



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

Ottimizzazione di protocolli di micropropagazione e
rigenerazione *in vitro* di due varietà di mora (*Rubus fruticosus* L.)
Optimization of proliferation and *in vitro* regeneration protocols of
two blackberry cultivars (*Rubus fruticosus* L.)

Tesi di Laurea di:

LUCIA IOCOLI

Relatore:

PROF. FRANCO CAPOCASA

Correlatore:

DOTT.SSA SILVIA SABBADINI

CO-CORRELATORE:

DOTT.SSA ANGELA RICCI

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

Sommario

1. INTRODUZIONE	4
1.1 La mora	4
1.1.2 Foglie, fiori e frutti della pianta di mora	5
1.1.3 More unifere o rifioventi	6
1.1.4 Classificazione varietale: Loch Ness e Loch Tay	7
1.2 Dati commerciali sulla mora	9
1.3 Tecniche di propagazione delle more	10
1.3.1 Micropropagazione	11
1.3.2 Fasi del processo	14
1.3.3 Substrati di coltura	17
1.4 Tecnica della rigenerazione da tessuti vegetali	20
2. SCOPO DELLA TESI	22
3.MATERIALI E METODI	23
3.1 Materiale vegetale	23
3.2. Influenza della gibberellina GA₃ sull'efficienza di propagazione di Loch Ness e Loch Tay	24
3.3. Approccio generale per la rigenerazione di Loch Ness e Loch Tay usando foglie e piccioli come espianti di partenza	26
3.4. Influenza di diverse concentrazioni e combinazioni ormonali sull'efficienza di rigenerazione di Loch Ness e Loch Tay utilizzando foglie e piccioli come espianti di partenza	28
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	29
4.1 Influenza della gibberellina GA₃ sull'efficienza di propagazione di Loch Ness e Loch Tay	29

4.2 Influenza di diverse concentrazioni e combinazioni ormonali sull'efficienza di rigenerazione di Loch Ness e Loch Tay utilizzando foglie e piccioli come espianti di partenza.....	32
5. CONCLUSIONI.....	41
6. BIBLIOGRAFIA.....	43

1. INTRODUZIONE

1.1 La mora

La **mora** o mora di rovo (*Rubus fruticosus* L.), appartenente alla famiglia delle *Rosaceae*, è un arbusto famoso per il suo frutto che è commercializzato in tutto il mondo per il suo gusto delizioso, il sapore gradevole e profilo nutrizionale. Si ritiene che l'arbusto abbia la sua origine in Armenia e ora è distribuito ovunque in Europa, Asia, Oceania e Nord e Sud America (Mihammad Zia-Ul-Haqet al., 2014).

Il rovo è una ceppaia perenne, arcuata, con fusto sotterraneo trasformato in un rizoma e la parte aerea costituita da fusti annuali e biennali. Cresce bene in terreni irrigati, leggeri e freschi ed è meno tollerante al freddo rispetto al lampone. Per questo motivo viene coltivata in zone a clima temperato-continentale e cresce e fruttifica bene su terreni al riparo dai venti freddi, sui pendii esposti a sud e in zone con sufficiente umidità.

L'apparato radicale è ben sviluppato ed è formato da radici principali tozze e rizomatose, mentre quelle secondarie sono superficiali e fascicolate; la maggior parte si trovano nello strato di terreno a profondità di 50 cm. Le radici sono forti, ben fissate nel terreno e sparse su una vasta area intorno alla pianta. Le piante di mora hanno gemme sulle radici, che consentono di propagarsi per propaggine (o capogatto).

L'arbusto è composto da numerosi germogli che hanno una durata biennale. Questi germogli sono in continuo rinnovamento ed espansione. Quelli con un anno di età sono chiamati *polloni*, mentre quelli di due anni sono i *tralci fruttiferi*. I polloni hanno una colorazione verde chiaro e sono ricoperti da piccole spine. A piena maturazione raggiungono una lunghezza superiore ai tre metri. Possono essere *radicali*, se generati da gemme poste lungo le radici o *del colletto* se sorgono alla base della pianta.

1.1.2 Foglie, fiori e frutti della pianta di mora

Le foglie sono imparipennate o palmate composte, con 3-5 foglioline, che diminuiscono di dimensioni dalla punta alla base della foglia. Il margine fogliare è finemente seghettato. Il picciolo è lungo 5-7 cm e può o meno presentare spine che si trovano, a seconda della varietà, sulla nervatura centrale, fino alla punta della foglia. In fondo alla foglia sono presenti due piccole stipole (volantini). La faccia superiore è verde scuro mentre quella inferiore è verde più chiaro.

