioni all'interno degli agroecosistemi.

La conservazione *in situ* è utile per:

- garantire l'accesso al materiale genetico di alcune specie diffuse solo in particolari luoghi;
- conservare alcune specie che non possono essere stabilizzate o riprodotte al di fuori del loro ambiente naturale, come nel caso di specie che fanno parte di ecosistemi complessi, dove è presente un alto grado di interdipendenza tra le specie;

- attivare un certo grado di salvaguardia di specie senza alcuna importanza economica apparente ma che svolgono una funzione all'interno dell'ecosistema.

Nonostante numerosi ricercatori abbiano sottolineato la necessità di attuare un tipo di conservazione *in situ* delle risorse genetiche vegetali e di preservare gli ambienti nei quali tali risorse si trovano (Wilkes e Wilkes, 1972; Iltis, 1974; Nabhan, 1979; Prescott-Allen e Prescott-Allen 1982), questa strategia di conservazione presenta alcune problematiche quali, il difficile accesso al materiale genetico, gli episodi di erosione genetica causati da circostanze impreviste anche di tipo naturale ed i costi sia diretti che indiretti dovuti al mancato reddito degli operatori locali che avrebbero potuto destinare ad attività produttive le aree destinate alla conservazione.

2.2 Conservazione *ex situ*

Un interesse crescente è rivolto alla conservazione del germoplasma di specie erbacee e arboree, sia selvatiche che coltivate, al di fuori degli ambienti naturali. Questa strategia di conservazione, infatti, oltre ad essere complementare alla conservazione *in situ*, è spesso l'unica via percorribile per la conservazione di specie rare e a rischio di estinzione (Ramsay et al. 2000), o più in generale, nei casi in cui le altre metodologie, per motivi diversi, sono difficili da realizzare. La conservazione *ex situ* ricopre, infatti, anche un ruolo indispensabile per la ricerca e il miglioramento genetico delle varietà. Sono diverse le tecniche di conservazione *ex situ* di germoplasma impiegate per la salvaguardia della biodiversità vegetale. Oltre alla conservazione dei semi e a quella *in vivo*, sono in aumento studi finalizzati all'applicazione delle metodologie di coltura *in vitro* alla salvaguardia della biodiversità, con particolare attenzione alla micropropagazione.

2.2.1 Colture *in vitro*

La propagazione *in vitro*, o micropropagazione, rappresenta uno dei sistemi che rientrano nella vasta tipologia delle colture di tessuti vegetali. Questo sistema fonda la propria funzionalità sulla *totipotenza* della cellula vegetale ovvero sulla capacità di formare nuovi tessuti ed organi vegetali a partire da una cellula che detiene al suo interno tutta l'informazione genetica necessaria. La coltura di tessuti, quindi, consiste nella possibilità di stabilizzare e mantenere piante o organi di piante in coltura asettica, per l'appunto *in*

vitro; ciò si applica a organi specifici (embrioni, germogli, radici, foglie, ecc.) o tessuti singoli (cellule, callo, protoplasti, tessuti aploidi, ecc.). La coltura di tessuti rappresenta un sistema che consente di approfondire la conoscenza della risposta degli organi vegetali alle diverse tecniche di propagazione, all'effetto di specifici fito-ormoni, all'influenza dei fattori climatici (luce, temperatura, fotoperiodo, ecc.); è, altresì, un importantissimo mezzo di produzione vivaistica, atteso che la gran parte dei portinnesti delle specie da frutto è ordinariamente moltiplicato *in vitro* attraverso tecniche ampiamente consolidate.

La micropropagazione è una tecnica notoriamente proposta quale alternativa per il superamento della recalcitranza alla propagazione ordinaria, sia in termini di riproduzione che di moltiplicazione vegetativa. Per moltissime specie, oggi, si utilizza tale metodica, non solo per la conservazione ma anche per la moltiplicazione soprattutto nel tentativo di superare, come già accennato, fenomeni di recalcitranza alla propagazione vegetativa. I processi e le tecniche legate alle colture *in vitro* sono da ricondurre, principalmente, a due fenomeni che rappresentano la base fisiologica su cui si fonda l'intero processo di moltiplicazione. Si parla infatti di organogenesi diretta che è una metodologia volta all'ottenimento di germogli o radici, direttamente da tessuti messi in coltura attraverso specifiche fasi che garantiscono una discreta stabilità genetica e consentono l'ottenimento di piante assolutamente identiche alla pianta madre. La capacità di rigenerazione diretta è caratteristica di un numero ristretto di specie, risulta limitata ad alcuni tessuti e si realizza attraverso la conoscenza dell'equilibrio tra diverse specifiche sostanze nutritive ed ormonali che garantiscono la crescita, lo sviluppo e la proliferazione dei tessuti nonché l'emissione di radici e l'acquisizione della loro funzionalità assorbente. Tale particolare tecnologia prevede di operare la moltiplicazione partendo da un unico espianto, spesso uninodale, che viene inserito, dopo opportuna sterilizzazione, in ambiente di crescita artificiale sia per quanto concerne il substrato che per l'ambiente culturale. Una volta avvenuta l'introduzione *in vitro* (establishment), si procede, attraverso l'utilizzo di specifici substrati, alla successiva proliferazione dei germogli a partire da una singola porzione (shooting) e successivamente, in fase finale, alla stimolazione per l'emissione di radici avventizie (rooting). L'ultima fase più delicata, è quella dell'acclimatazione ovvero del passaggio del nuovo individuo così ottenuto dal *vitro* al *vivo*. Tutte le procedure appena descritte avvengono in asepsi totale. In alternativa, sono state studiate e sviluppate forme di organogenesi indiretta che avvengono attraverso il passaggio per ammassi cellulari

denominati "calli". Il materiale vegetale, sia pure perfettamente organizzato, perde la propria struttura consentendo, grazie ad uno specifico equilibrio ormonale a prevalente base auxinica, la formazione di massa cellulare che viene definita 'callo embriogenetico'. In funzione della modificazione del quadro ormonale è possibile indurre il callo affinché una o più cellule riacquistino la capacità di dividersi dando origine a centri meristematici (fase di induzione). Successivamente, attraverso una fase di determinazione, regolata e dipendente sempre dalla tipologia di mezzi colturali utilizzati, i centri meristematici acquistano una polarità indirizzandosi verso la formazione di un apice radicale o apicale.

Le tecniche di embriogenesi somatica sono state proposte per il superamento della recalcitranza in conifere con una serie di difficoltà nel mantenere efficiente il grado di vitalità degli embrioni e il successivo sviluppo nella costituzione della pianta intera (Bonga et al. 2010). L'embriogenesi somatica è altresì proposta per il superamento della recalcitranza alla moltiplicazione vegetativa di *Prunus avium* L. soprattutto per la produzione di piante clonali per fini produttivi in impianti da legno. Mandegaran et al., (1999) hanno a tale scopo proposto l'applicazione della tecnica su Colt, ibrido triploide tra *P. avium* e *P. pseudocerasus*, evidenziando una efficienza nettamente superiore e la possibilità di avviare questa tecnica anche alla produzione commerciale con costi accettabili. Pijut, nel 1997, evidenziava la possibilità di avviare alla moltiplicazione *in vitro* il genere *Juglans*, con risultati ampiamente variabili in funzione della specie, delle condizioni di coltura e degli organi di prelievo dalla pianta madre. Almehdi, nel 1998, riportava con successo la possibilità di rigenerare *in vitro* piante di *Pistacia vera* L. a partire da talee uninodali di giovani germogli, mentre Onay (2000) evidenziava un approccio innovativo che consentiva, per la medesima specie, la moltiplicazione a partire da piante adulte opportunamente predisposte alla produzione di giovani germogli in attiva crescita per la coltura di tessuti *in vitro*.

L'embriogenesi somatica è stata ampiamente studiata e proposta quale tecnica sviluppata per il superamento della recalcitranza alla propagazione vegetativa *in vivo* anche per carrubo; Carimi et al., (1997), e più tardi Canhoto et al., (2006) e Custodio e Romano (2006), hanno proposto, con un parziale ma soddisfacente successo, metodologie di induzione di embrioni somatici a partire da embrioni zigotici immaturi con l'ausilio di opportuni stimoli ormonali *in vitro* così come precedentemente riportato per altre specie su medesimo substrato vegetale (Akhtar et al. 2000).

Molti lavori che trattano la coltura *in vitro* di diverse specie arboree ed arbustive poliennali, riportano con evidenza sperimentale una serie di problematiche connesse con la recalcitranza ad alcune fasi della micropropagazione, soprattutto nella fase della emissione delle radici. La radicazione, infatti, è legata fortemente ad un corretto bilancio ormonale e alla approfondita conoscenza della specifica sostanza utilizzata e dei suoi effetti in tutto il processo. Come già accennato, il ruolo delle auxine di sintesi risulta efficace e sensibile nella fase di induzione mentre può assumere un comportamento tossico o inibitore nella fase di emissione o immediatamente dopo. Ciò accade, ad esempio, in *Eucalyptus* spp. dove elevate dosi di IBA mantenute oltre la fase di induzione delle radici contribuiscono alla formazione di callo basale con diminuzione dell'efficacia della rizogenesi e compromissione quasi totale della pianta prodotta (Fazal et al., 2003). In *Ceratonia*, invece, un contributo alla recalcitranza nelle diverse fasi della propagazione *in vitro* è fornita dall'abbondanza di sostanze tanniche e fenoliche che vengono ordinariamente rilasciate dai tessuti, soprattutto nelle fasi immediatamente successive all'introduzione in asepsi (Naghmouchi et al. 2008). Un comportamento analogo si evidenzia nella germinazione *in vitro* soprattutto per via delle sostanze rilasciate dal tegumento del seme, ancorché scarificato, che se non opportunamente rimosse o allontanate impediscono il corretto sviluppo dell'embrione e l'accrescimento della plantula.

3. Sistemi di immersione temporanea

La micropropagazione, anche se offre molteplici vantaggi rispetto alle tecniche convenzionali di propagazione vegetativa, presenta il principale svantaggio legato ai costi di esecuzione.

Le tecniche attuali richiedono un gran numero di piccoli contenitori e di substrati solidi in quanto le piante devono essere periodicamente trasferite in substrati rinnovati (subcoltura) a causa dell'esaurimento degli elementi nutritivi nel substrato di coltura e anche per via della crescita continua degli espianti e quindi della riduzione dello spazio all'interno dei contenitori (Maene e Debergh, 1985). Il lavoro manuale rappresenta il 40–60 % dei costi di produzione. La separazione degli inoculi ed il successivo trasferimento sono le fasi che incidono fortemente sui costi finali (Chu, 1995). Sebbene la manipolazione dei tessuti rappresenti la gran parte del lavoro, incidono pure sui costi finali la pulizia, il riempimento dei contenitori utilizzati, senza contare il costo dell'agente solidificante. Da quanto detto in

precedenza, l'applicazione commerciale della micropropagazione delle diverse specie può avvenire solo se si mettono in atto delle nuove tecnologie per automatizzare alcune procedure e migliorare i protocolli inerenti la fase di acclimatemento (Kitto, 1997). Una delle metodologie per cercare di limitare i costi della micropropagazione può essere rappresentata dall'applicazione di metodologie che utilizzano substrati liquidi. I sistemi che prevedono l'utilizzo del mezzo liquido possono fornire alla coltura condizioni più omogenee, il substrato può essere facilmente rinnovato senza cambiare il contenitore, la sterilizzazione può essere eseguita con la microfiltrazione. In confronto con il sistema di micropropagazione convenzionale, che utilizza substrati agarizzati, i contenitori utilizzati per la coltivazione in mezzo liquido sono molto più grandi, e quindi capienti, e ciò consente di ridurre sia il tempo che il numero di trasferimenti.

I vantaggi della coltura *in vitro* su mezzo liquido sono spesso accompagnati da potenziali problemi associati all'insorgenza di fenomeni di iperidricità o vitrescenza del materiale vegetale, alla necessità di attrezzature complesse, alla possibilità di contaminazioni microbiche che riguardano sia l'introduzione del materiale vegetale che i protocolli inerenti le operazioni dei bioreattori su larga scala; infatti, funghi, batteri, lieviti, e insetti sono fonte di gravi contaminazioni, causando pesanti perdite di materiale vegetale in laboratori commerciali. Per limitare tali problemi sono state sviluppate altre tecniche che prevedono l'immersione temporanea della coltura nel substrato liquido piuttosto che il contatto permanente.

Harris e Mason (1983) hanno descritto i "bioreattori ad inclinazione" progettati per realizzare l'immersione temporanea (TIS), questi combinano gli effetti positivi dell'impiego del substrato liquido e garantiscono allo stesso tempo l'aerazione degli espianti.

Tutti i diversi sistemi ad immersione temporanea che vengono realizzati si basano sui principi enunciati da Teisson et al., (1999):

- evitare l'immersione continua in quanto incide negativamente sulla crescita e sulla morfogenesi;
- fornire un adeguato ricambio di ossigeno;
- limitare il numero di tagli;
- ridurre il numero delle contaminazioni;
- ridurre i costi della propagazione.

Le sostanziali differenze che contraddistinguono i diversi TIS sono rappresentati dalle dimensioni del contenitore, dal tipo di substrato di coltura, dal sistema computerizzato di immersione oppure dalla presenza di un semplice timer che regola le immersioni, dall'uso di una pompa pneumatica o dal movimento meccanico del contenitore per garantire la movimentazione del substrato liquido permettendo l'immersione temporanea e dal riutilizzo del substrato. Questi sistemi sono più facili da usare ed inoltre permettono di programmare i tempi e la tipologia di immersione (totale o parziale).

I contenitori utilizzati nelle tecniche di micropropagazione che sfruttano il principio dell'immersione temporanea vengono chiamati bioreattori.

Un bioreattore è un contenitore che assicura un ambiente sterile autonomo all'interno del quale è presente un substrato di coltivazione liquido che viene gestito mediante un sistema di afflusso ed efflusso di aria. Il principale obiettivo dell'impiego dei bioreattori è quello di riprodurre sistemi di micropropagazione su larga scala, riducendo i costi. Ciò è anche possibile in quanto l'uso dei bioreattori permette di automatizzare gran parte delle operazioni e di controllare puntualmente le condizioni micro-ambientali della coltura e, in alcuni casi, di ridurre il numero di trasferimenti.

Ad oggi si dispone di differenti tipologie di bioreattori; questi, come detto in precedenza, si possono distinguere in base al sistema che permette l'immersione (meccanico o dipendente dall'insufflazione di aria) e in base alle modalità di immersione (totale o parziale).

I primi esperimenti sono stati condotti nel 1981 per la propagazione di *Begonia* spp. (Takayama e Misawa, 1981). Oggi questa tecnica è applicata a molte specie e organi vegetali vale a dire: germogli, bulbi, microtuberi, cormi, embrioni somatici ecc. I bioreattori si basano su una tecnica di sistema di immersione temporanea (TIS) in cui il contatto degli espianti con il mezzo non è continuo ma in tempi prefissati.

Esistono diversi tipi di bioreattori a immersione temporanea:

- a) RITA®, Recipient for Automated Temporary Immersion system (Alvard et al., 1993) (Figura 1) si compone di un bioreattore con all'interno il materiale vegetale nella parte superiore mentre in quella inferiore vi è il substrato di coltivazione. Questi due scomparti sono collegati fra loro in modo tale che quando viene immesso un flusso d'aria nel sistema il substrato liquido salendo nel comparto superiore va ad immergere gli inoculi; la frequenza e la durata dell'immersione vengono programmate a seconda le esigenze.

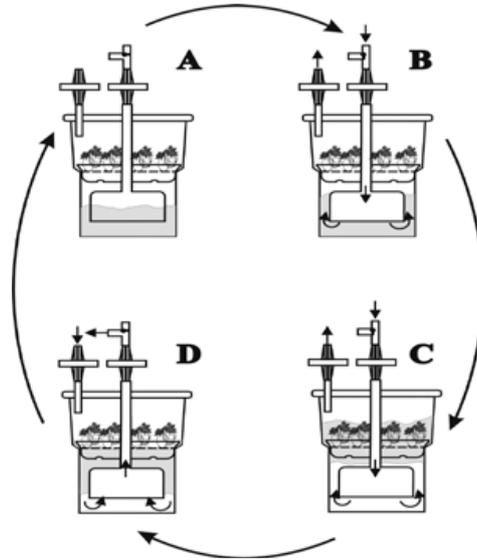


Figura 1 - Funzionamento sistema RITA® (Georgiev et al. 2014).

- b) BIB®, Bioreactor of Immersion by Bubbles, sviluppato da Soccol et al., (2008) (Figura 2) è un sistema interconnesso con tubi di gomma che riforniscono le piante di aria e substrato liquido. Il bioreattore si presenta costituito da un tubo di vetro con divisione in più scomparti attraverso delle piastre forate in acciaio inossidabile, nella parte più bassa del tubo è presente il substrato in posizione di riposo, appena nel sistema viene immessa aria il substrato risale all'interno del bioreattore venendo a contatto con la coltura, una volta bloccato il flusso d'aria il substrato ritorna alla base del bioreattore grazie alla forza gravitazionale.

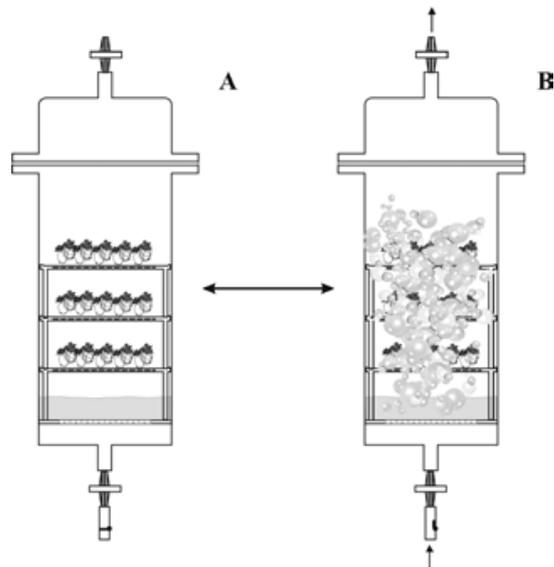


Figura 2 - Schema di funzionamento sistema BIB® (Georgiev et al. 2014).

