

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI AGRARIA, ALIMENTAZIONE E AMBIENTE

Dottorato di Ricerca in

“Produttività delle piante coltivate in ambiente mediterraneo”

XXVIII Ciclo

NICOLETTA ZINGALE

**Tecniche innovative di propagazione e di
caratterizzazione di specie e varietà
di *Opuntia* e generi affini**

DISSERTAZIONE FINALE

Tutor: Prof. Stefano La Malfa

Co-tutor: Prof.ssa Elisabetta Nicolosi

Coordinatore: Prof.ssa Daniela Romano

2015

A Matilde e a Salvo

Ai miei genitori ed Alessia

*grazie ai quali sono la persona che sono e
ai quali posso dire solo un sincero grazie*

*“Un uomo senza sogni, senza utopie, senza ideali,
sarebbe un mostruoso animale,
un cinghiale laureato in matematica pura.”*

Fabrizio De André

SOMMARIO

1	Abstract.....	3
2	Introduzione.....	5
2.1	Origine e diffusione.....	5
2.2	Inquadramento botanico.....	5
2.3	Descrizione morfo-fisiologica.....	6
2.3.1	Efficienza dell'uso dell'acqua.....	10
2.4	Importanza economica nel mondo e in Italia.....	11
2.5	Utilizzazioni.....	12
2.6	Propagazione.....	15
2.7	Miglioramento genetico in <i>Opuntia</i> spp.....	16
2.8	Marcatori molecolari.....	18
2.8.1	Simple Sequence Repeats (SSR).....	20
2.8.2	Utilizzo dei marcatori molecolari in <i>Opuntia</i>	23
2.9	Le colture <i>in vitro</i>	24
2.9.1	Micropropagazione.....	25
2.9.2	Metodologie della micropropagazione.....	26
2.9.3	Fasi della micropropagazione.....	27
2.10	I sistemi ad immersione temporanea.....	33
2.10.1	Stato dell'arte dei Sistemi ad Immersione Temporanea.....	38
2.11	La micropropagazione in <i>Opuntia</i> spp.....	40
3	Scopi.....	44
4	Materiali e metodi.....	45
4.1	Introduzione delle nuove varietà.....	45
4.2	Caratterizzazione molecolare con marcatori microsatelliti.....	54
4.2.1	Materiale vegetale.....	54
4.2.2	Estrazione del DNA.....	54

4.2.3	Amplificazione	55
4.2.4	Elaborazione dei dati	57
4.3	Definizione di protocolli di micropropagazione ad elevata efficienza _____	58
4.3.1	Materiali utilizzati.....	59
4.3.2	Definizione del protocollo di micropropagazione attraverso sistemi ad immersione temporanea, utilizzando una varietà modello.....	68
5	Risultati e discussioni	81
5.1	Introduzione delle nuove varietà _____	81
5.2	Caratterizzazione molecolare con marcatori microsatelliti _____	82
5.3	Definizione di protocolli di micropropagazione ad elevata efficienza _____	90
5.3.1	Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti.....	90
5.3.2	Stabilizzazione degli espianti	91
5.3.3	Fase di moltiplicazione.....	94
5.4	Validazione del protocollo di micropropagazione attraverso sistemi ad immersione temporanea sulle varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana _____	111
5.4.1	Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti.....	111
5.4.2	Stabilizzazione degli espianti	112
5.4.3	Fase di moltiplicazione.....	114
5.4.4	Fase di radicazione e di ambientamento.....	118
6	Conclusioni	120
7	Bibliografia	124

1 ABSTRACT

The species of *Opuntia* genus, along with those of other genera of *Cactaceae*, are being more and more considered for their high water use efficiency according to their particular metabolism. These species are nowadays used in arid and semiarid environments for fruit production (*prickly pears*) and, mainly for biomass production to be used for animal feeding, but also as biomass and renewable energy source.

In order to speed up their use in these sectors it would be very useful to take into account not only the *Opuntia ficus-indica* (Mill.) varieties currently spread into cultivation in Italy for fruit production, but also other species and varieties spread in other countries among which Brasil.

The research activities developed within the ph.D course in “Plant productivity in Mediterranean area” focused on some aspects considered as relevant and preliminary for spreading in Italy as well as in other countries selected *Opuntia* species and varieties for biomass production. The considered aspects move from some bottlenecks of the sectors mainly dealing with the lack of suitable varieties, with the little knowledge about their genetic basis, and the need to develop a competitive nursery activity that could match requirements in terms of quality, of phytosanitary status and of availability of propagation material of the selected varieties for high density plantations.

All of the above mentioned aspects could benefit of new protocols more performing than those currently used hampered by quantitative and phytosanitary constrains. In such a context a number of activities have been developed moving from the introduction in Italy of more than 20 selected genotypes coming from “Instituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) of Recife (Brasil). The new material has been checked for phytosanitary aspects, further propagated and planted at University of Catania experimental field. In order to identify, distinguish and allow future traceability of this material a genetic characterization has been performed

by means of 8 microsatellite markers. The analysis allowed to identify relationships among the selected genotypes as compared to some already identified *Opuntia* species. This characterization appears to be very useful due to the specific taxonomic aspects of *Opuntia* species for which a high degree of genetic mixture has been reported, along with indeterminateness of systematics, also for the lack of suitable morphological descriptors.

Another aspect of the research deals with the set up and evaluation of micropropagation protocols for *Opuntia* species and varieties using Temporary Immersion Systems (TIS). With the aim of identifying the most suitable conditions in terms of culture medium, of microclimatic conditions and of system management (also in view of its automatization), a number of trials has been carried out that allowed to define specific protocols for a model variety (ARL) and the adopted for other interesting varieties (Gigante and Orelha de elephante mexicana). It is worth underlining that the protocol also encompasses acclimatization and some additional trials useful to increase production efficiency in the nursery and also to allow cuttings transportation without soil along a rather long period. On the whole the protocols allow the diffusion in time and space, and for relevant quantities, of selected propagation material certified for phytosanitary and genetic aspects.

The amount of data obtained during the thesis work, ranging from the availability of new varieties, to their molecular characterization up the development of efficient propagation protocols, represent an important prerequisite for going on with the set up of high density plantations in which the selected varieties could be tested for their capability of producing biomass in different environmental conditions.

2 INTRODUZIONE

2.1 ORIGINE E DIFFUSIONE

L'areale di origine delle specie e varietà afferenti al genere *Opuntia* e affini comprende l'America tropicale e subtropicale, in particolare in Messico furono trovati dei semi fossili risalenti al settimo millennio a.c., a conferma dell'utilizzo di queste piante a fini alimentari. Dall'area di origine la prima diffusione ha interessato il Canada, il Cile, la Bolivia, l'Argentina, gli Stati Uniti, il Venezuela, e diversi Paesi del centro America, perfino i Caraibi.

Le specie afferenti ai generi *Opuntia* e *Nopalea* vennero introdotte nel bacino del Mediterraneo grazie agli spagnoli che le importarono dal Messico (Barbera, 1999). Attualmente sono presenti sia forme coltivate che spontanee in tutto il Mediterraneo: sud della Spagna, Francia, Grecia, Italia e Turchia fino ad arrivare in Israele. Gli arabi diffusero queste specie dalla Spagna in Africa portandole in Algeria, Eritrea, Egitto, Etiopia, Marocco, Tunisia ma il principale areale di diffusione rimane l'America. Sono presenti anche in India e Australia. Per esempio, in Australia e Africa, l'*Opuntia* è considerata una pianta infestante per la sua facile propagazione, mentre in Brasile, Tunisia ed Italia ha importanti utilizzi agricoli. Nel bacino del Mediterraneo è parte integrante del paesaggio delle zone costiere ed insulari grazie alla sua elevata adattabilità.

Tra le specie del genere *Opuntia* maggiormente diffuse distinguiamo *Opuntia ficus-indica*, *O. robusta*, *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. streptacantha*, *O. iptiacantha*, *O. leucotricha*.

Già dagli anni '80 queste specie vengono impiegate nelle zone sub-desertiche in quanto presentano limitate esigenze dal punto di vista delle caratteristiche pedologiche, così si adattarono facilmente a luoghi dove altre colture non possono svilupparsi, diventando fonte alternativa di alimentazione sia per l'uomo che per gli animali.

2.2 INQUADRAMENTO BOTANICO

Le popolazioni indigene messicane elaborarono una preliminare classificazione di queste piante su base morfologica, aventi radice etimologica comune, attribuibile a diversi genotipi afferente al genere *Opuntia*. Numerose sono le classificazioni tassonomiche ma quella di Britton e Rose (1963) è ritenuta la più valida.

I generi *Opuntia* (300 specie) e *Nopalea*, solo 10-12 specie sono utilizzate dall'uomo per diversi scopi, questi generi appartengono alla famiglia delle *Cactaceae*, all'ordine delle *Caryophyllales* e alla sottoclasse delle *Caryophyllidae*. La famiglia

delle *Cactaceae* è suddivisa in tre tribù: le *Pereskieae*, le *Opuntieae* e le *Cereae*. Alla tribù delle *Opuntieae* appartiene il genere *Opuntia* suddiviso in quattro sottogeneri: *Platyopuntia*, *Tephrocactus*, *Brasiliopuntia* e *Cylindropuntia*.

L'inquadramento tassonomico è molto difficile per una serie di ragioni: fenotipicamente variano considerevolmente a seconda delle condizioni ecologiche in cui si trovano. Scheinvar (1995) descrive nove specie selvatiche di *Opuntia* (*O. hyptiacantha* Web; *O. joconostle* Web; *O. lindheimeri* (Griff e biondi) Bens; *O. matudae* Scheinv; *O. robusta* Wendl. var. *robusta*; *O. Sarca* Griff. ex Scheinv; *O. streptacantha* Lem; *O. tomentosa* SD. var. *tomentosa* e var. *herreriae* Scheinv.) e tre specie coltivate (*O. albicarpa* sp. novembre; *O. ficus-indica* (L.) Mill; *O. robusta* Wendl. var. *larreyi* (Web.) Bravo), così come una specie coltivata appartenente al sottogenere *Nopalea* [*O. cochenillifera* (L.) Mill.].

2.3 DESCRIZIONE MORFO-FISIOLOGICA

Il genere *Opuntia* comprende specie tipiche delle zone aride e desertiche, che presentano una serie di adattamenti morfo-fisiologici che permettono alle specie stesse di adattarsi agli ambienti di origine tipici di queste regioni. Sono piante dicotiledoni perenni, xerofite, presentano un'altezza compresa tra 1 e 5 metri. L'apparato radicale è formato da una radice fittonante in grado di raggiungere elevate profondità permettendo alla pianta di intercettare l'acqua (Nefzaoui e Ben Salem, 2002) e da radici secondarie che si differenziano in superficie, permettendo alla pianta di captare efficientemente le brevi precipitazioni di pochi mm, garantendogli la sopravvivenza in ambienti con livelli di umidità che precludono la vita ad altre piante. Infatti, in tutti i tipi di suolo le radici assorbenti si possono trovare ad una profondità massima di 30 cm e con uno sviluppo radiale di 8 metri (Sudzuki Hills, 1995).

I fusti e i rami sono trasformati in organi appiattiti di forma ellittica od ovoidale, carnosì di colore verde, chiamati cladodi (Figura 1), all'interno di essi è presente un tessuto detto parenchima che assolve alla funzione di immagazzinamento dell'acqua. I cladodi sono ricoperti da un'epidermide ricca in cere, che limita la traspirazione. La frequenza degli stomi è generalmente bassa per *Opuntia*, generalmente da 20 a 30 per mm² (Conde, 1975; Pimienta-Barrios *et al.*, 1992). L'epidermide è interrotta dalla presenza degli stomi, questi sono collegati al clorenchima attraverso dei canali favorendo gli scambi gassosi con l'atmosfera. Gli stomi sono inseriti in profondità e con temperature elevate e forte insolazione riescono a rimanere chiusi tutto il giorno. Le foglie sono rudimentali hanno carattere effimero e cadono precocemente. In mancanza

di foglie il processo fotosintetico è affidato ai cladodi verdi (Benson, 1963; Pimienta Barrios, 1990).



Figura 1 Architettura di una pianta adulta di *Opuntia ficus-indica* Mill. (Fonte: Robles-Julio, 2009).

Queste piante sono piante a ciclo Crassulacean Acid Metabolism (CAM): durante la notte gli stomi sono aperti e la CO_2 viene assorbita ed organizzata ad acido malico nel vacuolo, durante il giorno gli stomi si chiudono e l'acido malico viene decarbossilato ad opera dell'enzima malico – NAD dipendente. La CO_2 che si forma non potendo uscire per la presenza degli stomi chiusi si accumula in elevate quantità inibendo la fotorespirazione, entra in un normale ciclo C_3 che porta a formare amido. I giovani cladodi presentano un metabolismo C_3 : mantengono gli stomi aperti di giorno richiamando acqua ad essi necessaria dai cladodi sottostanti, e tutto ciò per la pianta rappresenta una fonte notevole di perdita di acqua (Nobel *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997). Per tale motivo in periodi siccitosi non si ha la produzione di nuovi cladodi. Le specie afferenti ai generi *Opuntia* ed affini, sono denominate CAM obbligate, anche se poste ad interventi irrigui il loro metabolismo fotosintetico non cambia (Osmod, 1978).

Sulla superficie del cladodo alla base della foglia si trova l'areola, trattasi di una gemma ascellare che produce normalmente delle spine più o meno sviluppate, *i glochidi*, ma tali gemme possono evolvere producendo anche radici, fiori o altri cladodi. Anche il frutto si presenta ricoperto di areole.

Il fiore è ermafrodita, di grosse dimensioni e misura circa 6-10 cm di lunghezza, presenta una colorazione che può virare dal giallo all'arancione (Figura 2) ed è cleistogamo ovvero la fecondazione avviene ancor prima che sia avvenuta l'antesi (Ross, 1981). L'androceo è composto da numerosi stami che circondano il gineceo, quest'ultimo è composto da un ovario infero sormontato da uno stigma multiplo. La fioritura avviene in tarda primavera ed i fiori spesso si sviluppano sui cladodi di un anno di età sulla parte apicale, l'apertura e la chiusura del fiore avviene durante il giorno e dura 8–11 ore (Mandujano *et al.*, 1996). La pianta inoltre può essere indotta ad una rifioritura artificiale, attraverso l'asportazione dei fiori formati durante la primavera; questa tecnica, chiamata “*scozzolatura*” viene eseguita nel periodo di maggio–giugno, e la pianta viene indotta ad una seconda fioritura che permetterà di ottenere dei frutti tardivi.



Figura 2 Diverse tonalità e colori di fiori di *Opuntia* spp. (Fonte: Robles-Julio, 2009)

Il frutto è una falsa bacca uniloculare, presenta un notevole numero di semi, l'epicarpo è munito di glochidi che rendono difficoltosa la raccolta e la conservazione. Il frutto essendo aclimaterico, cioè che non matura dopo la raccolta, viene raccolto quando presenta una maturazione ottimale che si raggiunge dal momento in cui la

colorazione dell'epicarpo è pari alla metà di quella che avrebbe raggiunto il frutto in piena maturazione; in questa fase il frutto raggiunge un contenuto in solidi solubili totali del 12–15% e presenta le migliori caratteristiche per il consumo fresco e la conservazione (Figura 3).



Figura 3 A sinistra: Pianta di *Opuntia* spp. con frutti in diverse fasi di maturazione. A destra: diverse forme e colori dei frutti (Fonte: Robles-Julio, 2009).

Il successo ecologico ed agronomico delle *Cactaceae* dipende dalle loro capacità adattative, quali abilità a conservare l'acqua nel parenchima acquifero dei cladodi e ad assimilare l'anidride carbonica durante la notte (Nobel, 1988; 1995). Queste piante sono caratterizzate dall'elevata tolleranza alle temperature estreme, infatti, gli organi fotosintetici di *Opuntia* e generi affini, possono sopportare fino a 15 °C in più rispetto a quelle ambientali (Goten *et al.*, 1968). Per esempio, per *Nopalea dejecta*, queste temperature solo elevabili a 60 °C, quindi ad alte temperature desertiche, i sistemi enzimatici sono in grado di operare normalmente. L'importanza di queste piante è legata al fatto che hanno basse esigenze colturali: si avvantaggiano di lavorazioni superficiali, non hanno bisogno di potatura e non richiedono apporti idrici e trattamenti antiparassitari e di conseguenza hanno bassi costi energetici di produzione.

Le *Cactaceae* in generale hanno bassa produttività dovuta in parte alle limitazioni imposte dal mezzo in cui crescono. I genotipi selvatici di solito si osservano in terreni poveri, con basso contenuto in sostanza organica, in regioni dove la durata del periodo di accrescimento non permette l'espressione del suo potenziale produttivo.

Queste specie sono influenzate negativamente dall'ombreggiamento in qualsiasi fase dell'accrescimento, infatti lo spessore dei cladodi e l'architettura della pianta tendono a ridurre l'efficienza fotosintetica. Il fattore limitante più importante nelle alte

densità è il PAR (Photosynthetically Active Radiation), mentre la temperatura e l'umidità del suolo sono di importanza secondaria per la produttività della pianta.

2.3.1 Efficienza dell'uso dell'acqua

Lo scambio di gas da parte delle piante è il risultato del rapporto di CO₂ fissata dalla fotosintesi e l'acqua perduta per traspirazione, misurato come l'efficienza dell'utilizzo idrico (Water Use Efficiency). La Figura 4 rappresenta. Questo valore è circa il triplo in piante a ciclo C4 altamente produttive (come il mais o canna da zucchero) alle stesse condizioni ambientali. Le piante C4 hanno un assorbimento netto di CO₂ cinque volte superiore rispetto alle piante a ciclo C3 altamente produttive (come l'erba medica, il cotone, o grano), che hanno anche assorbimento netto diurno di CO₂ dal quale il prodotto iniziale della fotosintesi è un composto tre atomi di carbonio (Nobel, 1995).

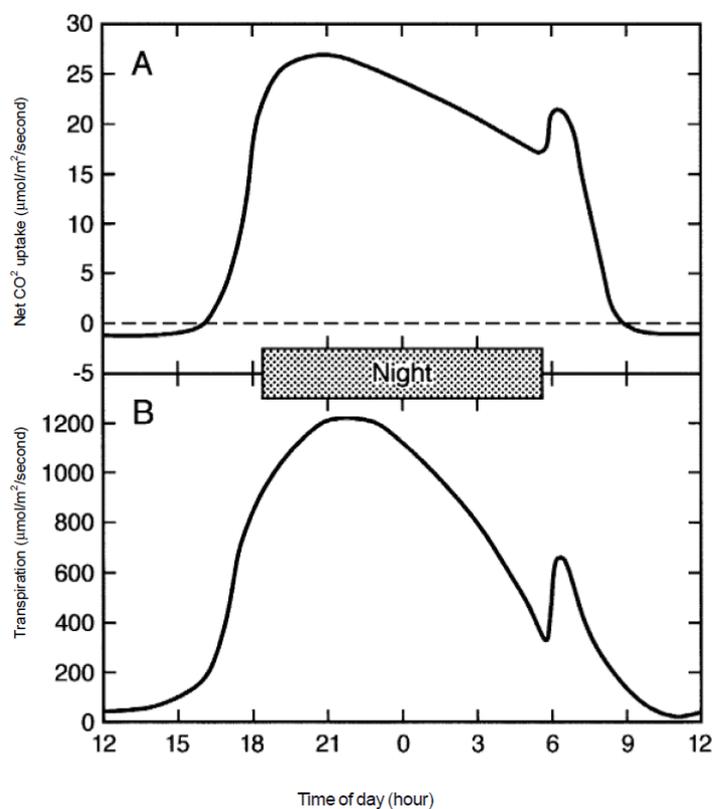


Figura 4 Assorbimento netto di anidride carbonica (A) e livelli di traspirazione (B) in *Opuntia ficus-indica* misurati per 24 ore in condizioni di suolo umido, assenza di stress termici, ed elevata insolazione. (Fonte: Nobel, 1995)

I valori di WUE sono molto più elevati per piante CAM perché la differenza di concentrazione di vapore acqueo tra la pianta e l'atmosfera durante il periodo di sostanziale apertura stomatica si riduce. In particolare, il contenuto di vapore acqueo in foglie e steli sono entro 1% del valore di saturazione in aria alla temperatura del tessuto

(Nobel, 1999); la temperatura dei tessuti tende ad essere molto più bassa di notte, e il valore di saturazione di vapore acqueo aria aumenta quasi esponenzialmente con la temperatura. Le piante CAM tendono a perdere solo dal 20 al 35% di acqua rispetto alle piante a ciclo C3 o C4 per un dato grado di apertura stomatica. Infatti le piante CAM usano da 50 a 100 kg di acqua per kg di sostanza secca, le piante C4 da 300 a 500 kg ed infine le piante C3 da 700 a 1000 kg (Nobel, 1988).

2.4 IMPORTANZA ECONOMICA NEL MONDO E IN ITALIA

Le piante afferenti al genere *Opuntia* e *Nopalea* sono presenti in molti Paesi del mondo dove vengono utilizzate con diversi scopi:

- per l'alimentazione umana (consumo dei frutti e cladodi teneri);
- per la produzione di foraggio;
- per l'allevamento di cocciniglie per l'estrazione del colorante naturale carminio;
- per le materie prime per l'industria della cosmesi, produzione di liquori, integratori alimentari;
- per il controllo della desertificazione.

Considerando *O. ficus-indica* a livello mondiale, il Messico è il principale paese produttore di frutti con circa 72.500 ettari di superfici investite (Barbera, 1999), il Messico è anche il principale produttore dei cladodi destinati al consumo umano (principalmente insalate, prodotti in salamoia), con una produzione di circa 564.000 t/anno di cladodi (Sagarpa, 2004).

In Argentina il ficodindia viene utilizzato solamente per la produzione di frutti, nell'ultimo decennio le superfici coltivate intensivamente hanno raggiunto i 2.000 ettari a fronte di 200.000 ettari di piante selvatiche che vengono usate per il prodotto fresco (Ochoa e Uhart, 2004). Oltre al prodotto fresco, dal succo estratto dal frutto e successivamente concentrato si ottiene uno sciroppo che viene usato per guarnire formaggi o per la produzione di dessert. In Brasile, queste piante sono presenti su 40.000 ettari e vengono impiegate per la produzione di foraggio, mentre in Perù si raggiungono i 35.000 ettari di estensione concentrati nella regione della Sierra e sono impiegate per l'allevamento della cocciniglia del carminio (Barbera, 1999), per tale scopo vengono impiegate principalmente le piante in forma selvatica. Circa 2.400 ettari sono impiegati per la coltivazione di piante destinate alla produzione di frutti con una produzione annuale di 15.000 t circa (Barbera, 1999). La produzione di frutto del Perù se confrontata con quella di altri Paesi risulta relativamente bassa per la presenza di innumerevoli problematiche di ordine fitosanitario.

In Europa, l'Italia vanta un settore specializzato per la produzione di frutti di ficodindia destinati al consumo fresco, dove la superficie investita è di 3.500 ettari di coltivazioni intensive su 15.000 ettari complessivi con una produzione di 70.000 t/anno di prodotto di cui il 90% deriva dalla Sicilia che si conferma la principale regione produttrice di ficodindia in Italia (Inglese *et al.*, 2002). In Sicilia, viene stimato un consumo *procapite* annuo di frutti freschi di 1 kg (Basile, 2001). La maggior parte della produzione intensiva della Sicilia (circa 80%) si trova nella zona montuosa di San Cono, nel versante sud orientale dell'Etna e nella Valle del Belice. Le varietà utilizzate in Italia sono quelle a bacca gialla (80% del totale), rossa (15%) e bianca (5%). Grazie a tali produzioni l'Italia a livello mondiale si conferma al secondo posto per la produzione di frutti di ficodindia dopo il Messico. Una piccola parte della materia prima è destinata a piccole industrie artigianali che producono marmellate, liquori, gelati, alimentando un mercato di nicchia che è in fase di espansione grazie anche al mercato elettronico.

Il principale utilizzo è il consumo fresco del frutto che ha un buon mercato in diverse parti del mondo. Dai semi si può ottenere un olio commestibile con caratteristiche simili a quello proveniente dal girasole, dalla soia e dal mais (Sepuueda e Joenz, 1988).

Le piante vengono utilizzate anche in campo zootecnico, infatti in Brasile, Cile e Sud Africa viene utilizzata anche come foraggera, i cladodi sono molto ricchi in acqua e contribuiscono a soddisfare il fabbisogno idrico degli animali (Gosten e Vecchio, 1979).

Le piante afferenti ai generi *Opuntia* e *Nopalea* spesso vengono utilizzate come frangivento per la recinzione dei campi. Inoltre nel passato venivano coltivate per allevare la cocciniglia del carminio (*Dactylopius coccus*) da cui si estraeva, dopo essiccamento e macinazione dell'insetto, una polvere utilizzata come colorante per tessuti, e come soluzione acquosa colorante per l'industria alimentare e farmaceutica. Infine, il 10% circa dell'acido carminico è utilizzato come indicatore e reattivo in istologia e batteriologia (Barbera, 1991 b).

2.5 UTILIZZAZIONI

Queste specie vengono anche utilizzate in programmi di prevenzione dell'erosione del suolo e lotta alla desertificazione; hanno una grande capacità di adattamento crescendo in terreni gravemente degradati inadeguati al altre tipologie di piante.

Per la produzione di foraggio le varietà senza spine sono preferite grazie alla facilità di digestione e hanno meno problemi per la somministrazione agli animali. Il

materiale per la coltivazione deve provenire da piante robuste, produttive e sane. I cladodi possono essere consumati, da parte degli animali, direttamente sulla pianta, ma il consumo incontrollato può danneggiare la pianta. I cladodi appena raccolti devono essere immagazzinati in un luogo fresco e ombreggiato.

Tra tutti le utilizzazioni che questa pianta offre, quella del foraggio può essere più idonea, dato che l'*Opuntia* può costituire una fonte importante e continua di foraggio durante le stagioni di siccità (Figura 8). Queste piante hanno anche altri vantaggi tra i quali l'elevata palatabilità, poche spine, alta digeribilità, facile gestione della coltivazione, importante alimento per il bestiame e per la fauna selvatica in zone aride e semiaride, resistenti alle condizioni di trasporto, alto tasso di adattabilità alle condizioni di raccolta; sempreverdi e elevata produzione di biomassa.



Figura 5 *Opuntia* utilizzata come foraggio. (Fonte: Pessoa J., 2007.)

Per questo esiste una continua ricerca di piante che possano tollerare condizioni climatiche che inducono elevati livelli di stress termico e che aiutino a contrastare i fenomeni di desertificazione e/o di impoverimento del suolo. In questo contesto, l'*Opuntia* ha un potenziale interessante, come già si è dimostrato nei centri di origine e nelle aree di maggiore diversità in molte altre zone del mondo.

Ulteriori possibili utilizzazioni delle piante afferenti ai generi *Opuntia* e *Nopalea* sono le produzioni di biogas e di etanolo. Secondo dati acquisiti personalmente da alcune società del settore (cfr. greenwatt.be) un ettaro di *Opuntia* può produrre sino a 17.500 m³ di biogas. Il biogas prodotto è la stessa molecola del gas naturale, contenente CH₄ (75%), CO₂ (24%) e 1% di gas minori. Il valore calorico del biogas ottenuto da *Opuntia* è di 7.000 Kcal/m³. Sulla base della densità d'impianto di 635–5000 piante per ettaro, una media di 300 litri e 3000 litri di etanolo possono essere ottenuti rispettivamente da coltivazioni non irrigate ed irrigate.

Settore	Parti della piante interessate
Alimentazione Umana	Frutti: freschi o trasformati (passati, succhi, polpa, vino, liquore, melassa, gelatina, puree, dolcificante); cladodi: giovani per la produzione di verdura, trasformati in salamoia, precotti congelati, gelatina, dolci; semi: olio.
Alimentazione Animale	Cladodi, frutti e semi: foraggio (al pascolo o raccolto)
Agricolo	Pianta: protezione e conservazione del suolo, recinzione viva, frangivento e materia organica
Farmaceutico	Radici: diuresi; cladodi: diabete, colesterolo, antiinfiammatorio; fibra e mucillagini: obesità; fiori: diuresi e dissenteria.
Energia	Cladodi: etanolo, biogas e legna da ardere. Fiori: etanolo e biogas.
Cosmetica	Cladodi: shampoo, saponi, creme, districanti e lozioni
Altro	Pianta: ornamentale; cladodi: colla, pectine, fibre, carta, antitraspirante, colorante e mucillagini. Frutti: coloranti

Tabella 1 Usi ed applicazioni potenziali della pianta di ficodindia (*Opuntia ficus-indica*). Ripresa e modificata da Barbera (2001)

2.6 PROPAGAZIONE

L'*Opuntia* si può propagare per seme o per talea. La talea è costituita dal cladodo di due anni con 2 o 3 cladodi di 1 anno. La tecnica presenta diversi vantaggi: è una tecnica semplice, rapida ed economica, consente di ottenere piante uniformi, identiche alla pianta madre, permettendo di mantenere caratteri favorevoli (Pimienta Barrios, 1990) (Figura 6).



Figura 6 Impianto di ficodindia realizzato con cladodi interi (da Santos *et al.*, 2002)

La propagazione per seme (Figura 7) è poco diffusa, perché il seme è di difficile germinazione in quanto è ricoperto da uno strato molto duro (falso arillo), il funicolo che avvolge l'ovulo lignifica quando la maturazione del seme è terminata. Non ha endosperma, i cotiledoni sono carnosì e l'ipocotile non è succulento. La germinazione è particolarmente scalare da 4-5 giorni fino a 4-5 mesi, è questo è uno dei motivi che rende questa tecnica svantaggiosa. Inoltre, le piante da seme non sono uniformi e attraversano una fase lunga giovanile. L'aumento della germinabilità può essere ottenuta con la scarificazione del seme meccanica o chimica. I semi sono poliembrionici, un embrione è di origine sessuale e deriva dalla fecondazione del sacco embrionale e gli altri sono di natura apomittica e derivano da cellule del sacco embrionale e dai tessuti della nucella (Pimienta Barrios, 1990). La riproduzione sessuale viene utilizzata solo per il miglioramento genetico.



Figura 7 Semi di *Opuntia* spp. (Fonte: Robles-Julio, 2009).

2.7 MIGLIORAMENTO GENETICO IN OPUNTIA SPP.

Il miglioramento genetico di *Opuntia* spp. è iniziato in epoca relativamente recente, soprattutto se comparato ad altre colture che hanno programmi di miglioramento genetico con base scientifica più consolidata. Alcuni obiettivi fanno riferimento al miglioramento della produttività, alla resistenza alle malattie e ai patogeni. Altri invece riguardano il valore nutrizionale, la produzione e le caratteristiche organolettiche dei frutti, l'architettura della pianta. Per 25 anni il naturalista e genetista vegetale Luther Burbank raccolse diverse specie afferenti al genere *Opuntia*. Selezione e realizzò incroci guidati ottenendo varietà senza spine (Mondragón *et al.*, 2003). Per Mondragón *et al.* (2003) l'ibridazione naturale tra specie distinte di *Opuntia* è molto comune e l'elevato livello di ploidia rappresenta una delle maggiori cause di diversità. Alcune tecniche di ibridazione di queste specie furono descritte da Mondragón e Borderlon (1998), alcuni programmi di miglioramento genetico hanno incontrato difficoltà legate alla produzione di semi apomittici e alla loro fase giovanile (Mondragón-Jacobo, 2002). Le *Cactaceae* hanno numero cromosomico pari a $x=11$, mentre quello dei cromosomi somatici è di 22. Elevati livelli di ploidia sono fenotipicamente espressi come incremento vegetativo (dimensione dei cladodi) e del

vigore riproduttivo. I differenti livelli di ploidia di 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 8x, 10x, 11x, 12x, 13x, 19x e 20x sono stati riportati tra le popolazioni di *Opuntia* sia selvatiche che coltivate (Yuasa *et al.*, 1974; Pinkava *et al.*, 1992). Varietà con alto numero di cromosomi $2n = 6x = 66$ e $2n = 8x = 88$ si trovano per lo più tra i genotipi coltivati, con eccezione di una popolazione selvatica di *O. streptacantha* Lemaire. Le cultivar con basso numero di cromosomi $2n = 2x = 22$ e $2n = 4x = 44$ si trovano nelle popolazioni selvatiche (Pinkava *et al.*, 1992).

Secondo Santos *et al.*, (2005), il primo programma di miglioramento genetico di *Opuntia* in Brasile fu iniziato dall'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”-(IPA) di Recife (Brasile) nel 1980, ed ebbe come obiettivo l'aumento della diversificazione genetica attraverso l'introduzione e la generazione di nuovi cloni e attualmente la banca del germoplasma conta circa 1400 accessioni.

I principali obiettivi del miglioramento genetico sono:

- la resistenza alla cocciniglia del carminio;
- la resistenza alla cocciniglia *Diaspis echinocacti*;
- la resistenza alla fusariosi;
- adattamento ad aree meno favorevoli;
- maggiore produttività.

La caratterizzazione del germoplasma delle popolazioni native e naturalizzate, così come il lavoro continuo di ibridazione, sono necessari per individuare nuove selezioni e sviluppare nuove cultivar adattabili alle aree desertiche al fine di recuperare le produttività biologiche. Si sono realizzati diversi tentativi per migliorare l'*Opuntia* dai primi anni del XX secolo, quando Luther Burbank in California, cominciò lo sviluppo di varietà di *Opuntia* senza spine per il foraggio. Fuentes (1991) e Flores e Aranda (1997) indicarono l'uso di 10-18 specie, 15 delle quali sono platyopuntie, tra le quali si annoverano *O. streptacantha*, *O. megacantha*, *O. leucothrica*, *O. robusta*, *O. rastrera*, *O. lindheimeri*, *O. engelmannii*, *O. cantabrigiensis*, *O. macrocentra* e *O. phaeacantha*, considerate come le più importanti in quanto per numero, distribuzione e preferenza degli stessi agricoltori. Anche se realmente, le più utilizzate sono *O. engelmannii* e *O. lindheimeri* (De la Cruz, 1994).

La presenza di spine sui cladodi è un serio impedimento per l'uso mondiale di *Opuntia*, infatti i programmi di ibridazione hanno come obiettivo produrre varietà senza spine. Si pensa che i cladodi senza spine siano il risultato del processo di domesticazione, dato che quelle le piante con cladodi lisci non prosperano in ambienti selvatici.

2.8 MARCATORI MOLECOLARI

Un marcatore molecolare può essere definito come un locus genomico, rilevabile con sonde o inneschi specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' (Barcaccia e Falcinelli, 2006). Questi non sono legati all'attività di specifici geni, ma si basano sulla rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc.

Gli individui appartenenti ad una determinata specie si diversificano tra di loro per un numero più o meno elevato di caratteri (alleli) e ciò mette in condizione di poter rilevare i polimorfismi nelle regioni di DNA omologhe (loci). Dal punto di vista molecolare si possono classificare i polimorfismi in tre categorie:

- a) polimorfismi di sequenza, dovuti a differenze nelle sequenze fra basi;
- b) polimorfismi d'inserzione e delezione, causati da mutazioni puntiformi;
- c) polimorfismi del numero d'unità di ripetizione.