I fiori sono ermafroditi, costituiti da cinque sepali, cinque grandi petali di vario colore (dal bianco al rosa) ed elevato numero di pistilli e stami. Il nettare si produce alla base del fiore e la sua secrezione inizia prima che i petali si aprano e continua finché non cadano. Questa specie ha impollinazione entomofila, operata da api e altri insetti impollinatori. Il polline è tuttavia molto leggero e quindi l'impollinazione può essere anche anemofila, ossia può avvenire grazie al vento. Ogni cima contiene 8-80 fiori che sbocciano in modo sfalsato: la fioritura inizia dalla sommità dello stelo e progredisce verso il basso, durando per circa tre settimane. infatti, i fiori sono prodotti dalla tarda primavera all'inizio dell'estate su brevi racemi.

La caratteristica della mora è che si tratta di un frutto aggregato composto da diverse drupe poste attorno ad un piccolo, conico, ricettacolo che a maturità si stacca dalla pianta insieme al frutto. Ogni drupa contiene un seme. La forma del frutto può essere sferica, conica o cilindrica e il colore è generalmente nero e lucido, con rivestimento ceroso; tuttavia, esistono delle varietà di more rosse o rosso- scure. La maturazione avviene a partire da giugno fino a metà agosto e sono state suddivise in precoci (inizio giugno), medie (da fine giugno a metà-fine luglio) e tardive (da fine luglio a metà settembre). La differenza tra mora e lampone, un'altra specie appartenente al genere *Rubus*, è presente nelle caratteristiche del frutto: un esempio è il ricettacolo del lampone, che al momento della raccolta, rimane sulla pianta, creando il nocciolo cavo del frutto. un'altra distinzione è la presenza di tricomi (peli): le drupe del lampone sono pelose, quelle delle more sono glabre, lisce e più lucide (Ciorchină Nina et al., 2017).

1.1.3 More unifere o rifioventi

La pianta di mora in base all'epoca e al tipo di fruttificazione, si distingue in due gruppi: unifera e rifiovente (bifera) (Morgan Diemoz, 2013).

Il **rovo unifero** ha un ciclo di produzione che avviene a cavallo di due anni. Nel primo anno c'è l'accrescimento vegetativo dei polloni, che a fine autunno sono completamente lignificati. Durante il secondo anno, invece, a partire dalla primavera, i polloni diventano tralci fruttiferi che originano ramificazioni laterali. Questi vanno a frutto durante l'estate. In autunno/inverno i tralci fruttiferi seccano e vengono rimpiazzati da nuovi polloni. Le varietà coltivate di mora sono prevalentemente unifere.



Figura 1- Ciclo biologico del rovo unifero

Anche il **rovo rifiovente** ha un ciclo produttivo di due anni, ma con la differenza che i polloni possono fruttificare due volte. La prima volta nella parte apicale, alla fine della stagione di crescita, ossia in autunno, e una seconda volta nella parte sottostante l'apice vegetativo, nell'estate dell'anno successivo. La pianta in questo caso produce due volte all'anno. Varietà di mora rifioventi sono molto limitate e ancora non molto diffuse perchè con scarse caratteristiche produttive e qualitative. Questo è determinato dalla difficoltà di riuscire a combinare con le tecniche di miglioramento genetico tradizionale i caratteri produttivi e qualitativi con il carattere rifiovenza. In questo ambito risulta interessante riuscire ad applicare nuove tecniche biotecnologiche utile a modificare l'habitus vegeto-riproduttivo delle varietà di mora unifere con le migliori caratteristiche produttive e qualitative.

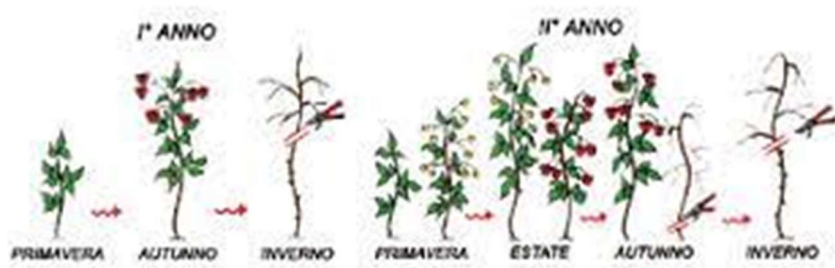


Figura 2- ciclo biologico del rovo rifiorante

1.1.4 Classificazione varietale: Loch Ness e Loch Tay

L'intero lavoro svolto in questa tesi si è concentrato su due cultivar di mora: Loch Ness e Loch Tay, se ne riporta di seguito una breve descrizione.