Queste tipologie di bioreattori risultano, tuttavia, troppo piccoli o troppo pesanti per poter essere manipolati con un piccolo fondo interno che spesso porta a disordini delle colture a causa dell'alta densità (Welander et al., 2007) o a una perdita di efficienza del sistema che non può contenere molti espianti in coltura.

Il Bioreattore PLANTFORM è un nuovo sistema sviluppato recentemente per migliorare le colture di piante *in vitro*. Questo bioreattore si basa su un sistema di immersione temporaneo con una ventilazione che garantisce il rinnovo dell'aria all'interno del contenitore. Il vantaggio di questo bioreattore è la presenza di un fondo interno più grande per colture da propagare e, allo stesso tempo, di dimensioni adeguate per la manipolazione. Questa tecnica è stata testata per la micropropagazione su larga scala di piante ornamentali ed è stato dimostrato di essere in grado di migliorare alcuni parametri di crescita (Welander et al., 2013; Lambardi, 2012) (Figura 3)

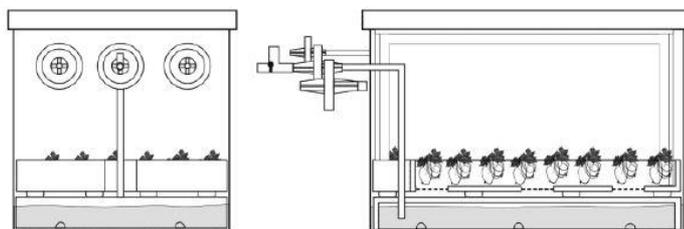


Figura 3 - Bioreattori PlantForm (Georgiev et al. 2014).

Ad oggi il sistema ad immersione temporanea è sempre più utilizzato all'interno dei laboratori di ricerca ma anche in alcuni laboratori di imprese commerciali.

3.1 Stato dell'arte dei sistemi di immersione temporanea

Molteplici sono gli studi effettuati allo scopo di valutare l'efficienza dei diversi sistemi ad immersione temporanea (TIS) nell'ambito della micropropagazione e di seguito vengono riportati alcuni risultati ottenuti attraverso l'impiego di questa metodologia.

Welander et al., (2014) hanno sviluppato uno studio con lo scopo di valutare il nuovo sistema ad immersione temporanea messo a punto da PlantForm per la micropropagazione di *Rubus idaeus* (lamponi), *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpurea*. *Digitalis* e *Rubus* hanno dato gli stessi risultati a livello di numeri di germogli di buona qualità prodotti sia in agar che nei bioreattori, mentre *Echinacea* ha prodotto in bioreattori un numero maggiore di germogli di buona qualità. Inoltre *Echinacea* e *Digitalis* micropropagate attraverso bioreattori hanno presentato, al termine dello studio, un maggiore peso fresco rispetto a quelle propagate in substrato agarizzato, viceversa per *Rubus* il peso secco ottenuto era uguale in tutte e tre le specie per i due sistemi utilizzati

Yan et al., (2010) hanno dimostrato che l'uso dei TIS permette di ottenere migliori risultati rispetto alla micropropagazione con substrato solido. Infatti piantine di *Siratia grosvenorii* hanno presentato un tasso di moltiplicazione, lunghezza dei germogli, peso fresco e secco, produzione totale di biomassa significativamente maggiore in TIS rispetto alla coltivazione in substrato solido. Inoltre, nella stessa ricerca, con il sistema ad immersione temporanea si è potuta apprezzare una minore produzione di callo rispetto al sistema che utilizza l'agar ed al substrato liquido permanente. È stato notato come nelle plantule prodotte in TIS la radicazione era migliore rispetto all'agar, le radici si presentavano più solide con un maggiore sviluppo di radici secondarie, quindi migliore adattamento delle piante *ex vitro*.

Lorenzo et al., (1998) su canna da zucchero utilizzando i TIS, hanno dimostrato di poter raddoppiare il tasso di moltiplicazione rispetto al protocollo convenzionale messo a punto da Jiménez et al., (1995) permettendo di ridurre i costi di micropropagazione per tale coltura del 46%.

Damiano et al., (2005) hanno messo a confronto le metodologie di micropropagazione su solido, liquido e TIS per tre specie di *Prunus* e un portinnesto di *Malus* spp. Sono stati proposti due periodi di immersione giornaliera, 30 e 60 minuti, dopo 60 giorni sono stati valutati alcuni parametri (tasso di moltiplicazione, contenuto in acqua, clorofilla, carotenoidi, fruttosio). I risultati hanno messo in evidenza un ridotto tasso di

moltiplicazione un ridotto contenuto di clorofilla e carotenoidi ed iperidricità nelle piante coltivate in substrato liquido. Mentre il tasso di moltiplicazione in TIS aveva evidenziato la mancanza di espianti iperidrici e il maggiore contenuto in fruttosio, clorofilla e carotenoidi. McAlister et al., (2005) hanno messo a punto dei protocolli per la propagazione di sei cloni di *Eucalyptus* attraverso l'impiego del sistema RITA®. I risultati hanno dimostrato di aver incrementato la proliferazione dei germogli dimezzando il tempo con il sistema RITA® rispetto alla propagazione su substrato solido. Inoltre le piantine prodotte attraverso il sistema TIS hanno presentato una migliore capacità di adattamento durante la fase di acclimatamento, minore formazione del callo e un migliore tasso di radicazione rispetto alle piante provenienti dal substrato solido.

Arencibia et al., nel 2013 hanno dimostrato per il mirtillo (*Vaccinium corymbosum* L.) la maggiore efficienza dei sistemi TIS rispetto alle tecniche di micropropagazione tradizionale: il numero di piante e il numero di internodi per pianta è risultato maggiore, inoltre le piante ottenute da TIS hanno presentato una maggiore adattabilità in serra durante l'acclimatamento rispetto alle piante provenienti da agar.

Da quanto descritto, quindi, si evince come l'efficienza dei TIS in generale nell'ambito delle attività di micropropagazione sia dipendente da diversi fattori: la specie e la struttura vegetativa scelta, la composizione del substrato, il numero ed il tempo di immersione.

4. Cappero

Il genere *Capparis* appartiene alla famiglia delle Capparaceae (Hall et al., 2002; Innocencio et al., 2006) e include 350 specie di origine tropicale e subtropicale, molti dei quali distribuiti nelle regioni del mediterraneo (Fici, 2001; Innocencio et al., 2006).

A questo genere appartengono diverse specie con interesse economico, e tra queste vi sono i capperi commerciali, principalmente coltivati o raccolti da piante spontanee nel bacino del Mediterraneo ed in alcuni paesi limitrofi. In Sicilia il cappero, *C. spinosa* L., è ampiamente diffuso allo stato spontaneo ed in coltivazione, e l'isola è rinomata in tutto il mondo per l'eccellente qualità dei boccioli fiorali che vi si producono. Nel bacino del Mediterraneo è presente con molta frequenza allo stato spontaneo e caratterizza molti ambienti siccitosi dei Paesi che delimitano tale bacino. La sua coltivazione, sia pure con interessi commerciali differenti, è riportata in Grecia, Cipro e Turchia e, in misura certamente maggiore, in Marocco, Spagna e Italia. I boccioli fiorali trovano largo uso nella cucina mediterranea tradizionale; più recentemente anche i frutti, comunemente denominati 'cucunci', ed i giovani germogli appaiono sempre più richiesti ed apprezzati in Europa e negli USA (Inocencio et al., 2005). L'Italia si caratterizza per la presenza diffusa di cappereti sia in forma consociata che specializzata. Gli impianti sono, comunque, realizzati con piante appartenenti alla specie *Capparis spinosa* var. *spinosa* e sono più frequenti nelle regioni meridionali anche se non mancano alcuni esempi in specifiche aree del nord del Paese con clima particolarmente favorevole (Liguria, Lago di Garda). Tra le regioni meridionali, la maggiore intensità di cappereti è senza alcun dubbio presente nell'isola di Pantelleria (TP) e nelle isole Eolie e, nell'ambito di queste, a Salina (ME). Nei territori di queste due isole il cappero è da considerare coltura da reddito per piccole e medie imprese agricole, spesso in consociazione con olivo e/o vite da vino, talvolta in impianti specializzati di grande interesse per la valorizzazione dello sviluppo agronomico ed economico della coltura. All'interno delle due isole si svolge l'intero processo della filiera cappericola attraverso le tipiche trasformazioni del prodotto nelle diverse tipologie commerciali avviate al mercato. A seconda degli areali di coltivazione, i cappereti coltivati vengono tradizionalmente realizzati utilizzando sistemi di propagazione differenti: quello per via gamica (da seme), ancorché limitato da una ridotta percentuale di germinazione, rimane il principale sistema di propagazione soprattutto nell'isola di Pantelleria.

Sporadicamente, e limitatamente all'isola di Salina, è utilizzato, invece, il sistema di moltiplicazione per talea spesso adottato non da un vivaismo specializzato ma dagli stessi produttori i quali, seppure con risultati molto variabili, riescono in tal modo ad integrare i propri impianti o a rimpiazzare eventuali fallanze.

La scarsa efficienza dei semi di capperò è dovuta alla ridotta capacità di germinazione per via di un tegumento molto duro ed impermeabile; pertanto, la struttura dura del seme e la mucillaggine che si sviluppa a contatto con l'acqua potrebbero limitare la diffusione dell'ossigeno all'embrione (Barbera, 1991; Bahrani et al., 2008).

La variabilità genetica che consegue alla propagazione gamica, come è infatti noto, si riflette negativamente sull'omogeneità del materiale di propagazione ottenuto e, di conseguenza, sull'omogeneità dell'impianto dal punto di vista fenologico, vegetativo, produttivo e qualitativo. Per tale ragione, diversi sono stati i tentativi sperimentali posti in atto per la definizione di protocolli di propagazione agamica con risultati, tuttavia, ampiamente variabili e spesso poco incoraggianti.

La disomogeneità colturale, la difficoltà di ottenere impianti altamente produttivi e caratterizzati da un elevato standard qualitativo, si traduce spesso in un forte rallentamento alle possibilità di ulteriore diffusione degli impianti specializzati che necessitano di materiale selezionato, per produzione e qualità, propagato agamicamente.

5. Bibliografia

- Akahtar N. (1997). Studies on induction of somatic embryogenesis and production of artificial seeds for micropropagation of a tropical fruit tree guava (*Psidium guajava* L.). Ph.D. Banaras Hindu University, Varanasi, India.
- Ali A Almehti, Dan E Parfitt, H Chan, (2002). Propagation of pistachio rootstock by rooted stem cuttings. *Scientia Horticulturae* Pages 359-363.
- Altieri M.A., Merrick L.C. (1987). *In situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming system. *Economic Botany*, 41(1):86-96.
- Alvard D., Côte F., Teisson C. (1993). Comparison of methods of liquid media culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 32:55-60.
- Arencibia A.D., Vergara C., Quiroz K., Carrasco B., Bravo C., Garcia-Gonzales R. (2013). An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, 4: 1022 – 1028.
- Bahrani M.J., Ramazani G.M., Shekafandeh A., Taghvaei M. (2008). Seed germination of wild Caper (*Capparis spinosa* L., var. *parviflora*) as affected by dormancy breaking treatments and salinity levels. *Seed Sci. Technol.* 36, 776–780. 10.15258/sst.2008.36.3.27.
- Barbera G. (1991). Le câprier (*Capparis* spp.), in Programme de Recherche Agrimed, ed Guisepppe B., editor. (Luxembourg: Commission des Communautés européennes L-2920), 62.
- Barbera G., (2001). L'erosione e la salvaguardia della biodiversità. Atti del seminario IAED La biodiversità nei paesaggi agrari e forestali, Palermo Pantelleria, 31 maggio 2 giugno 2001, pp 7-19.
- Canhoto J.M., Rama S.C., Cruz G.S. (2006). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Carob (*Ceratonia siliqua* L.) *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.*, 42 (6): 514-519.
- Carimi F., Di Lorenzo R., Crescimanno F.G. (1997). Callus induction and somatic embryogenesis in carob (*Ceratonia siliqua* L.) from ovule culture. *Sci.Hortic*; 70: 73-9.

- Chu I. (1995). Economic analysis of automated micropropagation. *Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 19 – 27.
- Cohen J.I., Potter C.S. (1993). Conservation of biodiversity in natural habitats and the concept of genetic potential. In: Potter, Cohen, Janczewshi (eds) *Perspectives on culture*. *Plant Cell Physiol.* 22: 461–467.
- Custódio L., Romano A. (2006). *In vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Acta Hort.*, n. 725, 477-481.
- Damiano C., La Starza S.R., Monticelli S., Gentile A., Caboni E., Frattarelli A. (2005). Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. - In: Hvoslef - Eide, A.K., Preil, W. (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Netherlands, pp. 243–251.
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., Bley T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. – *Engineering in Life Sciences*.
- Engelmann F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica*, 57:227-247.
- Engelmann F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *biodiversity: Case studies of genetic resource conservation and development*. AAAS Press, pp. 19-22.
- Fazal R., Mussarat J., Ihsan I., (2003). Mass propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Asian J. Plant Sci.*, 2, 184-187.
- Fici S. (2001). Intraspecific variation and evolutionary trends in *Capparis spinosa* L. (Capparaceae). *PlantSyst. Evol.* 228, 123–141. 10.1007/s006060170024.
- Fideghelli C., Engel P. (2011). L'attività di raccolta, caratterizzazione, valorizzazione e conservazione della biodiversità vegetale di interesse agricolo in Italia con particolare riguardo alle risorse genetiche frutticole. *Review n.15. Italus Hortus* 18 (3), 33-45.
- Frankel O.H, Brown A.H.D., Burdon J.J. (1995). *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press, UK.
- Hall C.J., Systma J.K., Iltis H.H. (2002). Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. *Am. J. Bot.* 89, 1826–1842. 10.3732/ajb.89.11.1826.

- Harris R.E., Mason E.B. (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. - Can. J. Plant Sci., 63: 311–316.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. (1997). Plant propagation: principles and practices. Plant propagation: principles and practice, 7th edn.
- Iltis H.H. (1974). Freezing the genetic landscape – the preservation of diversity in cultivated plants as an urgent social responsibility of the plant geneticist and plant taxonomist. Maize Genetics Cooperation Newsletters, 48:199-200.
- Inocencio C., Cowan R.S., Alvaraz F., Rivera D. and Fay M.F. (2005). AFLP fingerprinting in *Capparis* subgenus *Capparis* related to the commercial sources of capers. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 137 – 144.
- Inocencio C., Rivera D., Obon C., Alcaraz F., Barrena J. A. (2006). A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae). Ann. Missouri. Bot. Gard. 93, 122–149. 10.3417/0026-6493(2006)93[122:ASROCS]2.0.CO;2 [Cross Ref]
- J.M. Bonga, K.K. Klimaszewska, P.von Aderkas (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), pp 241–254.
- Jarvis D.I., Hodgkin T. (2000). Farmer decision making and genetic diversity: linking multidisciplinary research to implementation on-farm. In: Brush (eds) Genes in the field: on-farm conservation of crop diversity. Lewis Publishers, pp. 261-278.
- Kameri-Mbote P., Cullet P. (1999). Agrobiodiversity and international law. Journal of Environmental Law, 11(2): 257-279.
- Kitto S. L. (1997). Commercial micropropagation. – Hort Science, 32: 1012–1014.
- Lambardi M. (2012). Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. Riv. Frutticoltura. Ortofloricolt. 12: 32-38.
- Lorenzo, J.C., González, B.L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., Borroto C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. - Plant Cell, Tissue Organ Cult. 54, 197–200.
- Maene L., Debergh P. (1985). Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. - Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5: 23–33.
- Mandegaran Z., Roberts A.V., Hammat N. (1999). The ability of *Prunus avium* x *P. pseudocerasus* ‘Colt’ to form somatic embryos *in vitro* contrasts with recalcitrance of *P. avium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59: 57-63.

- Mcalister B., Finnie J., Watt M. P., Blakeway F. (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 347 – 358.
- Nabhan G.P. (1979). Cultivation and culture. *Ecologist*, 9:259-263.
- Naghmouchi A., Larbi Khouja M., Nejib Rejeb M., Boussaid M. (2008). Effect of growth regulators and explant origin on *in vitro* propagation of *Ceratonia siliqua* L. via cuttings. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12 (3), 251-258.
- Nazioni Unite (1992). “Convention on biological diversity” – Rio de Janeiro, 5 June .
- Norse E.A.R., Wilcove K.L., Wilcox D.S., Norse B.A.E.A. & Rosenbaum K.L. (1986). Conserving biological diversity in our national forests (No. 333.7516 C6).
- Onay A., Tilkat E., Isikalan C., Namli S. (2007). Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer Netherlands. ISBN: 978-1-4020-6352-7.
- Pijut P.M. (1997). Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (butternut). In: *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 39, 345-357. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Prescott-Allen R., Prescott-Allen C. (1982). The case for *in situ* conservation of crop genetic resources. *Natural Resources*, 23:5-20.
- Ramsay K.A., Smuts M., Els H.C. (2000). Adding value to South African landrace breeds conservation through utilization. *Animal Genetic Resources*, 27:9-15.
- Scarascia Mugnozza G.T. (1974). Le risorse genetiche vegetali. Principi, realtà, problemi. *Giornale Botanico italiano*, Vol.108- 5, 247-257.
- Soccol C.R., Scheidt G.N., Mohan R. (2008). Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. - Universidade Federal do Paraná. (DEPR.01508000078).
- Takayama S., Misawa M. (1981). Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlet by shake Plant and Cell Physiology, Volume 22, Issue 3, Pages 461–467, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076188>.
- Teisson C., Alvard D. (1999). *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. - *Potato Res.*, 42: 499–504;
- Van de Wouw M., Kik C., Van Hintum T., Van Treuren R., Visser B. (2009). Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 8(1):1-15.