I marcatori molecolari presentano numerosi vantaggi rispetto agli altri marcatori genetici in quanto non subiscono interferenze dall'ambiente, coprono qualsiasi parte del genoma, sia quella codificante che quella non codificante (introni e regioni di regolazione), non presentano effetti pleiotropici ed epistatici e in molti casi hanno espressione codominante, consentendo di discriminare la condizione di omozigosi da quella di eterozigosi, infine nella maggior parte dei casi i polimorfismi molecolari sono neutri ovvero una variazione allelica nel locus marcatore, non ha alcun effetto a livello fenotipico se non quello di permettere di determinare il genotipo.

Le applicazioni dei marcatori molecolari nel campo della ricerca e del miglioramento genetico possono essere diverse: si possono costruire dettagliate mappe di associazione (linkage maps), che consentono la comparazione tra genomi di gruppi tassonomici diversi e la rivelazione di correlazioni e omologie genetiche; si può ottenere l'identificazione varietale attraverso fingerprinting, evidenziando le differenze presenti nella sequenza di DNA tra due o più campioni a confronto, al fine di determinarne l'identità o accertarne le correlazioni esistenti; si possono ancora sfruttare i marcatori molecolari nella "selezione assistita" (MAS, Marker Assisted Selection), cioè nella selezione precoce per il carattere d'interesse non più a livello del fenotipo bensì a livello del genotipo.

Il numero di marcatori molecolari attualmente disponibili è molto elevato e in costante aumento, grazie alla continua messa a punto di strumentazioni e tecniche

d'analisi sempre più affidabili. Le caratteristiche di un marcatore molecolare ideale sono:

- alto livello di polimorfismo;
- stabilità;
- estesa distribuzione nel genoma;
- semplicità di analisi;
- ridotti costi di applicazione;
- ereditabilità mendeliana;
- codominanza;
- riproducibilità entro e tra laboratori.

È difficile trovare un marcatore che soddisfi tutte queste caratteristiche; la scelta del marcatore va fatta “caso per caso” sulla base delle esigenze del progetto di ricerca e della disponibilità del marcatore conosciuto per le specie prese in esame; sviluppare “*ex-novo*” marcatori in specie poco studiate comporta infatti notevoli costi e investimenti.

Una classificazione dei marcatori molecolari può essere fatta distinguendoli in base alle tecniche di analisi su cui si fondano, ovvero la digestione enzimatica abbinata all'ibridazione di acidi nucleici e la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction - PCR).

I marcatori molecolari basati su restrizione e ibridazione, utilizzati per primi nell'analisi dei genomi vegetali, sfruttano l'attività di endonucleasi di restrizione e quindi il processo di ibridazione (SBH, *Southern blot hybridization*) messo a punto da Southern nel 1975. Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica in grado di legarsi a particolari sequenze di basi (siti di taglio) e di tagliare la molecola producendo frammenti di dimensioni variabili. Eventuali mutazioni in questi siti, anche di una sola base, portano a variazioni nella lunghezza dei frammenti di restrizione generati dopo la digestione enzimatica. Il saggio di ibridazione richiede una sonda specifica, marcata con fluorofori, in grado di legarsi a una molecola di DNA a singola elica e la reazione di complementazione si osserva tramite l'emissione di luce rilevabile tramite fotometria. Le principali classi di questa prima categoria di marcatori sono: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*).

I marcatori molecolari basati sulla PCR (Polymerase Chain Reaction) sono stati sviluppati in seguito alla messa a punto, da parte di Mullis *et al.* (1986), della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) ovvero l'amplificazione *in vitro* di DNA situato tra

due sequenze nucleotidiche, utilizzando una DNA polimerasi, stabile alle alte temperature, estratta dal batterio *Thermus aquaticus* e nota come Taq polimerasi. L'amplificazione utilizza un innesco omologo all'estremità 3' della catena nucleotidica da duplicare (primer) e prevede l'utilizzo di un termociclatore (Thermal Cycler) in grado di realizzare ripetuti cicli termici. Tale tecnica permette l'aumento esponenziale del numero di copie del frammento consentendo di ottenere da milioni ad alcuni miliardi di copie del segmento di DNA prescelto, ognuna lunga da qualche decina a qualche migliaio di coppie di basi. Tra le principali tecniche che appartengono a questa categoria troviamo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), I-SSR (*Inter-microsatelliti*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), S-SAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*).

Un'altra distinzione, non meno importante, può essere fatta in base al numero di loci analizzati durante la prova e distingue da i marcatori multi-locus e dai marcatori singolo-locus. I marcatori multi-locus si basano sull'analisi simultanea di molti loci genomici e implicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali mediante l'impiego di primer oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria (ad esempio: RAPD, I-SSR e AFLP). Sono definiti dominanti perché ad ogni locus si può osservare la presenza o l'assenza della banda, ma non è possibile distinguere la situazione eterozigote da quella omozigote. Al contrario, i marcatori singolo-locus prevedono l'ibridazione e l'amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l'utilizzo di sonde o primer specifici per determinati loci genomici (ad esempio: RFLP e SSR). I marcatori appartenenti a questa tipologia sono di tipo codominante poiché permettono di distinguere i loci omozigoti da quelli eterozigoti rappresentati rispettivamente da una sola banda (o l'uno o l'altro allele) o da 2 bande (entrambi gli alleli).

2.8.1 Simple Sequence Repeats (SSR)

I marcatori *Simple Sequence Repeats* (SSR, sequenze ripetute semplici), detti anche microsatelliti, consentono di identificare polimorfismi a livello di sequenze ripetute di DNA. Il sequenziamento del genoma di diverse specie di piante ha messo in evidenza l'ampia presenza di elementi ripetuti, tanto più frequenti quanto più è esteso il genoma. Disperse nel genoma esistono dunque moltissime sequenze ripetute, anche molto semplici, ovvero costituite da mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ed esa-nucleotidi (microsatelliti), che si susseguono in serie. Il funzionamento dei marcatori SSR prevede l'amplificazione di tali regioni ripetute, si otterranno così delle sequenze che non

differiscono per il motivo di base ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto. In base ai diversi pesi molecolari dei microsatelliti, mediante elettroforesi, è possibile visualizzare le differenze tra i genotipi studiati (Powell *et al.*, 1996).

I microsatelliti possono essere perfetti, quando costituiti da una sequenza ininterrotta del motivo di base o imperfetti, quando all'interno di una serie di ripetizioni vi sono tratti non ripetuti. Esistono, sebbene meno frequenti, anche microsatelliti composti, dati da una sequenza di ripetizioni perfetta o imperfetta adiacente ad un'altra sequenza di ripetizioni con un differente motivo di base. Ai fini degli studi sulla variabilità genetica i microsatelliti perfetti risultano più utili in quanto presentano una maggiore variabilità.

Per quanto riguarda il motivo ripetuto, nell'ambito delle sequenze di due nucleotidi, le ripetizioni (AT)_n risultano nelle piante molto frequenti, mentre piuttosto rare sono (AC)_n e (TC)_n, al contrario di quanto avviene nel genoma dei mammiferi. All'atto pratico però è meglio utilizzare microsatelliti costituiti da almeno 3 o meglio 4 nucleotidi in quanto facilitano la distinzione degli alleli che distano per un basso numero ripetizioni o anche una sola.

I marcatori SSR si distinguono in genomici, se presenti in regioni non codificanti, e genici se presenti in regioni codificanti, questi sono detti più specificatamente EST-SSR (EST, *Expressed Sequence Tags*).

La presenza di microsatelliti in regioni espresse indica un loro possibile ruolo nella regolazione dell'espressione genica. È stato ipotizzato che la presenza di ripetizioni nelle regioni 3'UTR e 5'UTR (*UnTranslated Regions*) delle sequenze geniche possa causare errori nella trascrizione e silenziamento, mentre SSR nelle regioni trascritte (ORF – *Open Reading Frame*) possono inattivare geni. Uno studio su larga scala dei microsatelliti genici in *Arabidopsis*, orzo e mais ha dimostrato una maggiore presenza di SSR nelle regioni UTR rispetto alle ORF (Morgante *et al.*, 2002).

I microsatelliti genici hanno delle caratteristiche peculiari rispetto a quelli genomici, generalmente sono più corti essendo le regioni codificanti più conservate rispetto a quelle non codificanti; gli EST-SSR inoltre presentano un maggior grado di trasferibilità e applicazione su diverse specie o generi affini (Varshney *et al.*, 2005). In numerosi studi i microsatelliti genici sono risultati però meno polimorfici rispetto a quelli genomici, visto che in generale le sequenze trascritte sono molto conservate.

L'utilizzo dei microsatelliti richiede la conoscenza del genoma oggetto di studio, ed in particolare sulle sequenze fiancheggianti il microsatellite in 5' e 3', in cui vanno disegnati i primer a monte e a valle del marcatore stesso. Tali zone sono altamente

conservate all'interno di una specie e tra specie affini, ciò significa che è possibile costruire dei primer comuni per tutti gli individui anche di più di una specie, capaci di amplificare le zone microsatelliti dei singoli individui. Il clonaggio dei marcatori SSR genomici può essere ottenuto seguendo due differenti strategie. La tecnica più diffusa prevede la costruzione di una libreria genomica ad inserti corti arricchita per sequenze specifiche di microsatelliti e la successiva selezione dei cloni che contengono il microsatellite attraverso uno screening con sonde sintetiche che presentano un definito motivo SSR (Powell *et al.*, 1996). In alternativa si possono amplificare frammenti di restrizione genomici usando un primer Inter-SSR, combinato con un primer adattatore-specifico, in modo da ricostruire le regioni fiancheggianti il microsatellite. Per entrambe le tecniche è poi necessario sequenziare i cloni ibridati o gli ampliconi, per verificare l'effettiva presenza del microsatellite e per disegnare i primer forward e reverse, rispettivamente alle estremità 5' e 3' del microsatellite considerato.

I microsatelliti genici possono essere identificati con più facilità tramite ricerche in database di sequenze geniche EST (Varshney *et al.*, 2005). Nel caso di specie vegetali importanti (riso, soia, vite, agrumi, ecc.), le migliaia di sequenze EST depositate permettono l'identificazione di microsatelliti ed il *primer design* a costi praticamente nulli. Nel caso di specie minori è invece necessario costruire librerie geniche e sequenziare i cloni della libreria per identificare i microsatelliti.

Gli SSR sono da diversi anni tra i marcatori più frequentemente utilizzati per studi di caratterizzazione varietale in molte specie frutticole (Wunsch e Hormaza, 2002), per la costruzione di mappe di *linkage*, per lo studio di caratteri quantitativi (Dondini *et al.*, 2004) e per studi di genetica delle popolazioni (Stoeckel *et al.*, 2006), infatti sono marcatori altamente affidabili, semplici da utilizzare e forniscono informazioni migliori e più specifiche rispetto a marcatori casuali come RAPD o AFLP, nonostante richiedano un maggior lavoro preliminare.

Negli ultimi anni microsatelliti genici, sono stati isolati da numerose specie frutticole e forestali (Rungis *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006) e utilizzati per la costruzione di mappe geniche (Chen *et al.*, 2008), per studi di diversità genetica (Bouck e Vision, 2007) e per il fingerprinting (Xie *et al.*, 2006). Per la loro efficienza, marcatori SSR sono stati, in tempi più recenti, identificati e utilizzati con successo anche in numerose specie frutticole minori come melograno (Dimpy *et al.*, 2013), giuggiolo (Bhat *et al.*, 2010; and Golein *et al.*, 2011), guava (Coser *et al.* 2012), ficodindia (Helsen *et al.* 2009).

2.8.2 Utilizzo dei marcatori molecolari in *Opuntia*

La tassonomia del genere *Opuntia* presenta molti punti poco chiari, a partire dal numero di specie ascritte al genere, che varia tra da 160 (Gibson e Nobel, 1986) a 250 (Britton e Rose, 1963) per la confusa nomenclatura, che interessa per altro anche altri generi delle *Opuntioideae*. Le principali ragioni di tale confusione tassonomica possono essere ascritte a diversi fattori che vanno dalla scarsità di caratteri morfologici, all'alto livello di plasticità fenotipica all'interno dei taxa, alla recente diversificazione, alla presenza di poliploidia che interessa oltre il 64% del totale (Pinkava *et al.*, 1998), nonché ai ripetuti fenomeni di ibridazione intra- e intergenerici (Wallace e Gibson, 2002). Anche per la specie più diffusa ed importante economicamente, *O. ficus indica*, c'è una certa incertezza in quanto la specie è talvolta descritta come priva di spine e tassonomicamente distinta da altre opunzie coltivate, come *O. megacantha*, *O. streptacantha* e *O. amyclaea* (Britton e Rose, 1963; Scheinvar, 1995; Reyes-Aguero *et al.*, 2005) mentre in altri casi (Gibson e Nobel, 1986; Pimienta-Barrios, 1994; Felker *et al.*, 2005), genotipi coltivati spinosi sono stati classificati come *O. ficus-indica*. Certamente la presenza di spine nei cladodi è una caratteristica che non può discriminare *O. ficus-indica* da altre opunzie arborescenti (Nieddu e Chessa, 1997; Kiesling 1998; Felker *et al.*, 2005), anzi all'interno del genere, il portamento, la presenza di spine, il numero di spine per areola e il numero di areole sono caratteri che differiscono drasticamente in diverse regioni di coltivazione (Rebman e Pinkava 2001). All'interno della famiglia delle *Opuntioideae*, i livelli di ploidia variano, comprendendo specie diploidi fino ad ottoploidi (Felker *et al.*, 2006). Le cultivar commerciali oggi coltivate sono ottoploidi (Felker *et al.*, 2006), ma i loro ancestrali sono sconosciuti. Diversi autori riferiscono la difficoltà di assegnare correttamente genotipi coltivati ad un taxon definito (Kiesling, 1998; Felker *et al.*, 2006; Mondragon-Jacobo 2001, Labra *et al.*, 2003). La variazione morfologica continua all'interno del genere, la mancanza di descrittori chiari per ciascuna specie e la relativa facilità di ibridazione incrociata (con la presenza individui dai caratteri intermedi) ha portato a designazioni di specie errate, con il risultato che spesso le stesse varietà sono classificate come appartenenti a specie diverse o, in altri casi, sono considerate ibridi tra parentali sconosciuti.

Le incertezze nella classificazione basata su indicatori morfologici, possono essere superate utilizzando marcatori molecolari, stabili e riproducibili. Negli ultimi due decenni, sono stati condotti alcuni studi di caratterizzazione di collezioni di germoplasma con marcatori molecolari RAPD (Wang *et al.*, 1998; Zoghalmi *et al.*, 2007;), AFLP (Garcia-Zambrano *et al.*, 2009;) e ISSR (Souto Alves *et al.*, 2009; Luna-

Paez *et al.*, 2007). Due importanti studi (Labra *et al.*, 2003; Griffith, 2004) hanno impiegato diversi strumenti molecolari per chiarire alcuni aspetti tassonomici del genere ed in particolare l'origine di *O. ficus-indica*. Labra *et al.* (2003) hanno indagato con marcatori AFLP sulla mancanza di differenziazione genetica tra *O. ficus-indica* e popolazioni di *O. megacantha*, suggerendo che *O. ficus-indica* dovrebbe essere considerata come una forma addomesticata della spinosa *O. megacantha*. D'altra parte, Griffith (2004) ritiene che la specie indicata come *O. ficus-indica* non sia che un gruppo di diversi cloni, selezionati per le poche spine e per i frutti carnosì e ottenuti da diversi parentali, molto probabilmente opunzie arborescenti, del Messico centrale e meridionale.

In ogni caso, la maggior parte delle analisi ha rivelato discrepanze tra la caratterizzazione molecolare e la classica classificazione tassonomica. Recentemente, altre ambiguità nella classificazione tassonomica delle specie di *Opuntia* sono emerse da uno studio che ha utilizzato marcatori microsatelliti polimorfici per cercare di discriminare due varietà botaniche di *O. echios* (*echios* e *gigantea*) native delle Isole Galapagos e morfologicamente distinte (Helsen *et al.*, 2009). Ancora una volta, gli autori hanno evidenziato che l'attuale differenziazione tassonomica non è sostenuta da dati molecolari. Marcatori microsatelliti SSR ed EST-SSR sono stati utilizzati per uno studio sulla variabilità genetica in un'ampia collezione di genotipi coltivati e specie selvatiche di diverse origini (Messico, Italia, Israele) (Caruso *et al.*, 2010). In tempi più recenti (de Lyra *et al.*, 2015), utilizzando come marcatori geni che codificano per il DNA ribosomale, in particolare regioni di DNA spaziatore interno (Internal Transcribed Spacer of nuclear ribosomal genes -nrITS), sono state analizzate 34 accessioni presenti della banca di germoplasma di *Opuntia* spp. dello stato brasiliano di Pernambuco, già caratterizzate per i tratti morfologici, ottenendo risultati in parte coincidenti. Questi studi hanno chiarito alcuni aspetti tassonomici del genere e sono stati utili per il fingerprinting varietale, ma non risolvono del tutto i dubbi sull'origine genetica dei genotipi coltivati più diffusi nel mondo, sulle relazioni tra le diverse cultivar e i genotipi selvatici e sui parentali di *O. ficus-indica*.

2.9 LE COLTURE *IN VITRO*

Le tecniche di coltura *in vitro* si basano sulla capacità che le cellule hanno di crescere e moltiplicarsi su un substrato nutritivo a composizione chimica definita in condizioni di asepsi. Le colture *in vitro* hanno come fulcro il principio della totipotenza, cioè la capacità della cellula vegetale di potersi differenziare e di rigenerare una pianta

intera. Le applicazioni della coltura *in vitro* sono molteplici e la propagazione *in vitro* ne rappresenta una tipica realizzazione.

2.9.1 Micropropagazione

La micropropagazione è quella tecnica che permette la propagazione delle piante per via vegetativa, a partire da piccoli espianti che possono essere rappresentati da singole cellule o gruppi di cellule o frazioni di tessuto di organi di piante che si intendono moltiplicare. La propagazione *in vitro* si basa sulla proliferazione delle gemme ascellari e sulla capacità di differenziazione, appartenente alle cellule vegetali mature, per redifferenziare e sviluppare nuovi centri meristemati che sono capaci di rigenerare un'intera pianta. La rigenerazione può seguire due percorsi morfogenici: l'organogenesi, con la formazione unipolare di organi, e l'embriogenesi somatica, con la produzione di strutture bipolari chiamati embrioni somatici con radici e germoglio meristemato.

La micropropagazione consente di ottenere in tempi ridotti un numero elevato di piante identiche tra loro, e alla pianta madre, quindi si presenta come alternativa alla propagazione convenzionale e nell'attuale vivaismo frutticolo è una tecnica ampiamente collaudata. Questa tecnica è a supporto della crioconservazione e della trasformazione genetica vegetale, viene utilizzata per la moltiplicazione di nuove varietà, per la conservazione di piante rare e a rischio di estinzione.

La tecnica presenta i seguenti vantaggi:

- gli espianti sono prelevati da un numero limitato di piante madri;
- la propagazione non è dipendente dall'andamento stagionale;
- possibilità di moltiplicare specie o particolari genotipi che presentano difficoltà ad essere propagati con le tecniche tradizionali (recalcitranti);
- capacità di fornire elevate produzioni in spazi limitati ed in tempi contenuti;
- sanità e l'uniformità dei materiali ottenuti;
- il materiale prodotto si può conservare per un periodo relativamente lungo.

I principali svantaggi della propagazione *in vitro* sono rappresentati da:

- elevati costi;
- necessità di apposite strutture;
- possibilità che si verifichi variabilità somaclonale;
- i tessuti delle piante micropropagate possono andare incontro a iperidricità;
- alterazioni che si potrebbero presentare nel successivo allevamento *ex vitro*.

Il Paese pioniere sulla propagazione commerciale su larga scala di materiale vegetale basata sulla coltura di tessuti vegetali è stato l'USA. Nel corso degli ultimi trent'anni di propagazione vegetale, è emerso che la micropropagazione è una delle principali agro-tecnologie globali. Tra il 1986 e il 1993, la produzione mondiale basata sulla propagazione *in vitro* è aumentata del 50%. Nel 1993, la produzione mondiale è stata di 663.000.000 piante. Nel 1997, la produzione si è attestata a 800 milioni di piante. Durante il quinquennio 1990-1994, in Europa l'industria della micropropagazione diminuì, soprattutto per lo spostamento della produzione nei Paesi via di sviluppo; ma da allora a causa dell'aumento della domanda di piante con alta qualità si è assistito ad un aumento della produzione. Dal 1995, la produzione è aumentata del 14% nei paesi asiatici, soprattutto a causa dell'ingresso sul mercato della Cina, mentre l'aumento nel sud e nell'America Centrale è dovuta alla crescita della produzione a Cuba. Più di recente, alcune aziende provenienti da Israele, Stati Uniti e Regno Unito hanno spostato le loro produzioni in Costa Rica e in India.

2.9.2 Metodologie della micropropagazione

I metodi di propagazione *in vitro* che sono disponibili per la moltiplicazione delle piante da frutto sono:

- Moltiplicazione di germogli o gemme ascellari;
- Organogenesi;
- Embriogenesi somatica.

Moltiplicazione di germogli o gemme ascellari: prevede lo sviluppo e la propagazione dei germogli attraverso le seguenti fasi.

1. preparazione delle piante madri;
2. sterilizzazione e stabilizzazione degli impianti;
3. proliferazione;
4. radicazione;
5. acclimatemento.

Nel complesso le fasi cruciali per il successo di questa tecnica sono rappresentate dalla messa in coltura dell'espianto (difficoltà nella sterilizzazione, influenza dell'epoca di prelievo del materiale vegetale, influenza di metaboliti prodotti dall'espianto sulla capacità di assumere i composti nutritivi del mezzo di coltura) e dall'ambientamento delle giovani piantine alle condizioni normali di allevamento (mancata capacità di regolazione delle aperture stomatiche, estremo contenuto in acqua e scarsa lignificazione dei tessuti).

Organogenesi: prevede la formazione di organi unipolari (radici o germogli) da aggregati cellulari o tessuti non meristemati, attraverso la formazione di centri meristemati avventizi, chiamati meristemoidi. Trattasi di organogenesi per via diretta se i meristemoidi si sviluppano direttamente dall'espianto oppure organogenesi indiretta, qualora vi sia la formazione intermedia di callo da cui si sviluppano gli organi. Il processo organogenetico è in relazione con la specie e il genotipo ed è controllato da fattori fisici e ambientali, ma soprattutto dalla composizione del mezzo di coltura. Gli ormoni presenti nel substrato sono necessari per indurre la divisione e la distensione cellulare, in particolare elevati rapporti auxine/citochinine inducono la rizogenesi, bassi rapporti inducono la caulogenesi, mentre in situazione di equilibrio viene indotta la formazione di callo (callogenesi). Lo sviluppo del callo può essere ridotto eliminando la parte apicale degli espianti, così facendo viene eliminata la produzione di auxine prodotte dal meristema apicale (Infante, 1992). L'ottenimento quindi di una piantina completa da un espianto attraverso l'organogenesi, prevede due fasi distinte di coltura:

- formazione dei germogli;
- differenziazione della radice.

La rigenerazione di piantine attraverso l'organogenesi indotta dall'utilizzo di ormoni è stato il primo metodo di micropropagazione messo a punto per i cactus (Johnson e Emino, 1979) e ancora oggi è uno dei più usati. Un vantaggio di questo metodo è la possibilità di utilizzare qualsiasi organo o frammento di tessuto della pianta (non per forza il meristema). Tipo, dimensione, età e posizione dell'espianto utilizzato possono influenzare l'efficienza del ciclo di micropropagazione messo a punto.

Embriogenesi somatica: prevede la formazione di individui completi attraverso la formazione di embrioni somatici; si basa dunque sulla formazione di strutture morfologicamente e fisiologicamente simili a quelle degli embrioni zigotici, ma originate da singole cellule di qualsiasi organo vegetale. L'embriogenesi somatica *in vitro* può essere diretta, partendo da cellule dell'espianto iniziale, o indiretta partendo da cellule indifferenziate del callo. L'applicazione di questa tecnica su vasta scala nei fruttiferi presenta dei limiti, non solo dovuti all'insorgenza della variazione somaclonale, ma soprattutto per la difficoltà di conversione degli embrioni a pianta e per la lunga fase giovanile delle piante prodotte.

2.9.3 Fasi della micropropagazione

Le fasi della micropropagazione sono state individuate nel 1974 da Murashige dell'Università Riverside della California, l'intero ciclo di micropropagazione è stato

articolato in cinque fasi successive. Queste fasi sono universalmente applicabili per la moltiplicazione delle piante su larga scala. Le singole specie, varietà e cloni richiedono specifiche modifiche dei substrati per la crescita, per l'ambientamento e per le condizioni di indurimento. Le condizioni che devono essere applicate e regolate *in vitro* e quindi per la redazione del protocollo di micropropagazione devono essere il più possibile simili alle condizioni naturali della pianta

Fase 0: Selezione e preparazione della pianta madre

La scelta della pianta da cui prelevare il materiale o espianto di partenza è importante per assicurare, a fine ciclo propagativo, una produzione di buona qualità. La pianta madre che può essere allevata sia in serra che in campo deve rispondere allo standard varietale, deve essere indenne da patogeni, deve essere vigorosa e non deve aver subito stress ambientali. Per ridurre il livello di contaminazione nella fase successiva, possono essere eseguiti trattamenti fitosanitari, mentre per incentivare la successiva crescita e proliferazione *in vitro* degli espianti è utile somministrare fitoregolatori all'intera pianta o a parti di essa. In serra è più facile mantenere le piante sane perché si possono controllare i fattori che determinano lo sviluppo dei patogeni e quindi le infezioni. Il materiale di partenza può essere prelevato da piante in attiva crescita o dormienti a seconda della specie, dell'età e del metodo di coltura. La buona riuscita della coltura *in vitro* dipende dall'efficienza morfogenetica ed è influenzata da:

- stagione di prelievo dell'espianto: le condizioni ambientali quali temperatura e luce (intensità e fotoperiodo) determinano nei tessuti della pianta un diverso contenuto di carboidrati di riserva, di proteine, ma soprattutto di ormoni;
- stato fisiologico della pianta madre: un apice vegetativo in attiva crescita si sviluppa *in vitro* più rapidamente rispetto ad uno proveniente da una gemma, anche se è più difficile da sterilizzare;
- genotipo: i protocolli di micropropagazione sono genotipo dipendenti (specie, varietà, ecotipo). L'età della pianta madre: per certe specie, prevalentemente forestali, è indispensabile partire da materiale fisiologicamente giovane, poiché l'adattabilità della pianta alla coltura *in vitro* viene spesso perduta con l'età.

Fase 1: Stabilizzazione della coltura in condizioni asettiche

Questa fase prevede la raccolta del materiale, la sterilizzazione e la messa in coltura.

Raccolta del materiale: generalmente la coltura viene avviata da meristemi o da apici vegetativi, i quali sono costituiti da un cono vegetativo, comprendente il meristema e da alcuni primordi fogliari sub apicali. Gli apici vegetativi possono trovarsi all'estremità di un germoglio in attiva crescita, oppure possono essere ottenuti da una gemma indotta a germogliare *in vitro*. Di conseguenza il materiale di partenza può essere: erbaceo, semilegnoso, legnoso. Le gemme devono essere in fase di germogliamento e non vanno private delle perule. Il materiale raccolto va conservato in sacchetti di plastica per evitare la disidratazione se è conservato per più giorni, va tenuto in frigorifero a 3-4 °C. I periodi migliori per prelevare gemme in riposo vegetativo sono: l'autunno (prima dell'entrata in dormienza) e la fine dell'inverno (prima della ripresa vegetativa).

Sterilizzazione: la sensibilità del materiale durante la fase di sterilizzazione è influenzata dallo stadio di vegetazione. Un apice vegetativo di un germoglio in attiva crescita è infatti più sensibile delle sottostanti gemme ascellari, che sono parzialmente lignificate. È molto importante che l'agente sterilizzante entri in contatto con tutta la superficie dell'espianto. In alcuni casi la sterilizzazione di superficie non elimina contaminazioni interne di batteri o altri patogeni. Il controllo della contaminazione inizia con il pretrattamento delle piante donatrici. Esse possono essere preselezionate per le malattie, isolate e trattate per ridurre la contaminazione (George, 1993; Holdgate e Zandvoort, 1997). Gli espianti vengono poi portati al sito di produzione, vengono sterilizzati superficialmente e introdotti nella coltura. Essi in questa fase possono essere trattati con antibiotici e fungicidi (Kritzinger, *et al.*, 1997) e formulazioni antimicrobici, come PPM (Guri e Patel, 1998).

Stabilizzazione: gli espianti sterili, provenienti dalla fase precedente, vengono trasferiti in opportuni substrati di coltura. La grandezza degli espianti varia da meno di 1 mm a pochi centimetri: se derivano da meristemi apicali, gemme dormienti o in attività, hanno una lunghezza compresa tra 0,1-1,5 mm, mentre se derivano da germogli la loro lunghezza è compresa fra 1-3 cm. La stabilizzazione dell'espianto in una condizione asettica è considerata come una fase critica nella micropropagazione. Il processo richiede l'asportazione di piccole porzioni vegetali e la loro sterilizzazione superficiale con sostanze chimiche come ipoclorito di sodio, alcool etilico, altri sterilizzanti superficiali utilizzati sono il cloruro di mercurio (evitare il suo uso, per quanto possibile, dal momento che è altamente tossico), l'idrogeno perossido, e il permanganato di potassio. Vengono ripetuti lavaggi con acqua distillata sterile prima e dopo il

trattamento con sostanze chimiche. Dopo un breve periodo di coltura, di solito da 3 a 5 giorni, gli espianti contaminati vengono scartati.

I fitoregolatori che vengono impiegati in questa fase e che favoriscono l'emergenza degli espianti, comprendono nella maggior parte dei casi, una auxina e/o una citochinina; la loro concentrazione dipende dalla specie che si propaga e dal tipo di espianto. Durante la fase di stabilizzazione sono importanti le condizioni di luce e temperatura che normalmente variano da specie a specie. La durata di questa fase in media è di 3-6 settimane. La stabilizzazione è una fase di difficile gestione, in quanto si deve evitare principalmente la formazione di sostanze che impediscono lo sviluppo dell'espianto come tannini condensati o idrolizzabili, composti fenolici.

Fase 2: Moltiplicazione

L'obiettivo di questa fase è quello di ottenere nuovi propaguli che separati dall'espianto di origine sono in grado di formare nuovi germogli. Secondo la procedura che viene eseguita *in vitro* la moltiplicazione può essere realizzata da nuovi germogli o gemme ascellari, embrioni somatici od organi di propagazione. In alcuni metodi di micropropagazione la fase 2 include anche la stabilizzazione dei meristemi dai quali si possono sviluppare organi avventizi.

I nuovi germogli che si vengono a formare in questa fase possono essere:

- inviati alla successiva fase di radicazione;
- sottoposti ad una fase di allungamento per ottenere una maggiore uniformità dei germogli che vengono posti successivamente a radicare (fase di indurimento);
- oppure possono essere ritrasferiti su un substrato fresco per la moltiplicazione per ottenerne di nuovi (subcoltura).

Prolungando la fase di proliferazione e conseguentemente il numero di subcolture si possono manifestare sintomi di invecchiamento, quali: ingiallimento, perdita delle foglie basali e necrosi apicale. Ciò può essere legato ad una formulazione non corretta del substrato di coltura per quanto riguarda i macro ed i microelementi e/o gli ormoni. Se le condizioni di sviluppo dell'espianto non sono ottimali può esistere anche il rischio di mutazioni, soprattutto per le specie che non hanno una buona stabilità genetica. L'obiettivo primario è quello di propagare senza perdere la stabilità genetica. Le colture ripetute di germogli ascellari e avventizi, porzioni nodali, embrioni somatici e altri organi portano alla moltiplicazione di propaguli in grande numero. I propaguli prodotti in questa fase possono essere ulteriormente utilizzati per la loro moltiplicazione per le loro ripetute colture.

Fase 3: Preparazione alle condizioni ambientali

I germogli o le piantine derivate dalla fase precedente sono ancora piccole e non ancora capaci di accrescersi nel terreno o nel compost. Nella fase 3 si cerca di ottenere delle piantine autosufficienti cioè in grado di svolgere la fotosintesi.

Come proposto in precedenza da Murashige nella fase 3 è compreso il radicamento delle piantine prima che vengano trasferite nel suolo. La radicazione dei germogli è una fase importante in qualsiasi schema di propagazione *in vitro*. Alcune specie formano radici avventizie su germogli durante la coltivazione, ma di solito è necessario adottare una fase in più che permetta la radicazione, usando opportuni substrati che inducono la formazione delle radici. A volte i germogli necessitano di aver raggiunto una determinata lunghezza prima di radicare. Per ridurre i costi della micropropagazione molti laboratori ad oggi rimuovono i germogli dalla coltura *in vitro* senza le radici e li trasferiscono in vaso.

Pertanto nelle colture in cui la micropropagazione si basa su germogli avventizi o ascellari lo stadio 3 è conveniente dividerlo come suggeriscono Debergh e Maene (1981) in:

- Fase 3a, allungamento dei germogli formati durante la fase 2 per ottenere dei germogli di dimensione adeguata ad avviare la fase 3b.
- Fase 3b, radicazione dei germogli *in vitro* provenienti dalla precedente fase.

Fase 4: Acclimatazione

Questa è una fase molto importante in quanto se non eseguita accuratamente si potrebbe avere una notevole perdita di materiale di propagazione. L'acclimatazione si divide in 2 stadi:

- attecchimento delle piantine nel nuovo substrato di trapianto;
- ambientamento vero e proprio alle condizioni della serra e del campo.

Nel primo stadio si cerca di mantenere umidità e temperatura simili a quelle *in vitro*. Dopo alcuni giorni, se gli apici mostrano attività di crescita, inizia il secondo stadio durante il quale temperatura e umidità vengono portate lentamente alle condizioni naturali. L'ambientamento è reso difficile dalle caratteristiche ambientali che vengono mantenute *in vitro*. Per permettere ai diversi organi di riacquistare la normale attività, l'acclimatazione deve essere graduale. Il livello di umidità del substrato di trapianto rappresenta un fattore importante sia per l'accrescimento delle radici che per un

eventuale attacco di patogeni; perciò devono essere impiegati substrati capaci di assicurare una sufficiente permeabilità ed areazione del mezzo e contemporaneamente trattenere una quantità soddisfacente di acqua. I componenti del terriccio più comunemente utilizzati sono: torba, sabbia e perlite, in rapporti diversi a seconda delle esigenze della specie. Per avere un'umidità atmosferica simile a quella dei contenitori di coltura può essere impiegato un sistema Fog che incrementa gradualmente gli intervalli di erogazione dell'acqua permettendo la riduzione graduale dell'umidità relativa.

La luce e la temperatura vanno mantenute allo stesso livello della fase precedente. La pianta coltivata *in vitro* presenta, infatti, un metabolismo diverso rispetto ad una pianta cresciuta in condizioni normali: è essenzialmente eterotrofa poiché per il suo accrescimento utilizza il saccarosio presente nel substrato di crescita e fissa solo piccole concentrazioni di anidride carbonica. Uno dei primi problemi incontrati dalle piante *ex vitro* è l'eccessiva perdita di acqua. Questo fenomeno è legato alla consistenza delle foglie dei germogli sviluppatasi *in vitro* che sono sottili, con scarsa formazione del mesofillo e con il tessuto a palizzata che presenta grandi spazi intercellulari. Presentano anche poche cere epicuticolari poiché all'interno del contenitore esiste una elevata umidità relativa. Gli stomi sono caratterizzati da una scarsa funzionalità. Da qui se le piante *in vitro* vengono trasferite direttamente nelle normali condizioni ambientali queste perdono rapidamente acqua e l'attecchimento non avviene (Sutter e Langhans, 1979; 1980).