Attualmente si conoscono circa 300 varietà e cultivar di mora: le più apprezzate sono il risultato di un intenso lavoro di miglioramento genetico che ha portato, negli ultimi 20 anni, alla realizzazione di oltre 50 nuove cultivar in programmi di selezione sviluppati in Usa, Canada, Australia, Nuova Zelanda, Polonia, Serbia, Svezia, e Regno Unito. Le varietà di mora sono tutte unifere e si distinguono, in base al portamento, in striscianti, erette e semierette; sono per lo più tetraploidi e provengono da selezione e ibridazione di numerose specie di *Rubus*. In Europa, e in particolar modo in Italia, sono oggetto di maggior interesse le cultivar inermi erette e semierette perché facilitano le operazioni colturali e la raccolta. Gli attuali lavori di miglioramento genetico riguardano: resistenza al freddo, livello di autofertilità, precocità di maturazione, alta produttività e resistenza alle principali malattie. Per il frutto, invece, vengono ricercati: grossa pezzatura, buone caratteristiche organolettiche, moderata acidità, semi di piccole dimensioni, resistenza al trasporto e permanenza del colore dopo scongelamento.

Oggetto di studio di questa sperimentazione sono Loch Ness e Loch Tay, due cultivar ibride ottenute da selezioni di *Rubus* in Scozia. Sono acuminate dall'assenza di spine e dal portamento semi eretto, ma differiscono nell'epoca di maturazione.

Loch Ness: originaria del Regno Unito, è una varietà senza spine. Produce frutti molto grandi che sono neri e lucidi. È caratterizzata da un'elevata produttività e predilige zone molto soleggiate. La cultivar è vigorosa, i suoi germogli sono lunghi, semi eretti e possono crescere fino a 3-4 m. È resistente al gelo, ma può risentire a basse temperature se il legno non è ben lignificato in inverno. La pianta è resistente alle malattie, in particolare alla *Botrytis*, all'oidio e alla ruggine, ma è vulnerabile alla peronospora quando c'è troppo calore e umidità. Si adatta bene ai vari tipi di terreno. I frutti sono di media pezzatura a forma di cono, sodo e si conservano bene anche da congelati, per questo sono adatti al commercio. Le drupe maturano uniformemente e hanno spiccate proprietà organolettiche. I frutti vengono raccolti da fine luglio a settembre.

Loch Tay: ottenuta nel Regno Unito, è un arbusto rustico e vigoroso senza spine, con tralci molto lunghi che emettono polloni alla base e portamento semi eretto. L'apparato radicale è molto superficiale e fascicolato. Fiorisce in maggio-giugno con infiorescenze a forma di roselline e fruttifica precocemente (all'inizio di luglio), con grosse bacche ellittiche di colore rosso che diventano nere lucide a maturazione e di sapore dolce/acidulo. Si propaga molto facilmente per capogatto e l'eccessiva vigoria può intralciare le operazioni colturali. Ama molta luminosità e cresce bene in pieno sole, abbastanza resistente ai freddi invernali, alle brine tardive e a periodi di lunga siccità. Predilige un terreno fresco, di medio impasto anche calcareo. In inverno si tagliano i tralci vecchi che hanno prodotto lasciando solamente 4/5 tralci nuovi ai quali andrà fornito un sostegno, da questi si avrà la produzione l'anno seguente. Va irrigato regolarmente per ottenere delle buone fruttificazioni e non necessita di particolari concimazioni.

1.2 Dati commerciali sulla mora

La mora è il nome comune dato al frutto di diverse varietà del genere *Rubus* che rientrano nella categoria commerciale **come frutti di bosco o piccoli frutti**. Si è notato come negli ultimi anni ci sia stato un incremento di produttività, sia a livello italiano che europeo, di questa categoria di frutta. L'espansione della coltivazione della mora si è avviata grazie al contributo di diverse cooperative e gruppi produttori interessati ad aumentare la disponibilità del prodotto fresco per tutto l'anno. La sua produttività è molto legata alle regioni del nord anche se negli ultimi anni si è avuta un'ampia diffusione nelle regioni del Sud (Basilicata, Campania, Calabria e Sicilia).

La redditività di questa coltura è legata alla tipologia di impianto scelto, dalla scelta varietale operata, dalla zona pedo-climatica di produzione e dalla finestra di mercato in cui il prodotto viene immesso. Anche l'obiettivo di mercato fa variare notevolmente il calcolo dei costi: produrre per il mercato fresco richiede da un lato spese elevate di programmazione degli impianti, specie se programmati, di manodopera impiegata nella raccolta, di conservazione del prodotto. D'altro canto, produrre per l'industria richiede, accanto ad un abbattimento dei costi di produzione e raccolta, elevati e consistenti quantitativi, modalità di certificazione e tracciabilità non irrilevanti (Giongo, 2013).

Da sempre le more sono considerate un punto debole del comparto, perché sono un prodotto troppo delicato, destinate ad una vita post-raccolta molto breve, difficili da gestire sia in fase di produzione che di distribuzione. Ecco perché si punta sempre di più a nuove varietà che hanno caratteristiche migliori rispetto a quelle attualmente diffuse sul mercato e che si dimostrano particolarmente promettenti. Infatti, i risultati ottenuti sono un incremento della produttività del 30% e prolungamento della vita post-raccolta (shelf life) da 2 a 5 giorni.

