

Colture di cellule e tessuti vegetali: passato, presente e futuro

NELLO BAGNI

I recenti progressi nel campo della coltura *in vitro* di cellule e tessuti, cioè isolate dall'individuo e cresciute in apposite soluzioni nutritive in ambiente sterile, hanno trasformato questo campo di ricerca in uno dei più dinamici e promettenti della biologia vegetale. Le colture *in vitro* sono ora usate come strumento non solo per problemi di ricerca di base in fisiologia vegetale e genetica, ma anche in agricoltura, selvicoltura, orticoltura e nell'industria.

Le colture di cellule e tessuti hanno aumentato le nostre conoscenze in molti campi, inclusi la capacità di rigenerazione, differenziamento, nutrizione, metabolismo, radiobiologia e conservazione delle cellule.

Siamo infatti in grado di coltivare cellule in grande quantità partendo da singole cellule, di produrre piante da maristemi isolati, di indurre calli od anche singole cellule a sviluppare piante complete sia per mezzo dell'organogenesi o per sviluppo di embrioni *in vitro*. È anche possibile ottenere piante con differenti livelli di ploidia da colture di tessuti od endospermi, e di produrre aploidi usando raffinate tecniche di colture di embrioni dopo ibridazione interspecifica seguita dall'eliminazione dei cromosomi di uno dei genitori.

Questi sono solo alcuni dei numerosi esempi che provano l'importanza delle tecniche della coltura di cellule e tessuti nella ricerca.

Ma procediamo con ordine: cellule vegetali vengono coltivate *in vitro* sin dalla fine del secolo scorso, ma si deve a ricercatori quali White e Gautheret il loro sviluppo nell'immediato anteguerra. Un grosso impulso alle colture vegetali *in vitro* è stato dato nel 1958 quando fu dimostrato da Steward che, dati opportuni stimoli nutritivi ed ambientali, la cellula vegetale, nella fattispecie cellule del parenchima vascolare di carota, può generare

un organismo completo indistinguibile dall'organismo che si differenzia dall'uovo fecondato.

Numerose tecniche sono usate nella preparazione, manipolazione e studio degli espianti o delle colture di cellule, tecniche che dipendono dal tipo di tessuto e dalla finalità dell'esperimento. Una tecnica tipica, rappresentata nella figura 1, viene usata per la preparazione di espianti di carota e con sistemi analoghi per espianti di radici tuberizzate o tuberi quali patate o topinambour. La radice sterile è tagliata a fette di alcuni millimetri di spessore; da queste per mezzo di un foratappi si preparano cilindri di materiale contenenti alcune decine di migliaia di cellule. L'espianto così ottenuto è posto a crescere sulla superficie di un terreno agarizzato.

Quando si intende selezionare cellule mutanti con tecniche usate per i microrganismi, oppure quando si vuol preparare il materiale per la ibridazione somatica, cioè la fusione di due cellule vegetative, è possibile preparare cellule singole in quantità relativamente elevata, mediante la digestione enzimatica della lamella mediana e della parete cellulare. Un esempio è riportato nella figura 2 nella quale è rappresentata la preparazione di cellule singole e poi di protoplasti cioè di cellule prive di parete, dal mesofillo della foglia di tabacco. Dopo sterilizzazione superficiale della foglia di tabacco, si procede con l'aiuto di pinzette, alla rimozione dell'epidermide inferiore. La rimozione dell'epidermide è necessaria per permettere ad una soluzione di pectinasi di penetrare a fondo tra le cellule del mesofillo. In realtà tecniche più recenti messe a punto da ricercatori che operano nel Centro di Ispra della Comunità Europea hanno permesso di ottenere protoplasti dall'intera foglia, epidermide compresa e quindi

senza la necessità di asportare l'epidermide. Le cellule così liberate sono quindi raccolte mediante centrifugazione e trasferite in un terreno di coltura. Se facciamo agire anche certi tipi particolari di cellulasi, si distrugge anche la parete cellulare ottenendo così i protoplasti, i quali, posti in terreni di coltura isotonici, vi mantengono la loro integrità, rigenerano la parete cellulare ed iniziano a dividersi.