Per favorire il graduale aumento dello spessore del mesofillo e la riduzione degli spazi intercellulari e quindi evitare stress di trapianto, la pianta va inizialmente mantenuta in condizioni il più possibile vicine a quelle della camera climatica, dove vengono allevate le piante micropropagate. In alcune specie le radici formate su substrato contenente agar non presentano un capillizio radicale e muoiono dopo il trapianto e se ne sviluppano altre *ex novo* che assicurano la sopravvivenza della pianta.

Se la radicazione è avvenuta in un substrato agarizzato, le piantine vanno sciacquate in acqua per eliminare residui del mezzo di coltura che favorirebbe lo sviluppo di batteri e funghi patogeni. In alcune specie vegetali allevate *in vitro* la fase 3 si può saltare ed i germogli che si sono sviluppati possono direttamente radicare ed indurire assoggettandole alle condizioni ambientali.

2.10 I SISTEMI AD IMMERSIONE TEMPORANEA

La micropropagazione anche se offre molteplici vantaggi rispetto alle tecniche convenzionali di propagazione vegetativa presenta un principale svantaggio che è relativo ai costi di esecuzione.

Le tecniche attuali richiedono un gran numero di piccoli contenitori e di substrati solidi in quanto le piante sono periodicamente trasferite in substrati freschi (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 rappresenta 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 acclimatamento (Kitto, 1997). I progressi nell'automazione della coltura tissutale dipendono dall'uso di colture in substrato liquido in bioreattori, che potrebbero consentire la proliferazione veloce, il taglio meccanico, la separazione e la dispensazione automatica.

Una delle metodologie per cercare di limitare i costi della micropropagazione può essere rappresentata dall'utilizzo di 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 semisolidi i contenitori utilizzati per la coltivazione in mezzo liquido sono molto più grandi e questo consente di ridurre sia il tempo che il numero di trasferimenti.

I vantaggi della coltura *in vitro* su mezzo liquido sono spesso accompagnati da problemi quali la possibilità di anossia, iperidricità del materiale vegetale, attrezzature complesse, 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. Essi hanno progettato un apparecchio noto come "auxophyton" formato da una ruota ove si mettono i contenitori di coltura, questa ruota girando permette alla coltura di essere immersa nel mezzo liquido per un determinato periodo di tempo prestabilito.

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 che si vuole raggiungere con l'impiego di 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 ed in alcuni casi 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).

Nel caso dei sistemi meccanici possono essere utilizzati dispositivi quali quelli descritti da Harrison e Maene (1983): il primo è un dispositivo inclina beute Erlenmeyers, ad inclinazioni opposte con angolo di inclinazione di 30 gradi, nel quale è possibile collocare 400 beute da 50 ml oppure 320 da 125 ml; il dispositivo Rocker (Figura 8), è invece composto da una piattaforma a bilanciere dove si collocano delle vaschette ad apertura ampia; queste sono in policarbonato autoclavabile con un coperchio che garantisce ermeticità. Una volta azionato, il dispositivo inclinandosi dal lato dove è presente la coltura, ne permette il contatto col substrato. Entrambi permettono un'immersione totale del materiale vegetale.

Un sistema che garantisce un'immersione parziale degli inoculi è quello in cui si utilizzano dei bioreattori che presentano alla base un sistema di supporto (agar, cuscinetto in polipropilene, tappi di cellulosa) del tessuto vegetale. Il substrato liquido viene immesso di frequente e poi viene scaricato in un contenitore, questo permette al supporto di assorbirlo. In questo sistema solo la base del materiale vegetale viene immersa (Aitken – Christie e Davies, 1988).

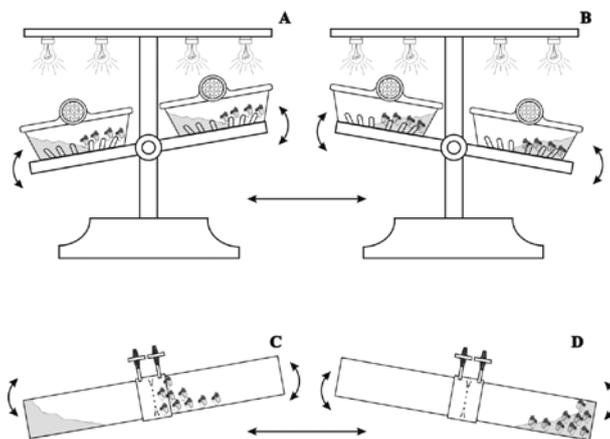


Figura 8 Schema di funzionamento della macchina Rocker (Georgiev et al., 2014)

Un'altra tipologia è stata descritta da Simonton *et al.* nel 1991: il sistema è caratterizzato da una pompa controllata da un software che permette di regolare la frequenza ed il tempo di immersione. Il materiale vegetale è supportato da un cuscinetto in polipropilene fissato all'interno del bioreattore.

Tra i sistemi ad immersione totale per via pneumatica distinguiamo: BIT[®] (Escalona *et al.*, 1999), RITA[®] (Alvard *et al.*, 1993), ed il sistema descritto da Paek *et al.* (2001) BTBB (balloon type).

BIT[®], Temporary Immersion Bioreactor (Figura 9) è costituito da un contenitore per la crescita delle piante e da un serbatoio dove viene posto il substrato liquido. Quando un'elettrovalvola viene aperta l'aria compressa viene immessa nel sistema spostando il substrato dal serbatoio al contenitore ove è posto il materiale vegetale; si attua il processo inverso per riportare il substrato alla posizione di origine.

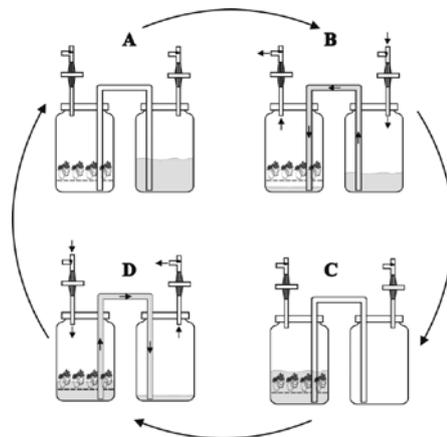


Figura 9 Rappresentazione funzionamento sistema BIT o Twin Flask system (Georgiev *et al.*, 2014).

RITA[®], Recipient for Automated Temporary Immersion system (Alvard *et al.*, 1993) (Figura 10) 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.

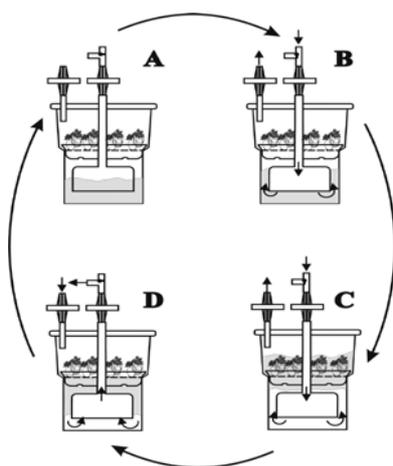


Figura 10 Funzionamento sistema RITA® (Georgiev et al., 2014).

BIB®, Bioreactor of Immersion by Bubbles, sviluppato da Soccol *et al.* (2008) (Figura 11) 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.

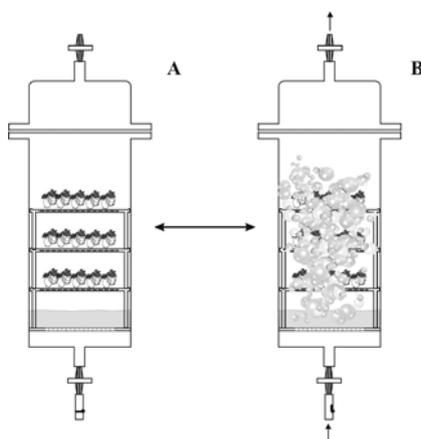


Figura 11 Schema di funzionamento sistema BIB® (Georgiev et al., 2014).

Come è noto uno dei principali ostacoli della micropropagazione convenzionale è la perdita di materiale vegetale durante la fase di acclimatazione.

Ad oggi il sistema ad immersione temporanea è sempre più utilizzato all'interno dei laboratori di ricerca ma anche nei laboratori commerciali. I sistemi più frequentemente rilevati sono RITA® e BIT® ed i molteplici studi condotti su entrambi i

sistemi hanno avuto lo scopo di mettere in atto dei protocolli di propagazione che permettano di ridurre tutte le problematiche legate all'utilizzo di tali sistemi. Tale tecnica potrebbe essere proposta per la propagazione di piante a rischio di estinzione o per quelle piante che stanno subendo una forte erosione genetica a causa della continua selezione fatta dall'uomo.

2.10.1 Stato dell'arte dei Sistemi ad 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 Plant Form® (Figura 12) per la micropropagazione di *Rubus idaeus* (lampone), *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 agar, viceversa per *Rubus* il peso secco ottenuto era uguale in tutte e tre le specie per i due sistemi utilizzati.

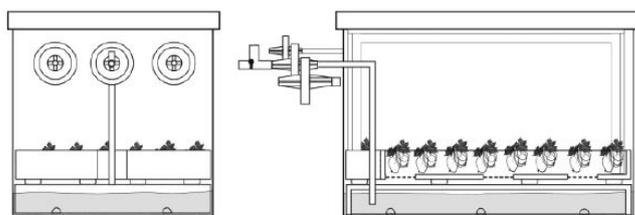


Figura 12 Bioreattori Plant form (Georgiev et al., 2014).

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 nel sistema ad immersione temporanea si è notato la riduzione del callo (3,31 mm) rispetto al sistema che utilizza l'agar (6,3 mm) ed al substrato liquido (6,7 mm). 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. Il tasso di moltiplicazione era simile al precedente sia per il substrato solido che per il TIS, la differenza sostanziale in quest'ultimo è stata la mancanza di espianti iperidrici e il maggiore contenuto in fruttosio, clorofilla e carotenoidi.

McAlister e collaboratori (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 in precedenza 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.

2.11 LA MICROPROPAGAZIONE IN *OPUNTIA* SPP.

In letteratura esistono numerosi riferimenti alla micropropagazione in *Opuntia* spp. che possono essere riconducibili a diverse metodologie (rev. in Lema-Rumińska e Kulus, 2014):

- Micropropagazione da gemme ascellari;
- Micropropagazione da germogli avventizi;
- Embriogenesi somatica.

La composizione del substrato è uno degli aspetti più importanti della micropropagazione. Tipicamente nel substrato troviamo sali MS (Murashige e Skoog – basal medium) e ormoni soprattutto citochinine come BA (benziladenina), allo scopo di favorire la proliferazione cellulare e lo sviluppo di germogli.

Estrada-Luna *et al.* (2008) hanno messo a punto un protocollo di micropropagazione per *Opuntia lanigera* Salm–Dyck. Hanno ottenuto un maggiore tasso di moltiplicazione quando gli espianti erano posti in verticale (4,975 germogli per espianto) rispetto a quando erano posti in orizzontale (3,692 per espianto). L'aggiunta di citochinine BA (benziladenina) nel substrato ha permesso di aumentare il numero di germogli prodotti (8 per espianto) rispetto ad altre citochinine come K (6 – furfurylaminopurina) e DAP [6-(γ , γ dimetilaminopurina)] che hanno permesso di ottenere in media 2 germogli per espianto. Con tale protocollo gli autori affermano sia possibile ottenere dopo 12 mesi circa 12.500 plantule sane.

García-Saucedo e collaboratori (2004) hanno avviato un ciclo di micropropagazione utilizzando come espianti piccoli cladodi di 3 genotipi di *Opuntia* spp. coltivati in substrato contenente MS e GA₃. I germogli ottenuti sono stati usati come espianti immessi in substrato contenente diverse concentrazioni di BA al fine di favorire la proliferazione dei germogli, i migliori risultati sono stati ottenuti nel substrato contenente 0,5 μ M di BA. Inoltre si è notata una maggiore radicazione delle piante che sono state trasferite su substrato contenente IBA (acido indol-3-butirrico), queste hanno presentato una migliore adattabilità in fase di acclimatemento.

In Marocco è stato messo a punto un protocollo di propagazione di 3 cultivar marocchine di *Opuntia* spp. importanti al fine di aumentare la produzione del materiale di moltiplicazione (El Finti *et al.*, 2013). Gli espianti ottenuti da giovani cladodi sono stati messi in substrato MS e 5 mg/l di BA. Le tre cultivar presentavano un notevole tasso di moltiplicazione, la cultivar 'Moussa' è quella che presenta il più alto tasso di moltiplicazione (17,26) seguono la cv 'Aissa' (14,12) e 'Delahia' (12,13). Inoltre è stata valutata la radicazione, gli inoculi messi su substrato contenente MS e 0,5 mg/l di IBA,

hanno mostrato un tasso di radicazione compreso tra il 95 e 100% delle piante radicate e la cultivar 'Delahia' ha raggiunto il più alto tasso (19,1). Tutte le piante ottenute hanno risposto ottimamente in serra durante l'acclimatamento.

Angulo-Bejarano e Paredes-Lopez (2011) hanno affrontato uno studio di propagazione per organogenesi indiretta di *Opuntia ficus-indica* Mill. var "Blanco sin Espinas". Gli espianti di 1 cm di lunghezza sono stati messi in substrato MS integrato con 20 concentrazioni diverse di 2,4-D (acido diclorofenossiacetico) e BA. I migliori risultati in termini di stabilizzazione di calli è stata nei substrati contenenti 2,26 μM di 2,4-D e 2,21 μM di BA. Mentre l'allungamento e la radicazione dei germogli è stata ottenuta su substrato contenente solo MS. Non sono state notate differenze morfologiche tra le piantine prodotte e la pianta madre.

Altri studi effettuati su *Opuntia* ed inerenti alla micropropagazione hanno avuto lo scopo di comprendere la capacità di alcune specie di resistere alle diverse condizioni presenti nella fase di acclimatazione e la rispondenza della pianta alle successive condizioni presenti in campo con particolare riferimento alla resistenza al freddo. Uno studio eseguito da Juárez *et al.* (2002) ha riguardato la propagazione massiva di *Opuntia ellisiana in vitro* ed il successivo acclimatamento. Gli espianti sono stati messi in substrato MS con diverse concentrazioni e combinazioni di BAP e IBA, temperatura di 27 ± 2 °C e 16 ore di fotoperiodo. La combinazione di BAP e IBA o zeatina e NAA (Clayton *et al.*, 1990) sono state utili per stimolare l'attivazione dell'areola. Il prodotto di questa fase è stato fatto radicare attraverso diverse concentrazioni di auxine presenti nel substrato, il 100% di piantine radicate sono state ottenute sul substrato 5 mg l⁻¹ di IBA dopo 12 giorni. Tutte le piantine sono sopravvissute alla fase di acclimatazione dimostrando che la specie in questione si adatta a queste tecniche di micropropagazione e può essere facilmente acclimatata in serra. È stato notato sempre in *Opuntia ellisiana* che una quantità eccessiva di ormoni può disturbare lo sviluppo del germoglio portando a problemi fisiologici di cui il principale in queste piante è l'iperidricità (vitrescenza) o ritardi nella fase di radicazione (Quiala *et al.*, 2009). Il problema della vitrescenza spesso è legato agli alti livelli di carbonio (derivanti ad esempio dal saccarosio), ciò porta in alcuni casi ad inibire lo sviluppo della pianta come in *Nopalea cochenillifera* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2012).

Considerando la possibilità di avviare un ciclo di micropropagazione per la coltura in questione a partire da embriogenesi somatica alcuni autori hanno sviluppato degli studi su questa metodologia al fine di mettere in evidenza il funzionamento di tale tecnica nei confronti di *Opuntia* spp. Da Costa *et al.* (2001) hanno ottenuto strutture

globulari da isolati di *Opuntia ficus-indica in vitro* con un substrato composto da 0,45 μM di 2,4-D con aggiunta di kinetina. Questo indica che la stabilizzazione allo sviluppo di embrioni somatici è legato ad uno stress delle cellule poste in coltura, è noto che è il 2,4-D ad indurre allo stress i geni (Das, 2010). Oltre al 2,4-D, l'aggiunta di picloram (16.6 μM) nel substrato con MS determina una significativa rigenerazione di embrioni somatici in *Opuntia ficus-indica in vitro* (Gomes *et al.*, 2006). I regolatori di crescita, non sono l'unico fattore che induce embriogenesi somatica nelle *Cactaceae*. Infatti, il taglio dell'espianto con il bisturi lungo l'asse longitudinale può indurre questo processo (come una risposta allo stress) senza l'impiego di regolatori della crescita (Lema-Rumińska e Kulus 2012). La produzione di embrioni somatici inoltre è dipendente anche dalle condizioni fotoperiodiche utilizzate durante le fasi di allevamento. Gomes *et al.* (2006) hanno ottenuto buoni risultati nella rigenerazione di embrioni somatici con *Opuntia ficus-indica* al buio, mentre gli espanti sottoposti a 16 ore di fotoperiodo non hanno sviluppato embrioni.

La micropropagazione pur risultando una tecnica vantaggiosa dal punto di vista del numero di piante riproducibili in poco tempo e in ridotto spazio, per le specie e varietà oggetto di studio presenta degli inconvenienti.

I meristemi sono localizzati in areole che spesso risultano suscettibili agli agenti disinfettanti (etanolo, ipoclorito di sodio). Particolare difficoltà impongono quelle varietà che possiedono spine lignificate che complicano la sterilizzazione, in quanto in questi spazi possono insediarsi microrganismi indesiderati. Le spine vanno rimosse con cautela perché si rischia di danneggiare il tessuto meristemato che è posto subito al di sotto (Gratton e Fay, 1999). Le piante appartenenti a questa famiglia producono grandi quantità di auxine che spesso inducono alla formazione del callo che potrebbe limitare la micropropagazione (Clayton *et al.*, 1990). La secrezione di composti fenolici e l'ossidazione causano la necrosi degli espanti costituendo un grosso problema (Vidican, 2012). Tutto ciò si può superare attraverso l'aggiunta nel substrato di sostanze antiossidanti come tocoferolo e latte di cocco. Alcuni autori hanno evidenziato che l'eccessiva umidità presente durante la fase di allevamento *in vitro* non permette alla pianta di acquisire il meccanismo di chiusura degli stomi che rimangono aperti, tale meccanismo verrà acquisito durante la fase di acclimatazione (Cerna *et al.*, 2002).

Una problematica che si viene a presentare spesso durante la coltivazione *in vitro* delle piante afferenti al genere *Opuntia* è l'iperidricità. Germogli di cactus ottenuti da colture di tessuti possono diventare iperidrici, mostrando un aspetto vetrificato e un numero ridotto di spine e/o radici; i tessuti si presentano ricchi di acqua (Balén *et al.*

2012). Studi ultrastrutturali di germogli iperidrici hanno fatto rivelare cambiamenti nei plastidi: de-differenziazione secondaria di cloroplasti maturi, gonfiore tilacoidale e la rottura, aumento delle dimensioni del plastidio, così come il cambiamento dei livelli di clorofilla, carotenoidi e l'attività enzimatica, riduzione dell'efficienza fotosintetica (Balen *et al.*, 2012).

Questo problema può essere risolto in diversi modi: introduzione di inibitori delle gibberelline (es. paclobutrazol), aumento della concentrazione dell'agente gelificante, ciò permette di ridurre la quantità di acqua disponibile (García-Osuna *et al.*, 2011).

Considerato quanto detto in precedenza il successo del protocollo di micropropagazione per le *Cactaceae* dipende non solo dal tipo di espianto e dagli ormoni usati, ma anche dalle condizioni di allevamento della pianta donatrice degli espianti.

Tra le tecniche di micropropagazione in precedenza enunciate per le *Cactaceae*, la micropropagazione da gemme ascellari è quella che presenta il livello di stabilità genetica più alto, dunque si presta meglio ad essere utilizzata nell'ambito commerciale. Tale tecnica, impiegata insieme ad altre innovazioni tecnologiche del medesimo settore, che permettono di automatizzare il processo di produzione, permetterebbe di produrre un elevato numero di cloni a basso costo.

3 SCOPI

Negli ultimi anni sta crescendo l'interesse verso le specie e le varietà di *Opuntia* con una destinazione d'uso (la produzione di biomassa) diversa a quella che ormai da secoli è ampiamente diffusa nei nostri areali riguardante la produzione del frutto per il consumo umano.

Nell'ambito dell'attività di ricerca della presente tesi di dottorato al fine di implementare il panorama varietale della collezione già presente presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania con genotipi con elevata attitudine alla produzione di biomassa, sono stati presi accordi con l'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”-(IPA) di Recife (Brasile), istituzione che ha selezionato varietà utilizzate a tale scopo nelle zone di origine. Date le pochissime informazioni sulla loro identità genetica, uno dei primi obiettivi del presente lavoro è stato quello di caratterizzare queste varietà dal punto di vista molecolare con marcatori SSR.

Una ulteriore parte dell'attività di ricerca è stata finalizzata alla definizione di protocolli di propagazione *in vitro* di alcune varietà appartenenti al genere *Opuntia*, attraverso l'utilizzo di tecnologie innovative che fanno riferimento ai sistemi ad immersione temporanea. I modelli di impianto destinati alla produzione di biomassa esigono elevate quantità di materiale vegetale altamente rispondente sia dal punto di vista varietale che in termini di caratteristiche fitosanitarie. 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. Obiettivo principale dell'attività, quindi, è stato quello di elaborare ed ottimizzare protocolli di micropropagazione ad elevata efficienza sfruttando i sistemi ad immersione temporanea e di validarli su varietà di interesse.

4 MATERIALI E METODI

4.1 INTRODUZIONE DELLE NUOVE VARIETÀ

Allo scopo di poter valutare in ambiente mediterraneo varietà di *Opuntia* e di generi affini già selezionate in altri ambienti per la produzione di biomassa (Garcia de Cortazar e Nobel, 1992; Akanni *et al.*, 2014), si è provveduto ad implementare la collezione già presente presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania. A tale fine, dopo una serie di contatti preliminari è stato stipulato un accordo con l'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) di Recife (Brasile) per l'introduzione di materiale selezionato (23 genotipi). Il nuovo materiale introdotto è caratterizzato dall'aver una destinazione d'uso volta principalmente alla produzione di biomassa come descritto in Tabella 2.

Il materiale vegetale introdotto, costituito da più cladodi per accessione (Figura 13), è giunto in Italia nel mese di ottobre 2014 ed è stato posto a radicare in vasi, previa una parziale disidratazione del cladodo per circa 30 giorni per evitare l'insorgenza di marciumi. Il substrato utilizzato per la radicazione era costituito in egual parte da torba e terra; i cladodi posti in vaso sono stati mantenuti a 2 diverse condizioni: alle normali condizioni ambientali e alla temperatura di 30 °C al fine di esercitare una forzatura per l'ottenimento di nuovi germogli da destinare sia all'analisi molecolare sia alla micropropagazione.



Figura 13 Cladodi introdotti dal Brasile in fase di disidratazione

ID accessione	Varietà	Probabile specie di riferimento	Figura	Principali indicazioni disponibili ¹
IPA-200016	Orelha de elefante Mexicana	<i>Opuntia stricta</i> Haw		<p>Alta produttività, poche e piccole spine, lenta crescita iniziale, resistente a cocciniglia del carminio, e suscettibile a <i>Diaspis cacti</i>. Cladodi larghi, spessi e di colore verde scuro e molto cerosi. È un clone importato dal Messico ed è meno esigente in fertilità del suolo ma possiede una grande quantità di spine, il che può comprometterne l'appetibilità e il suo uso come pianta foraggera. Prima di essere somministrata agli animali, le spine vengono eliminate mediante bruciatura. La pianta è di medie dimensioni, i cladodi sono di forma ovoidale, di colore verde-grigio, e i bordi del cladodo sono ondulati. Nel primo anno, riesce a produrre una media di 15 cladodi per pianta e il loro peso è variabile compreso tra 0,8 e 1,5 kg. La lunghezza del cladodo è di circa 20 cm e la larghezza è di 15 cm. La chioma raggiunge altezze in media di 80 cm e una larghezza media di 90 cm.</p>
IPA-200174	Orelha de elefante Africana	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths		Resistente a cocciniglia del carminio

IPA-200205	IPA-Sertânia	<i>Nopalea cocheninifera</i> Salm Dyck		Resistente alla cocciniglia del carminio ma è suscettibile a <i>Diaspis cacti</i> . È una mutazione di Palma Miuda. Ha un portamento eretto ma molto basso, i cladodi sono molto spessi e sono di colore verde-giallastro e sono ondulati margini. Produttiva.
IPA-200206	Orelha de onça	<i>O. ficus-indica</i> Mill.		I cladodi pesano all'incirca 1,8 kg con il vantaggio di essere resistenti alla siccità ma è suscettibile alla cocciniglia del carminio.
IPA-100001	Gigante	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		È chiamata anche palma grauda, acida o santa. Resistente al freddo, rapido accrescimento, suscettibile a <i>Dactylopius coccus</i> , coltivata in zone aride e in suoli poveri, portamento ben sviluppato, cladodi di forma ovale-ellittica, di colore verde opaco/scuro. Senza spine. Caule poco ramificato con accrescimento verticale. L'altezza della chioma è compresa tra i 3-5 metri. La larghezza del fusto può arrivare a 60-150 cm. Il cladodo può pesare fino a 1,8 kg, la sua lunghezza può arrivare a 50 cm. Il frutto è una bacca ovoidale, grande, di colore giallo che vira al rosso quando matura. Produttiva ed è più resistente a stagioni secche. Ha minore valore nutrizionale ed è meno appetibile.

IPA-100003	Clone IPA-20	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		Ottenuta per incrocio seguito da selezione. Molto produttiva.
IPA-200008	Palma F8	<i>Opuntia atropes</i>		
-	Mao de Moça	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm Dyck		Clone di Ipa Sertania. Produttiva, ricca in zuccheri, inerme ed è tollerante a <i>Dactylopius coccus</i>
IPA-100002	Palma Redonda	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		Inerme, accrescimento rapido. Si è originata da Palma Gigante. Portamento medio e molto ramificato pregiudicando lo sviluppo verticale. Il cladodo può pesare 1,8 kg con 40 cm di lunghezza di forma arrotondata ed è resistente alla siccità.

IPA-200001	Copena F1	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		<p>Pianta vigorosa con accrescimento eretto e cladodi ovali ed inermi. I frutti sono ovali e sono raccolti in Giugno. È una varietà da foraggio ma anche i frutti sono appetibili.</p>
IPA-200002	Copena V1	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		<p>Pianta vigorosa con accrescimento eretto e cladodi ovali ed inermi. I frutti sono ellittici e tipicamente vengono raccolti in agosto. È coltivata principalmente per l'ottenimento di verdura, ma anche i frutti sono appetibili.</p>
IPA-100407	IPA-90-18	-		<p>Selezione dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”-(IPA) di Recife (Brasile).</p>

IPA-100410	IPA-90-92	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm Dyck		Selezione dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) di Recife (Brasile).
-	México vegetable 1294	-		
IPA-200175	Additional cv. 1258	-		

IPA-200177	México Fodder/1278	<i>N. cochenillifera</i> Salm Dyck		
IPA-100414	IPA 90-156	-		Selezione dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) di Recife (Brasile).
IPA-200173	Marmillon Fodder-1327	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		

IPA-100413	IPA 90-115	-		Selezione dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) di Recife (Brasile).
IPA-100408	IPA 90-73	-		Selezione dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) di Recife (Brasile).
IPA-100412	IPA 90-111	-		Selezione dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco”–(IPA) di Recife (Brasile).

IPA-200146	V-19	-		
IPA-200023	Jalpa	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill		

Tabella 2 Descrizione delle varietà introdotte dal Brasile (Dos Santos et al., 2011; Candido et al., 2013; AA.VV., 2013; Lira et al., 2006)

4.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE CON MARCATORI MICROSATELLITI

Allo scopo di pervenire ad una univoca identificazione del materiale introdotto, è stato deciso di procedere alla caratterizzazione molecolare (fingerprinting) delle diverse accessioni. Sulla scorta di diverse esperienze già condotte anche presso il Di3A, i marcatori molecolari individuati per tale attività sono stati i marcatori SSR (Caruso *et al.*, 2010). Di seguito viene descritto il protocollo utilizzato per tale analisi.

4.2.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale sottoposto ad analisi era costituito dai genotipi brasiliani di cui alla Tabella 2, nonché da alcune accessioni, inserite come riferimento, appartenenti a diverse specie di *Opuntia* e prelevate dalla collezione del campo dell'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania. In particolare le specie inserite come riferimento sono le seguenti:

- *O. oligacantha* (C. F. Förs);
- *O. streptacantha* (Lem);
- *O. elizondoana* (E. Sánchez M. & J.L. Villaseñor);
- *O. spinulifera* (Salm-Dyck);
- *O. vulgaris* (Mill);
- *O. joconostle* (Web);
- *O. stricta* (Haw);
- *O. cochenillifera* [(L.) Mill];
- *O. robusta* (J.C. Wendl.);
- *O. ficus-indica* (Mill) (4 accessioni).

4.2.2 Estrazione del DNA

Per l'ottenimento del DNA da sottoporre ad analisi, è stato utilizzato il kit di estrazione ISOLATE Plant DNA Mini Kit (Bioline, Londra, UK). Il relativo protocollo di estrazione si basa sulla proprietà che hanno gli acidi nucleici di legarsi ad una matrice silicea in presenza di sali caotropici, composti organici che possiedono la capacità di rompere i legami idrofobici o idrogeno di acidi nucleici e proteine e conseguentemente denaturarli. Dopo avere lavato la matrice silicea, gli acidi nucleici vengono eluiti in tamponi a basso contenuto di sali e sono pronti per le successive reazioni (clonaggio, digestione con enzimi di restrizione, blotting, sequenziamento manuale ed automatico, amplificazione, ecc.). Il materiale vegetale utilizzato per l'estrazione del DNA era costituito da circa 0,1 g di tessuto isolato da giovani foglie o germogli di nuova formazione (Figura 14 A) dai quali veniva prelevata la parte più esterna e scartata la

parte più interna (parenchima) ricca di mucillagini. Il materiale è stato posto in tubi eppendorf da 1,5 ml; dopo aver aggiunto 350 μ l di Lysis Buffer PA2 ed avere posto una sferetta di metallo all'interno della provetta, il materiale è stato omogeneizzato con il TissueLyser (Qiagen) per 1,5 minuti con frequenza 30 oscillazioni al secondo ed successivamente incubato a 65 °C per circa 15 minuti (Figura 14 B).

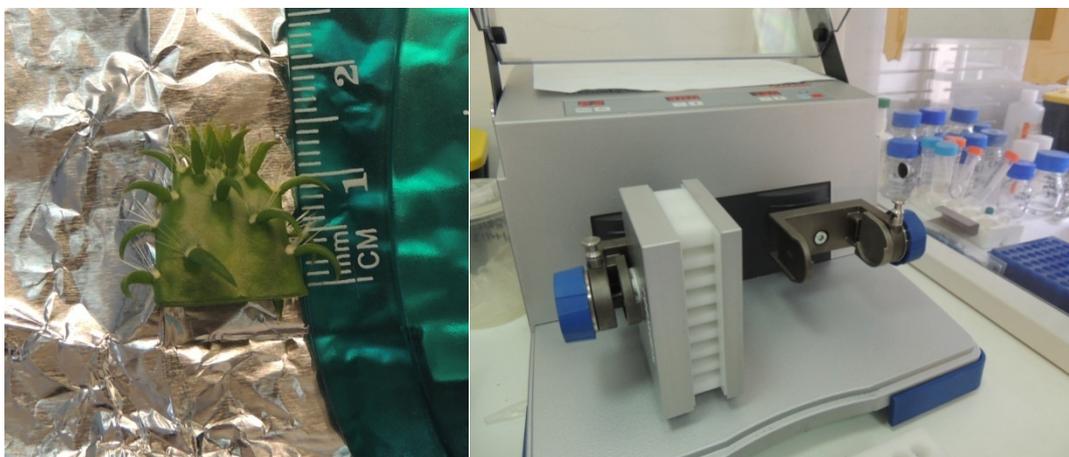


Figura 14 A: Particolare di germoglio ottenuto in seguito a forzatura a 30°C e utilizzato per l'estrazione del DNA. B: TissueLyser (Qiagen)

Successivamente all'incubazione, sono stati aggiunti 75 μ l di Precipitation Buffer; i campioni sono stati, quindi, posti su vortex per 5 secondi e incubati in ghiaccio per 5 minuti; la fase liquida è stata recuperata e trasferita nella colonnina filtro ISOLATE II (viola) posizionata all'interno di un tubo da 2 ml e centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto. Eliminata la colonnina, l'eluato è stato trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml ed addizionato di 450 μ l di Binding Buffer PD, mescolato accuratamente, trasferito nella Spin Column ISOLATE II e centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto. Posizionata la Spin Column ISOLATE II in un nuovo tubo, sono stati aggiunti 400 μ l di Wash Buffer PAW1 e il tutto è stato centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto. Il filtrato è stato eliminato, ed alla colonna sono stati aggiunti 700 μ l di Wash Buffer PAW2. Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 1 minuto, sono stati aggiunti 200 μ l di Wash Buffer PAW2 per l'ultimo lavaggio ed il campione è stato centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto. Posta la Spin Column ISOLATE II in un nuovo tubo da 1,5 ml, sono stati versati 50 μ l di elution buffer (pre-riscaldato a 65 °C) direttamente sulla membrana filtrante; dopo un'incubazione per 5 minuti a 65 °C, il tutto è stato centrifugato per 1 minuto ad 8000 rpm per eluire il DNA. La quantità e la qualità del DNA estratto sono state determinate tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific).

4.2.3 Amplificazione

I primer utilizzati (Tabella 3) sono stati scelti conformemente a quelli impiegati con successo in una precedente caratterizzazione genetica della collezione di *Opuntia*

del Di3A (Caruso *et al.*, 2010). In particolare per l'analisi sono stati utilizzati 6 marcatori microsatelliti isolati da Helsen *et al.* (2007) da *O. echios* (Op_3, Op_5, Op_9, Op_11, Op_12, Op_13), e altri 2 EST-SSR (Ops_9 e Ops_24) ottenuti da sequenze espresse di *O. streptacantha* (Caruso *et al.*, 2010). Tutti i primer sono stati sintetizzati dall'Eurofins MGW Operon e al primer forward di ogni coppia è stata aggiunta una coda M13 F (Oetting *et al.*, 1995) per la marcatura con fluorofori Ned, Pet e Fam.