- Welander M., Kuznetsova T., Persson J. and Sayegh A. (2013). Evaluation of a new vessel system for micropropagation based on temporary immersion system (TIS) and applied physiology. Proceedings of 8th IVCHB, Coimbra, June 2-7. p.36.
- Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L.H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. – *Scientia Horticulturae*, 179: 227 – 232.
- Welander M., Zhu L.H., Li X.Y. (2007). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*. 179: 227–232.
- Wilkes H.G., Wilkes S. (1972). The green revolution. *Environment*, 14(8):32-39.
- Wilson E.O., Peter F.M. (1988). Landraces: a review of definition and classification. *Euphytica* 104:127 – 139.
- Yan H., Liang C., LI Y. (2010). Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*103, 131–135.

SCOPO DELLA RICERCA

Le ricerche riportate nel presente elaborato si riferiscono ad aspetti più specificamente connessi alla propagazione e hanno preso spunto da esperienze passate su medesime tematiche. Va detto che molti approfondimenti sulla propagazione del capperò presenti in bibliografia riguardano prevalentemente metodi per l'incremento della percentuale di germinazione soprattutto con l'ausilio di sistemi di scarificazione e trattamenti ormonali (Sozzi e Chiesa, 1995; Barbera, 1991). Nonostante le problematiche legate alla ricombinazione genica del processo fecondativo, non si è dato un contributo significativo alla ricerca di alternative nei sistemi di propagazione. Le principali problematiche legate alla propagazione per talea sembrano derivare dalla tipologia di materiale di propagazione utilizzato (Barbera e Di Lorenzo, 1984) la cui formazione, in termini di sviluppo vegetativo, è certamente condizionata dall'ambiente di crescita. Poco tuttavia si conosce sulle cause che determinano una così bassa percentuale di rizogenesi e soprattutto la variabilità che questa percentuale può evidenziare in funzione dei biotipi utilizzati e dell'ambiente di radicazione.

Per tali ragioni, negli ultimi anni si assiste ad una intensificazione dell'interesse nei confronti della micropropagazione che consente di garantire omogeneità di caratteri genetici ed uniformità di materiale vegetale per il mantenimento delle caratteristiche dei genotipi considerati eventualmente più idonei per la realizzazione di impianti specializzati. L'attività di ricerca è stata condotta, quindi, su alcuni aspetti che caratterizzano la moltiplicazione *in vitro* della specie.

L'obiettivo dell'attività di ricerca è stata finalizzata alla definizione di protocolli di propagazione *in vitro* di alcune varietà appartenenti al genere *Capparis spinosa* L., attraverso l'utilizzo di tecnologie innovative che fanno riferimento ai sistemi di immersione temporanea della tipologia PlantForm (Welander et al., 2014; Yan et al., 2010; Damiano et al., 2005).

Il bioreattore si presenta come uno strumento tecnologico alternativo al processo di micropropagazione convenzionale volto a ottimizzare la coltivazione *in vitro* mediante l'automazione del processo (Oliveira et al., 2011b; Mariateresa et al., 2014; Maciel et al., 2016). Questi sistemi meccanizzati assicurano un maggiore contatto tra espianto e mezzo di coltura ed un maggiore numero di piante in minore tempo e spazio. Inoltre rispetto al

mezzo solido si ha un maggiore assorbimento di nutrienti da parte dell'espianto e una maggiore aerazione in ambiente *in vitro*.

La micropropagazione, che da decenni è a supporto della propagazione convenzionale, consente di ottenere produzioni con elevate caratteristiche qualitative e in grande quantità. D'altro canto però la propagazione *in vitro* ha elevati costi di produzione e si rende necessario, di conseguenza, l'utilizzo di sistemi di propagazione altamente efficienti, sia dal punto di vista dell'abbattimento dei costi che dal punto di vista della qualità del materiale ottenuto.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare per la fase di moltiplicazione l'attitudine alla coltura *in vitro* su substrato solido e liquido con la coltura mediante TIS, per valutare i vantaggi che è possibile ottenere in termini di efficienza e di economicità del sistema. Le prove hanno riguardato tre accessioni appartenenti al genere *Capparis spinosa* L. prelevati nell'isola di Salina e sono state effettuate con diversi substrati descritti successivamente.

Successivamente, gli espianati ottenuti nella fase di moltiplicazione sia da coltura liquida in bioreattore che da coltura solida sono stati utilizzati per la fase di radicazione con l'obiettivo di valutare la risposta a diverse condizioni ormonali.

ESPERIMENTO 1

RIGENERAZIONE DI GERMOGLI DI *CAPPARIS SPINOSA* L.: CONFRONTO TRA SISTEMA DI COLTURA SOLIDA E AD IMMERSIONE TEMPORANEA ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI BIOREATTORI

Riassunto

Germogli di tre genotipi siciliani di *Capparis spinosa* L., coltivati sull'isola di Salina (ME), sono stati micropropagati per valutare la risposta a due differenti sistemi di colturali: su terreno solido e in coltura liquida in bioreattore PlantForm. Il sistema di immersione temporanea PlantForm, rappresenta un nuovo approccio di propagazione, in cui i germogli subiscono un'immersione temporanea in mezzo liquido, evitando l'accumulo di gas attraverso la ventilazione forzata. Questo studio propone un protocollo per migliorare la propagazione *in vitro* del capperò riducendo i costi di produzione. Dai risultati ottenuti, i germogli di capperò propagati in PlantForm hanno mostrato una buona adattabilità e migliori tassi di crescita rispetto a quelli coltivati nel sistema convenzionale. Inoltre, lo studio ha rilevato differenze significative nel numero e nella lunghezza dei germogli nel substrato contenente 6,6 µm di mT in coltura liquida PlantForm (7,32 germogli con una lunghezza di 1,3 cm) rispetto alla coltura solida. E' stato possibile ottenere un'efficiente proliferazione del capperò in bioreattore in presenza nel mezzo della meta-Topolin (mT) rispetto al mezzo contenente la 6-benzilaminopurina (BAP). La performance positiva dell'approccio nell'utilizzo del bioreattore PlantForm è stata confermata anche dall'elevato indice relativo di crescita che è stato ottenuto. Questo è il primo studio documentato sulla tecnica dell'utilizzo dei bioreattori a immersione temporanea della tipologia PlantForm per la propagazione di Capperò.

1.Introduzione

Il capperò (*Capparis spinosa* L.) è un arbusto perenne comunemente presente nel bacino del Mediterraneo. La più importante area di produzione si trova in Paesi del Sud-Europa (Italia, Spagna e Grecia) dove è coltivato sia nei sistemi tradizionali che in quelli specializzati. Più recentemente, è stata registrata una vasta distribuzione di questa specie in

diverse aree in particolare in Nord Africa (Tunisia, Marocco ed Egitto) e Medio Oriente (Siria) dove, secondo i suoi diversi usi, è stato oggetto di un diffuso interesse commerciale (Gruère et al., 2006). Il genere *Capparis* appartiene alla famiglia delle Capparaceae che comprende circa 250 specie (Fici, 2001).

In Italia, il capperò è distribuito principalmente nel Sud e la produzione tradizionale è concentrata nelle isole minori intorno alla Sicilia (Pantelleria e Isole Eolie) dove la specie svolge un importante ruolo economico. L'importanza della produzione di capperò è legata al suo utilizzo nell'industria alimentare così come in quella medicinale e cosmetica (Zargari 1986; Al-Said et al., 1988; Bonina et al., 2002).

Da un punto di vista agronomico, sono diversi gli aspetti che devono essere attentamente valutati al fine di migliorare la resa e qualità. Uno degli aspetti più importanti è legato al sistema di propagazione. Molti approfondimenti sulla propagazione del capperò riguardano prevalentemente metodi per l'incremento della percentuale di germinazione soprattutto con l'ausilio di sistemi di scarificazione e trattamenti ormonali (Sozzi e Chiesa, 1995). Nonostante le problematiche legate alla ricombinazione genica del processo fecondativo, non si è dato un contributo significativo alla ricerca di alternative nei sistemi di propagazione. Le principali problematiche legate alla propagazione per talea sembrano derivare dalla tipologia di materiale di propagazione utilizzato (Barbera e Di Lorenzo, 1984) la cui formazione, in termini di sviluppo vegetativo, è certamente condizionata dall'ambiente di crescita

Per tali ragioni, negli ultimi anni si assiste ad una intensificazione dell'interesse nei confronti della micropropagazione che consente di garantire omogeneità di caratteri genetici ed uniformità di materiale vegetale per il mantenimento delle caratteristiche dei genotipi considerati eventualmente più idonei per la realizzazione di impianti specializzati. La coltura *in vitro* di capperò è stata segnalata per la prima volta nel 1984 da Ancora e Cuzzo 1984. Successivamente, la propagazione fu riportata da diversi autori che iniziarono principalmente da segmenti nodali (Rodriguez et al., 1990; Salem et al., 2001; Chalak et al., 2003; Caglar et al., 2005; Musallam et al., 2010; Al-Safadi ed Elias 2011; Carra et al., 2011; Horshati e Jambor-Benczur 2006; Movafeghi et al., 2008).

Pur avendo evidenziato positivi risultati in termini di moltiplicazione, soprattutto rispetto alla propagazione *in vivo*, la coltura *in vitro* non ha permesso di sviluppare protocolli

efficienti dal punto di vista vivaistico e ciò ha determinato la ricerca di soluzioni alternative in grado di coniugare alti tassi di moltiplicazione e ridotti costi di produzione. La tecnologia dei bioreattori è un sistema meccanizzato utilizzato nella coltura dei tessuti vegetali per migliorare la micropropagazione su larga scala in laboratori e centri di ricerca. Il bioreattore si presenta come uno strumento tecnologico alternativo al processo di micropropagazione convenzionale volto a ottimizzare la coltivazione *in vitro* mediante l'automazione del processo (Oliveira et al., 2011b; Mariateresa et al., 2014; Maciel et al., 2016). Questi sistemi meccanizzati possono aiutare a ottenere una maggiore biomassa vegetale e ridurre il tempo necessario per la propagazione. Tali guadagni sono il risultato del maggiore contatto tra espianto e mezzo di coltura. Ciò consente un maggiore assorbimento di nutrienti da parte dell'espianto e una maggiore aerazione in ambiente *in vitro*, che rinnova l'atmosfera gassosa all'interno dei vasi di coltura (Zobayed et al., 2003; Mariateresa et al., 2014).

L'obiettivo del presente lavoro di ricerca quindi, è stato quello di elaborare e ottimizzare protocolli di micropropagazione a elevata efficienza sfruttando i sistemi a immersione temporanea della tipologia PlantForm (Welander et al., 2014; Yan et al., 2010; Damiano et al., 2005). E' stata valutata la risposta delle varietà di *Capparis spinosa* ai due sistemi di coltivazione solido e liquido e dei terreni di coltura in base alla citochinine presente nel mezzo di coltura.

2. Materiali e metodi

Il materiale vegetale è stato ottenuto da piante adulte di genotipi siciliani di *Capparis spinosa* L. coltivati nell'isola di Salina (ME). Sono state prese in considerazione tre accessioni: Sal 39, Sal 37 e Virgona. La scelta di queste tre accessioni è stata operata a seguito di una pregressa attività di ricerca condotta dal Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali dell'Università di Palermo che mirava a mettere alla luce l'esistenza di alcuni genotipi migliorativi in termini qualitativi. Sal 39, Sal 37 e Virgona hanno fornito produzioni abbondanti, non eccessivamente scalari e costanti negli anni. Al contempo, la qualità dei boccioli fiorali è risultata di livello elevato grazie ad una ottima consistenza, mantenuta dopo la tradizionale salatura ed in salamoia. Le accessioni utilizzate nel

presente lavoro sono conservate *in situ on farm*, sull'Isola di Salina, direttamente negli appezzamenti in cui sono state reperite con il citato lavoro di indagine.

I primi di giugno sono stati prelevati germogli apicali che, dopo la rimozione delle foglie, sono stati lavati in acqua corrente e sezionati in segmenti uninodali (1 cm di lunghezza). Gli espianti uninodali sono stati sterilizzati attraverso immersione in soluzione di etanolo al 70% per 5 minuti e, successivamente, in soluzione di ipoclorito di sodio al 2% per 20 minuti seguita da tre risciacqui di 5 minuti in acqua distillata sterile. Dopo il risciacquo, la base dei segmenti nodali è stata leggermente rifulata al fine di evitare eventuali danni determinati dalla permanenza dell'ipoclorito di sodio. L'introduzione *in vitro* di espianti raccolti da piante adulte di capperò può presentarsi difficile per la presenza di funghi o contaminanti batterici, come riportato per molte altre specie (Duhem et al., 1988; Cassells et al., 1988; Onay 2000; Carimi e De Pasquale 2003).

2.1 Mezzi e condizioni di coltura

2.1.1 Substrato solido

Gli espianti una volta sterilizzati sono stati allevati in vasi Microbox contenete 25 ml di substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) supplementato con 8 g/L saccarosio e Plant agar (Duchefa) come agente gelificante, e posti in camera di crescita climatica a $25 \pm 1^\circ$ sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura1).

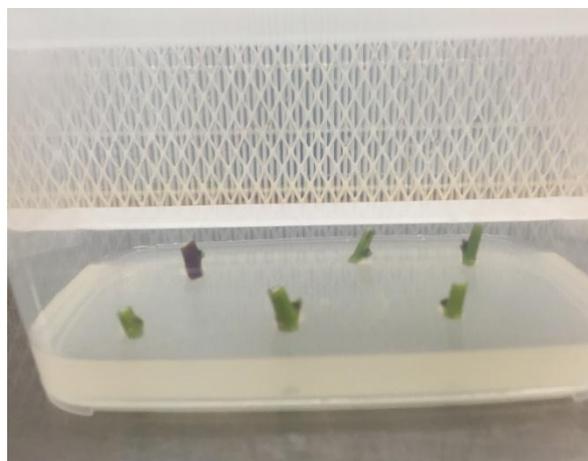


Figura 1 - Talee uninodali Sal 37 posti in substrato di introduzione *in vitro*

Al fine di confrontare l'effetto dei diversi regolatori di crescita sulla formazione dei germogli ascellari è stata testata una auxina e due citochinine: 6-benzilaminopurina (BAP) e meta-Topolin (mT).

Gli espianti ottenuti dalla fase di introduzione e/o stabilizzazione *in vitro* sono stati usati per la fase di moltiplicazione (Figura 2).



Figura 2 - Posizionamento espianti Sal 39 per avvio fase di moltiplicazione in bireattore a sinistra, su substrato solido a destra

Segmenti nodali (1 cm, in media) con gemme ascellari multiple, sono stati isolati dai germogli e subcoltivati su substrati MS integrato con (**tab.1**):

- Mezzo A1: 6-benzilaminopurina (BAP, Sigma B-4308), l'acido indolo-3butirrico (IBA, Sigma I-5.386)
- Mezzo A2: meta-Topolin (mT, alla stessa concentrazione della BAP), l'acido indolo-3butirrico (IBA, Sigma I-5.386)

In seguito, il materiale vegetale è stato mantenuto per 30 e 60 giorni in camera di crescita climatica a $25 \pm 1^\circ$ sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Strnad et al., (1997) hanno trovato una nuova citochinina aromatica, N6-meta-hydroxybenzyladenina dalle foglie di pioppo e hanno proposto il nome di meta-Topolin (mT). Questi ricercatori hanno registrato che la mT è più attiva della zeatina (ZEA) e della

benzilaminopurina (BAP), comunemente utilizzate nella coltura cellulare dei tessuti vegetali, capace di promuovere con maggiore efficienza la formazione di tessuti vegetali (Kubalaková e Strnad, 1992; Werbrouk e Strnad, 1996).