Tecniche identiche o simili a quelle illustrate nelle figure precedenti sono recentemente tornate di grande attualità ed hanno trovato un notevole sviluppo applicativo. Prende il nome di micropropagazione la capacità di ottenere un numero illimitato di piantine da un singolo meristema utilizzando la tecnica di coltura *in vitro*. L'uomo ha sempre fatto la propagazione per seme (moltiplicazione gamica) od agamica (pensate alle patate, alla moltiplicazione per talee od innesto). Quello che cambia è la quantità di piantine che può essere propagata: da 1 a 10 per mese, cioè 10^{10} - 10^{12} all'anno. Esistono diverse tecniche per ottenere queste piantine: o passando attraverso lo stadio di callo oppure direttamente. In quest'ultimo caso si fanno sviluppare, per azione della chinetina che sopprime la dominanza apicale, le gemme laterali formate alla base di ciascuna fogliolina. Il numero di gemme prodotte in tale maniera è illimitato. Se queste vengono isolate, esse possono formare altre gemme in presenza di chinetina o formare radici in sua assenza. Questa tecnica è stata perfezionata da Boxus (1974) in Belgio su piante di fragola. In 6-8 settimane la piantina iniziale si è trasformata in una massa di gemme in sviluppo senza radice e callo. Le gemme possono essere separate le une dalle altre, trapiantate su un nuovo terreno contenente chinetina, e in questo modo le gemme ascellari continua-

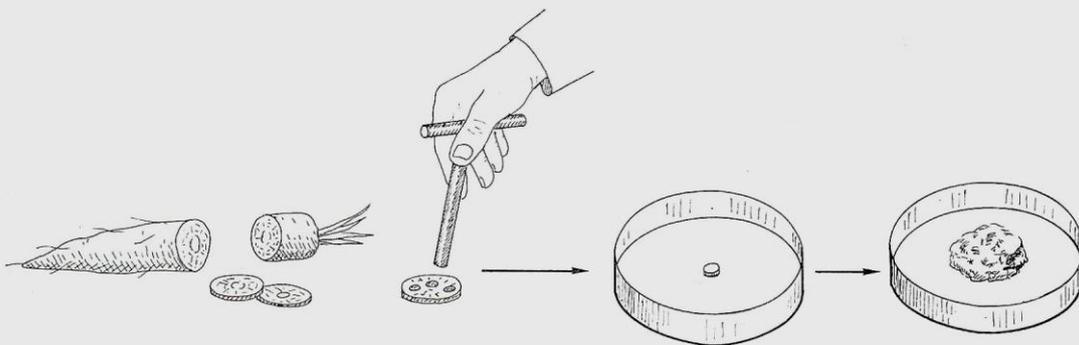
no a proliferare ed appaiono esternamente formate da tante piccole foglie semplici. Ma se vengono trapiantate su un mezzo senza chinetina, lo sviluppo di tali gemme cessa immediatamente e queste gemme producono giovani piante normali con radice e foglie trifogliate in 4-6 settimane. Con questo processo è possibile ottenere parecchi milioni di piante da una singola pianta madre in un anno. Le piante possono essere poi trapiantate nel terreno precedentemente sterilizzato, poste sotto plastica per alcuni giorni in particolare per evitare la disidratazione, poi possono essere esposte all'aria. La percentuale di attecchimento delle piante dalla provetta al suolo è superiore al 95%. Queste piante così ottenute crescono molto bene ed hanno una forte tendenza a produrre un gran numero di stoloni. Dall'uso di tali tecniche deriva tutta una serie di vantaggi:

1) possibilità di conservazione delle giovani piantine per parecchi mesi a temperatura ambiente (con trapianti anche ogni 6 mesi in certi casi) o in camera fredda prima del trapianto o prima della utilizzazione. In questo modo all'Università della California si sono conservate piantine di fragola per 10 anni.