Marcatore	Ripetizione	Prime forward e reverse*
Opuntia3	(AG) ₁₉	F: GTGAGTGCCCAGATGAAACT R: TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG
Opuntia5	(TA) ₅	F: TATGCACAAAGCACCATGC R: CCAACCATACCAACTGTACTGAC
Opuntia9	(AG) ₁₅	F: CTAGGCTTCATCCCACATTAGG R: TCCAAATTCACCTCCTCTGC
Opuntia11	(CT) ₁₃ TT(CT) ₂	F: CCTACACCTGCTGCCAATC R: CGAGACAAACATCAGAGGAG
Opuntia12	(TC) ₄ C(TC) ₁₂	F: TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC R: GGTATCTTGTTATTCGTTTCG
Opuntia13	(AG) ₁₂	F: CCAAATACCCAGCCCATAC R: CGAGAACCTAACTTCCGATG
Ops.9	(TGA) ₉	F: AACTGCCTCACACGAGTTCC R: GCTACGAAATCTGCCGAGTC
Ops.24	(CT) ₂₄	F: TCCTTCCATTTCCACCACAC R: CAAGACCCCTCATTCCAAAG

Tabella 3 Primer utilizzati nell'analisi molecolare

* La sequenza M13F (CACGACGTTGTAAAACGAC) è stata aggiunta all'estremità 5' dei primer forward

Nello specifico, per ogni coppia di primer, sono state effettuate delle amplificazioni di DNA su termociclatori GeneAmp 9700 e 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) utilizzando i seguenti parametri: denaturazione a 95 °C per 12 minuti, 40 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, annealing a 55 °C per 1 minuto, estensione a 72 °C per 1,5 minuti, ed un'estensione finale di 30 minuti a 72 °C. La miscela di reazione per l'amplificazione comprendeva: la coppia di primer specifica: reverse e forward con la coda M13F (0,3 mM), la sequenza complementare a M13F marcata con il fluoroforo (0,13 mM), circa 60 ng di DNA, 0,2 mM dNTPs, 1X PCR buffer II, 2 mM di cloruro di magnesio, 1 unità di DNA polimerasi BioTaq (Bioline) e 8,5 µl di H₂O per un volume totale di reazione pari a 15 µl. Un'aliquota di 1 µl per ogni

campione, previa disidratazione, è stata inviata presso la BMR Genomics (Padova, Italia) per la corsa su sequenziatore capillare.

4.2.4 Elaborazione dei dati

I risultati ottenuti sono stati elaborati con il programma PowerMarker Version 3.25 (Liu e Muse, 2005) usato per generare la matrice di similarità e per costruire gli alberi NJ - neighbor-joining e UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean; è stata realizzata anche l'analisi a rete NeighborNet (Bryant e Moulton, 2004) usando il software SplitsTree version 4.11.3 (Huson e Bryant, 2006) e utilizzando il coefficiente di Dice (1945).

4.3 DEFINIZIONE DI PROTOCOLLI DI MICROPROPAGAZIONE AD ELEVATA EFFICIENZA

Nell'ambito dell'attività di ricerca di cui alla presente tesi di dottorato, è stato individuato come ambito strategico quello della propagazione. Come accennato in precedenza, infatti, sebbene le specie considerate non presentino particolari problemi per quanto riguarda la propagazione, soprattutto agamica, il loro utilizzo ai fini della costituzione di impianti intensivi rende necessaria la disponibilità di materiale di propagazione in elevata quantità e con le indispensabili caratteristiche qualitative in termini di rispondenza varietale e di requisiti sanitari. In virtù di quanto sopra, e considerate le sinora esigue evidenze scientifiche in merito alla possibilità di rendere efficiente il sistema di propagazione per le specie di *Opuntia* e di altri generi affini, nell'ambito della presente tesi ci si è prefissi l'obiettivo di definire protocolli di micropropagazione efficienti in termini di caratteristiche qualitative del materiale ottenuto ma anche sostenibili dal punto di vista economico.

Nelle prove fatte nell'ambito del presente elaborato in particolare sono stati utilizzati sistemi ad immersione temporanea della tipologia Plant Form e la ricerca si è articolata in 2 fasi riguardanti rispettivamente la definizione del protocollo di micropropagazione attraverso sistemi ad immersione temporanea, utilizzando una varietà modello e la Validazione del protocollo di micropropagazione in sistemi TIS sulle varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana.

Tutte le operazioni relative alla coltura *in vitro* sono state eseguite in ambiente sterile avvalendosi di una cappa a flusso laminare orizzontale (Figura 15 A); i substrati, i bioreattori e la strumentazione di laboratorio sono stati sterilizzati in autoclave (Figura 15 B) con un ciclo di sterilizzazione di 20 minuti ad una temperatura di 121 °C e alla pressione di 1 bar.

Tutte le fasi di coltura sono state effettuate all'interno di una camera climatica (Figura 15 C), dove le condizioni microclimatiche erano le seguenti: fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, intensità luminosa di 100 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, temperatura 25 °C \pm 1 °C.



Figura 15 A: cappa a flusso laminare utilizzata durante la sperimentazione; B: Autoclave usata per la sterilizzazione delle attrezzature; C: interno della camera climatica.

Nel corso del presente lavoro di tesi la coltura *in vitro* su substrato solido è stata effettuata per le fasi di decontaminazione e stabilizzazione come descritto in appresso, nonché per la fase di moltiplicazione con la coltura mediante TIS per valutare i vantaggi che è possibile ottenere intermini di efficienza e di economicità del sistema. Le prove hanno riguardato le varietà ARL, Gigante e Orelha de elefante mexicana e sono state effettuate con diversi substrati descritti successivamente, all'interno di contenitori Ecobox 2.

4.3.1 Materiali utilizzati

Di seguito vengono descritti i materiali utilizzati nel corso della sperimentazione relativi sia alla micropropagazione convenzionale (substrato solido) che ai sistemi ad immersione temporanea.

Contenitori per la micropropagazione convenzionale

I substrati solidi utilizzati nel presente lavoro sono stati aliquotati in due diversi contenitori:

- Scatole Petri sterili, utilizzate in fase di stabilizzazione, aventi le seguenti caratteristiche:
 - Materiale: Polistirene trattato TC (PS);
 - Altezza: 15 mm;
 - Diametro: 90 mm.
- Ecobox 2 Duchefa Biochemie, utilizzate sia in fase di stabilizzazione che in fase di moltiplicazione (micropropagazione convenzionale), aventi i seguenti requisiti:
 - Materiale: crystal-clear polypropylene;
 - Altezza: 80mm;
 - Base: 125x65 mm;
 - Dimensioni del coperchio: 150x90 mm;
 - Filtro: white-filter (L).

Substrati

I substrati utilizzati nelle fasi di micropropagazione che hanno sfruttato i substrati solidificati sono stati organizzati nella Tabella 4:

SUBSTRATI	OP1-S	OP2-S	OP3-S	OP4-S	OP5-S	OP6-S	OP7-S
<i>Sali minerali Murashige & Skoog (g/l)</i>	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
<i>Saccarosio (g/l)</i>	30	30	30	30	30	30	30
<i>Mioinositolo (mg/l)</i>	100	-	-	-	-	-	-
<i>Acido Nicotinico (mg/l)</i>	0,5	-	-	-	-	-	-
<i>Piridossina -HCL (mg/l)</i>	0,5	-	-	-	-	-	-
<i>Tiamina -HCL (mg/l)</i>	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Glicina (mg/l)</i>	2	-	-	-	-	-	-
<i>BAP (Mg/L)</i>	2,5	5	0,25	1	2	3	-
<i>IBA (mg/l)</i>	2	-	-	-	-	-	-
<i>Fosfato Monosodico (mg/l)</i>	-	50	-	-	-	-	-
<i>Adenina (mg/l)</i>	-	40	-	-	-	-	-
<i>Kinetina</i>	-	-	-	-	-	-	0,5
<i>Gelrite</i>	5	5	5	5	5	5	5

Tabella 4 Composizione dei substrati solidi utilizzati nella sperimentazione

Per il sistema ad immersione temporanea sono stati utilizzati substrati liquidi, le composizioni sono state elencate in Tabella 5.

SUBSTRATI	OP1-L	OP2-L	OP2-L1	OP2-L2	OP2-L3	OP3-L	OP3-L1	OP3-L2	OP3-L3	OP8-L
<i>Sali minerali Murashige & Skoog (g/l)</i>	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
<i>Saccarosio (g/l)</i>	30	30	5	10	20	30	5	10	20	30
<i>Mioinositolo (mg/l)</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acido Nicotinico (mg/l)</i>	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Piridossina -HCL (mg/l)</i>	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tiamina -HCL (mg/l)</i>	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glicina (mg/l)</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>BAP (Mg/L)</i>	2,5	5	5	5	5	0,25	0,25	0,25	0,25	-
<i>IBA (mg/l)</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fosfato Monosodico (mg/l)</i>	-	50	50	50	50	-	-	-	-	-
<i>Adenina (mg/l)</i>	-	40	40	40	40	-	-	-	-	-

Tabella 5 Composizioni dei substrati liquidi utilizzati nella sperimentazione

Descrizione del sistema ad immersione temporanea

Nel corso delle diverse fasi della sperimentazione effettuata i bioreattori sono stati gestiti mediante due distinte modalità di controllo. In particolare nella prima modalità è stato previsto il controllo del sistema mediante un software sviluppato *ad hoc* nel corso della sperimentazione e che consente la gestione e il monitoraggio di un elevato numero di bioreattori e di numerosi parametri. La seconda modalità di gestione di bioreattori si basa invece sulle indicazioni fornite dalla ditta fornitrice degli stessi (Plant form) e si caratterizza per assenza di controllo remoto e semplicità di utilizzo.

Descrizione dei bioreattori

In entrambi i sistemi l'unità di base del funzionamento del sistema è costituito dal bioreattore. Nel corso del presente lavoro sono stati presi in considerazione i bioreattori Plant form, composti da diverse parti in policarbonato e polipropilene e totalmente autoclavabili. Presentano un coperchio a chiusura ermetica munito di una guarnizione allo scopo di evitare contaminazioni (Figura 16 A); all'interno è presente un sostegno (Figura 16 B/C) che ha lo scopo di contenere il substrato quando questo non è a contatto con gli espanti e, al contempo, su di esso poggia un supporto forato (Figura 16 D/E) dove vengono disposti gli espanti. Per evitare che il supporto forato galleggi durante le fasi di immersione (e cioè di salita del substrato liquido) è presente un telaio (Figura 16 F/G) che a contatto con il coperchio di chiusura, fissa il supporto al sostegno di fondo. La movimentazione del substrato è regolata dall'afflusso e deflusso di aria nel bioreattore che avviene grazie alla presenza di 3 fori (Figura 16 H) che fungono da canali per il passaggio dell'aria; questi sono collegati a tubi muniti di filtri di 0,22 micron (Figura 16 L/M). 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 espanti. 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 16 N). Nell'ambito della sperimentazione ogni prova è stata condotta su tre distinti bioreattori.



Figura 16 Singole componenti del bioreattore Plant form. A: coperchio a chiusura ermetica; B: sostegno del fondo per contenere il substrato; C: bioreattore con sostegno collegato con opportuna tubazione; D: supporto forato per le colture; E: bioreattore con il supporto inserito all'interno; F: telaio per il fissaggio del supporto forato; G: bioreattore con telaio inserito; H: primo piano dei fori per l'entrata e l'uscita di aria; I: spinotto con guarnizioni che viene inserito nel foro per il collegamento dei tubi e dei filtri; L: tubi e filtri per collegare il bioreattore al sistema pneumatico; M: bioreattore con filtri e tubi collegati; N: bioreattore completo.

Sistema di funzionamento automatizzato

Nella prima fase della sperimentazione, per il funzionamento dei bioreattori ci si è avvalsi di un sistema automatizzato (Figura 17) realizzato in collaborazione con il gruppo di lavoro della Fondazione dryGrow (www.drygrow.org) commissionaria al Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente di alcune prove sulla micropropagazione di *Opuntia*. Il sistema risulta costituito da diverse parti, come di seguito elencato:

1. Compressore (Figura 18 A)
2. Filtri per l'aria compressa (Figura 18 B)
3. Bombola di CO₂ (Figura 18 C)
4. Set di filtri di aria miscelata (Figura 18 D)
5. Unità di miscelazione (Figura 18 E):
 - a. Due elettrovalvole che controllano l'aria e la CO₂
 - b. Regolatore di flusso di massa (MFC)
 - i. 1 Aria
 - ii. 1 CO₂
6. Gruppo della guida del flusso (FGG) (Figura 18 F), comprendente 3 elettrovalvole connesse all'unità di miscelazione e che regolano il ricambio di aria e l'immersione (al set di filtri di aria compressa sono collegati 9 FGG paralleli ognuno dei quali può controllare un gruppo di massimo 50 bioreattori indipendenti);
7. Bioreattori connessi parallelamente al gruppo di valvole.

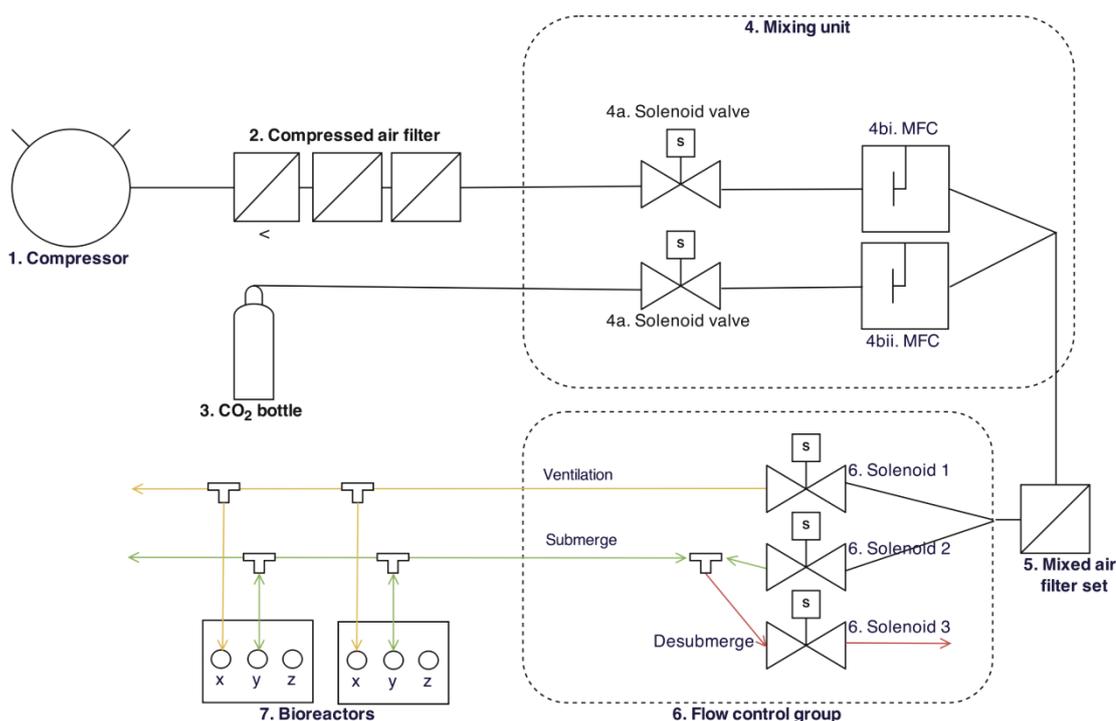


Figura 17 Schema di funzionamento del sistema automatizzato

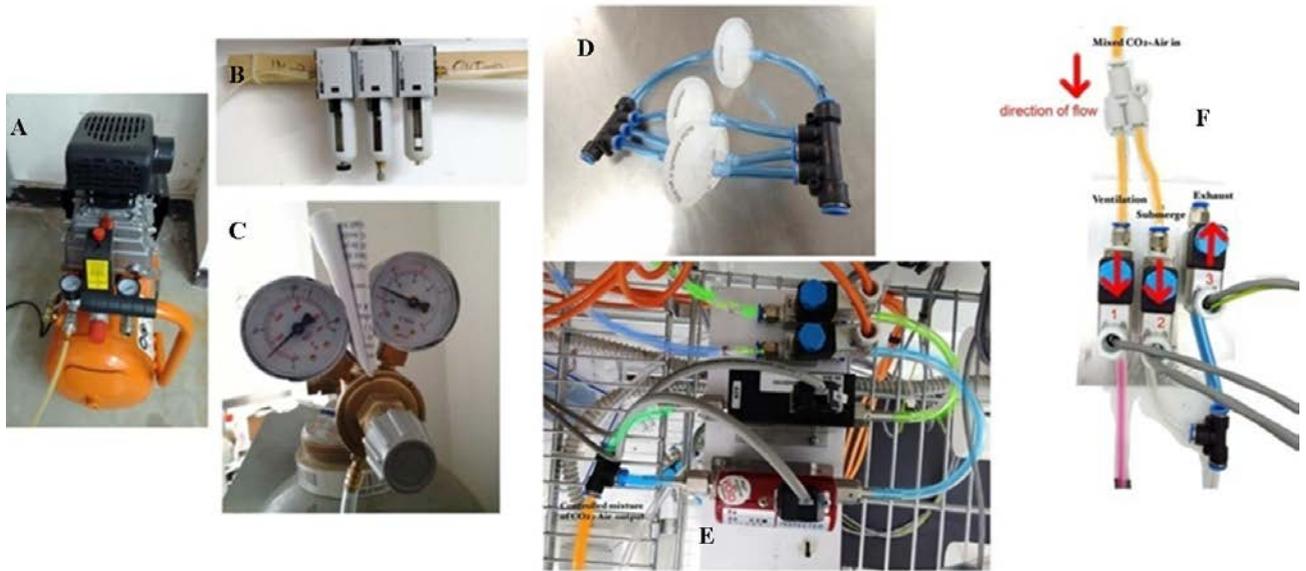


Figura 18 Parti del sistema: A: compressore; B: filtri per l'aria compressa; C: Bombola di CO₂; D: filtri per l'aria miscelata; E: unità di miscelazione; F: gruppo della guida di flusso.



Figura 19 Particolare delle scatole di controllo del sistema

Il sistema è gestito attraverso unità controllate da Arduino Mega 2560, una scheda di controllo collegata alla rete e nella quale il file di settaggio è presente in una scheda micro SD, univoca per ciascuna unità.

Il software utilizzato per la gestione, denominato “Cactus Server”, è un'applicazione web basata sul software open source Tomcat con il server di database Microsoft MSSQL. La comunicazione fra il server e le unità di controllo avviene tramite un semplice protocollo binario TCP / IP. I settaggi vengono definiti con JavaScript e tipicamente prevedono l'avvio del flusso d'aria e l'apertura delle valvole per l'immissione dell'aria all'interno di un gruppo di bioreattori e quindi il livello del substrato all'interno degli stessi. Il sistema prevede inoltre che possa essere introdotta nei bioreattori aria alla sua normale composizione (ventilazione o ricambio di aria), o con concentrazione modificata di anidride carbonica (CO₂); quest'ultima proviene dall'apposito contenitore previsto nel sistema automatizzato e viene miscelata con l'aria introdotta nei bioreattori mediante una apposita unità di miscelazione.

Tutti i parametri modificabili o monitorati (temperatura, CO₂, apertura e chiusura delle valvole) sono gestiti da gruppi di controllo e i relativi valori sono memorizzati per successivi controlli. Se richiesto il software invia una email quando viene registrata un'anomalia. Il controllo del sistema viene effettuato eseguendo il login con username e password su un computer dedicato che permette la visualizzazione dei parametri delle diverse prove.

Nella Figura 20 è mostrata la schermata della pagina del programma attraverso la quale è possibile configurare i parametri della prova che vuole essere impostata su uno dei gruppi (FGG) precedentemente selezionato. Di seguito sono riportate le specifiche delle singole voci di settaggio:

Job Enabled: Attivazione/disattivazione del lavoro corrente.

Job Paused: Quando selezionato, il processo non è eseguito.

State: Indica se l'attività in corso è finalizzata alla produzione o/e una prova.

Group: Indica il gruppo di lavoro al quale la prova è associata.

Job Name: Rappresenta il nome del lavoro.

Cron String: Rappresenta la scheda di schedulazione che deve essere impostata perché il lavoro sia effettuato correttamente.

Job Class: Invia una email quando il lavoro non viene eseguito correttamente.

Parameters: Viene utilizzato per inserire nuovi parametri che vengono gestiti dagli javascript.

Job: Fridge_Cool

Job Enabled	<input type="checkbox"/>
Job Paused	<input type="checkbox"/>
State	production
Group	Fridge
Job Name	Fridge_Cool
Cron String	0 1/15 22,23,0,01,02,03
Job Class	com.voxendal.cactus.job.MailTriggeringJavaScriptJob
Parameters	
scriptSource	FridgeCool.js
<input type="button" value="add"/>	
Note	
Author	<input type="text"/>
Comment	<input type="text"/>
<input type="button" value="save"/> <input type="button" value="reset"/>	

Figura 20 Schermata della pagina del programma "CACTUS SERVER"

Attraverso l'accesso ad altre pagine è possibile ricavare o visionare le informazioni relative ad ulteriori voci di sistema:

Stato lavoro: Quando si entra in questa pagina, la data predefinita è la data corrente. Le prove pianificate sono in programma per il giorno corrente. Se lo sfondo è rosso, il lavoro non è riuscito.

Log: I registri sono ordinati /organizzati a livello di gruppo. Ogni volta che un gruppo viene avviato, verrà creato un nuovo registro per quel gruppo. Una voce senza una "fine" è un gruppo che è in esecuzione.

Statistics: Descrive quante volte i diversi lavori associati al gruppo corrente hanno lavorato. Ogni volta che c'è un cambiamento in un lavoro verrà aggiunto un nuovo controllo.

Temperature: Permette di visualizzare i termometri collegati alle caselle di controllo.

CO₂: Mostra le concentrazioni in ppm della CO₂ misurate da appositi sensori.

Sistema di funzionamento standard

Nella seconda fase della sperimentazione per il funzionamento dei bioreattori si è utilizzato un sistema composto da due pompe pneumatiche HAILEA® ACO 9602 e ACO 9610 (Figura 21 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 micron. 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 21 B) che si apre allorché il substrato deve scendere attraverso la fuoriuscita dell'aria dal sistema. Le pompe e l'elettrovalvola vengono attivate attraverso l'utilizzo di timer (Figura 21 C) che vengono preimpostati con i tempi desiderati in funzione della durata di ciascuna immersione e della loro frequenza giornaliera. A differenza che nel sistema automatizzato, nel sistema di funzionamento standard è preclusa la possibilità di utilizzo della anidride carbonica, mentre è sempre possibile l'immissione di aria alla norma composizione per la ventilazione all'interno dei bioreattori. Il sistema di pompe e timer è progettato per poter gestire contemporaneamente fino ad un massimo di 12 bioreattori.



Figura 21 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.



Figura 22 Sistema Plant form completo.

4.3.2 Definizione del protocollo di micropropagazione attraverso sistemi ad immersione temporanea, utilizzando una varietà modello

Per l'elaborazione del protocollo, il ciclo di micropropagazione mediante TIS è stato articolato come segue:

1. Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti;
2. Stabilizzazione degli espianti;
3. Fase di moltiplicazione;
4. Radicazione dei germogli;
5. Ambientamento delle piante.

Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti

Le varietà di *Opuntia* spp. utilizzate per la definizione degli idonei protocolli sono di origine messicana e siciliana e sono state prelevate dal campo collezione presente presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania. Le varietà selezionate sono inermi, e l'assenza di spine rende più efficace la sterilizzazione in quanto meno tessuto vegetale viene sottoposto a tale procedura più successo avrà questo trattamento di decontaminazione; inoltre l'asportazione delle spine avrebbe potuto danneggiare l'areola sottostante invalidando la successiva fase di stabilizzazione; si è pensato, infine, di redigere un protocollo di micropropagazione per

varietà inermi anche perché rappresentano i genotipi più adatti alla produzione di biomassa per la loro semplice gestione. Tra le varietà messicane sono state utilizzate: Amarilla grande (*Opuntia* spp.), ARL (*Opuntia* spp.), Rosalito (*Opuntia ficus-indica* Mill.); tra quelle siciliane: Bianca trunzara e Inerme (tutti cloni di *O. ficus-indica* Mill.).

Le piante madri, dalle quali deriva il materiale di partenza per l'avvio del ciclo di propagazione, sono state allevate in pieno campo e selezionate sulla base del migliore stato fitosanitario presentato al momento del prelievo del materiale.

Gli espianti utilizzati presentavano un differente grado di sviluppo in modo da poter testare eventuali differenze nell'efficienza morfogenetica degli espianti; in particolare per la varietà Bianca trunzara sono stati utilizzati cladodi dell'anno precedente (Figura 23 A), mentre per le varietà Amarilla grande, ARL, Rosalito e Inerme cladodi di due mesi di età (Figura 23 B). Dopo il prelievo i cladodi sono stati lavati con acqua e sapone e quindi suddivisi nell'unità di base individuate dalle areole.

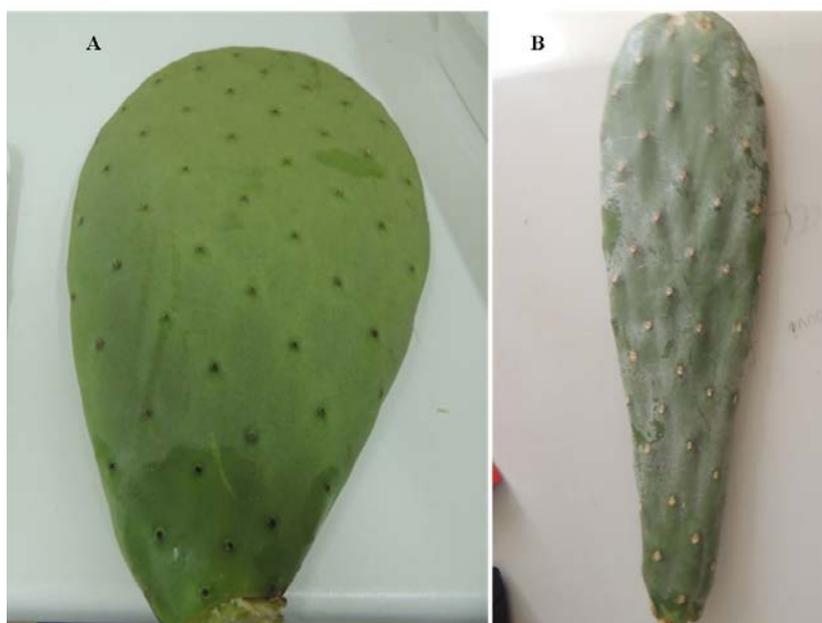


Figura 23 A: cladodo dell'anno precedente; B: cladodo di due mesi di età.

Per quanto concerne la sterilizzazione sono stati provati alcuni protocolli basati sull'utilizzo di differenti agenti decontaminanti a diverso tempo; in particolare sono stati utilizzati:

- Etanolo al 96%;
- Ipoclorito di sodio con 7% di cloro attivo;
- Tween[®] 20 (tensioattivo non-ionico idrosolubile che aiuta l'agente decontaminante ad aderire ai tessuti vegetali).

La tabella 4 riporta i protocolli di decontaminazione saggiati. Ogni protocollo è stato ripetuto in maniera indipendente almeno due volte su un set di campioni di 50 areole per trattamento. Tutti i protocolli di sterilizzazione hanno previsto, innanzitutto, un pretrattamento con un lavaggio con acqua corrente e sapone commerciale per eliminare i contaminanti grossolani (polvere e terreno); ed infine, per evitare la presenza di residui dell'agente decontaminante, sono stati eseguiti tre lavaggi con acqua bidistillata sterile.

Protocolli di sterilizzazione				
Varietà	Etanolo 70%	Ipoclorito di sodio 2% e 1% Tween 20	ID Procedura	Età cladodo di partenza
Inerme	10'	15'	A	Nuova formazione
Rosalito	-	15'	B	
Amarilla grande	10'	10'	C	
ARL	5'	15'	D	
Rosalito	-	15'	B	Età > 1 anno
Bianca trunzara	5'	15'	D	

Tabella 6 Protocolli di decontaminazione adottati nella fase di sterilizzazione del materiale vegetale

Stabilizzazione degli espianti

Una volta accertata l'avvenuta decontaminazione (dopo 15 giorni dal trattamento di sterilizzazione) gli espianti vitali delle varietà ARL, Amarilla grande, Inerme e Rosalito sono stati utilizzati per le prove di stabilizzazione *in vitro* ed ogni prova di stabilizzazione è stata ripetuta almeno due volte. Gli espianti utilizzati, provvisti di una sola areola (Figura 24) ed in numero di 35 per ciascuna prova, sono stati disposti in piastre Petri contenenti il substrato solido OP1-S in numero di 6-7 per piastra. Dopo 20 giorni metà degli espianti, al netto di quelli eliminati per l'insorgenza di contaminazioni (comunque sempre inferiori al 5%) sono stati mantenuti sullo stesso substrato solido e metà trasferiti, per un massimo di ulteriori 40 giorni di coltura, in bioreattori contenenti il substrato OP1-L e gestiti con 2 immersioni al giorno per 2 minuti e un ricambio di aria al giorno per 4 minuti.

Una ulteriore prova ha riguardato la valutazione della possibilità che gli espianti decontaminati potessero essere direttamente introdotti in bioreattore per la coltura liquida (Figura 25). A tal fine espianti della varietà ARL sono stati posti in numero di 10 all'interno di bioreattori contenenti il substrato OP1-L e settando il sistema con due immersioni al giorno per due minuti e un ricambio di aria al giorno per 4 minuti, alle normali condizioni di allevamento.

Il tasso di stabilizzazione (T.S.) è stato calcolato come segue:

$$T.S. = \frac{n.e.s.}{n.e.t.} \times 100$$

Dove: n.e.s. = numero di espianti che presentavano germogli di almeno 1 cm (stabilizzati);

n.e.t. = numero espianti totali.

La stabilizzazione è stata considerata conclusa quando i germogli di tutti gli espianti in fase di organogenesi avevano raggiunto la lunghezza di 1 cm, individuata come dimensione minima per l'avvio della successiva fase di moltiplicazione. In ogni caso tutti i dati sono stati rilevati entro 65 giorni dall'avvio della fase di stabilizzazione.

Unitamente al rilievo del tasso di stabilizzazione, è stato stilato un giudizio sintetico sulla qualità dei germogli ottenuti.

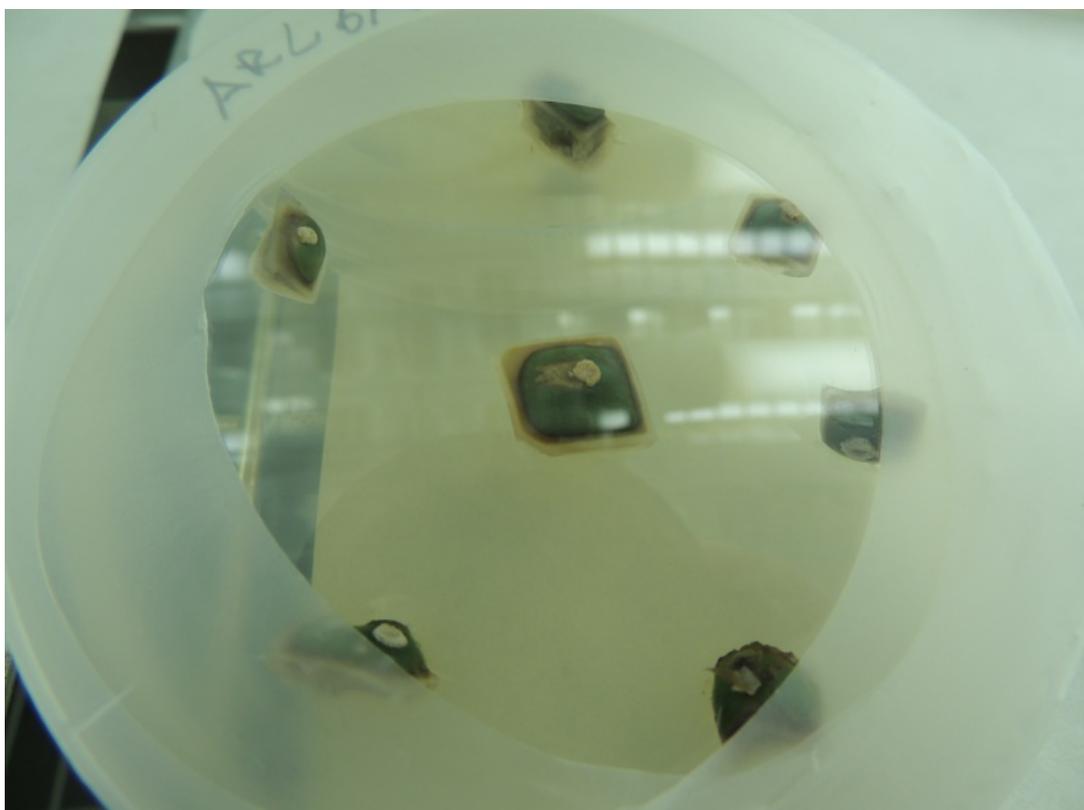


Figura 25 Espianti di ARL sterilizzati posti in substrato di stabilizzazione

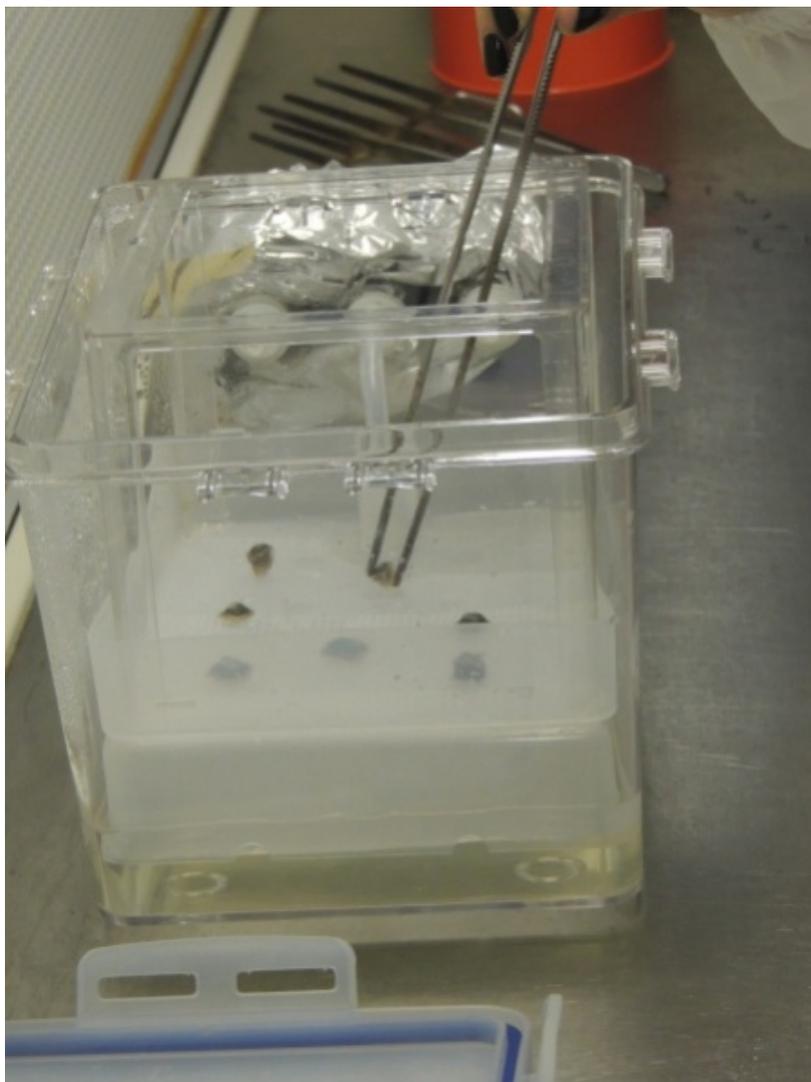


Figura 25 Introduzione degli espianti nei bioreattori nella fase di stabilizzazione

Fase di moltiplicazione

La fase di moltiplicazione è quella individuata come decisiva per la definizione di un protocollo efficiente ed è pertanto quella rispetto alla quale sono state condotte in maggior numero di analisi, di seguito descritte.