Tabella 1 Composizione mezzi di coltura

Componenti	Bap	mT
	litro	
Ms including vitamins	1X	1X
Sucrose	30 mg	30 mg
6- benzilaminopurina	6,6 μ M	
meta-Topolin		6,6 μ M
l'acido indolo-3butirrico	0,25 μ M	0,25 μ M
pH	5.07	5.07

2.1.2 Sistema a immersione temporanea PlantForm

Per la propagazione con sistema a immersione temporanea (TIS) sono stati usati i bioreattori PlantForm (Welander et al., 2014) (Figura 3). Il ciclo di immersione temporanea è stato controllato da un sistema elettronico impostato come segue:

- 2 immersioni al giorno per 2 minuti;
- 2 ricambi di aria al giorno per 2 minuti

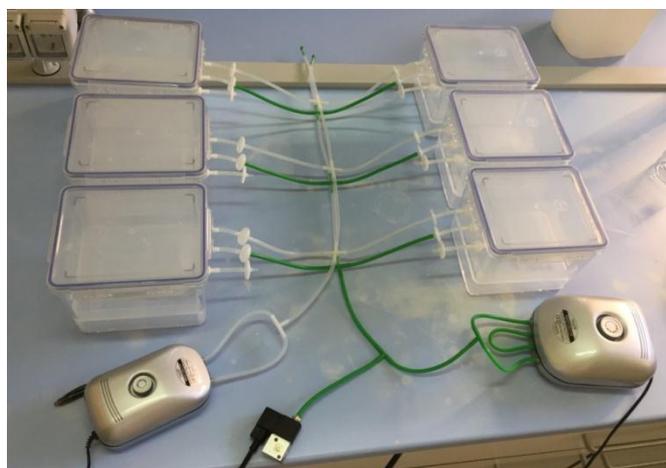


Figura 3 - Bioreattore PlantForm completo

L'iniezione di aria è stata eseguita utilizzando filtri a pori di 0,20 μ per promuovere la sterilizzazione. Preliminarmente, tutte le parti del bioreattore sono state sterilizzate in autoclave per 20 minuti a 120°C. I substrati di coltura utilizzati sono stati uguali a quelli su substrato solido; ogni bioreattore ha contenuto 500 ml di substrato. Il bioreattore è stato mantenuto in camera di crescita climatica a 25 \pm 1° sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

I bioreattori PlantForm sono composti da diverse parti in policarbonato e polipropilene totalmente autoclavabili. Presentano un coperchio a chiusura ermetica munito di una guarnizione allo scopo di evitare contaminazioni (Figura 4 A); all'interno è presente un sostegno che ha lo scopo di contenere il substrato quando questo non è a contatto con gli espianti (Figura 4 B/C) e, al contempo, su di esso poggia un supporto forato dove vengono disposti gli espianti (Figura 4 D/E). Per evitare che il supporto forato galleggi durante le fasi di immersione (e cioè di salita del substrato liquido) è presente un telaio che a contatto con il coperchio di chiusura, fissa il supporto al sostegno di fondo (Figura 4 F). La movimentazione del substrato è regolata dall'afflusso e deflusso di aria nel bioreattore che avviene grazie alla presenza di 3 fori che fungono da canali per il passaggio dell'aria (Figura 4 G); questi sono collegati a tubi muniti di filtri di 0,22 μ (Figura 4 H/I). Il foro centrale è collegato direttamente attraverso un tubo interno al fondo di sostegno del bioreattore e grazie ad esso, a seguito dell'immissione di aria, avviene la salita del substrato che entra in tal modo a contatto con gli espianti. Gli altri due fori servono: rispettivamente uno per la discesa del substrato e per eliminare l'aria in eccesso. Il bioreattore è stato progettato per contenere di 0,5 L di substrato liquido.

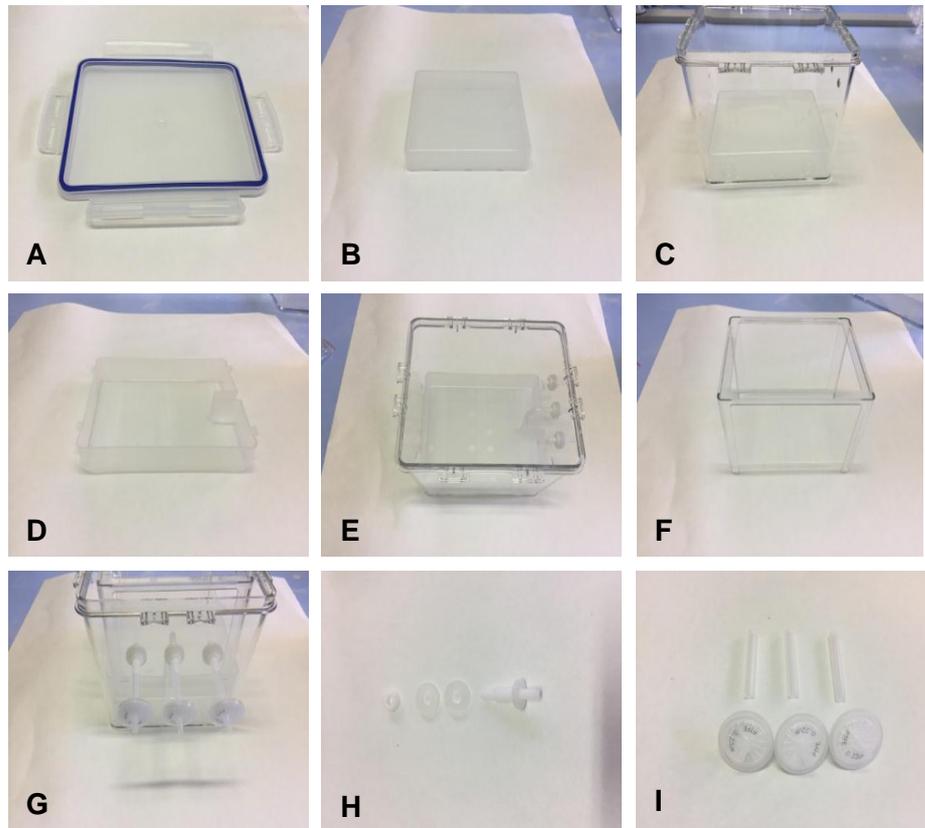


Figura 4 - Singole componenti del bioreattore PlantForm. A: coperchio a chiusura ermetica, B: sostegno del fondo per contenere il substrato, C: sostegno posto all'interno del bioreattore, D: supporto forato per le colture, E: bioreattore con il supporto all'interno, F: telaio per il fissaggio del supporto forato, G: bioreattore con filtri e tubi collegati, H: spinotto con guarnizioni che viene inserito nel foro per il collegamento dei tubi e dei filtri, I: tubi e filtri per collegare il bioreattore al sistema pneumatico.

Nell'ambito della sperimentazione ogni prova è stata condotta su tre distinti bioreattori. Per il funzionamento dei bioreattori si è utilizzato un sistema composto da due pompe pneumatiche HAILEA® ACO 9602 e ACO 9610 (Figura 5 A); la prima presenta una potenza di 5 W ed è impiegata per garantire la salita del substrato, essendo collegata al foro centrale del bioreattore; mentre la seconda pompa di maggiore potenza, 10 W, viene utilizzata per la discesa del substrato nel sistema e per il ricambio di aria all'interno dei contenitori; questa pompa è collegata al foro destro o sinistro del bioreattore mediante l'ausilio di tubi in polipropilene; il sistema come sopra descritto è isolato dall'esterno per prevenire contaminazioni attraverso filtri di 0,22 μ . Per agevolare la discesa del substrato, al fine di aumentare la quantità d'aria espulsa dal bioreattore, nel tubo di collegamento della pompa (utilizzata per l'immersione) è presente un'elettrovalvola (Figura 5 B) che si attiva allorquando il substrato deve scendere attraverso la fuoriuscita dell'aria dal sistema.

Le pompe e l'elettrovalvola vengono attivate attraverso l'utilizzo di timer (Figura 5 C) che vengono preimpostati con i tempi desiderati in funzione della durata di ciascuna immersione e della loro frequenza giornaliera.



Figura 5 - A: pompe per il funzionamento del sistema; B: elettrovalvola utilizzata per favorire la fuoriuscita di aria dal sistema; C: timer utilizzati per attivare il sistema.

La crescita *in vitro* e lo sviluppo della pianta sono determinati da regolatori di crescita che sono responsabili della divisione cellulare e crescita. I regolatori (auxina e citochinina) regolano lo sviluppo di organi su parti di piante coltivate *in vitro*. Le Auxine (IAA, IBA, NAA o 2,4-D) inducono l'allungamento cellulare e gonfiore dei tessuti, divisione cellulare (formazione di callo) e formazione di radici avventizie, mentre le citochinine (chinetina, BAP, mT, 2ip o ZEA) stimolano la crescita e lo sviluppo. Inoltre migliorano la divisione cellulare e inducono formazione di germogli avventizi diminuendo la dominanza apicale (Pierik, 1987). Sono disponibili pochi documenti sulla propagazione *in vitro* del cappero e sono principalmente focalizzati sull'inizio della propagazione da materiale vegetativo. Da alcuni esperimenti condotti, i migliori risultati, in termini di induzione di sviluppo germogli ascellari, sono stati ottenuti quando citochinine e auxine che, principalmente

BAP, da solo o in combinazione con basse concentrazioni di auxine, sono stati usati (Salem et al., 2001; Chalak et al., 2003; Carra et al., 2012 b).

L'effetto dei diversi mezzi colturali e dei metodi di coltura sulla moltiplicazione è stata determinata a 30 e 60 giorni al termine dei quali è stato calcolato:

- il tasso di crescita relativa su peso fresco (*Relative growth rate*: RGR) :
($RGR = \frac{\ln(\text{peso finale}) - \ln(\text{peso iniziale})}{n^\circ \text{giorni di subcoltura}} * 100$)
- il tasso di proliferazione reale dei germogli (*Abosulte growth rate*: AGR):
($AGR = \frac{n^\circ \text{microtalee finali}}{n^\circ \text{microtalee iniziali}}$)
- numero e lunghezza dei germogli.

Il tasso relativo di crescita o *Relative Growth Rate* (RGR) è un indice della capacità di sviluppo delle specie, e quindi della immediata risposta ai trattamenti, poiché misura il tasso proporzionale di crescita per unità di tempo, mentre l'*Abosulte Growth Rate* (AGR) è un parametro che caratterizza la crescita reale degli espianti al termine del trattamento. Entrambi sono influenzati dalla cultivar presa in considerazione, dai regolatori di crescita presenti nel mezzo e dal metodo di coltura utilizzato.

3. Analisi dei dati

Ogni trattamento ha compreso 25 espianti. Cinque repliche (vaso Microbox) e cinque espianti per replica sono stati sottoposti a ciascuno dei trattamenti in sperimentazione per la coltivazione in mezzo solido. Nel sistema a immersione temporanea (TIS) sono stati posti all'interno di ogni bireattore 25 espianti.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SYSTAT 13. Per evidenziare differenze statisticamente significative e l'eventuale interazione tra i due fattori, è stata effettuata l'Analisi della Varianza (ANOVA) a due vie ($p \leq 0,05$). L'ANOVA a una via è stata realizzata quando l'interazione fra i due fattori non si è dimostrata significativa; ogni fattore è stato analizzato singolarmente e la separazione delle medie è stata realizzata mediante test di Tukey ($p \leq 0,05$).

4. Risultati e discussioni

Dai risultati ottenuti si evince che le tre selezioni messe in coltura hanno risposto in maniera differente ai sistemi colturali e mezzi di coltura utilizzati.

Entrambi i fattori, il sistema di coltura e la concentrazione dei regolatori di crescita, hanno influenzato la proliferazione di *Capparis spinosa* L.

Differenze significative sono state osservate tra i sistemi di coltura dopo 30 e 60 giorni. Nel complesso, i germogli di *C. spinosa* propagati in PlantForm hanno mostrato una buona adattabilità e un tasso di crescita migliore rispetto a quelli coltivati su substrato solido ($p \leq 0,05$).

Il più alto valore di Relative growth rate (RGR) è stato registrato quando la meta-Topolin (mT) è stata usata come fonte di citochinina in sostituzione alla 6-Bendiamminopurina (BAP).

In tutti i confronti, tra i due sistemi di coltura utilizzati quello ad immersione temporanea in bioreattore (denominato liquido) ha dato i migliori risultati (Figura 6, 7)

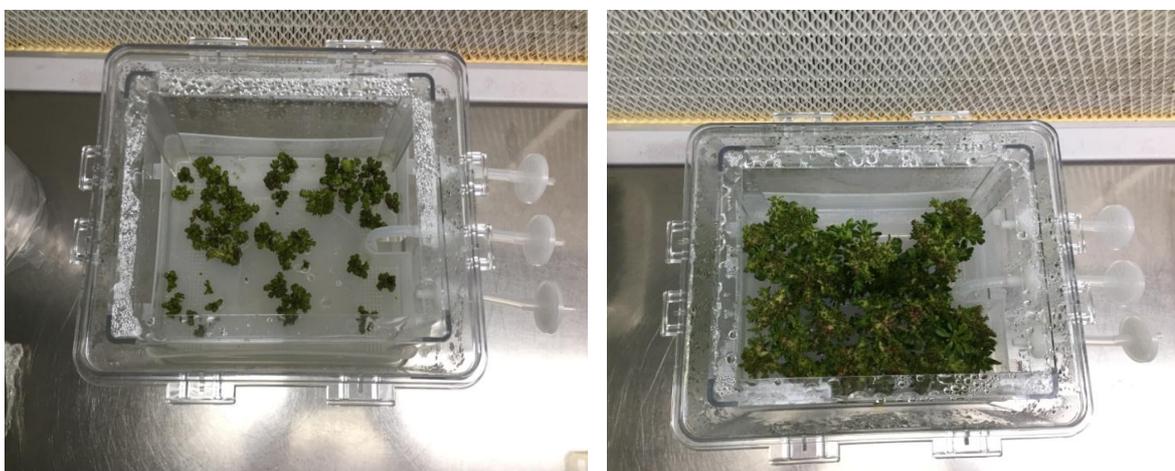


Figura 6 - Espianti di Sal 37 in bioreattore a sinistra dopo 60 giorni; a destra espianti di Sal 39.

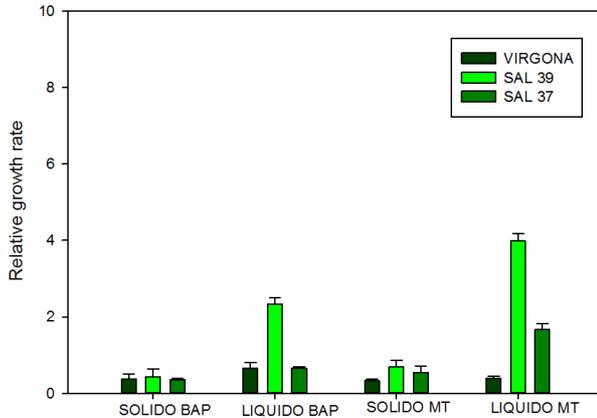


Figura 7 - Espianti di Sal 39 in substrato solido a sinistra dopo 60 giorni; a destra espanti di Sal 37 dopo 60 giorni.

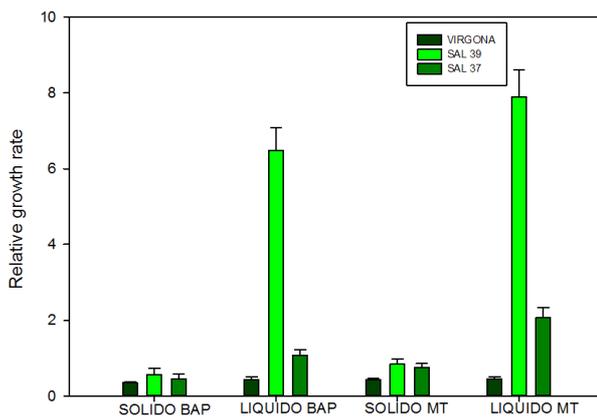
La selezione 39 è quella che ha fatto registrare i migliori risultati di RGR in mezzo contenente la meta-Topolin (mT) pari a 3,98 a 30 giorni in TIS; a differenza del mezzo solido nel quale è stato ottenuto un RGR pari a 0,69. Invece, la selezione Virgona, al contrario, ha mostrato una scarsa tendenza ad emettere germogli con un RGR più basso rispetto alle altre due selezioni. (**Graff. 1, 2**)

L'indice RGR, valutato dopo 30 e 60 giorni, ha confermato il miglioramento della crescita della coltura nel sistema TIS rispetto al sistema in mezzo solido confermando quanto già osservato da Benelli e De Carlo (2018) in *Olea europaea* L. cv Canino che con il medesimo supporto PlantForm avevano osservato il miglioramento della crescita della coltura nel sistema TIS rispetto al mezzo semisolido con un RGR crescente anche in funzione della percentuale di ormoni utilizzata nel mezzo.

Nel presente lavoro, un valore di RGR elevato è stata registrata anche dopo 60 giorni di coltura continua (cioè senza subcoltura). Infatti, RGR della coltura di germogli in TIS contenenti 6,6 μ M mT + 0,25 μ M IBA è stata di 7,89 rispetto a 0,84 su mezzo solido.

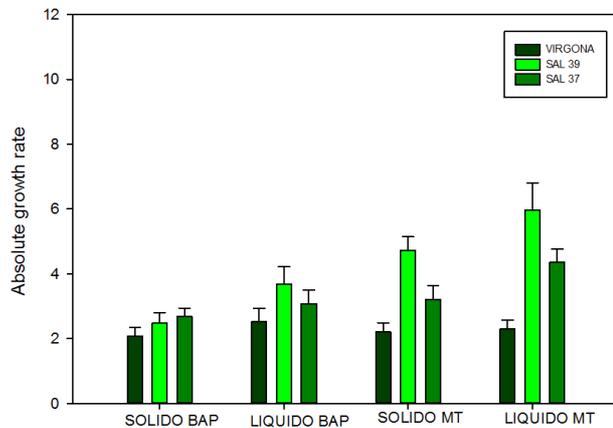


Graf. 1- Relative Growth Rate (RGR) di *C. spinosa* dopo 30 giorni nei diversi sistemi di coltura.

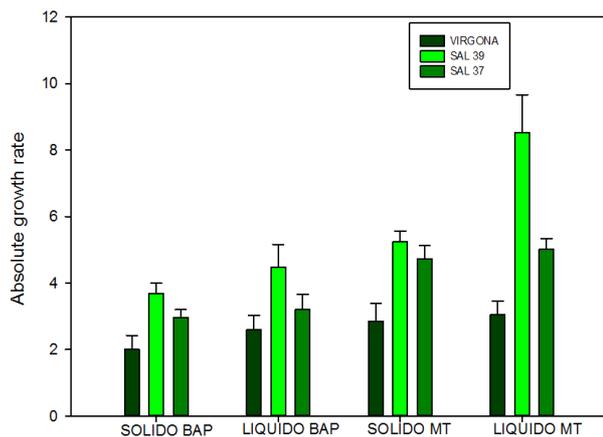


Graf. 2 - Relative Growth Rate (RGR) di *C. spinosa* dopo 60 giorni nei diversi sistemi di coltura.