1.3 Tecniche di propagazione delle more

In ambiente vivaistico, la mora può essere riprodotta o con metodi di propagazione asessuale e quindi attraverso propaggine, talea di radice, talea erbacea o può essere propagata molto efficacemente anche *in vitro*, attraverso la micropropagazione (Botez et al., 1984)

Tra le tecniche comunemente adottate in vivaio per la propagazione agamica vi è la **propaggine**, attraverso la quale si moltiplicano le piante per via agamica. Si tratta di una tecnica molto simile alla margotta, ma si differenzia nettamente dall'innesto e dalla talea. Si esegue incurvando un ramo, il quale viene interrato per un certo tratto, in modo che metta nuove radici (radici avventizie) da porzioni di pianta (rami vegetativi) ancora attaccate alla pianta madre. Il *capogatto* è una variante della propaggine, ed è una tecnica conosciuta anche come propaggine apicale. Si tratta dell'unico caso di tecnica di riproduzione agamica che non richiede il rispetto della polarità del germoglio, il quale viene interrato capovolto. Questa tecnica si pratica su rami di un anno, piegati e interrati di punta fino a 10-15 cm di profondità. Il capogatto si fa in autunno, in inverno la nuova pianta emette radici e in primavera si opera il distacco dalla pianta madre.

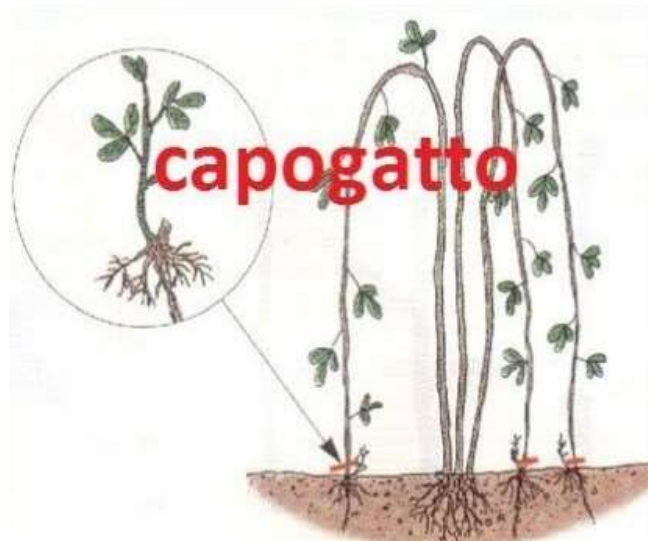


Figura 3- Propagazione della mora attraverso la tecnica del capogatto

Da queste tecniche tradizionali, però, si ottengono un basso numero di propaguli, ecco perché Broome e Zimmerman nel 1978 hanno segnalato alcuni svantaggi dei metodi di propagazione

tradizionali: ad esempio, la propagazione richiede una piantagione considerevole, sono disponibili pochi interventi per la pianta e risulta un problema il controllo delle erbe infestanti. La propagazione da talea non sempre è soddisfacente e richiede molta cura per una produzione vegetale di successo.

Ecco perché oggi per le piante di mora si punta sempre di più a tecniche innovative che hanno l'obiettivo di produrre piante nuove, sane e destinate al commercio.

1.3.1 Micropropagazione

Altra tecnica efficiente e oggetto di studio di questa sperimentazione è la micropropagazione *in vitro*. La moltiplicazione *in vitro* della mora è stata studiata da molti ricercatori (Gajdosova et al., 2006); Meng, 2004; Mihalache, 1996; Zawadska M. e T. Orlikowska 2006) ed è comunemente usata in commercio. È un metodo eccellente per introdurre rapidamente nuove cultivar nel mercato e per fornire materiale di piantagione pulito per una successiva propagazione più convenzionale. La micropropagazione delle more di solito viene eseguita con la proliferazione dei germogli con conseguente radicamento di quest'ultimi su terreni di coltura. Da lavori precedenti su cultivar di *Rubus* (Reed 1990) si è visto che il 69% dei genotipi di mora ha proliferato con successo su sali basali di Murashige and Skoog integrati con citochinine e auxine, ormoni che contribuiscono a indurre, in base alla concentrazione, la proliferazione dei germogli. Secondo alcune ricerche, la citochinina più comunemente utilizzata è BAP con concentrazioni che vanno da 1 a 2 mg L⁻¹, invece le auxine più usate sono IBA con concentrazione da 0,1 a 1 mg L⁻¹ o 0,1 mg L⁻¹ di NAA (Broome and Zimmerman, 1978; Compton and Preece, 1988; Fernandez and Clark, 1991; George, 1996; Harper, 1978; Reed, 1990; Skirvin et al., 1981; Slivinski et al., 1984).