L'indice di moltiplicazione è stato calcolato con il seguente rapporto:

$$I.M. = \frac{n.g.o.}{n.g.i.}$$

Dove: n.g.o. = numero di germogli ottenuti;

n.g.i. = numero di germogli iniziali.

Moltiplicazione su substrato solido

Una parte dei germogli della varietà ARL (che è quella che aveva meglio risposto alle precedenti fasi di stabilizzazione *in vitro*) sono stati trasferiti nelle scatole Ecobox 2 in

numero di circa 15 per contenitore (Figura 26). Le scatole contenevano substrati solidificati a diversa composizione adatti alla stimolazione della moltiplicazione. In particolare sono stati saggianti i substrati OP1-S, OP2-S, OP4-S, OP5-S e OP6-S (Tabella 4) differenti tra loro soprattutto per il contenuto ormonale. Il rilievo dell'indice di moltiplicazione è stato eseguito a 45 giorni dalla messa in coltura dei propaguli, ed inoltre è stato redatto un giudizio sintetico riportante informazioni sulla tipologia della biomassa ottenuta in termini di assenza di iperidricità e di altri caratteri che possano ridurre la qualità del materiale ottenuto.

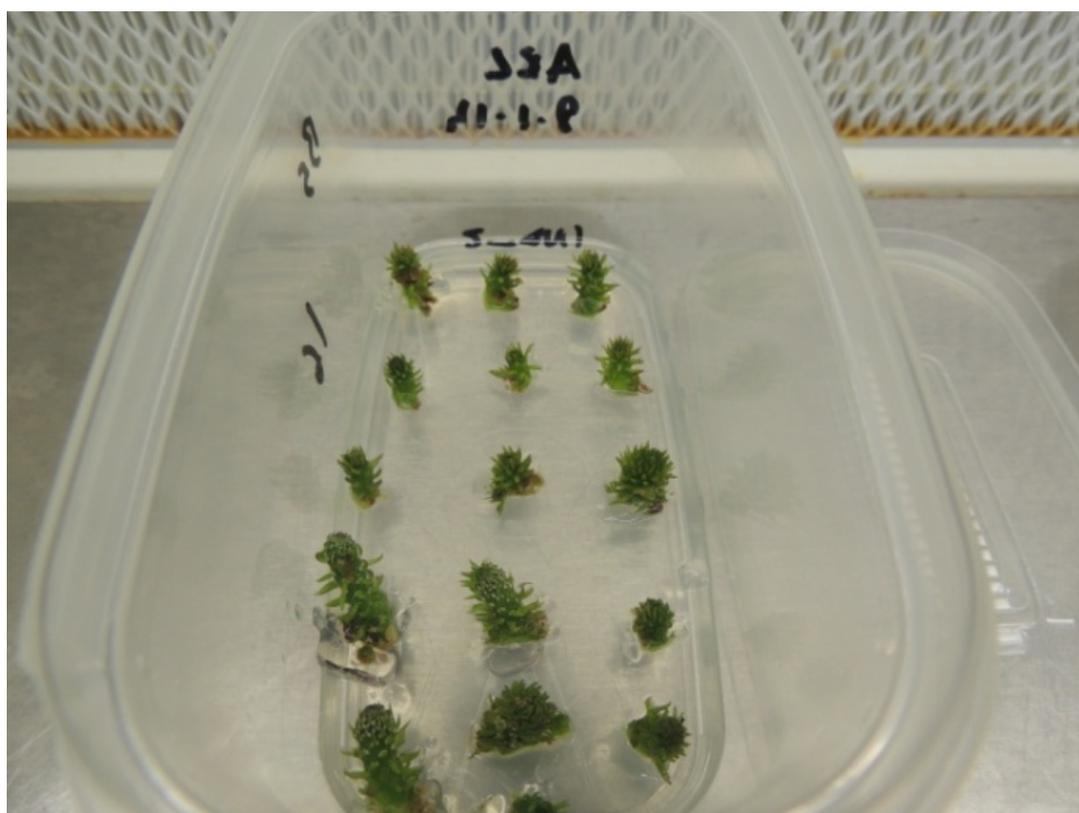


Figura 26 Espianti disposti all'interno dei contenitori "Ecobox 2".

Moltiplicazione su substrato liquido in sistemi TIS

Analogamente a quanto riportato sopra espanti provenienti dalla fase di stabilizzazione della varietà ARL sono stati utilizzati per prove di moltiplicazione con il sistema ad immersione temporanea, all'interno di bioreattori contenenti il substrato OP1-L e programmando il sistema con 2 immersioni al giorno per 2 minuti ed un ricambio di aria al giorno per 4 minuti.

Definizione delle condizioni di funzionamento dei sistemi TIS

Sono state valutate le caratteristiche di funzionamento dei TIS utilizzando il substrato OP1-L ed imponendo a tre diversi gruppi di bioreattori le seguenti condizioni:

- Gruppo A:
 - 2 immersioni al giorno per 2 minuti;
 - 1 ricambio di aria al giorno per 4 minuti;
 - 1 concimazione carbonica con 1.200 ppm di CO₂.
- Gruppo B:
 - 1 immersione a settimana per 2 minuti;
 - 1 ricambio di aria a settimana per 4 minuti.
- Gruppo C:
 - 1 immersione al giorno di 2 minuti;
 - 1 ricambio di aria al giorno per 4 minuti.

Una volta definite le migliori condizioni del sistema si è proceduto alla definizione di vari parametri della micropropagazione mediante TIS.

Definizione del substrato di moltiplicazione

Utilizzando le condizioni precedentemente individuate come efficienti in termini di condizioni tecniche del sistema (frequenza e durata delle immersioni e del ricambio di aria), sono stati valutati i seguenti substrati di allevamento: OP2-L, OP2-L1, OP2-L2, OP2-L3, OP3-L, OP3-L1, OP3-L2 e OP3-L3 (Tabella 5).

Individuati i substrati ottimali per la moltiplicazione, si è proceduto a valutare gli effetti sull'efficienza di moltiplicazione di ulteriori parametri all'interno di sistemi TIS come di seguito descritto.

Definizione del numero di espianti iniziali e loro caratteristiche

Sono stati valutati due aspetti fondamentali per l'efficienza della coltura *in vitro* ed in particolare il numero iniziale di espianti (10, 80, 140 e 230) posti in coltura e la tipologia dell'espianto (intero con apice, intero senza apice, sezionato longitudinalmente con e senza apice).

Parametri all'interno del contenitore

In questa fase sono stati valutati gli effetti sull'indice di moltiplicazione dell'immissione nel sistema, con frequenza giornaliera (di mattina), di aria contenente rispettivamente 400 (pari alla normale composizione dell'aria), 5.000 e 15.000 ppm di

CO₂, ovvero immissione di aria contenente 1.200 ppm di CO₂ durante le ore notturne; è stato inoltre valutato l'effetto della totale assenza di ricambio di aria.

Condizioni ambientali

Sono stati valutati gli effetti sull'indice di moltiplicazione e sulla qualità dei propaguli, della coltura degli espianti a due differenti regimi di temperatura (temperatura costante a 25 °C; temperatura a 25 °C durante il giorno e 16 °C durante la notte); in condizioni di ridotta intensità luminosa (40 μmoli s⁻¹m⁻²). Le prove relative alle condizioni di ridotta intensità luminosa sono state effettuate esclusivamente con il substrato OP3-L.

Radicazione dei germogli

La prova di radicazione ha previsto il confronto tra la radicazione *in vitro* e quella *ex vitro*. Per la radicazione *in vitro* in bioreattori è stato impiegato il substrato liquido BM.

Per la radicazione *ex vitro* i germogli ottenuti dalla fase di moltiplicazione sono stati posti a radicare direttamente in panetti di torba e di fibra di cocco di due marche differenti: Jiffy® e Coco Agro®, rispettivamente (Figura 27 A/B C). Questi sono stati collocati in contenitori in grado di garantire un'elevata umidità relativa analoga a quella presente in condizioni *in vitro* e sono stati posti in camera di crescita.

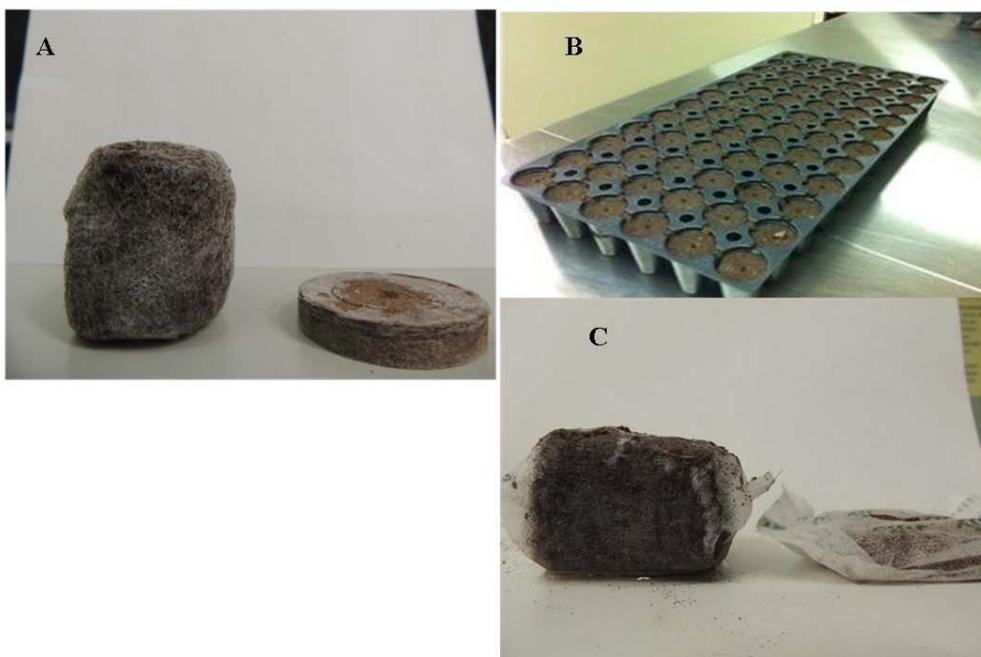


Figura 27 A: Jiffy-7® pellets; B: Jiffy preforma®; C: Coco Agro®.

Al termine di questa fase per ogni prova effettuata è stato valutato il tasso di radicazione (t.r.):

$$t.r. = \frac{n.e.r.}{n.e.t.} \times 100$$

Dove: *n.e.r.* = numero espianti radicati *n.e.t.* = numero espianti totali

Parallelamente alla fase di radicazione sono state valutate le modalità di conservazione degli espianti non radicati, per eventuali trasporti.

Le prove di conservazione sono state eseguite utilizzando germogli (talee) provenienti dalla fase di moltiplicazione di circa 3 cm di altezza, direttamente prelevati dai bioreattori. La conservazione è avvenuta, sino a un massimo di 20 giorni, in buste di plastica non sterili (Figura 28 A) in contenitori “Ecobox 2” sterili (Figura 28 B). In entrambi i casi gli espianti sono stati mantenuti in camera climatica in condizioni di normale allevamento o a 4 °C al buio.



Figura 28 A: espianti conservati in buste plastiche; B: espianti conservati in Ecobox 2 sterili

Ambientamento delle piante

La prima fase di ambientamento è avvenuta in camera climatica e successivamente in ambiente protetto attraverso una graduale riduzione dell'umidità relativa. Per favorire l'indurimento è stata effettuata una fertirrigazione con concime nitrato di potassio (46%). Dopo 20 giorni dall'avvenuta radicazione metà delle piantine sono state cimate tagliando la parte apicale del germoglio. Al termine della fase di ambientamento è stata valutata la percentuale di sopravvivenza, data dal rapporto tra le piante sopravvissute in questa fase e il totale ed è stato valutato l'effetto della cimatura dei germogli sull'aumento della biomassa.

3.3.3 Validazione del protocollo di micropropagazione in sistemi TIS sulle varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana

In questa fase del lavoro si è proceduto a validare il protocollo definito per la varietà ARL su due varietà diverse di *Opuntia* e precisamente, la varietà Gigante tra le accessioni di *O. ficus-indica* Mill e la varietà Orelha de elefante mexicana per quanto riguarda la specie *O. stricta* Haw. Sono state scelte queste due varietà perché considerate più promettenti e già ampiamente utilizzate per la produzione di biomassa (Lira *et al.*, 2006); esse sono inoltre abbastanza produttive, più resistenti alla cocciniglia del carminio ed adattabili a suoli poveri (Dos Santos *et al.*, 2002).

Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti

Al fine di ottenere il materiale vegetale iniziale più adatto all'introduzione *in vitro*, i cladodi delle varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana sono stati sottoposti a forzatura a 30 °C per ottenere nuovi germogli, su tale materiale è stato applicato il protocollo di sterilizzazione già definito nella prima fase del lavoro ed altri tre protocolli (Tabella 7) differenti per durata delle immersioni e concentrazioni dell'agente decontaminante. I nuovi germogli sono stati prelevati e pretrattati con acqua corrente e sapone commerciale. Quindi sono stati suddivisi in espianti contenenti più areole e sottoposti a quattro diversi protocolli di sterilizzazione che hanno previsto l'utilizzo di diversi agenti decontaminati come già descritto nella fase di sterilizzazione della prima fase.

Protocolli di sterilizzazione						
ID procedura	Etanolo		Lavaggio con acqua bidistillata sterile	Ipoclorito di sodio		Tween 20
	Concentrazione (%)	Durata immersione (min)	Numero	Concentrazione (%)	Durata immersione (min)	Concentrazione (%)
D	70	5	no	2	15	1
1	70	5	x	3	10	no
2	70	5	no	2	12	no
3	65	5	no	2	10	no

Tabella 7 Protocolli di decontaminazione degli espianti adottati nella fase di sterilizzazione per le varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana

Tutti gli espianti sono stati infine sottoposti a 3 lavaggi con acqua bidistillata sterile.

L'efficacia della sterilizzazione è stata valutata in funzione del numero di espianti sterili e vitali dopo 15 giorni.

Stabilizzazione degli espianti

Gli espianti, sono stati posti in Ecobox 2 (Figura 29) con il substrato di stabilizzazione denominato OP5-S contenente 5 mg/l di BAP (Khalafalla et al., 2007) e sono stati allevati alle normali condizioni di coltura in termini di temperatura (25 °C) e di intensità luminosa (100 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$).



Figura 29 Espianti della varietà Orelha de elefante posti in substrato di stabilizzazione.

È stata determinata l'efficacia della fase di stabilizzazione attraverso il rilevamento del relativo tasso. La stabilizzazione è stata considerata conclusa quando i germogli hanno raggiunto la lunghezza di 1 cm.

Anche in questo caso al fine di ottenere propaguli più omogenei per le successive fasi di coltura *in vitro*, i propaguli dei genotipi Gigante e Orelha de elefante mexicana, ottenuti dalla fase di stabilizzazione, sono stati subcolturali nei substrati solidi: OP5-S, OP3-S, OP4-S, OP5-S, OP6-S e OP7-S, con lo scopo di individuare l'ottimale in termini di maggior indice di moltiplicazione e buona qualità dei germogli ottenuti.

Fase di moltiplicazione

Le prove di moltiplicazione mediante tecnologia TIS, hanno previsto l'applicazione del protocollo definito nella per la varietà ARL e una prova aggiuntiva di

efficienza di moltiplicazione per quanto riguarda la varietà Orelha de elefante mexicana. Le caratteristiche del sistema sono schematizzate nella seguente Tabella 8.

Varietà	Gigante	Orelha de elefante mexicana
Substrato	OP3-L	
<i>Concimazione carbonica (ppm di CO₂)</i>	400 ppm	
<i>Condizioni climatiche</i>	intensità luminosa 100 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ temperatura 25 °C	
<i>Condizioni tecniche del sistema</i>	1 immersione al giorno per 2 minuti 1 ricambio di aria al giorno per 4 minuti	
<i>Tipologie di espianto</i>	Intero	
<i>Quantità iniziale espianti</i>	10	
<i>Durata della subcoltura (gg.)</i>	80	

Tabella 8 Schematizzazione della prova di moltiplicazione per le varietà Gigante e Orelha di elefante mexicana.

Fase di radicazione e ambientamento

Le fasi finali del ciclo di propagazione *in vitro* inerenti la radicazione e l'acclimatamento delle plantule micropropagate attraverso l'utilizzo di sistemi ad immersione temporanea delle varietà Gigante e Orelha de elefante sono state eseguite come previsto da protocollo elaborato per la varietà ARL della fase precedente.

5 RISULTATI E DISCUSSIONI

5.1 INTRODUZIONE DELLE NUOVE VARIETÀ

Le varietà provenienti dal Brasile, sono state introdotte sotto forma di cladodi in numero di almeno cinque per accessione. Dopo un controllo visivo da parte del competente Servizio Fitosanitario i cladodi sono stati catalogati ed utilizzati per l'ottenimento di nuovo materiale secondo i diversi protocolli individuati. In particolare i cladodi posti in camera calda a 30 °C, hanno cominciato a germogliare dopo circa 30 giorni dalla messa a dimora in vaso (Figura 29), il che ha reso possibile il prelievo di materiale utile per l'estrazione del DNA, per l'avvio delle fasi di propagazione *in vitro*, nonché per escludere la presenza di eventuali agenti fitopatogeni, secondo le indicazioni recepite dall'Ispettore Fitosanitario in sede di rilascio del nulla osta per l'importazione. Per quanto riguarda i cladodi posti alle normali condizioni ambientali, le piante hanno emesso nuova vegetazione nella primavera successiva e, dopo aver verificato anche l'avvenuta emissione delle radici queste sono state predisposte per il trapianto in un appezzamento del campo sperimentale dell'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania.



Figura 30 Varietà brasiliana germogliata sotto forzatura a 30 °C.

5.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE CON MARCATORI MICROSATELLITI

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI GERMOPLASMA DI *OPUNTIA* CON MARCATORI MICROSATELLITI

8 coppie di primer SSR sono state utilizzate su un campione di 33 genotipi appartenenti a differenti specie del genere *Opuntia* (*O. oligacantha*, *O. undulata*, *O. atropes*, *O. robusta*, *O. elizondoana*, *O. spinulifera*, *O. stricta*, *O. joconostle*, *O. streptacantha*, *O. vulgaris*, *O. ficus-indica*) ed al genere affine *Nopalea* (*N. cochenillifera*). Dopo un'analisi preliminare condotta su 10 diverse specie dati non mostrati, sono stati selezionati 6 loci microsatelliti (Tabella 9) che sono stati utilizzati per elaborare l'analisi di diversità genetica; 2 ulteriori loci sono stati scartati perché non hanno generato prodotti di amplificazione in molti genotipi o perché hanno fornito degli elettroferogrammi di difficile interpretazione; tali problemi di interpretazione sono stati dovuti alla presenza di numerosi alleli in un range di poche paia di basi e ad un numero eccessivo di *stutter bands*, cioè frammenti di DNA di poche paia di basi più piccoli rispetto all'allele reale, dovuti a "slittamento" della Taq polimerasi durante le reazioni amplificazione. Buona parte dei problemi di cui sopra è peraltro aggravata dalla natura poliploide di molte specie di *Opuntia* che rende complicato l'individuazione dei singoli alleli (Caruso *et al.*, 2010).

Marcatore	Ripetizione	Primer forward e reverse*	N° alleli totali	PIC [#]	N° alleli unici
Opuntia9	(AG) ₁₅	F: CTAGGCTTCATCCCACATTAGG R: TCCAAATTCACCTCCTCTGC	19	0,91	5
Opuntia5	(TA) ₅	F: TATGCACAAAGCACCATGC R: CCAACCATACCAACTGTACTGAC	6	0,75	1
Opuntia11	(CT) ₁₃ TT(CT) ₂	F: CCTACACCTGCTGCCAATC R: CGAGACAAACATCAGAGGAG	11	0,81	5
Opuntia13	(AG) ₁₂	F: CCAAATACCCAGCCCATAC R: CGAGAACCTAACTTCCGATG	26	0,84	11
Opuntia3	(AG) ₁₉	F: GTGAGTGCCAGATGAAACT R: TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG	6	0,75	1
Ops.24	(CT) ₂₄	F: TCCTTCCATTTCCACCACAC R: CAAGACCCCTCATTCCAAAG	17	0,90	4
Media			14,2	0,83	4,5
* La sequenza M13F (CACGACGTTGTAAAACGAC) è stata aggiunta all'estremità 5' dei primer forward					
[#] Polymorphic information content					

Tabella 9 Lista delle 6 coppie di primer SSR (5 SSE e 1 EST-SSR) utilizzate

I 6 loci SSR, di cui 5 isolati da *O. echios* (Helsen *et al.* 2007) e 1 ricavato da Expressed Sequence Tags (EST) di *O. streptacantha*, hanno permesso di ottenere elettroferogrammi chiari e riproducibili in entrambe le repliche e sono stati utilizzati per

il *fingerprinting* delle 23 accessioni di nuova introduzione confrontate nell'analisi con altre 7 specie note.

Dall'osservazione degli elettroferogrammi ottenuti in seguito ad amplificazione ed elettroforesi capillare, è stato riscontrato un numero di alleli variabile da 1 a 8 e corrispondente al livello di ploidia dei singoli campioni (Tabella 10); il minor numero di alleli è stato mostrato dalle specie certamente diploidi (*N. cochenillifera*) ed il più alto è stato ottenuto da varietà coltivate, generalmente ottaploidi. Inoltre, 13 tra i 33 genotipi analizzati hanno mostrato una media di alleli per *locus* uguale o superiore a 4 (Tabella 10) confermando l'elevato livello di ploidia della gran parte degli individui analizzati.

Genotipo	Specie presunta *	N° medio di alleli	N° di alleli unici
Orelha de elefante Mexicana	<i>O. stricta</i> (<i>O. ficus-indica</i>)	2,2	2
Orelha de elefante Africana	<i>O. undulata</i>	4,3	\
IPA-Sertânia	<i>N. cochenillifera</i>	2,0	\
Orelha de onça	<i>O. ficus-indica</i> (sinonimo di P. Redonda) (<i>N. cochenillifera</i>)	2,0	\
Gigante	<i>O. ficus-indica</i> (<i>O. robusta</i>)	3,8	\
Clone IPA-20	<i>O. ficus-indica</i>	4,0	\
Palma F8	<i>O. atropes</i> (<i>O. robusta</i>)	3,3	\
Palma Redonda	<i>O. ficus-indica</i>	4,2	\
Copena F1	<i>O. ficus-indica</i> (<i>O. robusta</i>)	4,3	2
Copena V1	<i>O. ficus-indica</i> <i>O. robusta</i>	3,8	4
IPA-90-18		4,0	1
IPA-90-92	(<i>N. cochenillifera</i>)	4,2	\
México vegetable 1294		4,2	\
Additional cv. 1258		1,8	3
México Fodder/1278	<i>N. cochenillifera</i>	3,7	\
IPA 90-156		5,0	\
Marmillon Fodder-1327	<i>O. ficus-indica</i> (<i>N. cochenillifera</i>)	3,8	\
IPA 90-115		4,7	\
IPA 90-73		4,0	\
IPA 90-111		4,6	\
V-19		3,0	3
Jalpa	<i>O. ficus-indica</i>	6,0	2
Mão de Moça	<i>N. cochenillifera</i> (originata da IPA-Sertania)	2,8	\
<i>O. ficus-indica</i> 1		3,2	\
<i>O. ficus-indica</i> 2		3,0	\
<i>O. ficus-indica</i> 3		3,5	3
<i>O. ficus-indica</i> 4		3,5	\

<i>O. oligacantha</i>		2,5	1
<i>O. streptacantha</i>		4,4	\
<i>O. elizondoana</i>		3,8	3
<i>O. spinulifera</i>		2,7	3
<i>O. vulgaris</i>		2,8	\
* tra parentesi si riporta la classificazione recentemente proposta da Lira <i>et al.</i> , 2015, la quale però è in disaccordo con tutti gli altri tentativi di classificazione			

Tabella 10 Lista delle accessioni analizzate con indicazione della specie presunta, numero medio di alleli e di alleli unici.

I loci SSR hanno manifestato un elevato livello di polimorfismo, con un numero medio di 14,2 alleli per ogni locus (Tabella 9). Prendendo in esame l'indice PIC (*Polymorphism Information Content*), che indica il livello di polimorfismo di un dato marcatore e quindi la sua capacità di discriminazione, sono stati ottenuti valori molto alti; ciò può essere dovuto all'eterogeneità del campione in cui sono comprese 12 specie presumibilmente differenti su un totale di 33 genotipi. In particolare i loci SSR più informativi sono risultati Opuntia9 (PIC=0,91) e Ops24 (PIC=0,90), (Tabella 9), il locus Opuntia3 ha dato il più alto numero di alleli (26), comprendendo anche un'alta percentuale di alleli unici (42%).

Sebbene i microsatelliti siano marcatori codominanti, l'analisi di diversità genetica si è basata sulla presenza/assenza degli alleli e non sul calcolo delle frequenze alleliche. Tale scelta, sebbene riduca il livello di informazioni ottenute dall'analisi di ciascun locus, si è resa necessaria a causa del diverso grado di ploidia delle specie di *Opuntia* e dell'elevata ploidia della maggioranza dei genotipi, che non ha consentito una stima accurata della frequenza allelica. Come si osserva dai dendrogrammi Neighbor joining (Figure 31/32) e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Figura 33) costruiti a partire da una matrice di similarità basata sul coefficiente "shared alleles", l'analisi svolta ha permesso di generare un numero di marcatori polimorfici tali da permettere la discriminazione della maggior parte dei genotipi analizzati e di formulare alcune considerazioni sulla loro origine. Tra i genotipi che non possono essere distinti con certezza ci sono Gigante, Palma Redonda ed IPA 20, questo risultato è in linea con quanto riscontrato in bibliografia in relazione a queste varietà, in quanto sia Palma Redonda che il clone IPA 20, derivano dalla varietà Gigante. Gli altri casi di genotipi non discriminati si riferiscono a cloni selezionati dall'"Istituto Agrônomico de Pernambuco"-(IPA) di Recife (Brasile) che hanno probabilmente una base genetica comune. L'analisi conferma l'origine della varietà Mao de moça che, essendo un clone di IPA-Sertania, si colloca molto vicina ad essa. Al contrario l'ipotesi che Orelha de onça possa essere un sinonimo di Palma Redonda sembra sconsigliata, mentre appare più plausibile l'ipotesi che afferisca alla specie *Nopalea cochenillifera*. I

diversi cloni di *O. ficus-indica* sono risultati distribuiti lungo l'albero, a conferma dell'origine polifiletica (*) del gruppo di varietà che oggi si includono in questa specie (Griffith, 2004).

Per superare i limiti del dendrogramma, dovuti alla presenza di diversi ibridi che potrebbero far parte di cluster differenti, e per rendere ancora più chiara la rappresentazione grafica della diversità genetica presente all'interno della nostra collezione, è stata eseguita un'analisi con il metodo NeighborNet (Bryant e Moulton, 2004).

Il *network* filogenetico (Figura 34), basato sul coefficiente di Dice, conferma che la maggior parte delle specie affini ad *O. ficus-indica* (*O. stricta*, *O. elizondoana*, *O. streptacantha*, *O. oligacantha*, *O. spinulifera*, *O. vulgaris*, *O. oligacantha*, *O. joconostle*, *N. cochenillifera*.) sono separate dalle varietà coltivate. Di contro, si individua un gruppo di accessioni brasiliane che, come già indicato dalla distribuzione nel dendrogramma, sembra condividere la stessa base genetica.

NJ 1

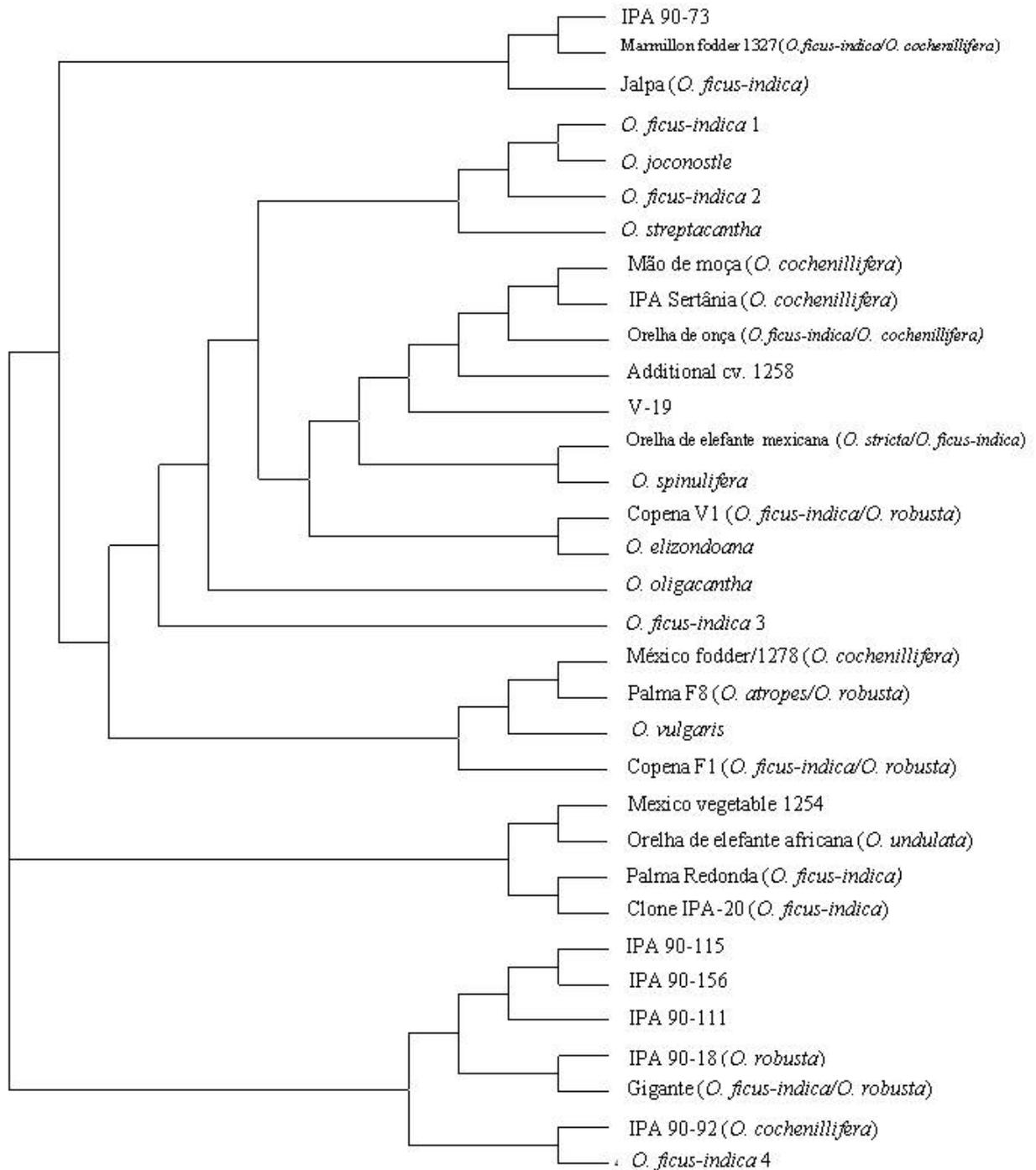


Figura 31 Dendrogramma neighbor joining costruito a partire da una matrice di similarità basata sul coefficiente di “shared alleles”

NJ 2

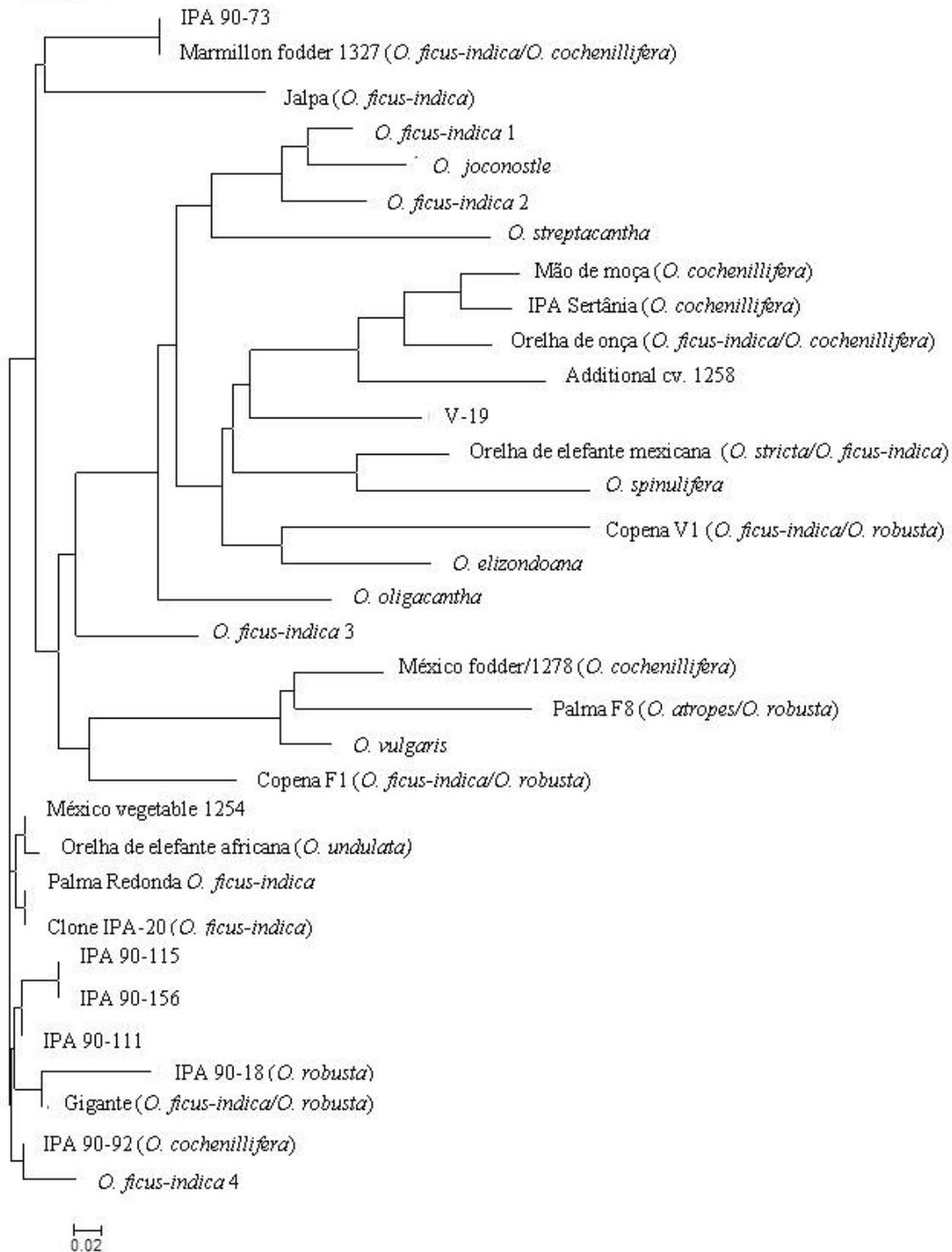


Figura 32 Dendrogramma neighbor joining costruito a partire da una matrice di similarità basata sul coefficiente di “shared alleles”