2) Oltre ad avere un incremento di produzione, la tecnica *in vitro* della micropropagazione è particolarmente utile per avere piante sane esenti da virus, nematodi e principalmente funghi del suolo. I trattamenti fitosanitari coi metodi tradizionali non offrono tale sicurezza.

3) Inoltre la micropropagazione *in vitro* permette più facilmente di pianificare la

Fig. 1. Preparazione di espianti dalla radice di carota allo scopo di iniziare colture di cellule indifferenziate su terreni solidi.
(da Sala e Cella)



produzione. Milioni di piantine possono essere prodotte in un anno da poche piante madri e messe nel terreno al momento opportuno. La conservazione e spedizione di piantine in contenitori di plastica apre nuove prospettive che riducono moltissimo le spese di spedizione. Tant'è vero che a distanza di pochi anni (cioè dal 1974) siamo già ad un ottimo livello industriale per quanto riguarda la fragola e già da tre anni operano nella regione Emilia-Romagna due laboratori, uno pubblico e uno privato, che riforniscono di piante i produttori agricoli. Sistemi analoghi vengono ora utilizzati per la moltiplicazione di piante da frutto quali per esempio ciliegio, bergamotto e clementine.

Anche le piante forestali, sia caducifoglie che perenni, data la continua domanda mondiale di prodotti legnosi, vengono attentamente considerate al fine di una loro propagazione industriale. L'Italia che, come è noto, è debitrice con l'estero per importazione di legname, pari all'80% del materiale necessario alle attività industriali ed artigianali, ha particolarmente bisogno di una tecnologia come quella della coltura di tessuti che possa sopperire efficacemente od affiancare quella della propagazione vegetativa dove questa è già in atto con successo. A questo ha pensato l'Azienda Regionale delle Foreste dell'Emilia-Romagna che ha promosso recentemente (luglio 1980) un programma pluriennale di ricerca e sperimentazione su alcune specie forestali di alto valore tecnologico e di rapido accrescimento al fine di potere trasferire le informazioni e le tecnologie necessarie sul piano dell'applicazione pratica. Tale ricerca verrà svolta congiuntamente dal laboratorio operante presso l'Istituto Botanico dell'Università di Bologna e dal Laboratorio per la moltiplicazione *in vitro* delle piante ortofrutticole della Centrale Ortofrutticola di Cesena.

Degna di menzione è inoltre l'intensa attività che da tempo si sta conducendo in floricultura, mi riferisco in particolare alla preparazione di garofani esenti da virus e più di recente alla propagazione di orchidee, della gerbera, di alcune felci e di altre specie ornamentali ed, all'estero, alla propagazione di canna da zucchero e di altre piante di interesse agrario (caffè, cacao, ecc.).

Gli sforzi di numerosi biologi vegetali che operano nel campo agrario sono indirizzati a