Nello specifico, con il termine micropropagazione si intende una tecnica di propagazione *in vitro* che consiste nella moltiplicazione vegetativa di piante attraverso la coltura di loro espianti (organi, tessuti o cellule), in condizioni di sterilità, ricorrendo a substrati nutritivi di composizione nota ed usufruendo di condizioni ambientali controllate dal punto di vista termico e luminoso. Questa tecnica sfrutta quindi la totipotenza poiché si basa sulla capacità rigenerativa propria delle cellule vegetali di riprodurre tessuti e organi completi e funzionali a partire da porzioni (espianti), generando piante geneticamente identiche tra loro e alla pianta

madre. Il vantaggio principale della micropropagazione risiede nella possibilità che offre di ottenere elevate quantità di piantine

complete di apparato caulinare e radicale, uniformi nello sviluppo ed omogenee come costituzione genetica, anche disponendo di materiale iniziale molto limitato. Tutto ciò risponde perfettamente alle esigenze di un moderno vivaismo, per il quale riveste sempre maggiore interesse la possibilità di compensare l'aumento dei costi con l'applicazione di tecnologie innovative che consentano la produzione e la diffusione rapida di materiale geneticamente uniforme e ad alto valore agronomico, paesaggistico o ornamentale.

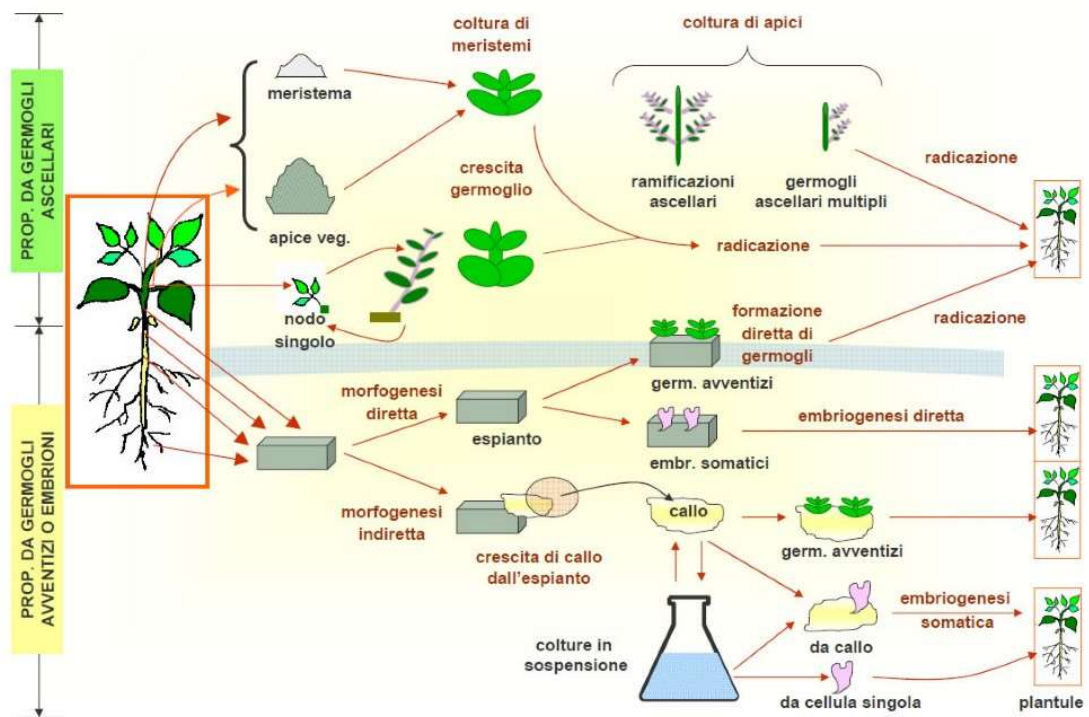


Figura 4- La coltura in vitro dei tessuti vegetali: schematizzazione dei diversi tipi di tessuti e processi di differenziazione che si possono adoperare.

Nei confronti delle tecniche tradizionali di moltiplicazione vegetativa la micropropagazione presenta alcuni vantaggi come:

- La necessità di mantenere un numero limitato di piante madri, consentendo una maggiore facilità di gestione in campo;
- La possibilità di propagare il materiale vegetale indipendente dall'andamento stagionale, programmando così le produzioni in base alle esigenze del mercato;
- La possibilità di moltiplicare specie o particolari genotipi che presentano difficoltà ad essere propagati con le tecniche tradizionali;
- La capacità di fornire elevate produzioni in spazi limitati e in tempi contenuti;
- Garanzia di uniformità genetica delle nuove piante rispetto alla pianta madre;
- Riproduzione di piante virus esenti;
- Conservazione del germoplasma di una specie, cioè di quei genotipi che per vari motivi non sono più utilizzati, ma depositari di caratteri genetici molto importanti, invece di essere raccolti in collezioni di pieno campo possono essere conservati *in vitro* e in uno spazio piccolo;
- Garanzia di una ridotta variabilità genetica.