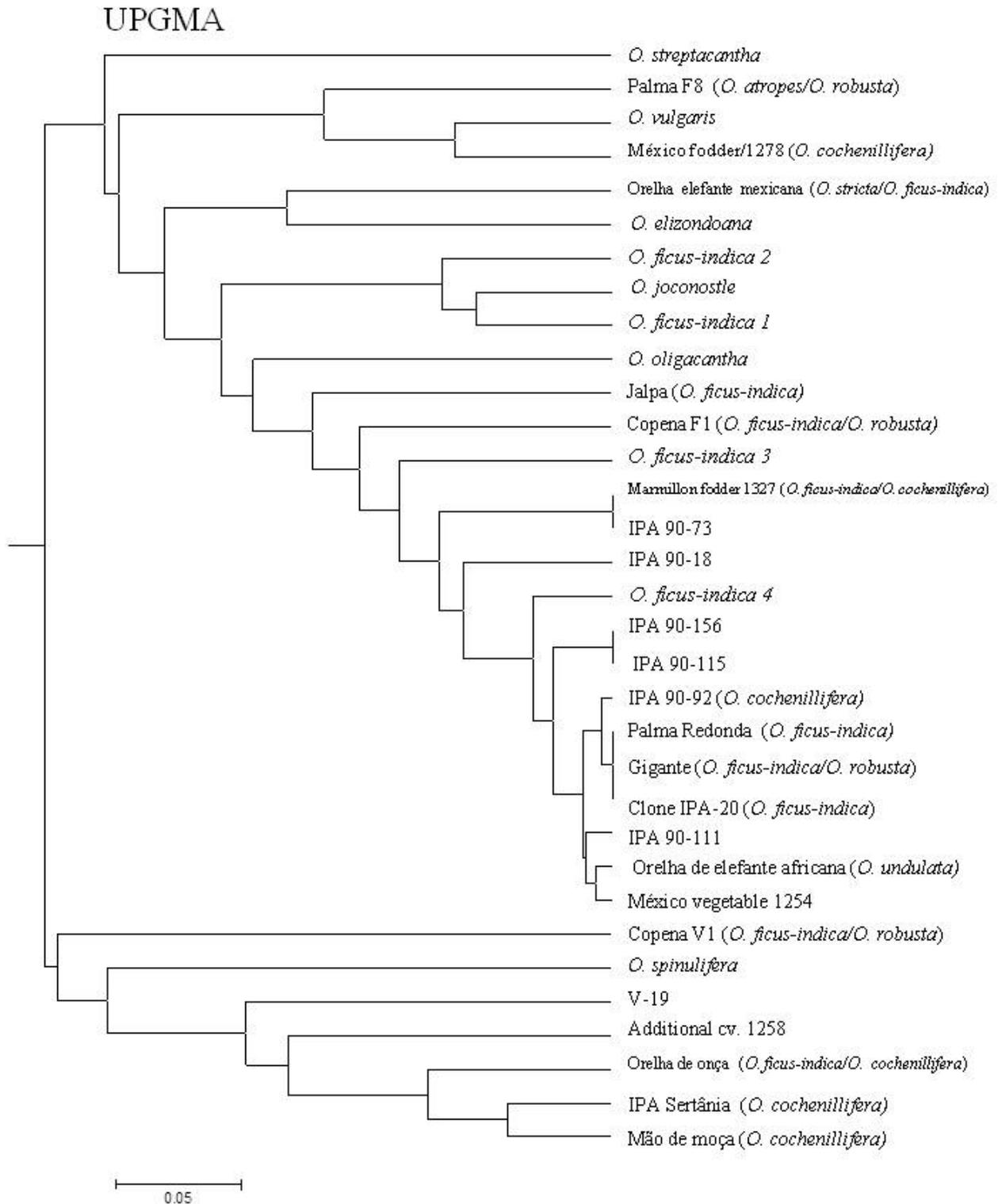


Figura 33 Dendrogramma UPGMA costruito a partire da una matrice di similarità basata sul coefficiente di “shared alleles”

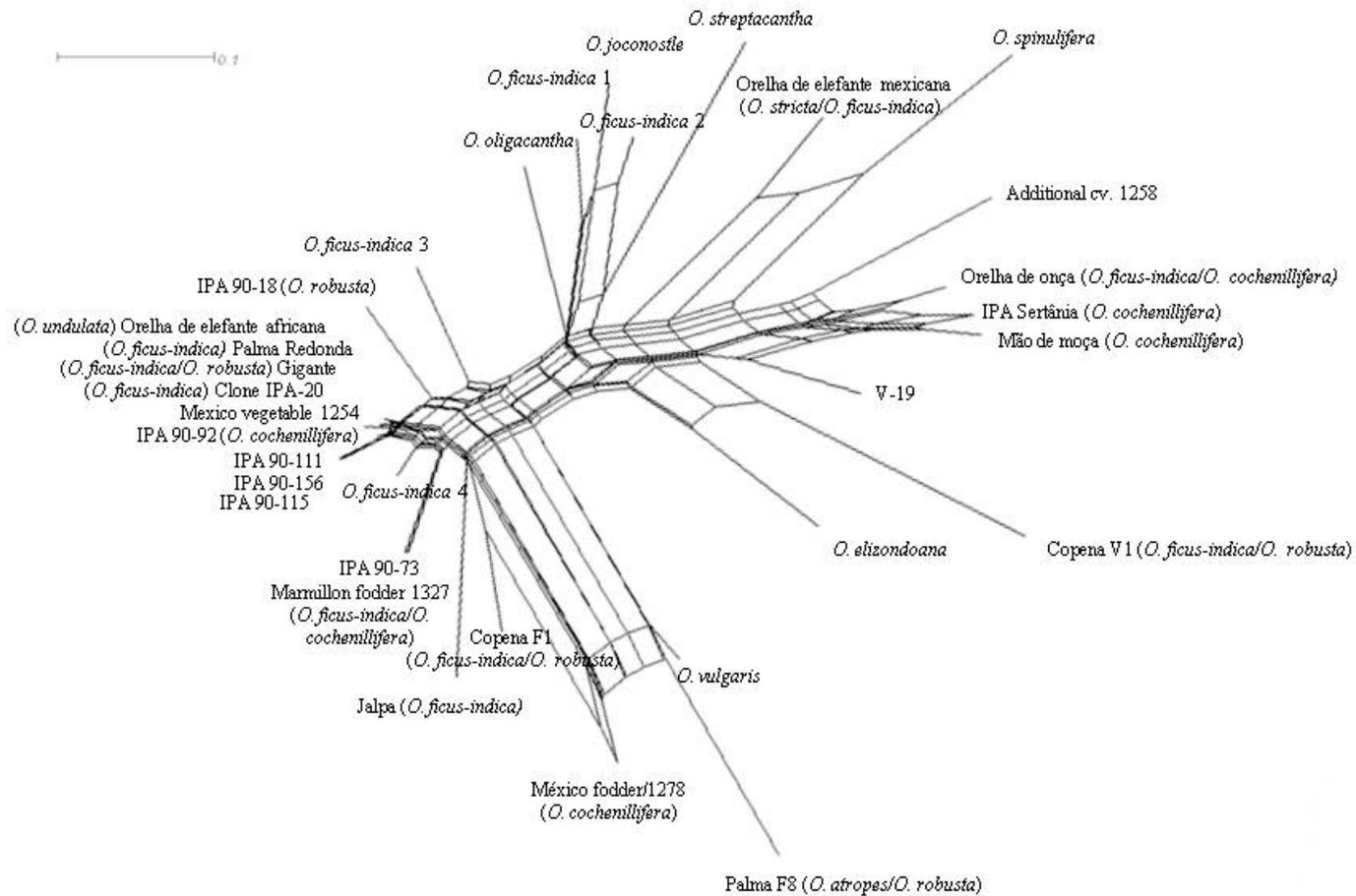


Figura 34 Network filogenetico ottenuto con l'analisi NeighborNet

5.3 DEFINIZIONE DI PROTOCOLLI DI MICROPROPAGAZIONE AD ELEVATA EFFICIENZA

La fase preliminare della ricerca ha riguardato la definizione di un protocollo di micropropagazione mediante l'utilizzo dei sistemi ad immersione temporanea (TIS) utilizzando la varietà che nelle prove di sterilizzazione e stabilizzazione aveva fornito i migliori risultati.

5.3.1 Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti

I risultati delle prove di sterilizzazione, effettuate a partire da cladodi di due diverse età e con l'adozione di diversi tempi di esposizione agli agenti decontaminanti, sono riportati in Tabella 11; la valutazione è stata eseguita dopo 15 giorni dai vari trattamenti.

Protocollo di decontaminazione	Varietà	Stadio di sviluppo del cladodo	Percentuale di espianti decontaminati e vitali (senza ustioni) a 15 giorni dal trattamento di decontaminazione (%)
A	Inerme	Nuova formazione	0
B	Rosalito		31,5
C	Amarilla grande		12
D	ARL		79,5
B	Rosalito	Età > 1 anno	0
D	Bianca trunzara		38,5

Tabella 11 Risultati dei protocolli di sterilizzazione adottati per le differenti varietà utilizzate con cladodi a diverso stadio di sviluppo.

Il protocollo di sterilizzazione individuato con la lettera "D", basato sull'utilizzo di etanolo al 70% per 5 minuti e di ipoclorito di sodio al 2% per 15 minuti, è stato quello maggiormente efficace avendo fatto registrare le migliori percentuali di sopravvivenza di espianti vitali sia su germogli giovani che su cladodi di un anno di età rispettivamente dei genotipi ARL e Bianca trunzara. In particolare per il genotipo ARL il protocollo di decontaminazione in questione ha consentito di avviare alla successiva fase di stabilizzazione circa l'80% degli espianti sottoposti a trattamento e ciò grazie sia all'efficacia del trattamento in sé, sia alla ridotta insorgenza di fenomeni di ustione a carico dei tessuti. I risultati suggeriscono inoltre la maggiore idoneità al trattamento dei cladodi di nuova formazione per ragioni legate sia al minore periodo di esposizione all'ambiente esterno e quindi anche ai possibili patogeni, sia alla minore consistenza e presenza di tessuti ed organi di protezione. I risultati tuttavia indicano anche la

possibilità di avviare alla coltura *in vitro* espianti provenienti da organi più vecchi, sia pure con una ridotta efficienza e che comunque, il successo del protocollo di decontaminazione risiede nella possibilità di trovare un giusto punto di equilibrio tra il mantenimento della vitalità dell'espianto ed il successo della decontaminazione stessa.

5.3.2 Stabilizzazione degli espianti

Per quanto riguarda la fase di stabilizzazione si è provveduto a conteggiare per ciascuna varietà e per ciascun trattamento, il numero di espianti che presentavano germogli di neoformazione di circa 1 cm ed a calcolare il relativo tasso di stabilizzazione (Tabella 12).

Per quanto riguarda la prova eseguita esclusivamente su substrato solido OP1-S, per la varietà ARL in 40 giorni, circa il 43% degli espianti hanno generato nuovi germogli (Figura 34). Mentre le altre varietà (Amarilla Grande, Inerme e Rosalito) non hanno avuto grosse differenze in quanto il tasso di stabilizzazione (T.S.) si è mantenuto su valori di circa il 30%. Per la prova che ha previsto una prima fase di stabilizzazione in substrato solido (20 giorni), e una seconda fase nella quale gli espianti sono stati trasferiti in bioreattore, i risultati (Tabella 12) hanno evidenziato che la varietà che ha dato i migliori risultati è stata ARL, con circa il 41% di espianti stabilizzati (Figura 35 A). Per le varietà Amarilla Grande (Figura 35 B), si è avuto un tasso di stabilizzazione basso (circa il 15%), nonostante siano stati utilizzati espianti di giovane età (due mesi); lo scarso successo della stabilizzazione potrebbe essere imputato alla ridotta vitalità dell'espianto a causa dalle pregresse fasi di decontaminazione. La varietà Inerme, nonostante abbia avuto circa il 38% degli espianti stabilizzati, ha manifestato gravi sintomi di iperidricità, rendendo i nuovi propaguli inutilizzabili per le fasi successive previste dal protocollo (Figura 35 C).

Per quanto riguarda la prova finalizzata alla valutazione della possibilità di effettuare la stabilizzazione direttamente su substrato liquido, questa ha dato esiti totalmente negativi, in quanto è stato accertato come in coltura liquida, a differenza di quanto è possibile effettuare su substrato solido, non sia possibile isolare precocemente le eventuali contaminazioni di origine fungina o batterica che dovessero insorgere, con conseguente irrimediabile compromissione dell'intero set di espianti utilizzati.

Varietà	Stabilizzazione su substrato solido/liquido				Stabilizzazione su substrato solido			
	Durata fase di stabilizzazione (gg.)	T.S. (%)	Dev. Stand.	Qualità degli espianti (giudizio sintetico)	Durata fase di stabilizzazione (gg.)	T.S. (%)	Dev. Stand.	Qualità degli espianti (giudizio sintetico)
ARL	26+20	40,95	1,78	Bassa incidenza di germogli iperidrici ma di dimensione ridotta	40	43	1,60	Buona qualità degli espianti, bassa incidenza dei germogli iperidrici e di formazione del callo
Amarilla Grande	43+20	11,11	1,60	Propaguli iperidrici con elevata formazione di callo		28	0,5	
Inerme	45+20	37,5	0,86	Elevata incidenza di espianti iperidrici di ridotta dimensione		26	1,37	
Rosalito	-	-	-	-		33	0,5	

Tabella 12 Confronto dei tassi di stabilizzazione delle diverse varietà introdotte *in vitro*, a sinistra sia su substrato solido e liquido, a destra solo su substrato solido.

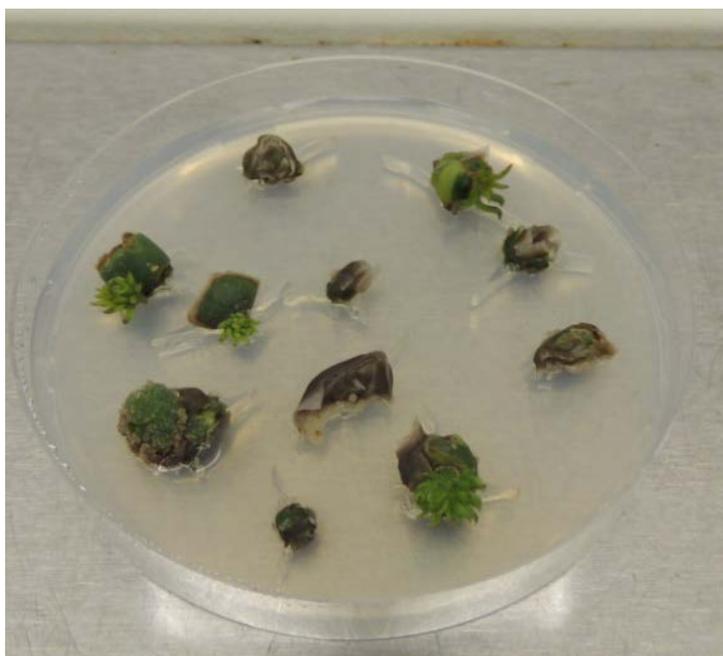


Figura 26 Espianti stabilizzati su substrato solido della varietà ARL con la differenziazione del primo germoglio

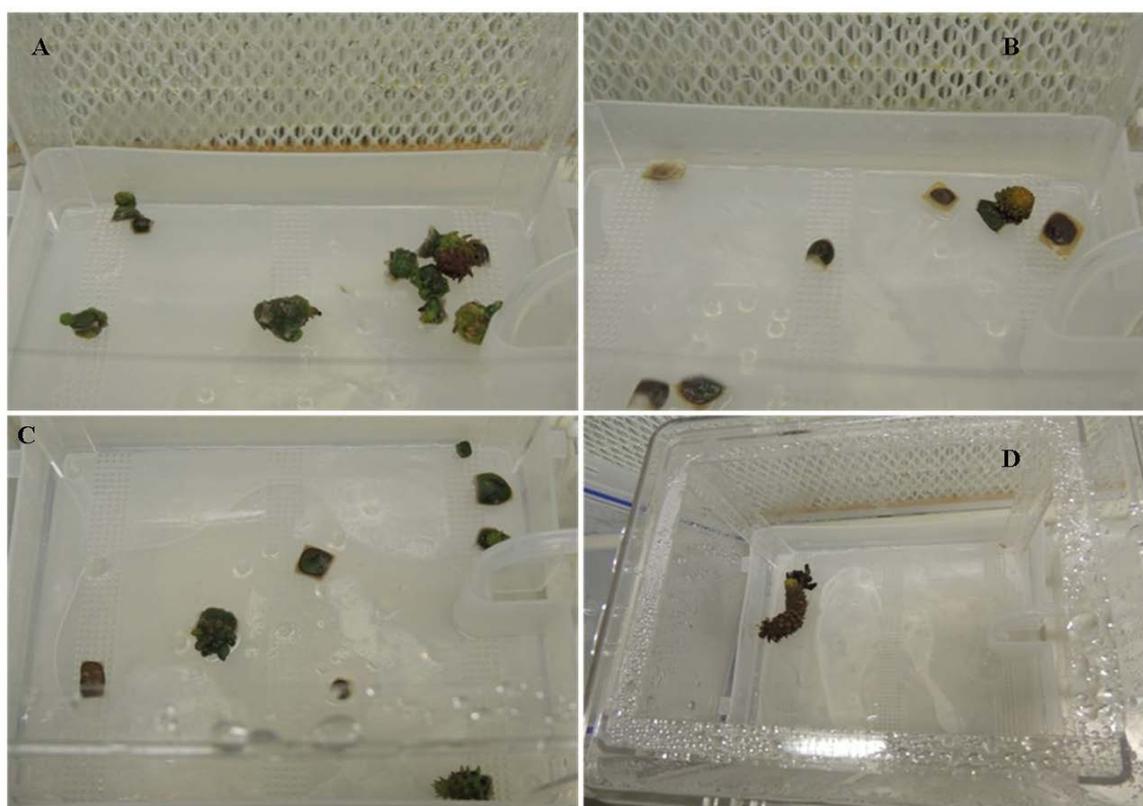


Figura 35 Espianti stabilizzati mediante l'utilizzo del substrato solido OP1-S e dopo 20 giorni trasferimento su substrato liquido OP1-L delle varietà: A- ARL; B- Amarilla grande; C- Inerme; D- Rosalito.

Sulla base dei risultati sopra descritti, riguardanti la stabilizzazione degli espanti, è stato quindi individuato come genotipo modello la varietà ARL rispetto alla quale sono stati osservati tassi di stabilizzazione di circa il 40%, tanto nella prova in

solido quanto in quella in solido ed in liquido. Più in dettaglio la prova di stabilizzazione su substrato solido è risultata maggiormente efficace in quanto ha fatto registrare una bassa incidenza di germogli iperidrici.

In generale, anche se i risultati ottenuti indicano che in linea teorica è possibile utilizzare il substrato liquido per la fase di stabilizzazione, di fatto se ne sconsiglia l'adozione per la minore qualità dei germogli ottenuti, per la ridotta efficienza, soprattutto per alcuni genotipi, e per i tempi più lunghi necessari per concludere la fase di stabilizzazione.

5.3.3 Fase di moltiplicazione

La fase di moltiplicazione è quella rispetto alla quale sono state effettuate il maggior numero di prove, sempre utilizzando propaguli (germogli) di almeno 1 cm del genotipo ARL ed operando sia su substrato solido che con sistemi TIS.

Le prove effettuate sui diversi substrati solidi hanno permesso di individuare la composizione ottimale per l'allevamento dei propaguli della varietà ARL.

I risultati riportati nella Tabella 13 indicano che la concentrazione ottimale per la moltiplicazione dei germogli è quella relativa al substrato OP5-S contenente 2 mg/l di BAP e che ha fatto registrare dopo 45 giorni di subcoltura l'ottenimento di un indice di moltiplicazione superiore a 7 con espunti di buona qualità. Di contro tutti gli altri substrati hanno dato risultati non soddisfacenti o in termini di valori dell'indice di moltiplicazione ottenuto o di qualità del materiale ottenuto (Figura 36).

Substrato	Durata subcoltura (gg.)	I.M.	Dev Stand.	Giudizio sintetico
OP1-S	45	4,67	1,26	Eccessivo accostamento dei germogli, elevata proliferazione del callo, espunti di bassa qualità
OP2-S		3,62	0,95	Media proliferazione di callo e espunti di buona dimensione e di buona qualità
OP6-S		6,03	2,33	Elevata radicazione degli espunti con ingiallimento dei germogli
OP5-S		7,42	0,78	Espunti di dimensione omogenea con bassa proliferazione del callo e colore verde brillante dei germogli, espunti di buona qualità
OP4-S		7,87	0,87	Elevata proliferazione del callo ed alta incidenza di ingiallimenti ed iperidricità dei germogli

Tabella 13 Indici di moltiplicazione delle varietà ARL con diverse composizioni del substrato solido.

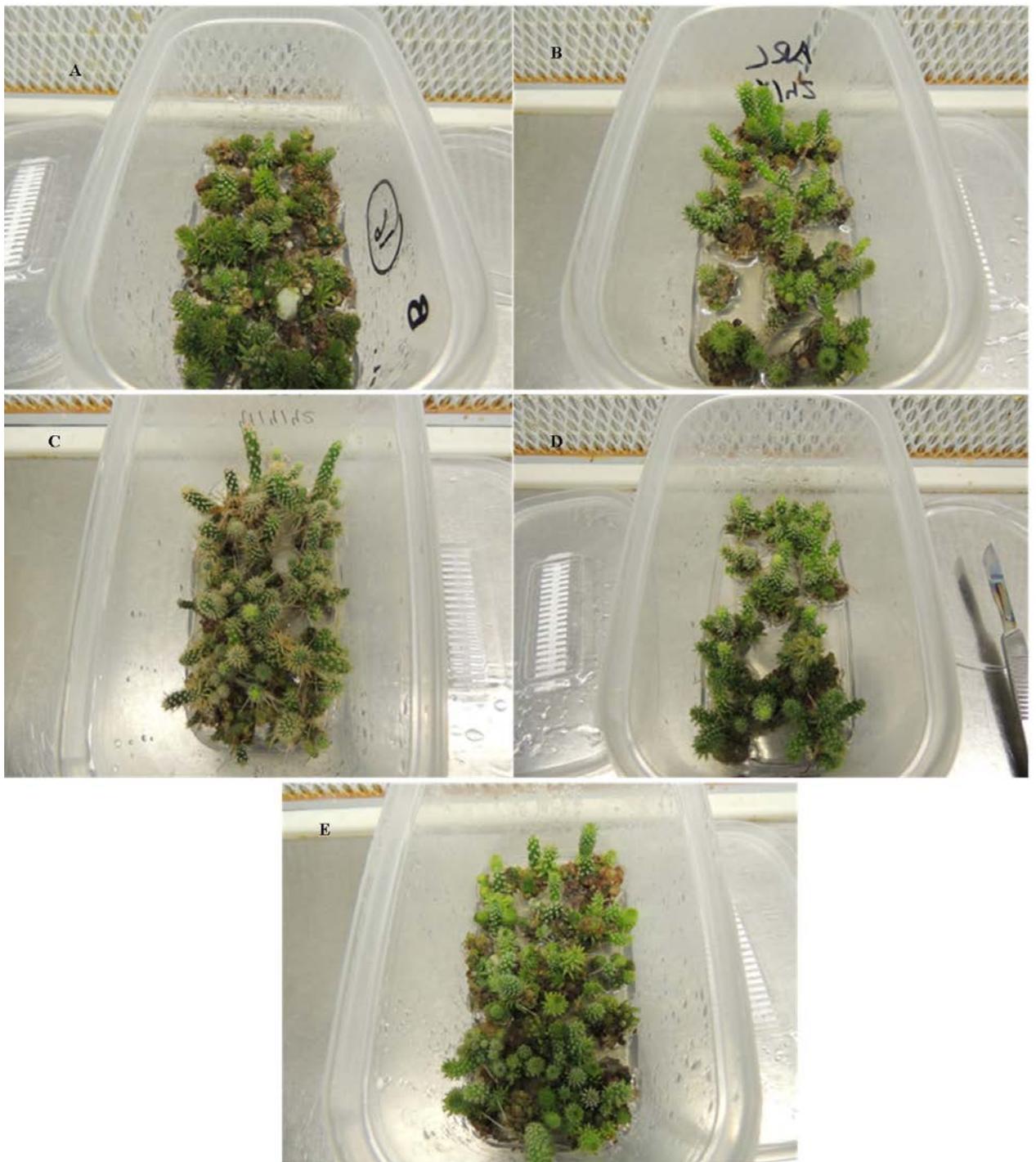


Figura 36 Espianti della varietà ARL allevati su substrato solido a diverse composizioni. A: OP1-S; B: OP2-S; C: OP6-S; D: OP5-S; E: OP4-S.

Il substrato solido ottimale che ha permesso di ottenere propaguli omogenei per l'avviamento della moltiplicazione nei sistemi ad immersione germogli è stato quello denominato OP5-S, in 45 giorni di subcoltura. Facendo registrare non solo il più alto indice di moltiplicazione pari di 7,42 ma anche una buona qualità dei germogli ottenuti in relazione alla bassa proliferazione del callo.

Il primo approccio con il sistema TIS ha fatto rilevare che i germogli allevati nei bioreattori con substrato OP1-L ed impostati per effettuare 2 immersioni al giorno per 2 minuti ed a 1 ricambio di aria al giorno per 4 minuti, dopo 40 giorni di subcoltura hanno fatto registrare un rapporto di moltiplicazione pari a 4:1, ma i germogli sono apparsi alquanto ingialliti con proliferazione di callo (Figura 37), e non in grado di differenziare nuovi germogli. Nonostante i bassi valori dell'indice di moltiplicazione riscontrati in questa prima prova di moltiplicazione in bioreattore (insufficienti anche con quanto rilevato in analoghe prove di moltiplicazione su substrato solido), i risultati hanno consentito di verificare l'idoneità del sistema ai fini della coltura. Pertanto, le prove successive sono state, quindi, modulate agendo su tutte le componenti del sistema per aumentare sia gli indici di moltiplicazione, sia la qualità dei germogli ottenuti ed anche per valutare la possibilità di ridurre gli interventi dell'operatore aumentando l'intervallo di tempo tra le subcolture; quest'ultimo aspetto infatti rappresenta uno dei vantaggi che la coltura su substrato liquido consente di ottenere (Beruto *et al.*, 2011) .



Figura 37 Varietà ARL durante la fase della moltiplicazione in TIS

Definizione delle condizioni di funzionamento dei sistemi TIS

I gruppi di bioreattori individuati con le lettere A, B, C, contenenti sempre il substrato OP1-L e propaguli della varietà ARL, sono stati impostati per il funzionamento a diverse condizioni sperimentali riguardanti frequenza e durata delle immersioni e del ricambio di aria e presenza della concimazione carbonica. I risultati hanno fatto emergere come le condizioni imposte al gruppo A (2 immersioni al giorno per 2 minuti e 1 ricambio di aria al giorno per 4 minuti ed 1 concimazione carbonica

con 1200 ppm di CO₂) abbiano determinato un eccessivo rigonfiamento dei germogli per iperidricità (Figura 38 A) ed abbiano inibito la moltiplicazione (dati non mostrati); di contro nelle condizioni del gruppo B (un'immersione a settimana per due minuti e un ricambio di aria a settimana per quattro minuti) i germogli sono apparsi disidratati (Figura 38 B) e non è stata registrata alcuna moltiplicazione. Infine le condizioni settate per il gruppo C (un'immersione al giorno di due minuti ed un ricambio di aria al giorno per quattro minuti) hanno dato i migliori risultati sia in termini di indice di moltiplicazione, sia con riferimento alla qualità degli espianti ottenuti. Nello specifico, le condizioni di funzionamento imposte al gruppo "C" hanno consentito di ottenere valori dell'indice di moltiplicazione soddisfacenti con valori medi di 9 (dati non mostrati). Per di più, stante il buono stato della coltura, è stato possibile proseguire le osservazioni fino a 100 giorni dalla messa in coltura (Figura 38 C), evidenziando che, a differenza di quanto osservato per colture su substrato solido, il substrato liquido mantiene la sua efficacia nutritiva per tempi maggiori in accordo con quanto riportato da Arencibia *et al.* (2013).



Figura 38 Risultati della prova di moltiplicazione eseguita applicando diverse condizioni di funzionamento a tre diversi gruppi di bioreattori: A germogli del gruppo A; B germogli del gruppo B; C germogli del gruppo C.

Sulla base dei risultati ottenuti, le caratteristiche di funzionamento del gruppo C (1 immersione al giorno di due minuti e 1 ricambio di aria al giorno per quattro minuti) sono state utilizzate per le successive prove che hanno avuto come obiettivo la definizione dei migliori parametri inerenti la fase di moltiplicazione in sistemi TIS.

Definizione del substrato di moltiplicazione nei TIS

In questa fase del lavoro sono stati saggiati 8 diversi substrati che differiscono tra loro per la concentrazione della citochinina BAP e per il contenuto di saccarosio. I risultati relativi alla risposta dei diversi substrati sono riassunti nella Tabella 14 e oltre alle misurazioni oggettive riguardanti l'indice di moltiplicazione, riportano anche delle valutazioni sintetiche sulla qualità dei germogli relativamente all'iperidricità, all'insorgenza di fenomeni di ingiallimento, e di assenza di crescita, aspetti qualitativi tutti coinvolti nella valutazione della idoneità d'uso del materiale di propagazione ottenibile. L'osservazione sull'indice di moltiplicazione è stata considerata conclusa quando non vi è stata più formazione di nuovi germogli (80 giorni per un primo gruppo di 4 substrati e 200 per gli altri 4 substrati). In linea generale è possibile osservare come i substrati caratterizzati dalla presenza delle più elevate concentrazioni di BAP (5 mg/l), contrassegnati come OP2-L abbiano tutti fatto registrare il raggiungimento dei maggiori valori dell'indice di moltiplicazione dopo un periodo più lungo di coltura, probabilmente determinato da un iniziale effetto inibente della concentrazione della citochinina. Va inoltre rilevato come la riduzione della concentrazione relativa al saccarosio abbia determinato significative riduzioni dei valori dell'indice di moltiplicazione registrato.

I dati ottenuti fanno emergere come i substrati OP2-L e OP3-L contenenti entrambi il 3% di saccarosio abbiano fatto registrare il migliore valore dell'indice di moltiplicazione pari a quasi 29 propaguli per espianto messo in coltura (Figura 38 A/B).

Substrato	I.M.	Dev Stand.	Qualità degli espianti (Giudizio sintetico)	Durata subcoltura (gg.)
OP3-L	28,8	4,5	Ridotta formazione di callo, assenza di vitrescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione	80
OP3-L1	10,23	2,22	Propaguli di buona qualità e di dimensione eterogenea	
OP3-L2	18,15	1,45	Eccessiva formazione di callo	
OP3-L3	4,6	0,5	Eccessiva radicazione e riduzione della qualità del germoglio	
OP2-L	28,32	3,99	Ridotta formazione di callo, assenza di vitrescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione	200
OP2-L1	7,73	3,34	Elevato numero di germogli iperidrici	
OP2-L2	17,75	1,45	Dimensione maggiore degli espianti con formazione di callo	
OP2-L3	13,05	6,72	Eccessiva radicazione e dimensione dei germogli eterogenea	

Tabella 14 Indici di moltiplicazione delle subcolture effettuate in diversi substrati liquidi

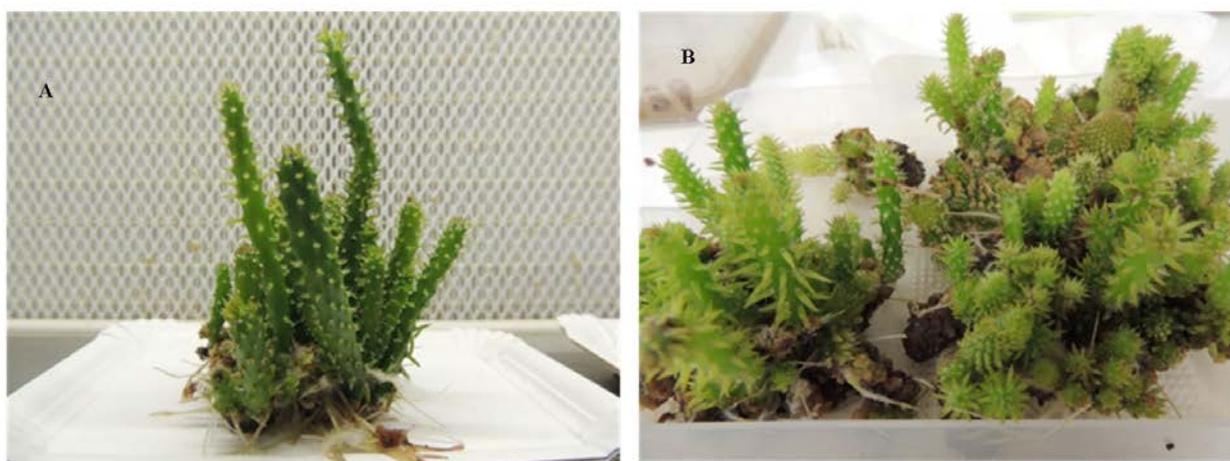


Figura 38 A Particolare di un propagulo in fase di moltiplicazione su substrato OP3-L; B Germogli ottenuti su substrato OP2-L. Le immagini sono state riprese alla fine del periodo di coltura (80 e 200 giorni, rispettivamente)

I risultati ottenuti dalle prove descritte fanno emergere come il substrato OP2-L abbia fornito una risposta più lenta essendo stati registrati i maggiori valori dell'indice di moltiplicazione dopo 200 giorni dall'inizio della coltura, mentre il substrato OP3-L ha fatto registrare i valori maggiori dopo 80 giorni. Per il substrato OP2-L, caratterizzato da una più lenta risposta, la scelta del mantenimento in coltura per un periodo così lungo scaturisce dall'esigenza di valutare comunque l'efficienza del sistema a seguito di cicli colturali più lunghi e quindi con interventi da parte dell'operatore ridotti. E' da notare comunque il raggiungimento dei valori

più elevati dell'indice di moltiplicazione in tempi più ridotti, consenta successivamente l'allungamento dei germogli stessi, fenomeno che risulta essere invece almeno parzialmente inibito con i substrati a risposta più lenta (Figura 38). Allo scopo di migliorare ulteriormente l'efficienza del processo di moltiplicazione i due substrati sopra individuati come maggiormente rispondenti allo scopo, sono stati utilizzati per la valutazione di ulteriori parametri monitorando l'effetto delle variabili dopo intervalli di subcoltura pari a 80 giorni per il substrato OP3-L e 200 giorni per il substrato OP2-L.

Definizione del numero di espianti iniziali e loro caratteristiche

I valori relativi ad entrambi i substrati ma in presenza di un numero crescente di espianti (10, 80, 140 e 230), riportati in tabella 15, dimostrano come l'indice di moltiplicazione diminuisca significativamente all'aumentare del numero di espianti posti in coltura, raggiungendo i valori minimi di appena 2,34 nel caso della immissione in coltura di 230 espianti per il substrato OP3-L e di 2,21 per il substrato OP2-L (Tabella 16). E' possibile ipotizzare che un ridotto numero di germogli introdotti nei bioreattori (10), favorisca il processo di moltiplicazione in quanto gli espianti hanno a disposizione un maggiore volume dello spazio di testa (area compresa tra la superficie del substrato e il coperchio del contenitore) e una maggiore facilità di assorbimento di nutrienti. Al contrario un elevato numero iniziale di espianti all'interno dei bioreattori, favorisce l'iperidricità dei germogli, abbassando notevolmente l'indice di moltiplicazione perché molti propaguli non entrano a contatto con la soluzione nutritiva.

Le Figure 39 e 40 mostrano lo stato delle colture a fine ciclo (rispettivamente 80 giorni con il substrato OP3-L e 200 con il substrato OP2-L) a partire da un numero di espianti iniziali posti in coltura pari a 10.