Per quanto riguarda l'analisi dell'*Absolute growth rate* (AGR), i risultati statisticamente significativi sono stati ottenuti con i mezzi in presenza di meta-Topolin (mT). Anche in questo caso la selezione che ha dato i migliori risultati è stata la Sal 39 in mezzo liquido contenente la meta-Topolin (mT) con AGR pari a 5,96 a 30 giorni e 8,52 a 60 giorni di subcoltura. Segue poi Sal 37 con AGR 4,72 a 60 giorni. La selezione Virgona è stata quella che ha dato anche per l'analisi del tasso di proliferazione assoluto i risultati più bassi. (Graf. 3, 4)



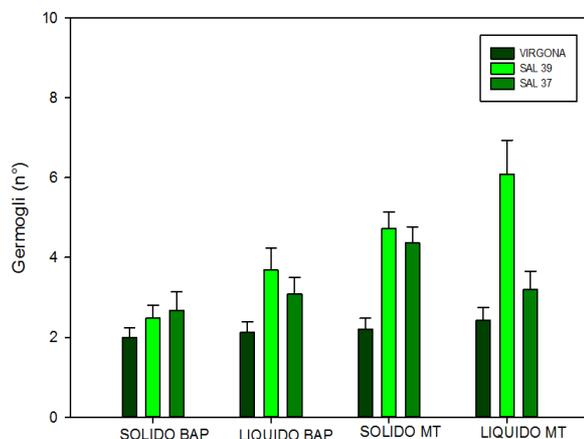
Graf. 3 - Absolute growth rate (AGR) di *C.spinosa* dopo 30 giorni nei diversi sistemi di coltura.



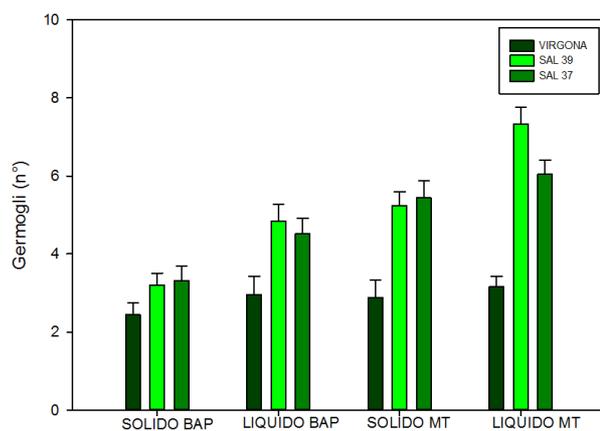
Graf. 4 - Absolute growth rate (AGR) di *C.spinosa* dopo 60 giorni nei diversi sistemi di coltura.

Dall' analisi statistica condotta su parametri di crescita, si è rivelato, che c'è stata una significativa interazione tra i fattori sulla lunghezza e numero dei germogli. Un più alto numero di germogli è stato ottenuto nel TIS rispetto al mezzo solido (7,32 vs 5,24, rispettivamente) in presenza di meta-Topolin (**Graff. 5, 6**).

Nel presente studio, l'induzione dei getti ascellari è stata maggiore in mezzo MS integrato con mT 6,6 μ M + 0,25 μ M IBA rispetto al substrato contenente la BAP.



Graf. 5 - Effetto di diversi sistemi di coltura e concentrazioni dei regolatori di crescita sul numero di germogli in *C. spinosa* 30 giorni.



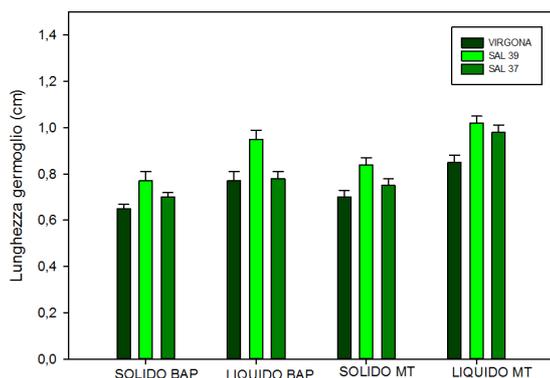
Graf. 6 - Effetto di diversi sistemi di coltura e concentrazioni dei regolatori di crescita sul numero di germogli in *C. spinosa* 60 giorni.

Carra et al., (2011a) hanno usato MS con 6 μM BAP + 0,12 μM IBA per la moltiplicazione ottenendo $8,9 \pm 1,6$ germogli per espianto. Carra et al., (2012 b) ponendo gli espianti in MS, integrato con 88 nM di saccarosio, 6,6 μM BAP + 0,25 μM IBA hanno generato da 8 a 10 germogli. Rodriguez et al., (1990) hanno ottenuto una risposta dell'80 % in mezzo MS2 con 4 μM di BAP, con 4 germogli per espianto. Nel presente lavoro, dai valori ottenuti dalle masse di germogli, in mezzo contenente BAP, si può ottenere da 3,2 germogli con una lunghezza di 0,82 cm in mezzo solido, fino a 4,84 espianti con una lunghezza dei germogli di 0,95 cm in mezzo liquido per la Sal 39 dopo 60 gg di coltura;

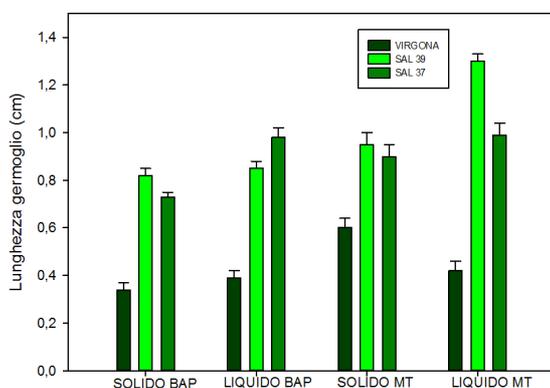
mentre per la Sal 37 sono stati ottenuti in media 3,32 germogli in substrato solido fino a 4,52 in substrato liquido.

In mezzo contenente mT, è stata ottenuta una media di germogli per la Sal 39 di 5,24 con una lunghezza di 0,95 cm in mezzo solido, fino a 7,32 germogli con lunghezza di 1,3 cm in mezzo liquido; seguita dalla Sal 37 con 5,44 germogli in solido fino a 6,04 in liquido. Una maggiore lunghezza degli espianti è stata ottenuta nel sistema a immersione temporanea (TIS) rispetto al mezzo solido (1,3 cm vs 0,95 cm) per la Sal 39 in mezzo MS integrato con mT dopo 60 giorni di coltura (**Graff 7, 8**).

Le altre due selezioni Sal 37 e Virgona hanno dato una lunghezza dei germogli più bassa. Dai dati ottenuti si evidenzia il ruolo che ha giocato sia il regolatore di crescita mT presente nel mezzo che anche il sistema di coltura utilizzato nella fase di distensione dei tessuti in accrescimento (Figura8, 9).



Graf. 7 - Effetto di diversi sistemi di coltura e concentrazioni dei regolatori di crescita sulla lunghezza di germogli in *C. spinosa* dopo 30 giorni di coltura.



Graf. 8 - Effetto di diversi sistemi di coltura e concentrazioni dei regolatori di crescita sulla lunghezza di germogli in *C. spinosa* dopo 60 giorni di coltura.

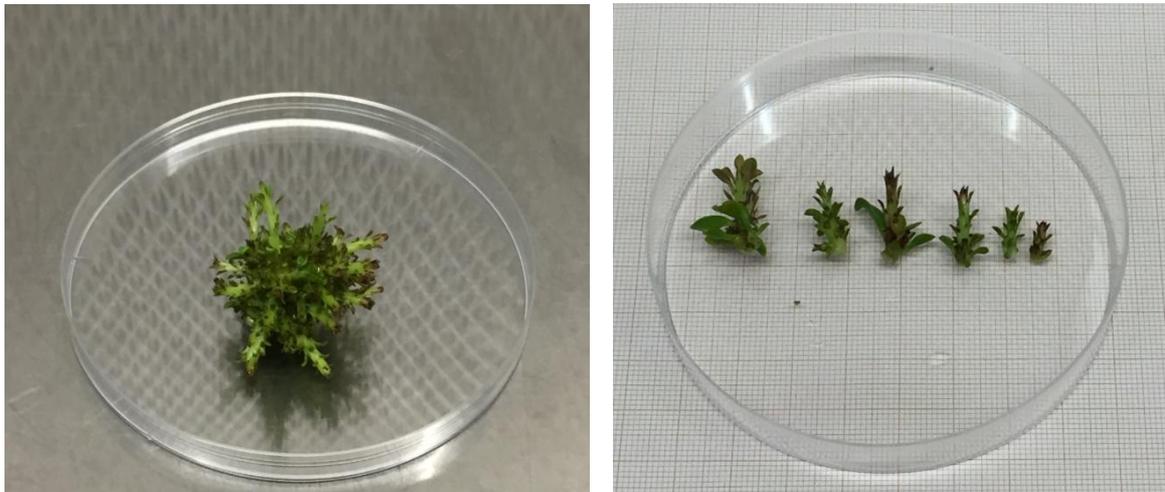


Figura 8 - Espianto Sal 39 ottenuto in bireattore dopo 60 giorni a sinistra, lunghezza espianti Sal 39 a destra.

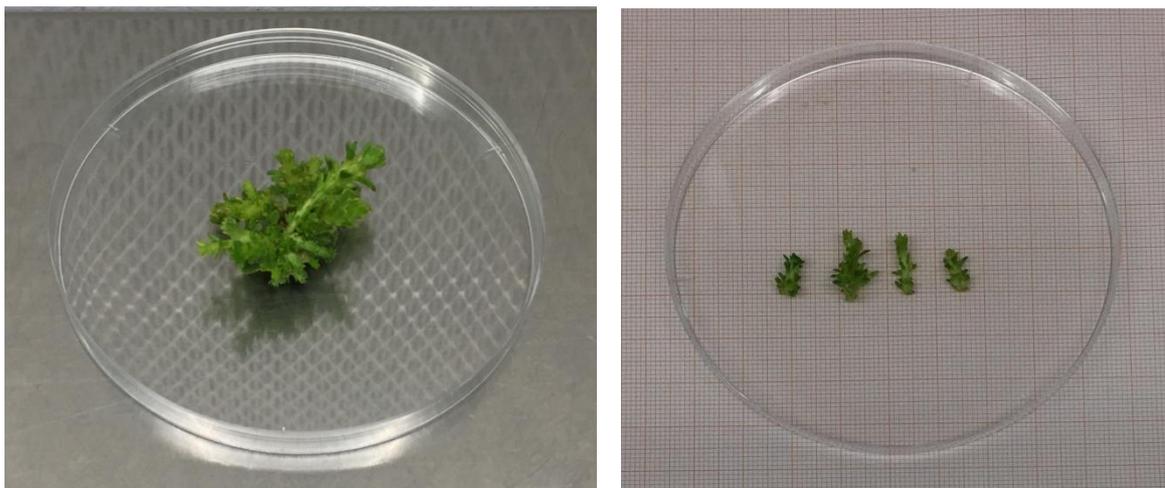


Figura 9 - Espianto Sal 39 ottenuto su substrato solido dopo 60 giorni a sinistra, lunghezza espianti Sal 39 a destra.

Molti studi hanno dimostrato che la BAP ha un effetto significativo sulla moltiplicazione dei germogli. Per esempio, Rodriguez et al. (1990) hanno riferito che BAP si è dimostrata un efficiente agente proliferante in tutte le concentrazioni saggate stimolando specifiche percentuali di crescita simultanea di germogli multipli di cappero. Inoltre, i risultati di Abbas e Qaiser (2010) hanno mostrato che diverse concentrazioni di BAP nel mezzo MS hanno avuto un effetto significativo sulla frequenza di rigenerazione dei germogli (65%) e il numero di germogli per espianto in *Cadaba eterotricha* (Capparaceae).

Risultati simili sono stati riportati, per *Capparis spinosa* L., da Carra et al., (2012a, b) ed è maggiore di quanto è stato citato da Rodriguez et al., (1990).

Nel presente lavoro i migliori risultati sono stati ottenuti in mezzo MS integrato con la meta-topolin. L'efficienza di mT è stata documentata per un certo numero di specie vegetali (Kubalaková e Strnad, 1992; Werbrouk e Strnad, 1996; Chiancone et al. 2015; Chiancone et al. 2017).

5. Conclusioni

Questo studio è stato finalizzato per capire se l'utilizzo dei bioreattori PlantForm possa rappresentare una valida alternativa alle tradizionali tecniche su substrato solido, in termini di indici di proliferazione, tasso di crescita relativo, numero e lunghezza dei germogli. Va sottolineato che nessuno studio precedente con tecniche TIS è mai stato effettuato su questa specie che è specificamente definita recalcitrante alla propagazione agamica. L'uso del sistema TIS è stato riscontrato per altre specie come: *Pinus radiata* (Atiken- Christie & Jonas, 1987); Banana (Alvard et al., 1993); *Saccharum* spp. (Lorenzo et al., 1998); *Ananas comosus* (Escalona et al., 1999); arborescenze di conifere (Gupta e Timmis, 2005); *Psidium guajava* L. (Vilchez e Albany, 2014) e altri. Tutti menzionano gli effetti positivi in uno o più stadi di proliferazione dei tessuti vegetali.

Dai risultati ottenuti, durante la fase di moltiplicazione sono state osservate differenze tra il sistema a immersione temporanea (TIS) in bioreattore PlantForm e terreno solido per quanto riguarda i parametri presi in considerazione. Si è avuto un RGR più alto in TIS rispetto al mezzo solido.

Come dimostrato in questo studio, gli indici di proliferazione, il numero di germogli prodotti per espianto sono migliori nel sistema a immersione temporanea in bioreattore rispetto al mezzo solido, come già osservato su specie a propagazione più semplice Etienne e Berthouly, (2002), Gupta e Timmis, (2005); Mamun et al., (2015); Vilchez e Albany, (2014) e Ziv, (2005).

Le colture in bioreattore hanno diversi vantaggi rispetto alle colture su substrato agarizzato, con un migliore controllo del contatto del tessuto vegetale con il mezzo di coltura, e un apporto ottimale di nutrienti e regolatori di crescita, così come l'aerazione e la circolazione del substrato, la filtrazione del mezzo e il ridimensionamento delle colture. Il sistema TIS può migliorare il protocollo di propagazione che introduce un processo di

coltivazione semi-automatico, ventilazione forzata e mezzo liquido (in grado di promuovere un assorbimento più efficace dei nutrienti).

In generale, è possibile concludere che l'utilizzo del mezzo liquido può essere correlato a un aumento della produzione di massa anche nelle colture di cappero. La disponibilità di nutrienti minerali dipende dal tipo di coltura, sia essa *agar-gelled* o liquido, il tipo e la dimensione degli espianti. Di conseguenza, la durata e la frequenza dell'immersione in TIS sono parametri che devono essere considerati per il successo della micropropagazione. Questo aspetto può in parte influenzare anche la dimensione dei germogli inducendo, ad esempio, una riduzione della lunghezza e numero dei germogli.

Va comunque rilevato che, così come in genere accade per le colture di tessuti vegetali, l'effetto genotipo non è indifferente. I dati presentati, infatti, dimostrano che alcuni genotipi sono più adattabili all'applicazione di tecniche di moltiplicazione *in vitro* quasi a voler confermare che non è semplice mettere a punto un protocollo per ogni singola specie mentre si rende necessario valutare forme di adattamento che si rivelino idonee per ciascun genotipo. Nei casi in cui, tuttavia, tale formula risulti efficiente nei sistemi TIS, la produzione che ne deriva può rappresentare un successo economico per l'attività di propagazione in vivaio qualora la struttura sia dotata di un piccolo laboratorio per le colture di tessuti vegetali *in vitro*.

6. Bibliografia

- Abbas, H., Qaiser, M. (2010). *In Vitro* Conservation of *Cadaba Heterotricha* Stocks, an Endangered Species in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42(3), pp. 1553-1559.
- Aitken- Christie, J. & Jones C. (1987). Towards automation: radiate pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8, 185-196.
- Al-Safadi B, Elias R. (2011). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using *in vitro* culture and gamma irradiation. *SciHortic* 127:290–297.
- Alvard D., Cote F. & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 55-60.
- Ancora G, Cuzzo L. (1984). *In vitro* propagation of caper (*Capparis spinosa* L.). *Atti del XXVIII Convegno della S. I. G. A*

- Barbera G, Di Lorenzo R. (1984). The caper culture in Italy. *Acta Hort*144:167-171.
- Benelli Carla e De Carlo Anna (2018). *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europea* L. cv Canino with temporary immersion system (PlantForm). *3 Biotech* (2018) 8:317Doi: 10.1007/s13205-018-1346-4
- Caglar C, Caglar S, Ergin O, Yarim M. (2005). The influence of growth regulators on shoot proliferation and rooting of *in vitro* propagated caper. *J Environ Biol* 26:479–485.
- Carimi F, De Pasquale F. (2003). Micropropagation of *citrus*. In: Jain SM, Ishii K (eds) *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer, Dordrecht, pp 589–619.
- Carla B., Fernanda C.M., De Carlo A. (2015). 'Plant Form', a temporary immersion system, for *in vitro* propagation of *Myrtus communis* and *Olea europaea*. The 6th International ISHS Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants (PEMP) Sanremo Italy 19-24 of April.
- Carra A., Del Signore M.B., Sottile F., Ricci A., Carimi F. (2012 b). Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L.. *Plant Growth Regul* (2012) 66:229–237 DOI 10.1007/s10725-011-9645-3.
- Carra A., Del Signore M.B., Sottile F., Ricci A., Carimi F. (2011). Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L. *Plant Growth Regul*. doi: 10.1007/s10725-011-9645-3.
- Cassells A.C., Carney B.F., McCarthy E., McHugh A., Harmeý M.A. (1988). Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium X domesticum*: the use of *Xanthomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants. *ActaHortic* 225:153–162.
- Chalak L., Elbitar A., Cordahi N., Hage C., Chehade A. (2003). *In vitro* propagation of *Capparis spinosa* L. *ActaHort*. 616 :335–338.
- Chiancone B., Karasawa M.M.G., Gianguzzi V., Abdelgalel A.M., Bárány I., Testillano D., Marinoni D., Botta D. and Germanà M.A. (2015). Early embryo achievement through isolated microspore culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan., cvs. 'Monreal Rosso' and 'Nules'. *Front. Plant Sci.*, 11 June 2015 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00413>.