Esistono però limitazioni nell'applicazione della coltura *in vitro*. Gli svantaggi principali sono rappresentati da:

- Alti costi per le attrezzature richieste;
- Richiesta di personale qualificato e specializzato per lavorare in ambiente asettico e controllato;
- Rischi di ottenere variazioni genetiche non controllabili nel materiale di propagazione;
- Rischi di ottenere piante vitrescenti o necrotiche inutilizzabili;
- Diffusione di patogeni, come batteri, funghi e virus.

1.3.2 Fasi del processo

Prelievo dell'espianto: il materiale vegetale deve essere selezionato prima che la micropropagazione vera e propria cominci.

Una micropropagazione di qualità è chiaramente legata alla disponibilità del materiale vegetale omogeneo già nella fase iniziale del processo, questo è garantito in caso di piante madri certificate.

È definita pianta madre qualsiasi pianta dalla quale si fa un piccolo prelievo vegetale da propagare, una pianta madre è quindi la fonte primaria per qualsiasi tipo di propagazione. Dobbiamo conoscere quali caratteristiche vogliamo ottenere nei cloni che quindi devono essere presenti nella pianta madre. A questo punto, la scelta della fonte di espianto è fatta ispezionando ogni singola pianta per individuare i caratteri che vogliamo nelle generazioni successive, ma anche per controllare l'assenza di malattie e sintomi virali.

La base di partenza del processo di micropropagazione è l'espianto, porzione di pianta che può essere rappresentata dal solo meristema apicale oppure l'apice vegetativo di un germoglio o una gemma dormiente. La scelta dell'espianto è fondamentale per l'ottenimento di piantine sane e vigorose. In generale i tessuti giovani hanno una capacità di accrescimento maggiore rispetto a tessuti più maturi e adulti. I tipi di espianto possono essere vari e in generale più piccolo sarà più accurata deve essere la tecnica e la strumentazione con cui si opera, in particolare se si tratta di meristemi apicali.

Impianto della coltura: obiettivo di questa fase è porre in coltura un espianto sterile. Due sono i passaggi fondamentali: i) la sterilizzazione del materiale vegetale, e ii) la messa in coltura.

Sterilizzazione: una delle caratteristiche principali della micropropagazione è rappresentata dalle condizioni di totale sterilità in tutte le fasi di coltura in cui si opera. La sterilizzazione serve per eliminare microrganismi che comprometterebbero la sopravvivenza *in vitro* dell'espianto. Gli inquinanti sono rappresentati da funghi, muffe, batteri, lieviti e altri microrganismi che sono presenti dovunque, anche se non percepiti a occhio nudo dall'operatore. Le spore di questi microrganismi viaggiano nell'aria e si depositano sia nella superficie delle piante, sia nelle mani o nei capelli degli operatori, o nei piani di lavoro, come spore in fase di riposo, una volta inseriti nel terreno di coltura, molto ricco di saccarosio, trovano un ambiente ideale per il loro sviluppo.

Per sterilizzare gli espianti sono utilizzati diversi principi attivi e la scelta di uno o l'altro dipende dal tipo di espianto (erbaceo o legnoso), delle condizioni di allevamento della pianta madre e dallo stato fitosanitario. Tra i principali principi attivi più utilizzati abbiamo l'ipoclorito di sodio alla concentrazione dell'1%, l'etanolo al 70% e l'acqua ossigenata al 10%. Il tipo di disinfettante usato, la concentrazione, il tempo di esposizione (da 1 a 30 min) varieranno in funzione della sensibilità dei tessuti e della difficoltà di sterilizzazione (Trigiano et al.,2003)

Maggiore è la durata più efficace sarà la sterilizzazione, tuttavia tempi d'impiego troppo lunghi possono causare danni ai tessuti. In ogni caso nella fase finale, prima di essere sezionato e posto nel mezzo di coltura, l'espianto è risciacquato 2 o 3 volte in acqua distillata sterile, per eliminare eventuali residui dell'agente sterilizzante. I contenitori di vetro, destinati all'inoculo del materiale trattato, devono essere sterilizzati anch'essi in autoclave insieme al substrato a una temperatura di 120 °C per un tempo di 15-20 minuti.

Messa in coltura: gli espianti sterilizzati vengono posti all'interno di tubi di coltura in vetro, singolarmente e in condizioni di asepsi e poi spostati in camera di crescita.