Variazione dell'indice di moltiplicazione in funzione del numero di espianti di partenza rilevati dopo 80 giorni				
Substrato	Numero di espianti	I.M.	Dev Stand.	Qualità degli espianti (giudizio sintetico)
OP3-L	10	27,5	3,5	Ridotta formazione di callo, assenza di vitescenza, espianti di buona qualità
	80	5,53	0,31	Basso numero di espianti di dimensione ridotta
	140	2,34	0,58	Espianti di ridotta dimensione e numero con formazione di callo e vitrescenti
	230	2,59	0,03	Espianti di ridotta dimensione e numero con elevata formazione di callo e fortemente vitrescenti

Tabella 15 Indici di moltiplicazione in funzione del numero di propaguli inseriti nei bioreattori, su substrato OP3-L.



Figura 39 Risultati della subcoltura con 10 espianti iniziali con substrato OP3-L

Variazione dell'indice di moltiplicazione in funzione del numero di espianti di partenza rilevati dopo 200 giorni				
Substrato	Numero di espianti	I.M.	Dev Stand.	Qualità degli espianti (giudizio sintetico)
OP2-L	10	11	1,32	Basso numero di espianti di piccola dimensione, ridotta formazione di callo, assenza di vitescenza, espianti di buona qualità
	80	5,25	1,07	Ridotta formazione di nuovi germogli con elevato ingiallimento
	140	2,21	0,26	Ridotta formazione di nuovi germogli con elevato imbrunimento
	230	2,22	0,75	

Tabella 16 Indici di moltiplicazione in funzione del numero di propaguli inseriti nei bioreattori, su substrato OP2-L.



Figura 40 Risultati della subcoltura con 10 espianti iniziali con substrato OP2-L

Per quanto riguarda la possibilità di utilizzo di diverse tipologie di espianto (intero, intero senza apice, sezionato longitudinalmente, sezionato longitudinalmente senza apice) i risultati sono riportati nelle Tabelle 17 (per il substrato OP3-L) e 18 (per il substrato OP2-L) e dimostrano come con nessuna tipologia alternativa di espianto sia stato possibile migliorare l'indice di moltiplicazione rispetto a quanto registrato con l'utilizzo di espianti interi. Le figure 41 e 42 mostrano lo stato delle colture a fine ciclo, rispettivamente per i substrati OP3-L e OP2-L, a partire da espianti di tipologia diversa rispetto a quello intero.

Sulla base dei risultati sopra descritti le ulteriori prove riguardanti la fase di moltiplicazione sono state condotte operando esclusivamente con un numero iniziale di espianti posti in coltura pari a 10 e con la tipologia di espianto intera.

Test	Substrato OP3-L		
	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico
Espianto sezionato longitudinalmente	2,58	0,09	Espianti con proliferazione di callo e espanti di buona qualità ma con indice di moltiplicazione basso
Espianto sezionato longitudinalmente senza apice	5,23	1,02	Espianti ipoidrici con eccessiva proliferazione radicale
Espianto intero senza apice	2,9	0,10	Espianti totalmente iperidrici
Espianto intero	27,01	2,27	Ridotta formazione di callo, assenza di vitrescenza, espanti di buona qualità con maggiore dimensione

Tabella 17 Indici di moltiplicazione in funzione della tipologia di espianto per il substrato OP3-L.

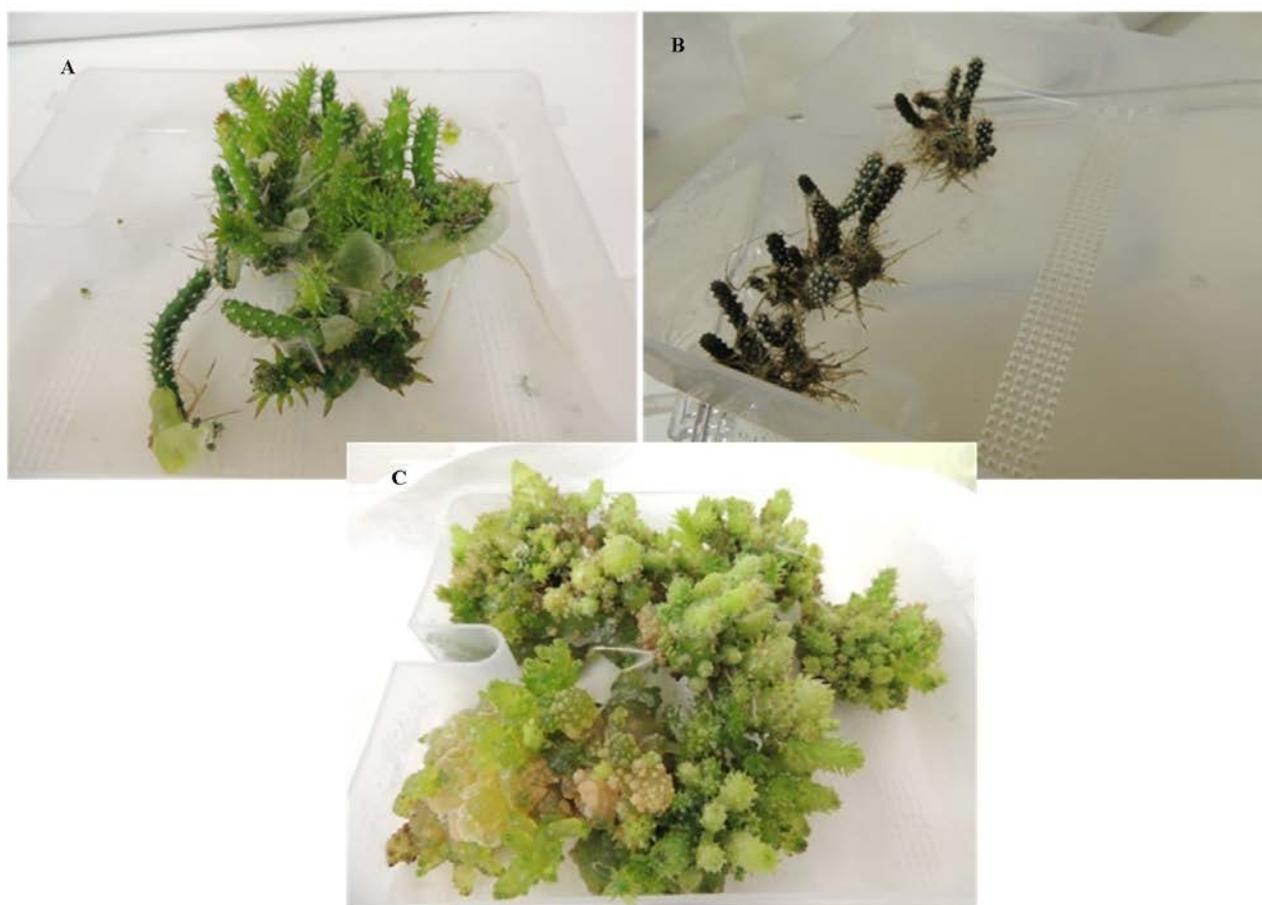


Figura 41 Effetti dell'utilizzo delle diverse tipologie di espianto su substrato OP3-L a fine ciclo colturale. A: espianto sezionato longitudinalmente; B: espianto sezionato longitudinalmente senza apice; C: espianto intero ma senza apice.

Test	Substrato OP2-L		
	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico
Espianto sezionato longitudinalmente	8,82	0,22	Eccessivo accestimento con elevata incidenza di imbrunimenti basali, espianti di ridotta dimensione
Espianto sezionato longitudinalmente senza apice	3,97	0,62	Espianti di ridotta dimensione ed ipoidrici
Espianto intero senza apice	16,77	0,7	Espianti eccessivamente imbruniti ed iperidrici
Espianto intero	28,01	3,87	Ridotta formazione di callo, assenza di vitrescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione

Tabella 18 Indici di moltiplicazione in funzione della tipologia di espianto per il substrato OP2-L.

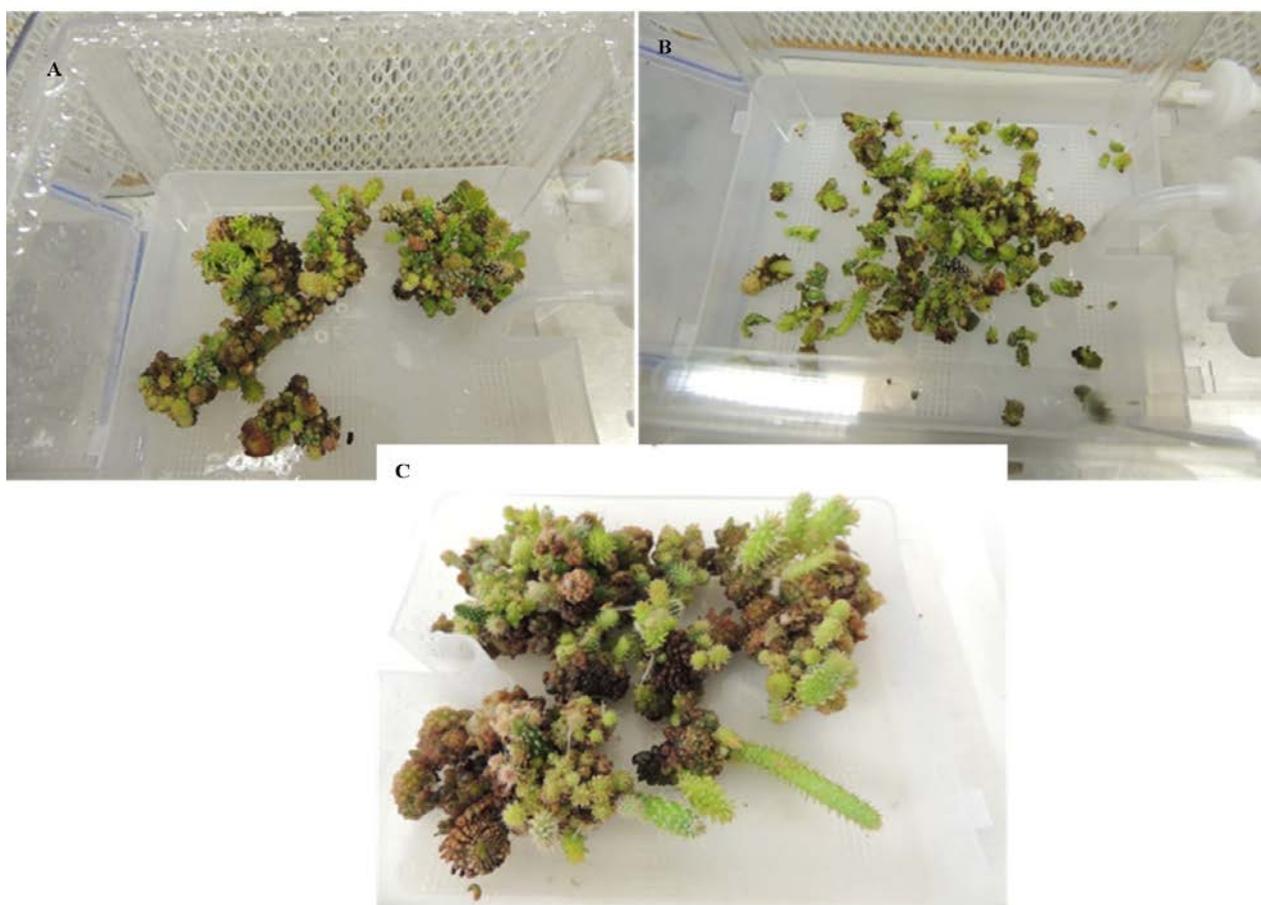


Figura 42 Effetti delle diverse tipologie di espianto su substrato OP2-L a fine ciclo. A: espianto sezionato longitudinalmente; B: espianto sezionato longitudinalmente senza apice; C: espianto intero ma senza apice.

Parametri all'interno del contenitore

I risultati relativi alla prova riguardante la modifica delle condizioni all'interno dei bioreattori sono riportati in Tabella 19 ed evidenziano anzitutto l'importanza del ricambio di aria all'interno dei contenitori. E' del resto noto dalla letteratura (Beruto *et al.*, 2011) che

molte delle problematiche relative alla qualità degli espianti ottenuti dalla coltura in vitro siano direttamente o indirettamente legate a problemi di tossicità per l'accumulo nella fase gassosa di gas (soprattutto etilene, ma anche la stessa CO₂) che interferiscono con la normale attività fisiologica degli espianti. Nelle condizioni sperimentali adottate i peggiori risultati relativi al tasso di moltiplicazione sono stati ottenuti, per entrambi i substrati allo studio, in presenza di concentrazioni di anidride carbonica superiori a quelle (400 ppm) normalmente presenti nell'atmosfera (Figura 43), ed in condizioni di assenza di ricambio di aria (Figura 44). La prova che ha previsto un aumento (sino a 1200 ppm) della concentrazione di CO₂ nelle ore notturne (quando in condizioni di autotrofia le specie del genere *Opuntia* sono in grado di utilizzare la CO₂) ha determinato una risposta positiva in termini di efficienza di moltiplicazione in almeno uno dei due substrati ma ha anche determinato uno scadimento qualitativo del materiale vegetale in coltura (ingiallimenti) riconducibili ad alterazioni dell'efficienza fotosintetica, probabilmente determinati da condizioni di stress. Il probabile effetto fitotossico della CO₂ è risultato evidente anche in condizioni di assenza di fonti di idrati di carbonio nel substrato OP3-L (Figura 43).

Concimazione Carbonica	OP2-L			OP3-L		
	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico
Assenza di ricambio di aria	12,93	2,9	Elevata iperidricità	10,3	0,6	Eccessivo accestimento dei propaguli ed elevata incidenza degli ingiallimenti
400 ppm	28,02	3,35	Ridotta formazione di callo, assenza di vitescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione	27,95	3,81	Ridotta formazione di callo, assenza di vitescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione
5.000 ppm	10,7	0,61	Espianti senescenti con eccessiva radicazione	3,07	0,8	Espianti senescenti con eccessiva radicazione
15000 ppm	6,23	0,55	Dimensione dei germogli eterogenea ed iperidrici	12,55	0,63	Dimensione dei germogli eterogenea ed iperidrici
15000 ppm in assenza di saccarosio nel substrato	n.d.	n.d.	n.d.	10,85	1,02	Propaguli di ridotta dimensione, iperidrici e con colorazione disforme
400/1.2000 ppm	39,97	8,2	Eccessivo ingiallimento dei propaguli	19,57	5,5	Eccessivo ingiallimento dei propaguli

Tabella 19 Indici di moltiplicazione in funzione della diversa concentrazione carbonica per il substrato OP2-L e OP3-L.

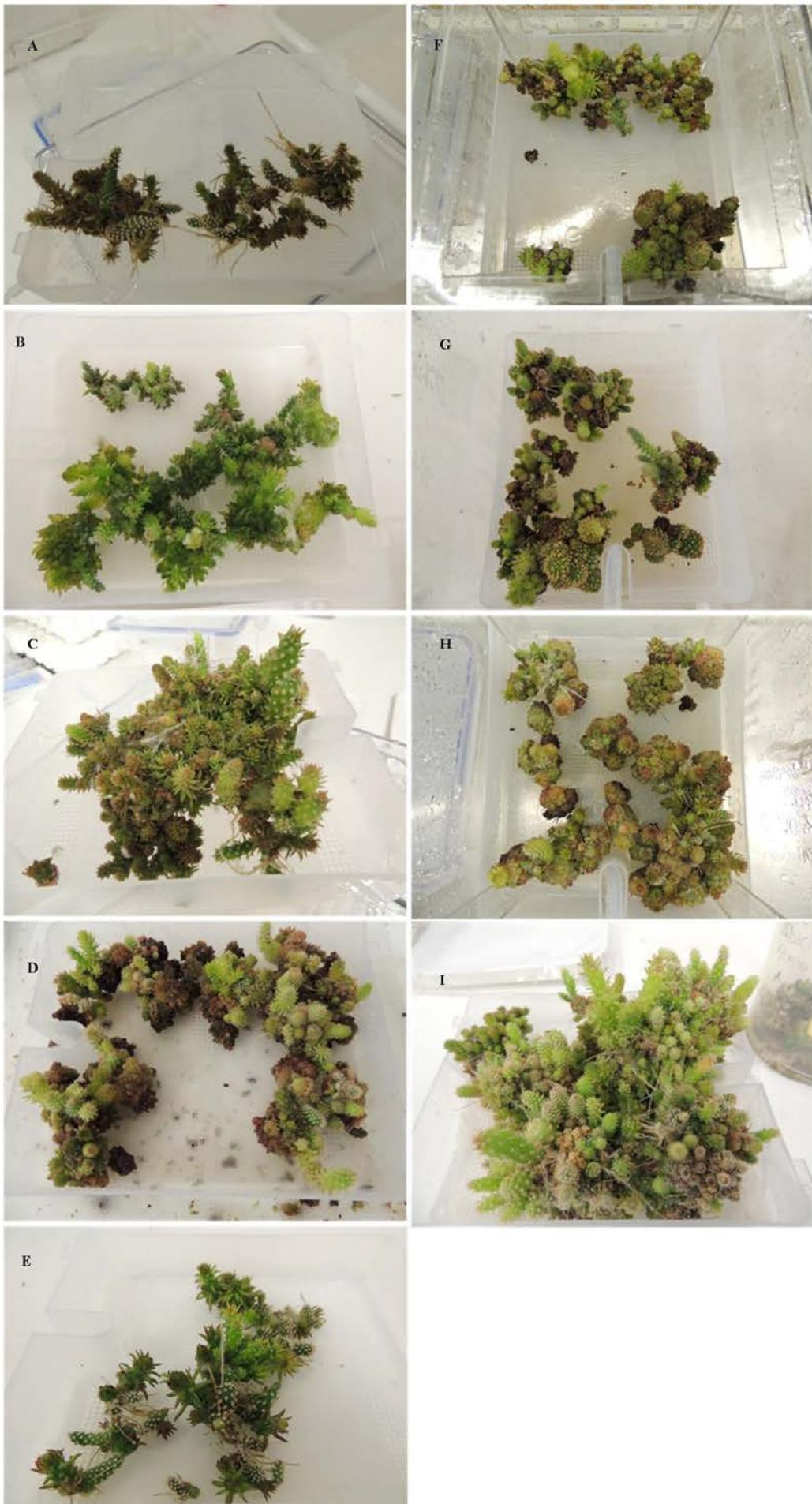


Figura 43 Effetti della concimazione carbonica sul substrato OP3-L (A: 5.000 ppm; B: 15.000 ppm; C: 400/1.2000 ppm; D: assenza di ricambio di aria; E: 15.000 ppm di CO₂ in assenza di saccarosio) e sul substrato OP2-L (A: 5.000 ppm; B: 15.000 ppm; C: 400/1.2000 ppm; D: assenza di ricambio di aria)

Condizioni ambientali

La tabella 20 mostra i risultati relativi ai tassi di moltiplicazione registrati con i substrati OP3-L e OP2-L in condizioni di temperatura costante a 25 °C ovvero di temperatura di 25 °C durante il giorno e 16 °C durante la notte. Il regime termico differenziato giorno/notte, sebbene riproponga l'andamento delle normali escursioni termiche non ha determinato un aumento dell'indice di moltiplicazione e lo ha anzi fatto diminuire probabilmente per la necessità degli espianti di adattarsi a condizioni termiche differenti il che rappresenta, in condizioni di eterotrofia, ed in presenza di meccanismi di regolazione (traspirazione) alterati per gli elevati livelli di umidità relativa all'interno dei contenitori, uno stress per gli espianti stessi (Figura 44). Analogamente nessun effetto positivo è stato riscontrato allorquando il sistema di coltura in substrato liquido è stato posto in condizioni di intensità luminosa ridotta ($40 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$).

Substrati	25 °C giorno / 16 °C notte $100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$			25 °C tutto il giorno $100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$			25 °C tutto il giorno $40 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$		
	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico	I.M.	Dev. Stand.	Giudizio sintetico
OP3-L	7,4	0,36	Eccessiva radicazione dei germogli con elevata incidenza di ingiallimenti ed iperidricità	28,8	4,5	Ridotta formazione di callo, assenza di vitescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione	5,51	0,88	Propaguli ingialliti con dimensioni eterogenee
OP2-L	5,76	0,4	Ridotta dimensione ed iperidricità degli espianti	11	1,32	Ridotta formazione di callo, assenza di vitescenza, espianti di buona qualità con maggiore dimensione	n.d.	n.d.	n.d.

Tabella 200 Indici di moltiplicazione in funzione delle condizioni ambientali per i substrati OP2-L e OP3-L.

Radicazione dei germogli

La prova di radicazione ha previsto sia la radicazione *in vitro* che quella *ex vitro*. La radicazione *in vitro* in bioreattori, per la quale è stato impiegato un substrato senza ormoni denominato OP8-L, è avvenuta in circa 20 giorni con il 100% degli espianti radicati.

Per quanto riguarda la prova di radicazione *ex vitro* (Figura 44) tutti i substrati utilizzati hanno dato dei buoni risultati con il 100% delle piante radicate, a conferma della buona attività rizogena della specie ed indipendentemente dal supporto utilizzato.



Figura 44 Plantule della varietà ARL in fase di radicazione *ex vitro*

Altre prove hanno riguardato la conservazione degli espianti in fase preliminare alla radicazione stessa, al fine di valutare la loro idoneità ai trasporti, in assenza di particolari accorgimenti.

Le prove di conservazione sono state realizzate per un periodo di 20 giorni, trascorso tale periodo le talee sono state trapiantate in Jiffy Preforma® e poste a radicare in camera climatica. Anche in questo caso si è avuto il 100% delle plantule radicate (Figura 45), ma quelle conservate alle condizioni della camera climatica, hanno mostrato un maggiore sviluppo dell'apparato radicale in termini di numero e lunghezza delle radici (dati non mostrati). Di contro, gli espianti conservati al buio presentavano eziolamento.



Figura 45 Plantule della varietà ARL radicate in Jiffy Preforma

Ambientamento delle piante

Le piante di Opuntia, poste a radicare sia subito dopo la fase di moltiplicazione, sia a seguito del protocollo di conservazione, non hanno manifestato problemi di sopravvivenza alle condizioni imposte per la fase di ambientamento. Quest'ultima è avvenuta prima in camera climatica e successivamente in ambiente protetto attraverso una graduale riduzione dell'umidità relativa; durante quest'ultima fase è stata altresì applicata una somministrazione di concime liquido, che dopo 15 giorni ha determinato un consistente allungamento delle plantule sottoposte al trattamento (Figura 46).



Figura 46 Plantule della varietà ARL fertirrigate in fase di ambientamento

La prova di cimatura è stata eseguita dopo 20 giorni dalla radicazione e i risultati sono stati valutati dopo 10 giorni dalla rimozione dell'apice. Tale periodo è stato sufficiente per osservare lo sviluppo di un adeguato numero di germogli avventizi (Figura 47) rispetto alle plantule mantenute senza cimatura. Parallelamente la parte della plantula cimata era stata con successo avviata ad un'ulteriore fase di radicazione, con o senza conservazione, validando in tal modo un protocollo considerato di grande interesse ai fini dell'industrializzazione dell'attività vivaistica, anche in relazione alla possibilità di alienare le piante dalla piattaforma produttiva in assenza di substrato (trasporto di talee), e di effettuare una parte del ciclo produttivo a destinazione.



Figura 47 Piantine di ARL dopo 15 giorni dalla cimatura (a sinistra) a confronto con piante della stessa età non cimata (a destra)

5.4 VALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO DI MICROPROPAGAZIONE ATTRAVERSO SISTEMI AD IMMERSIONE TEMPORANEA SULLE VARIETÀ GIGANTE E ORELHA DE ELEFANTE MEXICANA

5.4.1 Scelta della pianta madre e sterilizzazione degli espianti

Per le varietà Gigante (Figura 48) e Orelha de elefante mexicana (Figura 49), i cladodi introdotti dal Brasile, posti a forzatura a 30 °C, dopo 30 giorni hanno generato nuovi germogli.



Figura 48 Formazione di nuovi germogli da cladodi della varietà Gigante posti a 30°C



Figura 49 Formazione di nuovi germogli da cladodi della varietà Orelha de elefante mexicana posti a 30°C

Per quanto riguarda i protocolli di sterilizzazione, questi sono state adattate rispetto ai precedenti protocolli in funzione della consistenza erbacea dei germogli, peraltro ottenuti in ambiente confinato. I protocolli D e 1 hanno fatto registrare il 100% degli espianti ustionati, la procedura 2 ha provocato il 65% degli espianti ustionati ed infine la procedura 3, ha avuto maggiore successo in quanto vi è stata totale sopravvivenza degli espianti pari al 100% con basso livello di contaminazioni. Per tutti i protocolli è stato utilizzato come espianto per la stabilizzazione *in vitro* una porzione del giovane cladodo provvisto di più areole. Infatti utilizzando un espianto più grande ma più giovane, sono stati ridotti i danni a carico delle gemme ascellari e il materiale ottenuto per forzatura (in ambiente controllato) ha consentito di abbassare i tempi e le concentrazioni degli agenti decontaminanti utilizzati.

5.4.2 Stabilizzazione degli espianti

Gli espianti, posti nel substrato di stabilizzazione denominato OP5-S, hanno fatto registrare, dopo 15 giorni un tasso di stabilizzazione pari a 66,67% per il genotipo Gigante (Figura 50) e pari all'11,11%; per il genotipo Orelha de elefante mexicana.

Dopo 48 giorni per il primo genotipo si è raggiunto il 100% degli espianti stabilizzati mentre per il secondo il tasso di stabilizzazione è stato pari al 30,9 % (Figura 51).

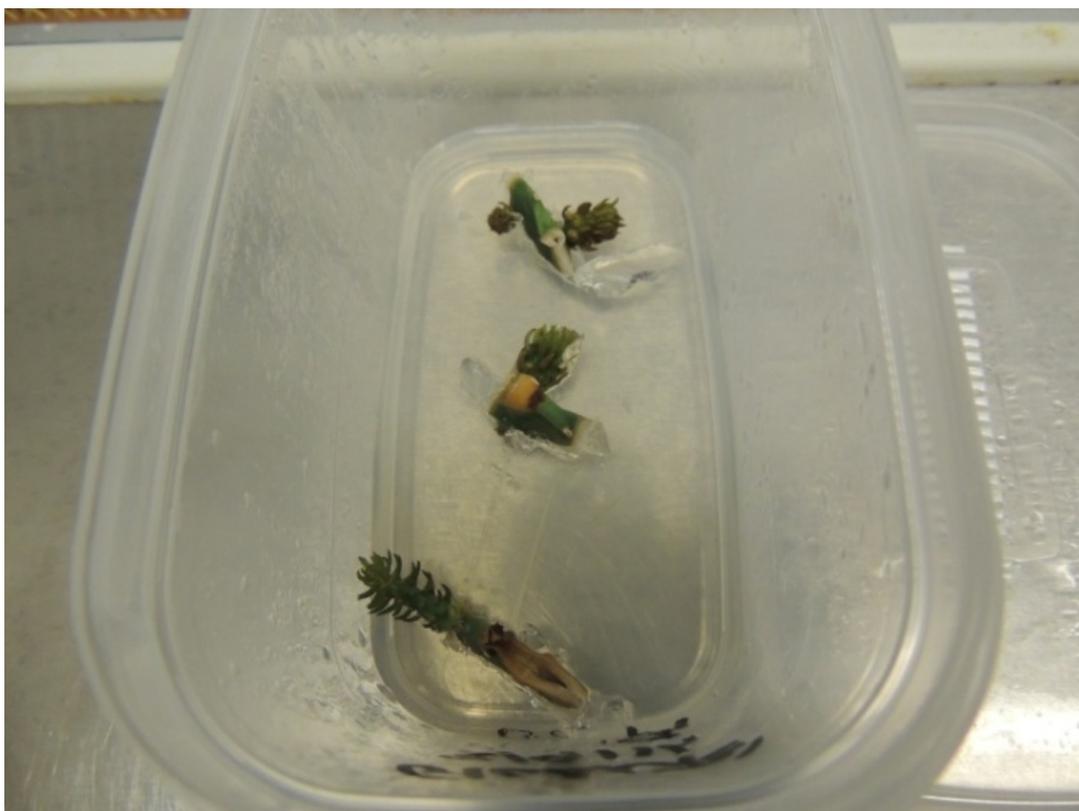


Figura 50 Espianti della varietà Gigante in fase di stabilizzazione dopo 15 gg dall'introduzione *in vitro*.

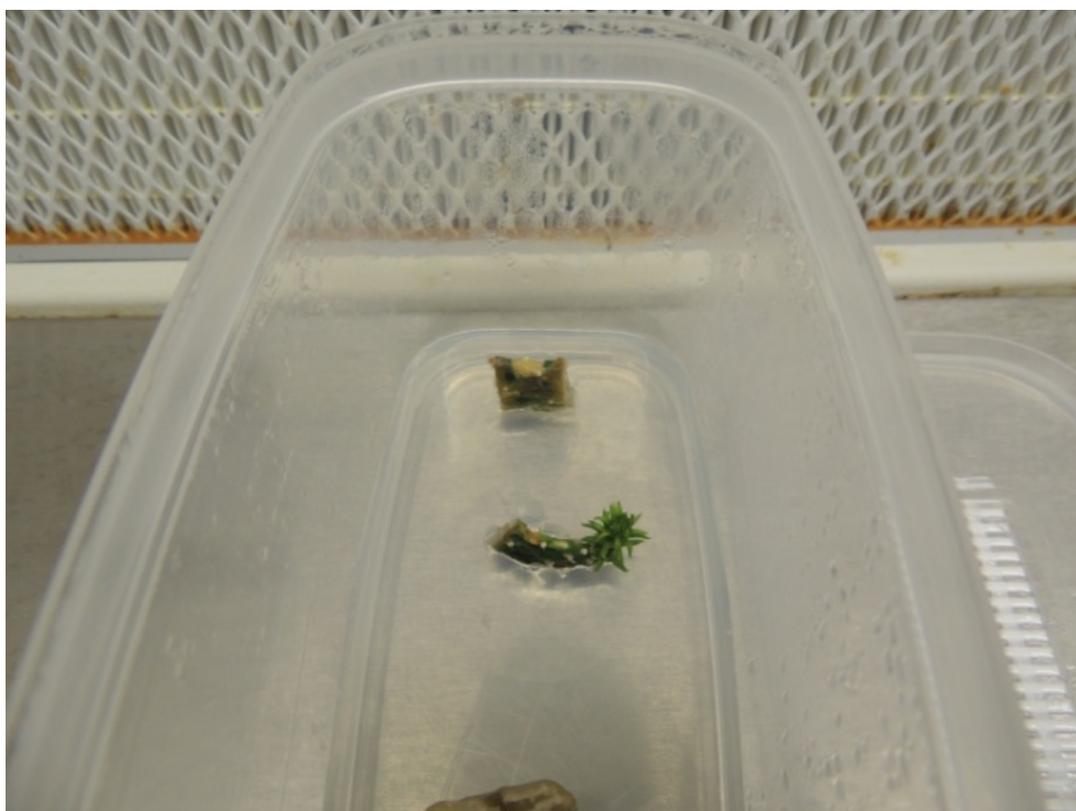


Figura 51 Espianti della varietà Orelha de elefante mexicana in fase di stabilizzazione dopo 15 gg dall'introduzione *in vitro*.

5.4.3 Fase di moltiplicazione

I risultati relativi alla scelta di un efficiente substrato di moltiplicazione per la varietà Gigante sono mostrati nella Tabella 22. Il substrato di coltura solido ottimale ai fini della moltiplicazione dei germogli è risultato il substrato OP4-S in quanto, in poco meno di 50 giorni di coltura, fa registrare a confronto con gli altri substrati, l'indice di moltiplicazione più elevato in presenza di buona qualità degli espianti. La figura 52 mostra la qualità degli espianti a fine ciclo di moltiplicazione della varietà Gigante coltivata su diversi substrati.

Substrato moltiplicazione	Durata subcoltura (gg.)	I.M.	Dev Stand.	Giudizio sintetico
OP3-S	51,33	6,17	1,96	Gli espianti appaiono eccessivamente imbruniti anche se vi è una bassa proliferazione del callo
OP4-S	48,80	6,00	2,16	Bassa incidenza degli imbrunimenti a carico dei germogli, germogli di buona qualità
OP5-S	41	5,58	1,78	Elevata incidenza di espianti iperidrici
OP6-S	61	4,11	0,12	
OP7-S	32	1,50	0,01	Esclusiva generazione dell'apparato radicale

Tabella 21 Indici di moltiplicazione delle varietà Gigante con diverse composizioni del substrato solido.

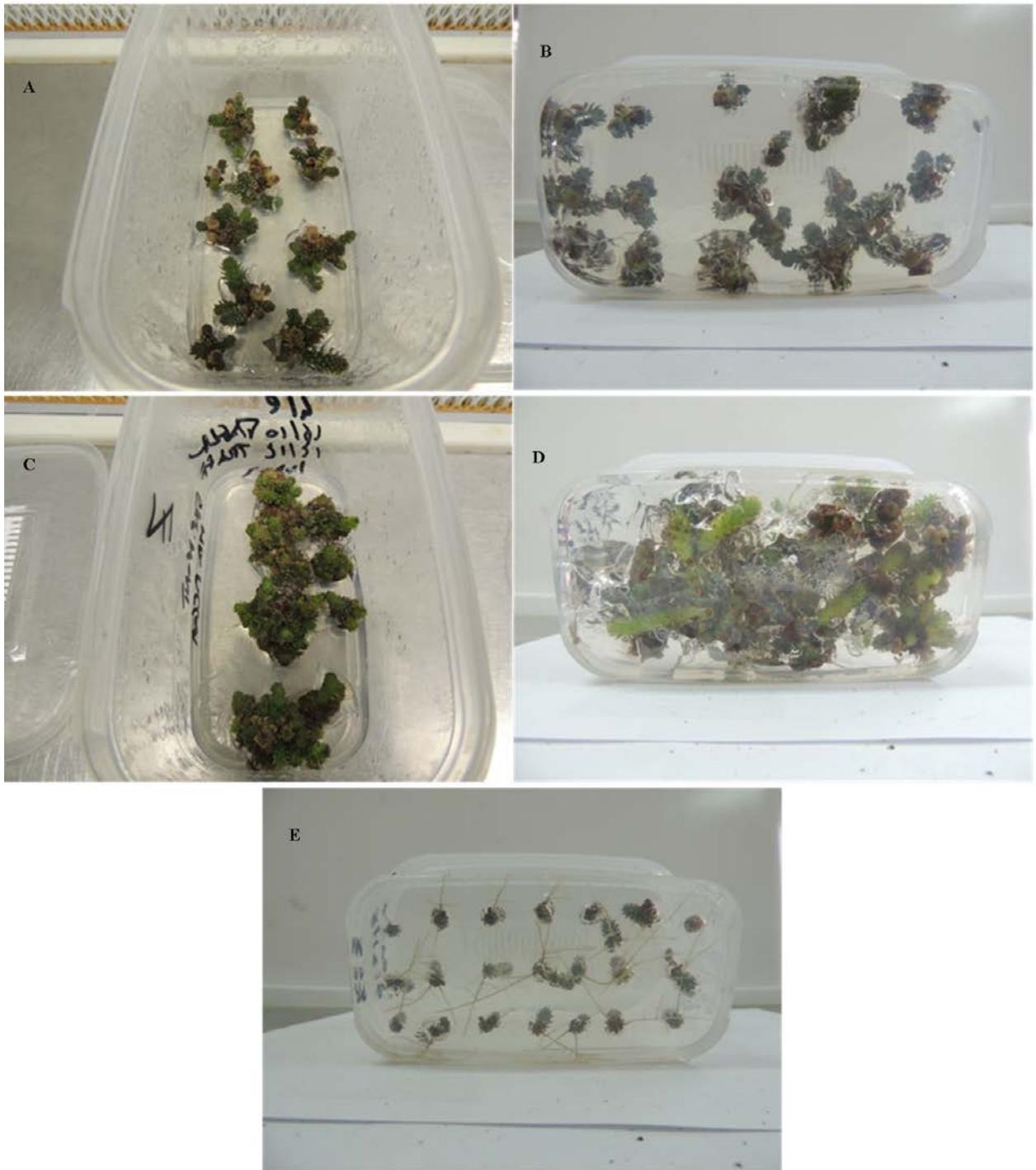


Figura 52 Effetti della diversa composizione del substrato su espunti della varietà Gigante. A: OP3-S; B: OP4-S; C: OP5-S; D: OP6-S; E: OP7-S.