- Chiancone B., Martorana L., Gianguzzi V., Germanà M.A. (2017). The effects of meta-Topolin and benzyladenine on *in vitro* organogenesis from epicotyl cuttings of Troyer citrange (*Citrus sinensis* L. Osbeck X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) ActaHorticulturae doi10.17660/ActaHortic.2017.1155.26.
- Damiano C., La Starza S.R., Monticelli S., Gentile A., Caboni E., Frattarelli A. (2005). Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. - In: Hvoslef - Eide, A.K., Preil, W. (Eds.), Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer, Netherlands, pp. 243–251.
- Duhem K., Le Mercier N., Boxus P.H. (1988). Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* culture of field collected coffee and cacao germplasm. ActaHortic 225:67–76.
- Enrico G., Ozudogru A., Lambardi M., Sgarbi, E. (2015). Comparison between a conventional culture system and plant for bioreactor in *Quercus robur* micropropagation. The 6th International ISHS Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants (PEMP) Sanremo Italy 19-24 of April.
- Etienne H. & Berthouly M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69: 215–231
- Escalona M., Lorenzo J.C., Gonzales B., Daquinta M., Gonzalez J.L., Desjardins, Y & Borroto C.G. (1999). Pinnapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports, 18, 743-748.
- Gupta, P.k. & Timmis, R. (2005). Mass propagation of conifer trees in liquid cultures- progress towards commercialization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81, 339-346.
- Horshati E., Jambor-Benczur E. (2006). *In vitro* propagation of *Capparis spinosa*. ActaHortic 725:151–154.
- Lorenzo J.C., Gonzalez B.L., Escalona M., Teisson C., Espinosa P. & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in a improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54, 197-200.
- Kubalaková M. and Strnad M. (1992). The effects of aromatic cytokinins on micropropagation and regeneration of sugar beet *in vitro*. Biologia Plantarum Suppl. 34: 578-579.

- Maciel de R., Lygia A., Almendagna F.R., De Carvalho M., Siqueira C.H., (2016). Acclimatization of Coffe ('*Coffea racemosa*'. '*Coffea arabica*) somaclones obtained from temporary immersion bioreactor system (RITA). Australian Journal of Crop Science. Volume 10: 169-175.
- Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U. & Aidun, C.K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Frontiers in Biology*, 10 (2), 177-193.
- Maria Teresa G., Paula Y., Jesùs S., Angel M. (2014). Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differetiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource Technology*. Volume 151: pages 191-198.
- Movafeghi A., Ghader H., Aliasgharpour M. (2008). Regenaretion of *Capparis spinosa* L. using hypocotyl explants. *Iranian J Biol*21:289–297.
- Musallam I., Duwayri M., Shibli R. (2010). Micropropagation of caper (*Capparis spinosa* L.) from wild plants. *Funct Plant SciBiotechnol* 5(special issue):17–21.
- Pierik R.L.M. (1987). *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *ISHS ActaHorticulturae* 226. Doi: 10.17660/ActaHortic.1988.226.1.
- Oliveira A.S.C., Filho F.N.C., Do Nascimento R.A.H., Paiva L.K.B. (2011). A palma forrageira: alternativa para o semi –árido. – *Revista Verde* (Mossorò – RN- Brasil), v.6, n.3, p. 49 – 58.
- Onay A. (2000).Micropropagation of pistachio from mature trees. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60:159–162.
- Rodriguez R., Rey M., Cuozzo L., Ancora G. (1990). *In vitro* propagation of caper (*Capparis spinosa* L.). *In Vitro Cell Dev Biol* 26:531–536.
- Salem A.B., Zemni H, Ghorbel A. (2001). Propagation of caper (*Capparis Spinosa* L.) by herbaceous cuttings and *in vitro* culture. *Agric Med* 31:42–48.
- Sozzi G.O., Chiesa A. (1995). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.)seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. *SciHortic*62:255-261.
- Strnad M., Hanus J., Vanek T., Kaminek M., Ballantine J.A., Brynleyand F., Hanke D.E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from polar laves (*Populus x canadensis* Moench., CV Robusta). *Phytochem*, 45:213-218.

- Vichez, J. & Albany, N. (2014). Multiplicacion *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de immersion temporal. Revista Colombiana de Biotecnologia, XVI (2), 96-103.
- Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L.H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. – Scientia Horticulturae, 179: 227 – 232.
- Werbrouk S.P.O., Strnad M., Van Onckolen H.A. and Deberg P.C. (1996). Meta-topolin an alternative to benzyladenine in tissue culture. Physiol Plant., 98: 291-297.
- Yan H., Liang C., LI Y. (2010). Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. - Plant Cell, Tissue Organ Cult. 103, 131–135.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81, 277-285.
- Zobayed S.M.A., Saxena P.K. (2003). *In vitro*-grown roots; a superior explants for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in temporary immersion bioreactor. Plant Science. Volume 165, pages 463-470.

ESPERIMENTO 2

EFFETTO DELLA TIPOLOGIA DI PRODUZIONE *IN VITRO* SULL'INDUZIONE ALLA RADICAZIONE DI *CAPPARIS SPINOSA L.*

Riassunto

La propagazione del capperò (*Capparis spinosa L.*) è stata eseguita utilizzando germogli di tre selezioni di *Capparis spinosa L.*, coltivati nell'isola di Salina (ME), e propagati in mezzo solido e in coltura liquida in bioreattore PlantForm. Gli espianti ottenuti dal sistema di coltivazione su substrato solido e su substrato liquido in bioreattori, sono stati utilizzati come materiale di base per gli esperimenti di radicazione. Tre esperimenti sono stati valutati, trasferendo i germogli ottenuti su mezzo MS (Murashige e Skoog 1962) integrati con: NAA, IBA e IAA alla concentrazione di 1 e 2 mg/L per ogni tipo di mezzo; differente presenza di zuccheri: saccarosio e fruttosio in combinazione con le auxine utilizzate nel primo esperimento; differente concentrazione di zuccheri: saccarosio e fruttosio in combinazione con 0,75 mg/L di NAA e 0,25 mg/L di IBA. Mettendo a confronto i tre esperimenti effettuati per l'induzione alla radicazione, il tasso più elevato di radicazione in termini di percentuale di radice per espianto è stato raggiunto quando i germogli di partenza provenivano da coltura liquida in bioreattore PlantForm e sono stati posti in mezzo MS e come fonte di carbonio il saccarosio e integrato con NAA alla concentrazione di 2 mg/L oppure una combinazione di ormoni composta da NAA 0,75 mg/L + IBA 0,25 mg/L. In queste condizioni sperimentali è stato possibile ottenere il 67 % di germogli radicati. Mettendo a confronto due differenti fonti di carbonio il fruttosio ha dato risultati più bassi (25%). Dopo sei settimane dall'induzione delle radici le piantine *in vitro* sono state acclimatate trasferendole in condizioni di assoluta sterilità prima in Jiffy® pot e successivamente trasferiti in vasi di plastica contenenti miscela di terra con perlite e poste in condizioni di crescita controllate. Successivamente le piantine rigenerate sono state acclimatate in serra

1.Introduzione

Il Capperò è una specie in via di estinzione che, se opportunamente promossa, potrebbe dare un contributo più forte allo sviluppo delle aree locali (Gruère et al., 2006).

Nonostante la sua importanza economica ed ecologica, solo pochi studi sono stati condotti sulla propagazione di *C. spinosa*; quasi tutte le ricerche si sono concentrate solo sulle sue proprietà medicinali (Infantino et al., 2008).

La propagazione del capperò per talea è difficile, soprattutto durante l'induzione alla radicazione che risulta non commercialmente fattibile (TansU 'e Kocabaa 1997; Alkire 2000). Per questa ragione l'istituzione di una procedura di propagazione efficiente è di particolare interesse per la moltiplicazione delle piante. La radicazione *in vitro* è un aspetto cruciale e, anche se diversi autori hanno riportato un successo elevato di percentuali (80-100%), l'induzione alla radicazione richiede alti livelli di auxine che però stimolano la formazione del callo (Chalak e Elbitar 2006; Musallam et al., 2010). In queste condizioni colturali, le radici potrebbero essere indotte a produrre callo e la presenza di callo nella radice risulta inappropriata per il trasferimento *ex vitro*, come riportato per altre specie (Ricci et al., 2001). Inoltre alte concentrazioni di auxine potrebbe essere inibitorie per la crescita delle radici (El Tahchy et al., 2011).

L'obiettivo del presente lavoro di ricerca, è stato quello di elaborare e ottimizzare protocolli di micropropagazione per la radicazione di capperò partendo da espianti ottenuti da moltiplicazione in sistemi a immersione temporanea TIS della tipologia PlantForm (Welander et al., 2014; Yan et al., 2010; Damiano et al., 2005) e da coltura su substrato solido.

2.Materiali e metodi

Espianti uninodali sono stati prelevati da piante adulte di genotipi siciliani di *Capparis spinosa* L. coltivati nell'isola di Salina (ME). Anche in questo caso sono state prese in considerazione le tre accessioni precedentemente descritte: Sal 39, Sal 37 e Virgona.

I primi di giugno sono stati prelevati germogli apicali che, dopo la rimozione delle foglie, sono stati lavati in acqua corrente e sezionati in segmenti uninodali (1 cm di lunghezza).

Gli espianti uninodali sono stati sterilizzati attraverso immersione in soluzione di etanolo

al 70% per 5 minuti e, successivamente, in soluzione di ipoclorito di sodio al 2% per 20 minuti seguita da tre risciacqui di 5 minuti in acqua distillata sterile. Dopo il risciacquo, la base dei segmenti nodali è stata leggermente rifilata al fine di evitare eventuali danni determinati dalla permanenza dell'ipoclorito di sodio.

Gli espianti, una volta sterilizzati, sono stati stabilizzati in vasi Microbox contenute 25 ml di substrato MS (Murashige e Skoog 1962) supplementato con 8 g/L saccarosio e Plant agar (Duchefa) come agente gelificante, e posti in camera di crescita climatica a $25 \pm 1^\circ$ sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La fase di moltiplicazione è stata condotta sia su substrato solido che liquido in bioreattori PlantForm e su due mezzi di coltura contenenti 6-benzilaminopurina (BAP, Sigma B-4308) e meta-Topolin (mT, alla stessa concentrazione della BAP). Il bioreattore è stato impostato con: 2 cicli di immersione al giorno per 2 minuti e 2 ricambi di aria al giorno per 2 minuti. Gli espianti posti in Microbox e in bioreattori PlantForm per l'intera durata della fase di moltiplicazione sono stati mantenuti in camera di crescita climatica a $25 \pm 1^\circ$ sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Gli espianti ottenuti dal sistema di coltivazione su substrato solido e su substrato liquido in bioreattori, in presenza di $6 \mu\text{M}$ mT + $0,25 \mu\text{M}$ IBA, sono stati utilizzati come materiale di base per gli esperimenti di radicazione.

I germogli rigenerati sono stati usati per la fase di radicazione, tre esperimenti sono stati testati trasferendo i germogli ottenuti su mezzo MS (Murashige e Skoog 1962) supplementato con 8 g/L saccarosio e Plant agar (Duchefa) integrati con:

- a. Differente presenza di auxine: NAA, IBA e IAA alla concentrazione di 1 e 2 mg/L per ogni tipo di mezzo;
- b. Differente presenza di zuccheri: saccarosio e fruttosio in combinazione con le auxine utilizzate nel primo esperimento;
- c. Differente concentrazione di zuccheri: saccarosio e fruttosio in combinazione con 0,75 mg/L di NAA e 0,25 mg/L di IBA.

Ogni trattamento ha compreso 42 espianti. Sei repliche (piastre Petri) e sette espianti per replica sono stati sottoposti a ciascuno dei trattamenti in sperimentazione. Per ogni trattamento la coltura è stata posta in camera di crescita climatica a $25 \pm 1^\circ$ sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Dopo sei settimane sono stati registrati i dati di percentuale, numero e lunghezza (cm) delle radici.

3. Analisi dei dati

Il disegno sperimentale è stato a randomizzazione completa, per evidenziare differenze statisticamente significative e l'eventuale interazione tra i due fattori, è stata effettuata l'Analisi della Varianza (ANOVA) a due vie ($p \leq 0,05$). L'ANOVA a una via è stata realizzata quando l'interazione fra i due fattori non si è dimostrata significativa; ogni fattore è stato analizzato singolarmente e la separazione delle medie è stata realizzata mediante test di Tukey ($p \leq 0,05$).

Quando gli effetti dei differenti mezzi colturali utilizzati in presenza di diversi ormoni e fonte di carbonio sono stati espressi come percentuali (su base scatola Petri), prima delle analisi, i dati sono stati opportunamente trasformati. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Systat 13 per Windows.

4. Risultati e discussioni

È stato valutato l'effetto del tipo di auxina sull'induzione della radice di *C. spinosa* dopo sei settimane di coltura. E' stata confrontata la risposta alla radicazione ai diversi esperimenti, utilizzando come materiale di partenza gli espianti ottenuti da substrato solido e da substrato liquido in bireattore PlantForm.

Dopo sei settimane di coltura sono state evidenziate variazioni significative tra le selezioni messe in coltura e all'interno dei vari regolatori di crescita e concentrazioni utilizzate nella radicazione di *Capparis spinosa* (Tabella 1, 2).

Dai risultati ottenuti, mettendo a confronto gli espianti provenienti da coltura solida e liquida che hanno emesso radici, il mezzo contenente NAA, ha dato la migliore formazione delle radici nelle selezioni scelte di *C. spinosa* e la maggiore percentuale di germogli radicati, lunghezza della radice e numero di radici è stato ottenuto alla concentrazione 2,0 mg/L.

Nel caso in cui gli espianti provenivano da liquido, la selezione che ha dato i migliori risultati è stata la Sal 39 in mezzo MS integrato con 2 mg/L di NAA che ha dato la più alta risposta di induzione alla radicazione (57%) seguita da 1 mg/L di NAA (36%). Anche nel substrato privo di auxine è stata ottenuta l'induzione delle radici con il 43 %. Dall'altra

parte, l'IBA (2mg/L) e IAA (2 mg/L) hanno dato una risposta di radicazione pari a 26 % e 24%. Inoltre, una concentrazione di IBA di 1 mg/L e di IAA di 1 mg/L hanno dato una percentuale di germogli radicati inferiore al 14 %.

La Sal 39 ha fatto registrare un numero di germogli radicati pari a 4 e una lunghezza di 1,1 cm in mezzo contenente NAA alla concentrazione di 2 mg/L (Figura 1, 2).

Nessun effetto sulla radicazione dell'IAA e IBA alle concentrazioni utilizzate è stata osservata per la selezione Sal 37 e Virgona, quasi a mettere in evidenza ancor di più l'effetto genotipo in queste metodologie di moltiplicazione *in vitro*.

Invece, quando sono stati utilizzati espianti provenienti da moltiplicazione in solido, i risultati di radicazione sono stati nettamente inferiori con una percentuale di radicazione per la selezione Sal 39 del 29 %, numero di germogli radicati pari a 2 e lunghezza delle radici di 0,75 cm.

Il ruolo vitale delle auxine sul radicamento è stato precedentemente riportato da Khalafalla et al., (2009) e KiongLing et al., (2009).

Le ragioni della bassa efficienza di radicazione dell'IBA e nessuna risposta alla radicazione nei trattamenti IAA nella radicazione *in vitro* di cappero potrebbe essere dovuto ad alcuni fattori come la variazione genetica tra le specie, in cui diverse specie hanno risposto allo stesso tipo di regolatore di crescita delle piante in modo diverso e alcune specie di piante sono state segnalate per rispondere meglio ai trattamenti IBA o IAA (Pandey et al., 2010; Khalafalla et al., 2009; Kiong Ling et al., 2009; Nandagopal e RanjithaKumari, 2007). Inoltre, Pierik nel 1987 ha affermato che l'IAA è migliore per promuovere il radicamento delle specie erbacee, mentre per le piante legnose rispondono meglio con IBA e NAA.

Rodriguez et al. (1990);Chalak e Elbitar (2006); Mussalam et. al. (2011) hanno trovato che la migliore induzione e allungamento della radice *in vitro* di *C. spinosa* è stato ottenuto utilizzando IAA rispettivamente 70%, 87 % e 80 %.