Una volta messi in coltura, si potrà notare la presenza di inquinamenti nel caso il protocollo di sterilizzazione non abbia avuto successo, allora le colonie di inquinanti compariranno sulla superficie dell'agar entro pochi giorni, sotto forma di film opaco o colonie variamente colorate o con miceli e spore neri. Ecco perché in questa prima fase è importante non solo disinfettare chimicamente il materiale vegetale, ma anche avere norme comportamentali igieniche sulla persona e sulle attrezzature (pulizie delle mani e dei piani di lavoro con disinfettante o alcool etilico, pulizia degli strumenti con calore). Questa fase di impianto ha una durata di circa 15-30 giorni e successivamente le colture che non hanno manifestato segni di inquinamento verranno sottoposte alla successiva fase di moltiplicazione. I germogli, quindi, vengono posti in camera di crescita. All'interno della camera di crescita ci sono parametri che vengono tenuti sotto controllo quali fotoperiodo, intensità luminosa e temperatura. il fotoperiodo è generalmente di 16 ore di luce e 8 di buio e la temperatura è di 24°C.

Moltiplicazione: nella fase di moltiplicazione o proliferazione lo scopo è quello di aumentare considerevolmente il numero dei germogli attraverso diverse subcolture la cui durata dipende dalla specie in esame ma che generalmente prevedono trasferimenti su substrati di crescita freschi con intervalli di 15-30 giorni. In questa fase i germogli vengono suddivisi ed allevati in contenitori da 500 ml di volume (vasi di coltura) nei quali vengono collocati un numero variabile di germogli provenienti dalla fase di impianto. In base al tipo di specie cambia anche

la tecnica con la quale i germogli sono trasferiti sul nuovo substrato e il tasso di proliferazione. Importante in questa fase è la frequenza con cui si rinnova il substrato e il taglio alla base del germoglio in maniera di massimizzare l'assorbimento dei nutrienti evitando di fare invecchiare i germogli e limitarne la proliferazione.

In genere la fase di moltiplicazione è strettamente correlata alla concentrazione di citochinine nel substrato di crescita, che influenza il tasso di moltiplicazione, la lunghezza dei germogli e la frequenza di variazioni genetiche. Normalmente il tasso di moltiplicazione aumenta con l'aumentare del livello di citochinina, ma in alcuni casi sono frequenti germogli di dimensioni ridotte e fenomeni di vitrescenza. Essa, anche chiamata iperidricità o vitrescenza, è un'alterazione morfologica che causa la morte e quindi impedisce l'acclimatamento delle piantine, che assumono un aspetto anormale, acquoso, vetrificato. Le foglie vitrescenti hanno un aspetto opalescente, traslucido, di colore verde pallido, di consistenza fragile e vitrea. Le cause di questo fenomeno sembrano collegate all'eccessiva disponibilità di acqua nel substrato (Ziv,1990).

Radicazione: Dopo aver subito il processo di moltiplicazione i germogli vengono fatti allungare in preparazione alla radicazione. In questa fase vengono trasferiti su substrato di crescita in cui la concentrazione di citochinina viene considerevolmente ridotta per favorire la distensione cellulare e quindi l'allungamento dell'asse dei germogli formati durante lo stadio di moltiplicazione. Lo scopo è quello di ottenere materiale omogeneo e facilmente manipolabile. La fase di radicazione è l'ultima fase che precede l'ambientamento delle plantule alla crescita *in vivo*. In apposito substrato di crescita, in cui l'ormone principale è l'auxina, i singoli germogli saranno sottoposti ad un periodo in cui dovranno differenziare radici ed allungarsi. L' induzione all'emissione dell'apparato radicale è generalmente ottenuta variando le concentrazioni della componente ormonale, aumentando le auxine e diminuendo le citochinine contenute nei terreni di coltura al fine di raggiungere un alto rapporto auxine/citochinine.

Ambientamento: Quando le piantine sono complete e autotrofe devono essere trasferite dalla condizione asettica *in vitro* a quella normale di pieno campo. Tale trasferimento è graduale e prevede una fase di ambientamento affinché le piantine possano riacquisire le funzioni necessarie alla condizione *ex vitro*. Le piantine vengono mantenute in condizioni di costante umidificazione, evitando sbalzi termici e ponendo particolare attenzione allo stato fitosanitario poiché i tessuti ancora molto acquosi sono particolarmente suscettibili agli attacchi parassitari. Il graduale ritorno alle condizioni di campo è molto importante: in questa