Anche per il genotipo Orelha de elefante mexicana, la durata della fase di coltura per la moltiplicazione su substrato solido è risultata variabile in relazione al substrato utilizzato; infatti, sul substrato OP6-S in soli 20 giorni di subcoltura sono stati ottenuti 8 nuovi germogli per propagulo sottoposto a moltiplicazione, dato che peraltro si accompagna all'ottenimento di propaguli di buona qualità. Al contrario la composizione degli altri substrati, anche in presenza di tempi di coltura più lunghi, ha inibito la proliferazione abbassando l'indice di moltiplicazione e peggiorando, inoltre, la qualità del materiale micropropagato (Tabella 23). La figura 53 illustra gli effetti della coltura di espianti della varietà Orelha de elefante mexicana su diversi substrati a fine ciclo.

Substrato	Durata subcoltura (gg.)	I.M.	Dev Stand.	Giudizio sintetico
OP3-S	76,25	5,84	1,92	Elevato accestimento di propaguli iperidrici
OP4-S	43,86	5,60	0,89	Elevata proliferazione del callo, elevata incidenza di germogli iperidrici eccessivo accestimento dei germogli con conseguenza riduzione della taglia
OP5-S	38,50	4,95	1,11	Elevato tasso di iperidricità dei germogli
OP6-S	20,33	8,10	0,60	Bassa proliferazione del callo e i germogli appaiono esenti da sintomi di iperidricità, germogli di buona qualità
OP7-S	32,33	2,68	0,20	Elevata proliferazione de callo ed ingiallimenti a carico dei germogli con proliferi razione dell'apparato radicale

Tabella 22 Indici di moltiplicazione delle varietà Orelha de elefante mexicana con diverse composizioni del substrato solido.

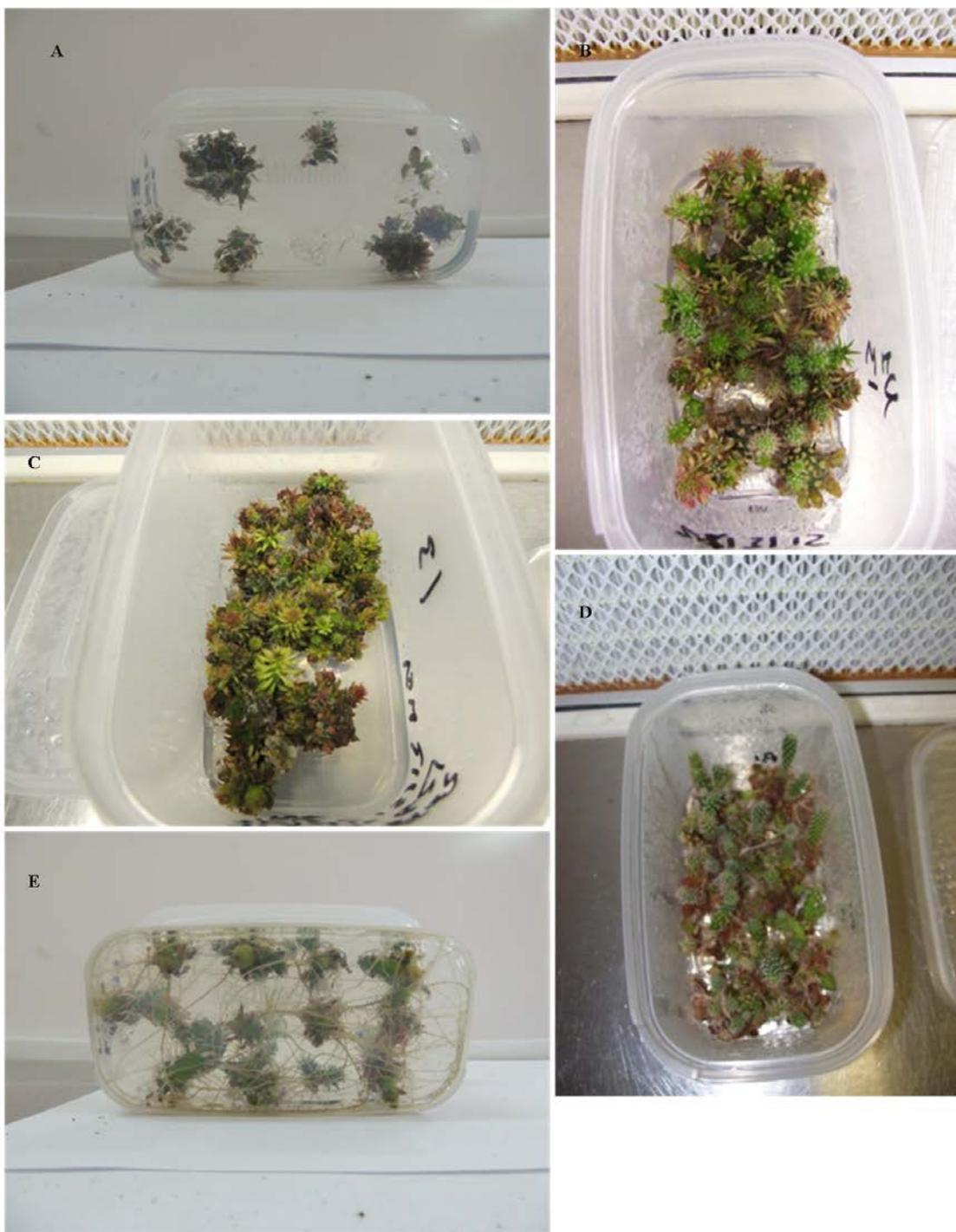


Figura 53 Effetti della diversa concentrazione del substrato su espanti della varietà Orelha de elefante mexicana. A: OP3-S; B: OP4-S; C: OP5-S; D: OP6-S; E: OP7-S.

Per la definizione della modalità di coltura nei sistemi TIS delle varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana è stato deciso di assumere come riferimento i parametri già definiti per la varietà ARL. Le condizioni di coltura applicate hanno permesso di ottenere, dopo 80 giorni di subcoltura, valori dell'indice di moltiplicazione pari a 10,33 (Dev. Stand. 4,9) per la varietà Gigante e di 5,67 (Dev. stand. 1,82) per la varietà Orelha di elefante mexicana. Con riferimento alla qualità degli espanti quelli della varietà Gigante si presentavano molto allungati, provvisti di radici e di colore verde brillante

(Figura 54); essi inoltre non erano iperidrici, presentavano una minima formazione di callo ed il loro aspetto era in generale di buona qualità. Invece per la varietà Orelha de elefante mexicana gli espianti erano eccessivamente iperidrici e di ridotta dimensione, con bassa incidenza di espianti di buona qualità (Figura 54) per cui occorrerà in futuro procedere alla valutazione di ulteriori condizioni sperimentali.



Figura 54 Stato della coltura su substrato di moltiplicazione su substrato OP3-L. A: varietà Gigante; B: varietà Orelha de elefante mexicana.

5.4.4 Fase di radicazione e di ambientamento

La radicazione delle plantule dei genotipi Gigante ed Orelha de elefante mexicana ottenute dalla fase di moltiplicazione, è stata indotta in condizioni *ex vitro* come previsto nel protocollo precedentemente adottato per la varietà ARL, rispetto al quale non sono stati necessari particolari accorgimenti in quanto anche per queste varietà sono stati registrati elevati livelli di efficienza delle fasi di radicazione. L'apparato radicale è fuoriuscito dal panetto di substrato utilizzato dopo circa sette

giorni in tutte le piante sottoposte alle condizioni ottimali per la proliferazione radicale (Figura 55).



Figura 55 Radicazione *ex vitro* delle varietà Gigante e Orelha de elefante mexicana in panetti di torba

Sempre analogamente a quanto osservato per la varietà ARL, anche in questo caso le plantule sono state cimate per favorire l'ottenimento di germogli avventizi e per aumentare in maniera semplice il numero di piante ottenibili (Figura 56).



Figura 56 Piante della varietà Gigante dopo 15 gg dalla cimatura. A sinistra pianta sottoposta a cimatura, a destra piantina non cimata.

6 CONCLUSIONI

Le attività di ricerca di cui alla presente tesi di Dottorato si inquadrano nel tentativo di promuovere in particolare nei Paesi a clima arido o semiarido, la coltivazione di specie e varietà di *Opuntia* e di generi affini non solo per la produzione di frutti quanto, soprattutto, per la produzione di biomassa da destinare all'alimentazione del bestiame o a fini energetici. L'utilizzo di tali specie viene considerato strategico dal punto di vista ambientale e sostenibile dal punto di vista economico in virtù dei ridotti livelli di input richiesti dalla loro coltivazione. Tali caratteristiche di rusticità riguardano in primo luogo il ridotto fabbisogno idrico, ma si estendono anche ad altri aspetti della coltivazione. L'acqua, come noto, rappresenta l'autentico fattore limitante la diffusione dell'agricoltura in molte zone del pianeta e le specie del genere *Opuntia* sono da questo punto di vista molto interessanti; esse manifestano una elevata *water use efficiency* che deriva dal loro particolare metabolismo fotosintetico (fotosintesi CAM - Crassulacean Acid Metabolism); questo prevede che l'apertura degli stomi per l'assimilazione dell'anidride carbonica avvenga durante le ore notturne; in tal modo le perdite di acqua per traspirazione sono ridotte, mentre la quantità di anidride carbonica assorbita è elevata, massimizzando l'efficienza d'uso dell'acqua.

Muovendo dalle considerazioni sul potenziale di utilizzo e sul ruolo strategico che tali specie possono rivestire, anche nell'ottica del contrasto alla desertificazione in quadro di profondi cambiamenti climatici in atto, il lavoro di tesi si è prefisso l'obiettivo di definire una serie di interventi propedeutici e preliminari per favorire lo sviluppo della loro coltura. Gli ambiti prioritari individuati sono stati: il reperimento e l'introduzione di idonee varietà da valutare nei diversi ambienti, la caratterizzazione genetico-molecolare del materiale introdotto per pervenire ad una univoca identificazione del materiale da diffondere, lo sviluppo di tecniche di propagazione intensiva per rispondere alle esigenze di diffusione di materiale di propagazione caratterizzato da elevata qualità. Nel loro insieme gli interventi individuati si prefiggono l'obiettivo di intervenire su alcune criticità del settore e rispondono alla necessità di avviare una moderna filiera vivaistica che possa soddisfare le esigenze di qualità con riferimento alla rispondenza varietale, allo stato sanitario, nonché alla stessa disponibilità del materiale di propagazione per impianti ad elevata densità.

Le attività di ricerca hanno preso avvio dalla introduzione sul territorio nazionale di 23 genotipi tra quelli già selezionati da parte dell'“Istituto Agrônomico de Pernambuco – (IPA)” di Recife (Brasile). Il nuovo materiale vegetale, previo controllo

fitosanitario ed acclimatazione, è stato posto a dimora nel campo collezione destinato alle specie di *Opuntia* presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania, unitamente ad altro già presente. Allo scopo di poter individuare e caratterizzare tale materiale in maniera univoca, nonché di consentirne la tracciabilità in futuro, è stata effettuata una analisi genetica di tutte le accessioni attraverso l'utilizzo di marcatori microsatelliti. È stato possibile così individuare le relazioni tra i nuovi genotipi e le principali specie di *Opuntia* presenti in collezione ed introdotte nell'analisi. Le differenze tra i profili SSR ottenuti sono state analizzate con due metodi basati su indici di similarità, Neighbor joining e NeighborNet, che hanno fornito una indicazione della variabilità genetica esistente tra i genotipi analizzati rivelando ulteriori informazioni per quanto riguarda la diversificazione e il grado di unione tra differenti pool genici. Tale aspetto risulta di particolare interesse per le specifiche caratteristiche tassonomiche di queste specie per le quali esiste un elevato grado di commistione genetica e, conseguentemente, anche di indeterminatezza del relativo inquadramento tassonomico e sistematico, reso ancora più problematico dalla difficoltà di utilizzo di descrittori di tipo morfologico.

Un altro aspetto fondamentale della ricerca ha riguardato la definizione e la valutazione di una serie di protocolli di micropropagazione per specie e varietà afferenti al genere *Opuntia*, attraverso l'utilizzo di sistemi ad immersione temporanea (TIS). A tal fine, allo 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, anche in relazione alla possibilità di una quanto più completa automazione del processo, sono state allestite numerose prove sperimentali. Queste hanno permesso la definizione di idonei protocolli per una varietà individuata come modello (ARL), successivamente adattati ad altre varietà di interesse (Gigante e Orelha de elephante mexicana).

I risultati conseguiti indicano chiaramente che per avviare un ciclo di micropropagazione, sia esso mediante tecnologia tradizionale che attraverso i nuovi sistemi ad immersione temporanea, è preferibile avvalersi di materiale iniziale ottenuto a condizioni controllate per minimizzare le contaminazioni. Le diverse metodologie provate in fase di stabilizzazione hanno dimostrato l'opportunità di condurre questa fase su substrato solido in modo tale da ottenere propaguli di elevata qualità in assenza di iperidricità, ciò consente anche di gestire al meglio le contaminazioni che, con un substrato liquido, provocherebbero la perdita di materiale vegetale. Per quanto riguarda la durata della subcoltura in bioreattore è stato dimostrato come, con idonei substrati, sia

possibile ottenere il massimo dell'efficienza in termini di ottenimento di numero di propaguli dopo 80 giorni mentre, non è risultato utile il prolungamento della fase di moltiplicazione a 200 giorni; i rilievi non si sono limitati solo agli aspetti quantitativi ma hanno riguardato anche gli aspetti qualitativi degli espianti con apposite osservazioni. Tutte le altre variabili prese in considerazione e riguardanti la variazione delle condizioni all'interno del contenitore, nonché le condizioni esterne di luce e temperatura non hanno permesso significativi incrementi di efficienza degli indici di moltiplicazione ma hanno consentito di mettere a fuoco alcuni fattori limitanti la coltura. Tra questi si segnalano quelli relativi alla progressiva indisponibilità di alcuni elementi nutritivi nonché quelli relativi all'assenza di ricambio di aria, rispetto ai quali la coltura nei sistemi TIS, messi a punto ed utilizzati nel lavoro di tesi, presenta già grandi vantaggi in termini di efficienza e rende possibile l'adozione di accorgimenti che non appaiono proponibili nella coltura solida.

Un altro 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 è possibile abbattere i costi di produzione grazie anche all'aumento dell'efficienza di moltiplicazione ed alla riduzione dell'intervento da parte dell'operatore.

La fase relativa alla definizione di protocolli di micropropagazione ad elevata efficienza è stata condotta utilizzando per i bioreattori un sistema di funzionamento automatizzato, progettato per lavorare su larga scala e governato da un software complesso. Al contrario per la fase della validazione del protocollo di micropropagazione in TIS sulle varietà brasiliane Gigante e Orelha de elefante mexicana è stato utilizzato un semplice sistema di pompe provvisto di un timer. Questa scelta ha consentito, nella prima fase di sperimentazione, di valutare contemporaneamente molti fattori e di individuare efficaci meccanismi di funzionamento e parametri di coltivazione, potendo gestire un numero potenzialmente infinito di gruppi differenti, ognuno contenente fino a 50 bioreattori. Questo sistema, per quanto complesso e costoso, si è rivelato in questa fase altamente funzionale, poiché il software rende da un lato molto più semplice impostare le diverse variabili anche con continue variazioni (es. variazioni a giorni alterni), dall'altro monitora continuamente eventuali malfunzionamenti (es: picchi di temperatura, interruzioni di corrente, ostruzione dei tubicini, ecc.) consentendo un controllo del sistema anche in remoto. Di contro, una volta definito il protocollo si è ritenuto di valutare anche un sistema molto

meno elaborato, non applicabile a produzioni su grandi volumi poiché ad ogni pompa possono essere collegati solo 12 bioreattori, ma che risulta più semplice per la gestione, facilmente trasportabile e più economico. Tale sistema presenta però alcuni limiti legati alla necessità di verificare l'omogeneità nella gestione del substrato ed alla necessità di maggiore controllo poiché piccoli inconvenienti di malfunzionamento non sono individuati in automatico e possono bloccare il sistema.

La fase di radicazione, data l'elevata adattabilità delle piante in oggetto, può essere condotta in condizioni *ex vitro* su panetti di torba; per favorirne l'ambientamento è utile una fertirrigazione con concime nitrato di potassio (46%), così come una cimatura delle piante effettuata dopo 15 giorni dalla radicazione, che consente di triplicare la biomassa ottenuta.

Dalla sperimentazione si evince come l'utilizzo di queste nuove tecniche di propagazione permetta, accanto ad un aumento degli indici di moltiplicazione, un abbattimento dei costi di produzione su pianta micropropagata, grazie all'allungamento delle subcolture (abbassando gli interventi dell'operatore), alla riduzione dell'utilizzo dei substrati solidificati e un netto miglioramento della qualità delle piante prodotte. 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 l'utilizzo delle nuove varietà di *Opuntia* e generi affini per l'ottenimento di biomassa, utile come foraggio e per la produzione di bioenergia.

Degno di interesse appare il fatto che il protocollo previsto sia stato definito sino alla fase di acclimatazione prevedendo anche delle prove utili per aumentare la performance produttiva in una auspicabile filiera vivaistica, nonché per favorire il trasporto dei propaguli in assenza di substrato per un periodo di tempo ragionevolmente lungo. In definitiva i protocolli definiti consentono la diffusione nel tempo e nello spazio, su larga scala, di materiale di propagazione certificabile dal punto di vista genetico e fitosanitario.

La mole di risultati ottenuti nell'ambito della tesi, che spaziano dall'incremento delle accessioni disponibili, alla caratterizzazione molecolare ed alla definizione di protocolli di propagazione ad elevata efficienza, rappresentano il prerequisito per poter procedere alla realizzazione di impianti intensivi sperimentali nei quali valutare la risposta delle varietà selezionate in termini di adattabilità e di produzione di biomassa.

7 BIBLIOGRAFIA

- Aitken - Christie J., Davies H. E., 1988. - Development of a semi-automated micropropagation system. - *Acta Hort.*, 230:81-87;
- Akanni G., Ntuli V. E Du Preez J.C., 2014 - Cactus pear biomass, a potential lignocellulose raw material for Single Cell Protein production (SCP): A Review - *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(7) 171-197;
- 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;
- Angulo-Bejarano PI, Paredes-López O (2011) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Sci Hortic* 128:283–288;
- 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;
- Barbera G., 1991 - Utilizzazione economica delle Opunzie in Messico. - *Frutticoltura*, 53(2): 41-48;
- Barbera G., Carimi F., Inglese P., 1992 - Past and present role of the Indian-fig prickly-pear *Opuntia ficus-indica* (L. Miller, Cactaceae) in the agriculture of Sicily. *Economic Botany* 46, 10–20;
- Barbera, G., Inglese, P. y Pimienta, E. 1999. Agroecología, cultivo y usos del nopal. *EstudioFAO Producción y Protección Vegetal*, 132. Roma;
- Barbera, G. História e importância econômica e agroecologia. In: Barbera, Giuseppe; Inglese, Paolo (Eds.). *Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira*. Paraíba: SEBRAE/PB, 2001. p. 1-11;

- Barcaccia G. e Falcinelli M., (2006). *Genetica e genomica – Vol. III Genetica e Genomica*, Liguori Editore, Napoli
- Basile, F., 2001. - Economic aspects of Italian cactus pear production and market. *J. Profess.-Assoc. Cactus Develop.* 4: 31-45;
- Bhat Z.A., Dhillon W.S., Rashid R., Bhat J.A., Dar W.A. and Ganaie M.Y., 2010 - “The Role of molecular Markers in Improvement of Fruit Crops”, *Not. Sci. Biol.*, vol. 2, pp. 22-30;
- Ben Salem H., Nefzaoui A., Abdouli H., Orskov E.R., 1996 - Effect of increasing level of spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* var. *inermis*) on intake and digestion by sheep given straw-based diets. - *Animal Science*, 62: 293-299;
- Bouck A. e Vision T. (2007). The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Molecular Ecology* 16: 907-924
- Britton N.L. e Rose J.N., 1963 - *The Cactaceae*, Vol. 1 Dover, New York;
- Caloggero S., Parera C. O., 2004 – Assessment of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) varieties and their possible planting system. – *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (3): 401 -407;
- Cândido M. J. D., Gomes G. M. F., Lopes M. N., Ximenes L. J. F., 2013 – Cultivo de palma forrageira para mitigar a escassez de forragem em regiões semiáridas. – *Informe Rural Etene*, v.7, n.3;
- Caruso M., Currò S., Las Casas G., La Malfa S., Gentile A., 2010 - Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species;
- Chen C., Zhou P., Choi Y.A., Huang S. e Gmitter F.G. (2006). Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1248-1257
- Chen C., Bowman K.D, Choi Y.A., Dang P.M., Rao M.N., Huang S., Soneji J.R., McCollum T.G. e Gmitter F.G. (2008). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 4: 1-10
- Chessa I. e Nieddu G. (1997). Descriptors for cactus pear (*Opuntia* spp). *CACTUSNET – FAO Newsletter Special Issue*, pp. 39

- Chu I., 1995 - Economic analysis of automated micropropagation. - Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 19 – 27;
- Clayton P.W., Hubstenberger J.F., Phillips C.G., 1990 - Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. - Journal of the American Society for Horticultural Science 115: 337–343;
- Coser M.S., Fontes M.P.M. e Ferreira F.S.M., 2012 - “Pollen Viability of Guava Genotypes from Different Locations”, in 3rd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae Held at Petrolina pe Brazil”, Session III: Myrtaceae Plant Breeding and Post-Harvest Management;
- 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;
- De Lyra M. C. C. P, da Silva M. L. R. B., Mergulhão A. C. E. S, Mondragon-Jacobo C., Martínez-Romero E., 2015 - Molecular studies of forage prickly-pear cactus from the semiarid of Pernambuco State-Brazil Journal of Applied Biology & Biotechnology, vol. 3 (02), pp. 001-005, March-April, 2015;
- Debergh P. C., Maene L. J., 1981 - A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. - Sci. Hortic. 14, 335-345;
- Dimpy R, Dhillon W S and Gill P P S (2013), “Molecular Marker Based Characterization and Genetic Diversity of Pomegranate Genotypes”, Ind. J. Hort., vol. 7, pp. 469-474;
- Dos Santos D. C., Farias I., Andrade L. M., Dos Santos M. V. F., Arruda G. P., Coelho R. S. B., Dias F. M., Demelo J. N., 2006 – Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em pernambuco. – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA;
- Dos Santos D. C., Farias I., Do Nascimento M. M. A., Andrade LIRA M., Tabosa J. N., 1994 – Estimativas de parâmetros genéticos em clones de palma forrageira *Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm – Dick. – Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.29, n.12, p.1947 – 1957;
- Dos Santos M. V. F., Cunha M. V., Lira A. M., Dubeux C. B., Freire L. J., Pinto C. M. S., Dos Santos D. C., Souza T. C., DA Conceição Silva M., 2011 – Manejo da Palma forrageira. – 2º Congresso Brasileiro de Palma e Outras Cactáceas;

- Dos Santos N., 2011 - Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável grupo verde de agricultura alternativa - v.6, n.1, p. 58 – 66;
- Dondini L., Pierantoni L., Gaiotti F., Chiadini R., Tartarini S., Bazzi C. e Sansavini S. (2004). Identifying QTLs for fireblight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. *Molecular Breeding* 14: 407-418
- Escalona M., Cejas I., González – Olmedo J., Capote I., Roels S., Canal M. J., Rodríguez R., Sandoval J., Debergh P., 1999 – The effect of meta – topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. – *InfoMusa*, v. 12 n.2;
- Estrada – Luna A. A., Martínez – Hernández J. J., Torres M. E., Chablè – Moreno F., 2008 – *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm – Dyck and effects of sprayed GA₃ after trasplantation to *ex vitro* conditions. – *Scientia Horticulturae*, 117: 378 – 385 (Elsevier B. V.);
- Felker P., Rodriguez S.C., Casoliba R.M., Filippini R., Medina D. e Zapata R. (2005). Comparison of *Opuntia ficus indica* varieties of Mexican and Argentine origin for fruit yield and quality in Argentina. *Journal of Arid Environments* 60: 405-422
- Felker P., Paterson A., Jenderek M. M., 2006 – Forage Potential of *Opuntia* Cloned Maintained by the USDA, National Plant Germplasm System (NPGS) Collection. – *Crop science society of America*, v.46, p. 2161 – 2168;
- El Finti A., EL Boullani R., Ait Aabd N., Msanda F., Serghini M. A., El Mousadik A., 2013 – *In Vitro* Propagation of Three Moroccan Prikly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil. – *Notulae Scientia Biologicae*, 5 (1): 39 – 44;
- García – Saucedo P. A., Valdez – Morales M., Valverde M. E., Cruz – Hernández A., Paredes – Lòpez O., 2005 – Plant re generation of three *Opuntia* genotypes used as human food. – *Plant, Cell Tissue and Organ Culture*, 80: 215 – 219;
- García – Saucedo P. A., Valdez – Morales M., Valverde M. E., Cruz – Hernández A., Paredes – Lòpez O., 2005 – Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80: 215 – 219;
- García De Cortázar B. e Nobel P.S., 1992 – Biomass and fruit production for the prickly pear cactus, *Opuntia ficus-indica*. – *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117 (4): 558 – 562;

- García-Osuna H.T., Benavides Mendoza A., Escobedo Bocardo L., Villarreal Quintanilla J.A., Cornejo Oviedo E., 2011 - Hyperhydricity control of *in vitro* shoots of *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) Gl. & F. - *Phyton* 80: 175–179;
- García-Zambrano E.A., Zavala-García F., Gutiérrez-Diez A., Ojeda-Zacarias M.C. e Cerda-Hurtado I. (2009). Estimation of the genetic diversity of *Opuntia* spp. using molecular markers AFLP. *Phyton* 78: 117-120
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., Bley T., 2014. – Temporary immersion systems in plant biotechnology. – *Engineering in Life Sciences*;
- Golein, B., Fifaei, R., Ghasemi, M., (2011). Identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus interspecific crosses by inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Afr J Biotechnol.* 10, 18965-18970.
- Griffiths D., 1914 - Reversion in Prickly Pears. - *Journal of Heredity*, 5: 222-225;
- Griffith M.P., 2004 – The origin of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence – *American Journal of Botany*, 91(11): 1915-1921;
- Han H., Felker P., 1997 - Field validation of water use efficiency of CAM plant *Opuntia ellisiana* in south Texas. - *Journal of Arid Environments* 36, 133–148;
- 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;
- Helsen P., Verdyck P., Tye A. e Van Dongen S. (2009). Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galápagos). *Plant Systematics and Evolution* 279: 1-10
- Infante R., 1992 - *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 155–159;
- Inglese P., Basile F., Schirra M., 2002 - Cactus pear fruit production. In: Nobel, P. (Ed.), *Cacti: Biology and Uses*. - University of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp. 163–183;
- Jiménez E., Pérez J., Gil V., Herrera J., GARCÍA Y., ALONSO E., 1995 - Sistema para la propagación de la caña de azúcar. - In: Estrade M, Riego E, Limonta E, Tellez P & Fuente J (eds) *Avances en Biotecnología Moderna*, Vol 3 (pp 11.2). Elfos Scientiae, Cuba;

- Johnson J.L., Emino E.R., 1979 - *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. -*HortScience* 14: 605–606;
- Khalafalla M. M., Abdellatef E., Mohameed Ahmed M. M., Osman M. G., 2007 - Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions -*Int. J. Sustain. Crop Prod.* 2(4):1-8;
- Kiesling R. (1998). Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 50-59
- Kitto S. L., 1997 - Commercial micropropagation. – *Hort Science*, 32: 1012–1014;
- Labra M., Grassi F., Bardini M., Imazio S., Guiggi A., CITTERIO S., BANFI E., Sgorbati S., 2003 – Genetic relationships in *Opuntia* Mill. Genus (Cactaceae) detected by molecular marker – *Plant Science*, 165: 1129-1136;
- 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;
- Luna-Paez A., Valadez-Moctezuma E., Barrientos-Priego A.F. e Gallegos-Vázquez C. (2007). Characterization of *Opuntia* spp. by means of seed with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 9: 43-59
- 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;
- Mandujano M. C., Montaña C., Mendez I., Eguiarte L., 1996. - Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert. Why are sexually derived recruitments so rare? - *American Journal of Botany* 83: 63–70;
- 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;
- Majure L.C., 2007 - The ecology and morphological variation of *Opuntia* (Cactaceae) spp. in the mid-south, united states - Mississippi State University;

- Medeiros C. E., Faria J. M., Camara T. R., Carvalho Silva C. U. – Aspectos bioquímicos e fisiológicos da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw sob distintos sistemas de cultivo *in vitro*. – Tesi di dottorato;
- Mondragon-Jacobo, C., and S. Perez-Gonzalez. Cactus (*Opuntia* spp) as forage. FAO Plant Production and Protection Paper 169. FAO, Rome, Italy; 2001;
- Mondragòn – Jacobo C., Pérez – González S., Reynolds E. A. S., Sánchez M. D., 2003 – El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje;
- Monjauze A., Le Houerou H.N., 1965 - Le rôle des *Opuntia* dans l'économie agricole nord-africaine. - Bulletin de l'Ecole Supérieure Agricole de Tunis, (8/9): 85-164;
- Morgante M., Hanafey M. e Powell W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194-200
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki K., Horn G.T. e Herlich H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273
- Murashige T., 1974 - Plant propagation through tissue cultures. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166;
- Nefzaoui A., Ben Salem H., 2002 - Cacti: efficient tool for rangeland rehabilitation, drought mitigation and to combat desertification - *Acta Horticulturae*, 581;
- Nobel S.P., 1995 - Environment biology. - Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO. Rome (Italy): 36 48;
- Nobel, P.S. 1994. Remarkable agaves and cacti. Oxford Univ. Press, New York;
- Ochoa, J. Y Uhart, S., 2004. - Nitrogen availability and fruit yield generation in tuna (*Opuntia ficus-indica*): IV. Effects on fruit yield on dry matter partitioning to reproductive sinks. - Pp 65-76 *In: Memorias. X Congreso Nacional y VIII Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal.* Chapingo, Mexico;
- Oetting W.S., Lee H.K., Flanders D.J. e Wiesner G.L. (1995). Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30: 450-458

- 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;
- Paek K. Y., Hahn E. J., Son S. H., 2001 - Application of Bioreactors for large-Scale Micropropagation Systems of Plants. - *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 37:149-157;
- Pessoa J., 2007 - Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semi-árido - Editor, Edson Batista Lopes - EMEPA/FAEPA;
- Pimentia-Barrios E., 1990 - El nopal tunero. - Edizioni dell'Università di Guadalajara, Mexico: p.246;
- Pinkava, D. J., B. D. Parfitt, M. A. Baker, and R. D. Worthington. 1992. Chromosome numbers in some cacti of western North America—VI, with nomenclatural changes. *Madroño* 39: 98–113.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. e Rafalski A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238
- Rebman J.P. e Pinkava D.J. (2001). *Opuntia* cacti of North America - an overview. *Fla Entomol* 84: 474-483
- Reyes-Aguero J.A., Aguirre J.R. e Hernandez H.M. (2005). Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 395-408
- Robles R., Julio E., 2009 - “El cultivo de tuna” *Opuntia ficus indica*. Gerencia Regional Agraria La Libertad, Trujillo-Perú., 18p. Área temática: Revaloración de cultivos nativos a la economía de pequeños y mediano agricultores;
- Ruminska J. L., Kulus D., 2014 – Micropropagation of cacti – A review. – *Haseltonia*, 19: 46 – 63;
- Stoeckel S., Grange J., Fernández-Manjarres J.F., Bilger I., Frascaria-Lacoste N. e Mariette S. (2006). Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species - *Prunus avium* L.. *Molecular Ecology* 15: 2109-2118

- Rungis D., Berube Y., Zhang J., Ralph S., Ritland C.E. e Ellis B.E. (2004). Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics* 09: 1283-1294.
- Sagarpa, 2004. - Sistema de Informacion Agropecuaria de Consulta. Sistema Integral de Informacion Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion. Mexico;
- Scheinvar L., 1995 - Taxonomy of utilized opuntias. - Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear, FAORome (Italy): 20-27;
- Silfverberg-Dilworth E., Matasci C.L., Van de Weg W.E., Van Kaauwen M.P.W., Walser M., Kodde L.P., Soglio V., Gianfranceschi L., Durel C.E., Costa F., Yamamoto T., Koller B., Gessler C. e Patocchi A. (2006). Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* 2: 202-224
- Simonton W., Robacker C., Krueger S., 1991 - A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 27: 211–218;
- Socol C. R., Scheidt G. N., Mohan R., 2008 - Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. - Universidade Federal do Paraná;
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 509-517
- Souto-Alves T., Vanusa Da Silva M., Alves De Almeida C.M., Oliveira Jordão Do Amaral D., Cordeiro Dos Santos D., Farias I., Tenório Sabino Donato V.M. e Da Costa A.F. (2009). Genetic diversity in cactus clones using ISSR markers. *Acta Horticulturae* 811: 55-58
- Sutter E., Langhans R. W., 1979 - Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104, 493-496;
- Sutter E., Langhans R. W., 1980 - Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. - *HortScience* 15, 429;
- Teisson C., Alvard D., 1999 - *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. - *Potato Res.*, 42: 499–504;

- Varshney R.K, Graner A. e Sorrells M.E. (2005).** Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55
- Wallace R.S. e Gibson A.C. (2002). Evolution and systematics. In: Nobel PS (ed) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, Berkeley, pp. 1-22
- Wang N., Zhang H., Nobel P.S., 1997 - Phloem-xylem water flow in developing cladodes of *Opuntia ficus-indica* during sink to source transition. - *J. Exp. Bot.*, 48: 675-682;
- Wang X., Felker P., Burrow M.D. e Paterson A.H. (1998). Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 3-14
- Wunsch A. e Hormaza J.I. (2002). Cultivar identification and genetic fingerprint of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 59-67
- Watt M. P., 2012 – The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. – *African Journal of Biotechnology*, v. 11 (76): 14025 – 14035;
- 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;
- Xie H., Sui Y., Chang F.Q., Xu Y. e Ma R.C. (2006). SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 2366-372;
- 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;
- Zoghalmi N., Chrita I., Bouamama B., Gargouri M., Zemni H., Ghorbel A., MLIKI A., 2007 – Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) in Tunisia – *Scientia Horticulture* 113, 134-141;