Tabella 1 Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo liquido in bireattore, in risposta a diversi trattamenti di auxine dopo sei settimane di coltura.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO	43 ± 0,5 b	3 ± 0,3 a,b	0,85 ± 0,07 b
	NAA1	36 ± 0,4 b	2,5 ± 0,3 b	0,75 ± 0,09 c
	NAA2	57 ± 0,3 a	4 ± 0,2 a	1,11 ± 0,08 a
	IBA1	14 ± 0,4 d	1 ± 0,1 d	0,6 ± 0,04 d
	IBA2	26 ± 0,7 c	1,83 ± 0,3 c	0,72 ± 0,07 c
	IAA1	24 ± 0,4 c	1,66 ± 0,2 c	0,64 ± 0,06 d
	IAA2	10 ± 0,4 e	0,66 ± 0,1 e	0,43 ± 0,07 e
SAL 37	CONTROLLO	12 ± 0,3 b	0,83 ± 0,1 b	0,56 ± 0,04 c
	NAA1	10 ± 0,4 b	0,7 ± 0,1 c	0,68 ± 0,07 b
	NAA2	17 ± 0,4 a	1,17 ± 0,2 a	0,86 ± 0,08 a
	IBA1	-	-	-
	IBA2	-	-	-
	IAA1	-	-	-
	IAA2	-	-	-
VIRGONA	CONTROLLO	5 ± 0,4 b	0,33 ± 0,1 b	0,1 ± 0,04 c
	NAA1	2 ± 0,4 b	0,17 ± 0,1 c	0,4 ± 0,05 b
	NAA2	7 ± 0,5 a	0,5 ± 0,1 a	0,6 ± 0,07 a
	IBA1	-	-	-
	IBA2	-	-	-
	IAA1	-	-	-
	IAA2	-	-	-

I dati riportano medie ± e.s.; lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar, evidenziano differenze significative per $P \leq 0,05$

Tabella 2 Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo solido, in risposta a diversi trattamenti di auxine dopo sei settimane di coltura.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO	24 ± 0,3 a	1,7 ± 0,2 a	0,64 ± 0,06 a
	NAA1	19 ± 0,4 b	1,3 ± 0,2 b	0,58 ± 0,04 b
	NAA2	29 ± 0,2 a	2 ± 0,1 a	0,75 ± 0,06 a
	IBA1	7 ± 0,3 d	0,5 ± 0,1 c	0,45 ± 0,02 d
	IBA2	10 ± 0,2 c	0,7 ± 0,1 c	0,49 ± 0,03 c
	IAA1	12 ± 0,2 c	0,8 ± 0,1 c	0,50 ± 0,03 c
	IAA2	5 ± 0,5 d	0,3 ± 0,1 c	0,34 ± 0,04 e
SAL 37	CONTROLLO	7 ± 0,3 b	0,5 ± 0,1 b	0,37 ± 0,04 b
	NAA1			
	NAA2	12 ± 0,3 a	0,8 ± 0,1 a	0,67 ± 0,05 a
	IBA1			
	IBA2			
	IAA1			
	IAA2			
VIRGONA	CONTROLLO	2 ± 0,4 b	0,17 ± 0,1 b	0,24 ± 0,03 b
	NAA1			
	NAA2	5 ± 0,4 a	0,3 ± 0,1 a	0,43 ± 0,05 a
	IBA1			
	IBA2			
	IAA1			
	IAA2			

I dati riportano medie ± e.s.; lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar, evidenziano differenze significative per $P \leq 0,05$

La diversa fonte di carbonio ha avuto un effetto significativo sull'induzione delle radici di *C. spinosa* (Tabella 3, 4).

I risultati hanno mostrato differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) tra i substrati testati. Il mezzo MS contenente 2 mg/L di NAA integrato con fruttosio 30 mg/L, nel caso in cui sono stati utilizzati germogli provenienti da coltura liquida, la percentuale di radicazione è stata del 38 %, con numero di radici (3) e lunghezza della radice (0,87 cm) per la selezione Sal 39. Nessuna formazione di radice è stata osservata per la selezione Virgona.

In questo esperimento, come già riferito, la fonte di carbonio ordinaria, il saccarosio, è stata sostituita con il fruttosio. Hossain et al., (2005) hanno dimostrato che il mezzo contenente 0,2 mg/L NAA e saccarosio (30 g/L) hanno prodotto il 70% di induzione della

radice e la massima lunghezza della radice di *Centella asiatica* L. piuttosto che altre fonti di carbonio come glucosio e maltosio. Al-Khateeb (2002), invece, ha riferito che il tipo di zucchero non aveva effetto significativo sulla percentuale di radicazione e il numero di radici di *Phoenix dactylifera* L. mentre i tipi e le concentrazioni di zuccheri hanno influenzato significativamente la lunghezza della radice.

È documentato che le specie manifestano ampia variabilità nella risposta alla crescita se la fonte di carbonio viene modificata (Pierik, 1987).

Khalaf A. and Arafeh R. (2015), hanno dimostrato che in mezzo MS integrato con 1,5 mg/L NAA e 30 g/L saccarosio ha dato percentuale di radicamento del 41,6%, mentre quando i mezzi contenevano 30 g/L di fruttosio o 15 g/L di fruttosio hanno prodotto rispettivamente il 25% e l'8,3% di percentuale di radicazione.

Tabella 3 Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo liquido in bireattore, in risposta a diversi trattamenti di auxine e come fonte di carbonio fruttosio dopo sei settimane di coltura.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO	21 ± 0,6 b	2,2 ± 0,2 b	0,86 ± 0,07 a
	FRUT + NAA1	24 ± 0,7 b	2,7 ± 0,4 a	0,80 ± 0,05 b
	FRUT + NAA2	38 ± 0,6 a	3 ± 0,3 a	0,87 ± 0,05 a
	FRUT + IBA1	2 ± 0,4 e	0,2 ± 0,1 e	0,40 ± 0,04 e
	FRUT + IBA2	5 ± 0,4 e	0,3 ± 0,1 e	0,58 ± 0,08 c
	FRUT + IAA1	10 ± 0,8 d	0,7 ± 0,3 d	0,46 ± 0,06 d
	FRUT + IAA2	14 ± 0,5 c	1 ± 0,2 c	0,44 ± 0,05 d
SAL 37	CONTROLLO	2 ± 0,4 d	1 ± 0,2 b	0,52 ± 0,05 a
	FRUT + NAA1	10 ± 0,4 b	0,7 ± 0,1 c	0,40 ± 0,06 b
	FRUT + NAA2	26 ± 0,8 a	1,8 ± 0,3 a	0,54 ± 0,04 a
	FRUT + IBA1	2 ± 0,4 d	0,3 ± 0,1 d	0,36 ± 0,03 c
	FRUT + IBA2			
	FRUT + IAA1	12 ± 0,5 b	0,8 ± 0,1 c	0,39 ± 0,03 c
	FRUT + IAA2	7 ± 0,5 c	1,5 ± 0,2 a	0,43 ± 0,05 b
VIRGONA	CONTROLLO			
	FRUT + NAA1			
	FRUT + NAA2			
	FRUT + IBA1			
	FRUT + IBA2			
	FRUT + IAA1			
	FRUT + IAA2			

I dati riportano medie ± e.s.; lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar, evidenziano differenze significative per $P \leq 0,05$

Tabella 4 Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo solido, in risposta a diversi trattamenti di auxine e come fonte di carbonio fruttosio dopo sei settimane di coltura.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO	17 ± 0,3 b	1,5 ± 0,2 a	0,42 ± 0,05 a
	FRUT + NAA1	19 ± 0,3 b	1,2 ± 0,1 b	0,39 ± 0,05 b
	FRUT + NAA2	29 ± 0,2 a	1,8 ± 0,2 a	0,44 ± 0,05 a
	FRUT + IBA1	5 ± 0,3 d	0,2 ± 0,1 d	0,11 ± 0,04 e
	FRUT + IBA2	7 ± 0,3 d	0,5 ± 0,1 c	0,29 ± 0,04 d
	FRUT + IAA1	12 ± 0,3c	0,5 ± 0,1 c	0,24 ± 0,05 d
	FRUT + IAA2	17 ± 0,3 b	0,7 ± 0,1 c	0,34 ± 0,06 c
SAL 37	CONTROLLO	14 ± 0,5 b	0,8 ± 0,1 c	0,35 ± 0,05 a
	FRUT + NAA1	7 ± 0,3 d	0,3 ± 0,1 e	0,28 ± 0,04 b
	FRUT + NAA2	19 ± 0,5 a	1,5 ± 0,2 a	0,38 ± 0,04 a
	FRUT + IBA1			
	FRUT + IBA2			
	FRUT + IAA1	5 ± 0,4 d	0,5 ± 0,2 d	0,29 ± 0,03 b
	FRUT + IAA2	12 ± 0,4 c	1 ± 0,2 b	0,20 ± 0,04 c
VIRGONA	CONTROLLO			
	FRUT + NAA1			
	FRUT + NAA2			
	FRUT + IBA1			
	FRUT + IBA2			
	FRUT + IAA1			
	FRUT + IAA2			

I dati riportano medie ± e.s.; lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar, evidenziano differenze significative per $P \leq 0,05$

In un ulteriore esperimento, è stato studiato l'effetto della combinazione di auxine (NAA con IBA) e della differente presenza di fonte di carbonio (saccarosio e fruttosio) aggiunto al mezzo MS. La percentuale, numero e lunghezza della radice ottenuta sono presentate nella Tabella 5, 6, 7, 8.

I risultati evidenziano che gli espianti di tutte e tre le selezioni hanno prodotto radici in tutte le combinazioni valutate, tranne per la selezione Virgona, partendo da espianti proveniente da solido, quando è stato utilizzato come fonte di carbonio il fruttosio.

È stato osservato che il MS integrato con 0,75 mg/L NAA e 0,25 mg/L di IBA contenente fruttosio ha comportato una bassa induzione della radice sia nel caso in cui sono stati utilizzati espianti provenienti da substrato solido che liquido.

L'induzione della radice è stata efficacemente osservata quando è stato utilizzato saccarosio con le due auxine IBA e NAA, con più alta percentuale di radicazione (67%),

numero di radici (4,1) e lunghezza della radice (0,9 cm) per la selezione Sal 39, quando sono stati utilizzati come materiale di partenza gli espianti provenienti da coltura liquida in bireattore. Valori più bassi sono stati ottenuti quando sono stati utilizzati espianti da coltura solida.

Il tasso di radicazione indotto dalle auxine è determinato dal tipo e dalla concentrazione (Carra et. al., 2012 b) dell'ormone. Le auxine inducono la formazione delle radici interrompendo la dominanza apicale indotta dalle citochinine. L'IBA è ampiamente usato perché non è tossico per la maggior parte delle piante e promuove la crescita delle radici in un gran numero di specie di piante (Deora e Shekhawat , 1995; Khalil et. al., 2012). In questo ultimo studio, la maggiore percentuale di radicazione è stata ottenuta con concentrazioni più basse di IBA e NAA.

Hartman et al., (2002) riportarono effetto positivo di IAA sulla promozione di radici e sul loro sviluppo. Salehi (2005) ha riportato l'uso di diverse concentrazioni di NAA, BA per il radicamento in *Dianthus caryophyllus* L. per radicamento. Ramezani (2008) ha riportato gli effetti di trattamento dell'acido butirrico anidico durante il radicamento talee di gambo di *Capparis spinosa* L.

Tabella 5. Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo liquido, in mezzo MS integrato con 0,75mg/L di NAA e 0,25 mg/L IBA e con saccarosio 30 g/L.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO (SACCAROSIO)	36 ± 0,3 ns	2,3 ± 0,2 ns	0,5 ± 0,06 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	67 ± 0,3 *	4,1 ± 0,2 *	0,9 ± 0,07*
SAL 37	CONTROLLO (SACCAROSIO)	14 ± 0,1 ns	1 ± 0,3 ns	0,4 ± 0,07 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	19 ± 0,2 *	1,9 ± 0,3 *	0,8 ± 0,08*
VIRGONA	CONTROLLO (SACCAROSIO)	10 ± 0,1 ns	0,1 ± 0,05 ns	0,1 ± 0,04 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	14 ± 0,2 *	0,3 ± 0,2 *	0,4 ± 0,08 *

I dati riportano medie ± e.s.; ns, * evidenziano differenze non significative e significative nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar per $P \leq 0,05$

Tabella 6. Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo solido, in mezzo MS integrato con 0,75mg/L di NAA e 0,25 mg/L IBA e con saccarosio 30 g/L.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO (SACCAROSIO)	12 ± 0,1 ns	1,4 ± 0,4 ns	0,30 ± 0,1 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	17 ± 0,2 *	2,7 ± 0,2 *	0,70 ± 0,08 *
SAL 37	CONTROLLO (SACCAROSIO)	7 ± 0,1 ns	0,6 ± 0,2 ns	0,40 ± 0,07 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	10 ± 0,1 *	1,1 ± 0,3 *	0,60 ± 0,08 *
VIRGONA	CONTROLLO (SACCAROSIO)	5 ± 0,1 ns	0,20 ± 0,1 ns	0,10 ± 0,04 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	12 ± 0,2 *	0,20 ± 0,1 ns	0,20 ± 0,05*

I dati riportano medie ± e.s.; ns, * evidenziano differenze non significative e significative nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar per $P \leq 0,05$

Tabella 7. Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo liquido, in mezzo MS integrato con 0,75mg/L di NAA e 0,25 mg/L IBA e con fruttosio 30 g/L.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO (FRUTTOSIO)	33 ± 0,5 *	2,6 ± 0,6 ns	0,68 ± 0,05 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	21 ± 0,5 ns	3,2 ± 0,5 *	0,77 ± 0,06 *
SAL 37	CONTROLLO (FRUTTOSIO)	7 ± 0,5 *	1,3 ± 0,3 ns	0,57 ± 0,02 *
	NAA 0,75 + IBA 0,25	5 ± 0,4 ns	1,5 ± 0,3 *	0,47 ± 0,06 ns
VIRGONA	CONTROLLO (FRUTTOSIO)	5 ± 0,4 ns	0,7 ± 0,2 ns	0,21 ± 0,04 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25			

I dati riportano medie ± e.s.; ns, * evidenziano differenze non significative e significative nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar per $P \leq 0,05$

Tabella 8. Percentuale di radicazione, numero medio di radici e lunghezza della radice *in vitro* di *C. spinosa*, da espianti provenienti da mezzo solido, in mezzo MS integrato con 0,75mg/L di NAA e 0,25 mg/L IBA e con fruttosio 30 g/L.

CV	Regolatori di crescita mg/L	Germogli radicati (%)	Radici per germoglio (n°)	Lunghezza germogli (cm)
SAL 39	CONTROLLO (FRUTTOSIO)	7 ± 0,5 ns	0,9 ± 0,2 ns	0,24 ± 0,03 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	14 ± 0,4 *	1,4 ± 0,3 *	0,35 ± 0,06 *
SAL 37	CONTROLLO (FRUTTOSIO)	2 ± 0,4 ns	0,5 ± 0,3 ns	0,21 ± 0,04 ns
	NAA 0,75 + IBA 0,25	10 ± 0,4 *	0,7 ± 0,2 *	0,27 ± 0,04 *
VIRGONA	CONTROLLO (FRUTTOSIO)			
	NAA 0,75 + IBA 0,25			

I dati riportano medie ± e.s.; ns, * evidenziano differenze non significative e significative nell'ambito di ciascuna colonna, raggruppate per cultivar per $P \leq 0,05$

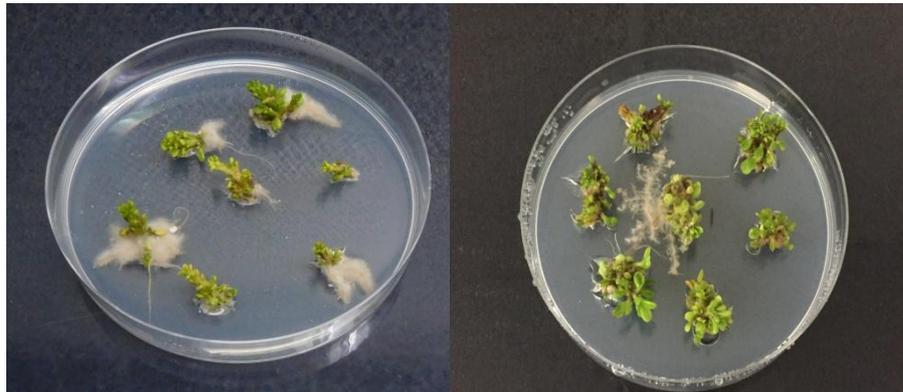


Figura 1 - Sal 39 proveniente da liquido, radicato in mezzo contenente 2 mg/L di NAA a sinistra, Sal 39 proveniente da solido a destra

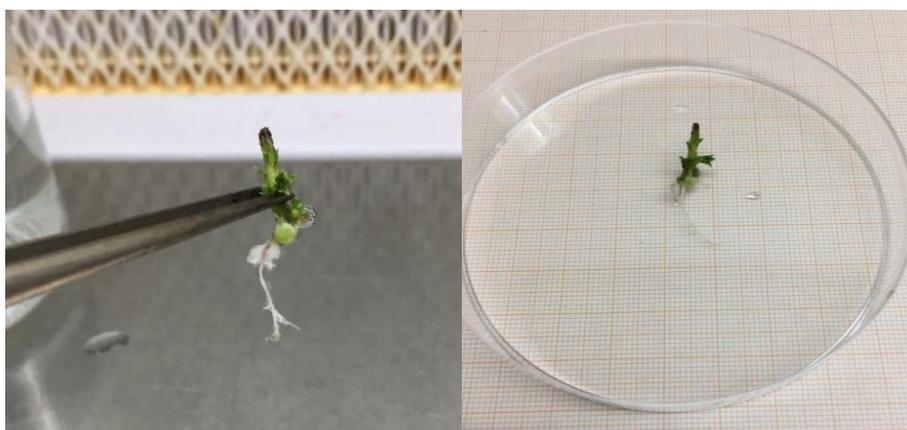


Figura 2 – Espianto radicato Sal 39 a sinistra, lunghezza radice a destra.

5. Acclimatazione

Le piantine *in vitro* sono state acclimate trasferendole in condizioni di assoluta sterilità in Jiffy® pot (sterilizzato in autoclave per 1 minuto) imbibito con acqua bidistillata sterile all'interno di vasi Magenta® GA7 e posto in camera di crescita alle stesse condizioni termiche e di luce della fase *in vitro* fino alla emissione di radici al di fuori del Jiffy (Figura 3).