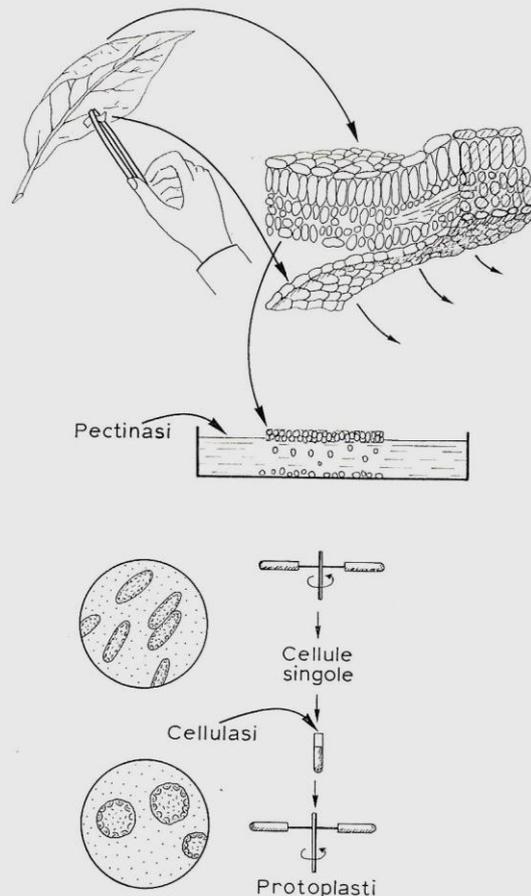


Fig. 2. Preparazione di cellule singole e di protoplasti dal mesofillo della foglia di tabacco. Giovani foglie, opportunamente sterilizzate con ipoclorito di sodio, vengono private della epidermide inferiore in modo da permettere l'ingresso della pectinasi e della cellulasi negli spazi intercellulari. Le cellule ed i protoplasti che si liberano possono essere isolati mediante centrifugazione frazionata. (da Sala e Cella)

livello mondiale verso lo studio dei processi di sviluppo delle piante di notevole interesse agrario. Una conferenza internazionale tenuta all'Università di Michigan (1975) e più di recente un altro convegno scientifico internazionale tenutosi a Smirne (Turchia) nel settembre 1978, si sono occupate del rapporto tra crescita e sviluppo dell'agricoltura mondiale nel 2000, discutendo quello che i ricercatori potranno fare nell'immediato futuro per risolvere i problemi della produttività vegetale in relazione all'incremento della popolazione mondiale. Nella figura 3, tratta dalla

pubblicazione degli atti della conferenza tenutasi nel Michigan è esposto, in grafico, quella che sarà la richiesta di cibo nel 2000 per la popolazione mondiale. Una delle raccomandazioni che sono emerse dalle conclusioni di questa conferenza indica la tecnica delle colture come fondamentale:

- 1) al fine di accelerare il miglioramento genetico delle piante di interesse agrario,
- 2) per identificare e valutare i meccanismi che controllano lo sviluppo della pianta;
- 3) per determinare le basi genetiche e fisiologiche della risposta agli stress ambientali.
- 4) per la conservazione del germoplasma (cioè di una data varietà senza modificazioni) e nello stesso tempo per la utilizzazione al momento opportuno delle potenzialità di variabilità genetica mediante ibridazione,
- 5) per potenziare la ricerca di base.

Quest'ultima voce non deve meravigliare perché anche se in molti campi si è già in fase applicativa, ancora sono carenti numerose informazioni circa la comprensione nel

dettaglio della genetica, biochimica e fisiologia delle piante agrarie.

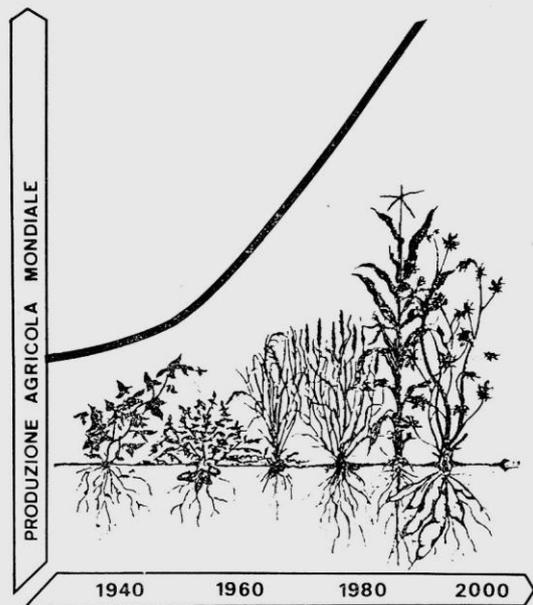
Questo è quanto si sta facendo adesso.