Successivamente la pianta con Jiffy® è stata trasferita in vasi di plastica contenenti miscela di torba con perlite e poste in condizioni di crescita controllate. La miscela è stata inizialmente inumidita con MS sterile senza saccarosio. Per mantenere un'alta umidità relativa, sui vasi sono stati posti dei sacchetti di plastica. L'umidità relativa è stata ridotta gradualmente e la completa rimozione del sacchetto di plastica ha avuto luogo dopo 6 settimane di collocamento. Le piantine sono state tenute in camera di crescita climatica a

25 ±1° sotto illuminazione con fotoperiodo di 16 h al giorno e intensità luminosa di 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Successivamente sono state poste in serra per l'acclimatazione finale (Figura 4)



Figura 3 - Sal 39 in Jiffy a sinistra, in vaso a destra



Figura 4 - Sal 39 posta in serra per acclimatazione

6. Conclusioni

Nel presente studio, espianti provenienti da propagazione in bioreattore PlantForm a immersione temporanea e da coltura solida sono stati utilizzati per mettere a punto un protocollo di radicazione efficiente su mezzo agarizzato .

Il tipo di auxina, il tipo e la concentrazione della fonte di carbonio utilizzata ha un effetto significativo sull'induzione delle radici *C. spinosa*.

Mettendo a confronto i tre esperimenti effettuati per l'induzione alla radicazione, il tasso più elevato di radicazione in termini di percentuale di radice per espianto è stato raggiunto quando i germogli di partenza provenivano da coltura liquida in bioreattore e sono stati posti in mezzo MS, come fonte di carbonio il saccarosio e integrato con NAA alla concentrazione di 2 mg/L oppure una combinazione di ormoni composta da NAA 0,75 mg/L + IBA 0,25 mg/L. In queste condizioni sperimentali è stato possibile ottenere il 67 % di germogli radicati.

Il protocollo sviluppato offre anche un potenziale sistema che dovrebbe essere utilizzato per il miglioramento, la conservazione e propagazione di massa di *C. spinosa*.

7. Bibliografia

- Alkire B. (2000). Capers. New Crop Factsheet, Purdue University, USA, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/caper.html>.
- Al-Khateeb A.A. (2002). Influence of Different Carbon Sources on In-Vitro Root Formation of Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) Cv Khanezi. Zagazig Journal of Agricultural Research, 28 (3), pp. 597-608.
- Carra A., Sajeve M., Abbate L., Siragusa M., Sottile F. & Carimi F. (2012b). *In vitro* Plant regeneration of caper (*Capparis spinosa*) from floral explants and genetic stability of regenerants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 109, 373-381.
- Chalak L, Elbitar A, Cordahi N, Hage C, Chehade A (2003). *In vitro* propagation of *Capparis spinosa* L. ActaHortic 616:335–338.
- Chalak L., Elbitar A. (2006). Micropropagation of *Capparis spinosa* L. subsp. *Rupestris* Sibth. and Sm. by nodal cuttings. Indian Journal of Biotechnology, 5, pp. 555-558.
- Damiano C., La Starza S.R., Monticelli S., Gentile A., Caboni E., Frattarelli A. (2005). Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. - In: Hvoslef - Eide, A.K., Preil, W. (Eds.), Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. Springer, Netherlands, pp. 243–251.
- Deora N.S. & Shekhawat N.S. (1995). Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edge.- a tree of arid horticulture. Plant Cells report 15:278-281.
- El Tahchy A., Bordage S., Ptak A., Dupire F., Barre E., Guillou C., Henry M., Chapleur Y., Laurain-Mattar D. (2011). Effects of sucrose and plant growth regulators on

- acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:381–390.
- Grue`re G.P., Giuliani A., Smale M. (2006). Marketing underutilized plant species for the benefit of the poor: a conceptual frame work (June 2006). IFPRI Environmental and Protection Technology EPT) Discussion Paper No. 154. Available at SSRN <http://ssrn.com/abstract=916572>.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R.L. (2002). *Plant Propagation Principles and Practices*. 7th Edition. New Jersey, Prentice Hall, pp: 367-374.
- Hossain Md. A., Hossain Md. A., Ali Md. R., Mahbubur Rahman, S.M. (2005). Effect of Different Carbon Sources on *in vitro* Regeneration of Indian Pennywort (*Centella asiatica* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*,8 (7), pp. 963-965.
- Infantino A., Tomassoli L., Peri E., Colazza S. (2008). Viruses, fungi and insect pests affecting caper. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 1 (2), 170-179.
- Khalil M., Ramachandra N., Abdal M., Jacob S & Thomas R., (2012). Effect of rooting Hormones (IBA and NAA) on rooting of semi Hardwood Cuttings of *Capparis spinosa*. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research*, 1 (7), 135-139.
- Khalaf A. and Arafah R. (2015). *In Vitro* Root Induction and Culture of the Medicinal Plant *Capparis spinosa* L. biotech.ppu.edu.
- Khalafalla M.M., Daffalla H.M., El-Shemy H.A., and Abdellatef E. (2009). "Establishment of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina*– a potent African medicinal plant", *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, issue. 21, pp. 5952-5957.
- Kiong Ling A.P., Kok K.M., Hussein S., and Ong S.L. (2009). "Effects of plant growth regulators on adventitious roots induction from different explants of *Orthosi phonstamineus*", *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, vol. 3, issue.3, pp. 493-501. 2009.
- Murashige T., and Skoog F.A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Musallam I., Duwayri M., Shibli R. (2010). Micropropagation of caper (*Capparis spinosa* L.) from wild plants. *Funct Plant SciBiotechnol* 5(special issue):17–21.

- Nandagopal S. and RanjithaKumari B.D. (2007). "Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in Chicory", Journal Central European Agriculture, vol.8, issue. 1, pp. 73-80.
- Pandey V.P., Cherian E., and Patani G. (2010). "Effect of growth regulators and culture conditions on direct root induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) benth by leaf explants", Tropical Journal of Pharmaceutical Research, vol. 9, issue.1, pp. 27-34.
- Pierik, R.L.M. (1987). *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht, Nertherlands: Martinus Njhoff publishers.
- RamezaniGasak M., Bahrani M.J., Shekafandeh A., Salehi H., Taghvaei M., Jami Al-ahmadi M. (2008). A comparison of different propagation method of common Caper-bush (*Caparis spinosa* L.) as a new horticultural crop. International J plant development biology 2: 106-110.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (1992). Biology of plants. New York: Worth. 545-572.
- Riccia A., Carra A., Torelli A., Maggiali C. A., Morini G. e Branca C. (2001). Cytokinin-like activity of N,N'-diphenylureas.N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl) urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl) urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). Plant Science Volume 160, Pages 1055-1065.
- Rodriguez R., Rey M., Cuzzo L., Ancora G. (1990). *In vitro* propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.) In vitro Cell Dev Biol-Plant 26: 531-536.
- Salehi H. (2005). Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of Canation cultivars .African JBiotechnol. 5: 25-30.
- Salisbury F.B., Ross C.W. (1992). Plant physiology. Belmont, CA: Wadsworth. 357-407, 531- 548.
- TansU´ S., Kocabaa F. (1997). Importance of caper (*Capparis spinosa* L.) under forest ecosystem and its cultivation. In: XI World forestry congress, V3, topic 15, Antalya, Turkey.
- Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L.H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. – Scientia Horticulturae, 179: 227 – 232.

Yan H., Liang C., LI Y. (2010). Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. - Plant Cell, Tissue Organ Cult.103, 131–135.

CONCLUSIONI GENERALI

Le moderne tecniche di propagazione, con le più recenti acquisizioni che sfruttano le potenzialità offerte dalle colture *in vitro*, rappresentano di certo oggi uno strumento in più per poter cercare soluzioni alle problematiche che si rendono manifeste soprattutto per alcune specie di più difficile propagazione.

La moderna tecnica vivaistica oggi fornisce ampie soluzioni per l'ottenimento di piante omogenee ed uniformi ma non sempre tale possibilità è percorribile anche per le specie minori. È assolutamente necessario che gli studi realizzati per comprendere i meccanismi di recalcitranza alla propagazione, gamica ed agamica, prendano spunto dalle peculiarità botaniche delle specie in esame e, allo stesso tempo, cerchino di sfruttare tutte le più moderne conoscenze che hanno trovato maggiore evidenze per specie di maggiore diffusione. Tutto ciò con l'obiettivo, sempre in primo piano, di rendere disponibili sistemi produttivi di interesse commerciale, in vivaio, che siano d'ausilio da un lato all'operatore in vivaio mentre, da un altro lato, consentano all'imprenditore agricolo di potersi avvalere del materiale vegetale più idoneo per il miglioramento dell'efficienza agronomica dei nuovi impianti.

La propagazione agamica, a tal fine, è, nell'ambito delle colture poliennali da frutto, uno strumento indispensabile per giungere all'ottenimento di piante in possesso di quei requisiti di uniformità, omogeneità ed identità genetica dai quali oggi non è in alcun modo possibile prescindere.

Se si valutano tali aspetti su una coltura come il capperò, si evidenzia in modo inequivocabile che l'assenza di conoscenze e di soluzioni utili alla standardizzazione di idonei sistemi produttivi in vivaio ha certamente contribuito a limitare lo sviluppo dell'attività di miglioramento genetico della specie e, di conseguenza, del rinnovamento della stessa in coltura.

È sufficiente, infatti, analizzare la bibliografia esistente per questa specie, in Italia, in altri Paesi del Bacino del Mediterraneo ma anche del Sud America (Bounous e Barone, 1989; Luna e Perez, 1985; Barbera, 1991), per comprendere come le difficoltà connesse con la propagazione agamica abbiano finito per condizionare negativamente un comparto che non è riuscito a trovare standard di produzione e di qualità del prodotto all'altezza delle richieste del mercato globalizzato. E' anche vero che, l'assenza di tali standard ha

contribuito in qualche modo al mantenimento di una certa tipicità della coltura anche per via della specificità connessa con l'uso del prodotto e con i processi di trasformazione che vengono applicati sullo stesso.

Disporre oggi di strumenti in grado di offrire soluzioni alternative a quella della complessa, ancorché diffusa, propagazione gamica rappresenta certamente un elemento di conoscenza scientifica importante che, se condotta su livelli di accessibilità tecnica e di sostenibilità economica, contribuirà indubbiamente ad un'ulteriore crescita del comparto.

La propagazione *in vitro*, il cui sviluppo non è di certo recentissimo, ha avuto una applicazione fin troppo timida sul cappero per via, probabilmente, di limitati ritorni economici a fronte di un investimento rilevante, in termini di attrezzature e competenze professionali. I primi approcci, infatti, furono limitati alla verifica della risposta della specie all'introduzione e alla proliferazione *in vitro* (Chalak et al., 2003; Caglar et al., 2005), senza, al contrario, aver proceduto alla fase di acclimatazione per un effettivo contributo al miglioramento delle tecniche di propagazione agamica. Muovendo dalle considerazioni sul potenziale utilizzo e sul ruolo strategico che, le specie appartenente al genere *Capparis spinosa* L., possono rivestire anche nell'ottica di conservazione di questa pianta resistente alla siccità può essere una sfida così come un potente strumento per ridurre la desertificazione, per il sostentamento e miglioramento della biodiversità. Il lavoro di tesi si è prefisso l'obiettivo di definire lo sviluppo di tecniche di propagazione intensiva per rispondere alle esigenze di diffusione di materiale di propagazione caratterizzato da elevata qualità.

Un aspetto fondamentale della ricerca ha riguardato la definizione e la valutazione di un protocollo di micropropagazione per specie e varietà afferenti al genere *Capparis spinosa*, attraverso l'utilizzo di sistemi di immersione temporanea (TIS), con lo scopo di individuare le migliori condizioni, soprattutto in termini di composizione del substrato, di caratteristiche microclimatiche dell'ambiente di coltura, nonché di parametri di funzionamento del sistema. Un fattore di rilievo considerato è quello relativo alla riduzione dei costi nella coltura liquida, determinata principalmente dall'abbattimento della spesa relativa all'agente gelificante (agar) nei substrati di moltiplicazione. I risultati delle prove, indicano che attraverso i sistemi ad immersione temporanea TIS è possibile abbattere i costi di produzione grazie anche all'aumento dell'efficienza di moltiplicazione ed alla riduzione dell'intervento da parte dell'operatore. Peraltro tali tecniche potrebbero essere

introdotte nella filiera vivaistica a vantaggio delle produzioni su larga scala che sono auspicabili in funzione dell'aumentato interesse verso questa specie di materiale di propagazione certificabile dal punto di vista genetico e fitosanitario. Nessun lavoro condotto sulla propagazione *in vitro* del Capperò menziona l'uso dei bioreattori a immersione temporanea, invece per altre specie si menzionano effetti positivi sui vari stadi di proliferazione dei tessuti attraverso l'utilizzo di questo sistema.

In questo studio, nella fase di moltiplicazione il tasso di crescita relativo, il tasso di proliferazione reale e la lunghezza dei germogli sono risultati maggiori nel sistema PlantForm a immersione temporanea rispetto al sistema solido, come viene confermato per altre specie da Etienne e Berthouly (2002); Gupta e Timmis (2005); Mamum et al. (2015); Vilchez e Albany (2014) e Ziv (2005).

Dai risultati ottenuti il bioreattore PlantForm migliora la coltura *in vitro* di *Capparis spinosa* L., inducendo maggiore proliferazione, lunghezza dei germogli rispetto alla coltura semi-solida in mezzo MS integrato con la Meta-topolin (mT) ed è stato quello che è risultato migliore nella fase di moltiplicazione.

In questo lavoro, prima esperienza del genere su *Capparis*, il bioreattore TIS attenua il problema dell'iperidricità durante la coltura e mostra molti vantaggi per la micropropagazione, compresa l'automazione e semplificazione delle procedure già precedentemente sottolineati (Georgiev et al. 2014) per ridurre i costi di produzione delle piantine. In particolare, permette di rinnovare il mezzo liquido senza trasferire le piante e, quindi, di andare a ridurre il lavoro manuale, si riducono anche i costi in quanto non è richiesto l'uso di agenti gelificanti.

Il protocollo sviluppato offre anche un potenziale sistema che dovrebbe essere utilizzato per il miglioramento, la conservazione e propagazione di *C. spinosa*.

Per quanto riguarda la fase di radicazione sono stati utilizzati espianti di *Capparis spinosa* L. ottenuti dalla coltura liquida in bioreattore e da coltura solida per definire un protocollo efficiente. Mettendo a confronto i tre esperimenti effettuati per l'induzione alla radicazione, il tasso più elevato di radicazione in termini di percentuale di radice per espianto è stato raggiunto quando, i germogli utilizzati per la radicazione provenivano da coltura liquida in bioreattore, sono stati posti in mezzo contenente MS, saccarosio come fonte di carbonio e integrato con combinazione di NAA 0,75 mg/L + IBA 0,25 mg/L

oppure con solo NAA 2 mg/L in queste condizioni sperimentali è stato possibile ottenere il 67 % di germogli radicati.

Il prosieguo delle attività di ricerca, in tale ambito, sarà assolutamente indispensabile per la verifica della rispondenza delle piante moltiplicate *in vitro* ed acclimatate una volta che saranno state poste in pieno campo, possibilmente negli ambienti di elezione produttiva. Solo attraverso questo ultimo passaggio finale sarà possibile considerare la metodologia proposta come utile per il trasferimento alla tecnica vivaistica ordinaria che, per altre specie, già si avvale comunemente della micropropagazione.

Bibliografia

- Barbera G., Di Lorenzo R., Barone E. (1991). Observations on *Capparis* populations cultivated in Sicily and on their vegetative and productive behaviour. *Agricoltura Mediterranea* 121:32-39.
- Bounous G., Barone E. (1989). Prospettive di sviluppo di specie legnose per le zone aride e semi-aride del Meridione e nuovi criteri di utilizzo: capperò. *Terra e Sole* 568:733-735.
- Caglar C., Caglar S., Ergin O., Yarim M. (2005). The influence of growth regulators on shoot proliferation and rooting of *in vitro* propagated caper. *J Envir Boil* 26:479–485.
- Chalak L., Elbitar A., Cordahi N., Hage C., Chehade A. (2003). *In vitro* propagation of *Capparis spinosa* L. *ActaHort* 616:335-338.
- Etienne, H. & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion system in plant Micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231.
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., Bley T. (2014). Temporary immersion systems in plant. *BiotechnolEng Life Sci* 14:607–621
- Gupta, P.k. & Timmis, R. (2005). Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 339-346.
- Luna F., Pérez M. (1985). *La Tapenera o Alcaparra: cultivo y aprovechamiento*. Publicaciones de ExtensiónAgraria. Madrid, España. 127 p.

- Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U. & Aidun, C.K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Frontiers in Biology*, 10 (2), 177-193.
- Vielhez, J. & Albany, N. (2014). Multiplicacion *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de immersion temporal. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, XVI (2), 96-103.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 277-285.

Ringraziamenti

Desidero ricordare tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione del seguente lavoro con suggerimenti, critiche ed osservazioni, a loro va tutta la mia gratitudine.

Sentito ringraziamento va al mio Tutor Chiar.mo Prof. Paolo Inglese e co-tutor Chiar.mo Prof. Francesco Sottile, per non avermi fatto mai mancare il loro supporto, consigli, commenti e suggerimenti, per avermi seguito nella realizzazione della tesi di dottorato.

A tutti i colleghi e amici per il continuo e straordinario supporto e incoraggiamento durante questi tre fantastici anni.

Desidero ringraziare con affetto la mia famiglia, Mamma e Papà, Irene per il loro supporto, incoraggiamento, pazienza e grande amore ogni singolo giorno.

A Nuccio che con amore mi ha supportato sempre in questo percorso.