Ma quali saranno le applicazioni delle colture di tessuti nel futuro? Direi che il futuro immediato è perlomeno già cominciato. Innanzitutto è stata fatta una serie di prove per tentare di far integrare nel genoma delle cellule di piante superiori di interesse agrario, che non siano leguminose, i geni che codificano per la nitrogenasi, cioè l'enzima responsabile della fissazione dell'azoto atmosferico, o secondariamente per tentare di riprodurre le simbiosi che avviene in natura tra il batterio *Rhizobium leguminosarum* e le diverse leguminose che sono le sole piante coltivate in grado di sfruttare l'azoto fissato dai batteri. Questo vorrebbe dire enorme risparmio economico di sali di azoto, nitrati in particolare, ed enorme riduzione di inquinanti nel terreno con benefici riflessi ecologici. Si sta lavorando attivamente in tale senso e si spera di ottenere risultati nell'immediato futuro.

Un altro aspetto della ricerca più avanzata è la fusione tra cellule di piante di specie e talora di genere diversi per ottenere nuove piante più utili dal punto di vista economico. Sono già stati ottenuti brillanti risultati (mi riferisco per esempio ai nuovi tipi di agrumi che si trovano ora in commercio). Mi voglio solo soffermare su un aspetto dei più clamorosi pubblicato dal prof. Melchers nel 1978, un famosissimo biologo vegetale tedesco, il quale dalla fusione di protoplasti provenienti da cellule vegetative di patata e di pomodoro ha ottenuto una pianta in coltura *in vitro* che poi, messa a dimora, ha prodotto patate (per la verità più piccole di una comune patata) e pomodori (più bruschi dei soliti). Gli è stato anche dato il nome inglese di «topeto». Questa fusione potrebbe dare luogo a una nuova specie e permetterebbe di ridurre della metà, ove la produzione venisse migliorata, le superfici coltivate di queste due piante.

Sul futuro più lontano è difficile fare previsioni. Per adesso si sconfinava apparentemente nella fantascienza. Ad esempio un saggio di questo potrebbe essere la fusione tra cellule umane e cellule vegetali, di carota, operata da un altro famoso biologo svedese di origini portoghese: Antonio Lima de Faria, notizia comparsa ai primi del 1979. C'è da dire che in questo caso come in altri di fusione a-

Fig. 3. Incremento della produttività agraria mondiale negli ultimi decenni fino al 2000.



nomala come quella tra cellule di uomo e topo, si assiste ad una serie di moltiplicazioni cellulari durante le quali si eliminano i cromosomi umani e rimangono solo quelli del topo. Questi esperimenti, è bene precisare, non vengono fatti per creare mostri, ma perché l'eliminazione di cromosomi è uno dei mezzi più efficaci per analizzare il patrimonio ereditario dell'uomo. Probabilmente anche questo esperimento serve per chiarire quali sono le sostanze comuni alle cellule fuse, comunque finora non ha portato alla formazione di nessun individuo. Gli esempi riportati, hanno aperto degli spiragli sulle enormi possibilità che offrono queste tecniche ed, anche esulando dal campo dell'applicazione in agricoltura, hanno mostrato quali enormi responsabilità abbia il biologo che opera con queste tecniche, tanto che un certo tipo di ricerca, almeno negli Stati Uniti, è stata posta sotto il controllo del Governo Federale per

tutta una serie di problemi etici e politici che essa comporta (1).

(1) A coloro che desiderassero approfondire questo tema si consiglia:

1) F. SALA e R. CELLA, *Culture di Cellule Vegetali: metodi ed applicazioni*; Quaderni di Biologia, Serie Verde n. 1, Piccin Editore, 1976.

2) Tecniche di colture *in vitro* per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole; Atti dell'incontro di Pistoia, 6 ottobre 1979 (edito dalla S.O.I., Firenze).

3) *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978*; Ed. T. A. Thorpe, I.A.P.T.C. 1978, Canada.

L'Autore:

Nello Bagni, Ordinario di Botanica nell'Università di Bologna.