fase è necessario ridurre al minimo il tasso di mortalità che altrimenti rischierebbe di compromettere l'efficienza e la convenienza dell'intero ciclo di propagazione. La fase di acclimatazione è sicuramente la fase più delicata per una plantula neoformata *in vitro*. L'elevata umidità relativa, la temperatura costante e la bassa intensità luminosa presente nei vasi di coltura, determinano sulle piantine la comparsa di alterazioni anatomiche, morfologiche e funzionali tali da comprometterne la sopravvivenza in condizioni naturali. In particolare, la mancanza di un efficiente controllo della perdita di acqua provoca una repentina disidratazione e il disseccamento delle piante al momento del trasferimento dal vaso di coltura all'ambiente esterno. Il meccanismo di chiusura stomatica, infatti, è pressoché nullo, in più le radici neoformate non hanno ancora sufficiente capacità di assorbimento dell'acqua in modo da compensare la domanda traspirativa della plantula. In questo momento quindi il rischio di stress idrico è elevato. In sintesi, quindi uno dei cambiamenti che deve avere luogo nella messa a coltura è il passaggio dallo stato eterotrofico a quello autotrofico. Questo processo coinvolge la formazione di nuove foglie da parte della plantula dopo che essa è rimossa dall'ambiente di coltura, per cui è importante mantenere il germoglio in condizioni di attiva crescita (Hartmann et al., 1990). Infine, occorre stimolare l'accrescimento dopo il trapianto per evitare fenomeni di dormienza e la conseguente riduzione di sviluppo.

1.3.3 Substrati di coltura

La preparazione del giusto substrato di crescita è fondamentale. La scelta degli elementi che compongono il substrato deve essere accurata sia nel tipo che nella concentrazione. Sono di particolare importanza:

- I macroelementi come azoto, fosforo, potassio, calcio, magnesio e zolfo, sono elementi indispensabili per la crescita delle piante e sono aggiunti al substrato sotto forma di sali a diverse concentrazioni (espressi generalmente in millimoli). Sono oggi facili da reperire in commercio sotto forma di pre-formulati;
- I microelementi come boro, cobalto, ferro, molibdeno, rame e zinco, che anche se presenti in piccole quantità, sono fondamentali nei processi fisiologici e metabolici della pianta;
- I composti organici come i carboidrati (saccarosio, glucosio e fruttosio), sono essenziali alla vita della pianta *in vitro* in quanto fungono da fonte di carbonio ed energia. Le condizioni delle

piante *in vitro* non sono paragonabili a quelle *in vivo*: l'attività fotosintetica risulta diminuita per via dei limitati scambi gassosi, per carenza di CO₂ all'interno dei contenitori e per la minore intensità luminosa che troviamo in camera di crescita. L'aggiunta di saccarosio risulta quindi una scelta obbligata per il corretto sviluppo della pianta. Il saccarosio è il disaccaride, costituito da glucosio e fruttosio, più utilizzato come fonte energetica poiché questo zucchero è sintetizzato e trasportato naturalmente all'interno della pianta. Oltre al saccarosio si possono utilizzare altri zuccheri semplici come glucosio, fruttosio e maltosio. L'elevata presenza di zucchero riveste inoltre una notevole importanza anche nella regolazione del potenziale osmotico del mezzo di coltura, condizionando sia l'assimilazione dell'acqua sia degli elementi nutritivi, influenzando così indirettamente la capacità di crescita dei tessuti. La presenza di zucchero inoltre può essere rischiosa dal punto di vista fitosanitario perché crea l'ambiente adatto allo sviluppo di funghi e batteri;

- Le vitamine sono sostanze organiche essenziali per la costituzione di enzimi e di cofattori di funzioni metaboliche fondamentali. Tra le vitamine, come mioinositolo, tiamina, glicina, acido nicotinico e piridossina, solamente la tiamina è essenziale nella coltura di tessuti poiché coinvolta nel metabolismo di carboidrati e nella biosintesi di alcuni aminoacidi. Il substrato Murashige e Skoog contiene tiamina HCl, acido nicotinico e piridossina;

- I fitoregolatori di crescita vanno impiegati a bassissime dosi nell'ordine di micromoli (da 0,001 a 10 µmol). Questi ormoni vengono di solito prodotti naturalmente dalla pianta e regolano la formazione e lo sviluppo di gemme e radici, stimolando la divisione e l'accrescimento cellulare. Nella tecnica *in vitro* devono essere aggiunti al substrato in diverse combinazioni e concentrazioni a seconda della fase del ciclo di propagazione poiché la pianta non è in grado di sintetizzarne una quantità sufficiente. Oltre agli effetti prodotti dalla concentrazione dei singoli ormoni, bisogna considerare il bilancio ormonale nel suo complesso. Il rapporto tra le concentrazioni dei vari ormoni, in base alla fase in cui si opera, deve essere sbilanciato verso un tipo di ormone rispetto a un altro in relazione alle risposte che si desiderano. Ci sono diverse classi di fitoregolatori:

- Le auxine hanno effetto sulla distensione cellulare, sull'espansione dei tessuti e sulla dominanza apicale. A basse concentrazioni favoriscono la formazione di radici avventizie, mentre a elevate concentrazioni favoriscono la formazione di calli. Tra le auxine sintetiche più comunemente usate troviamo l'acido 1-naftalenacetico (NAA), l'acido 2,4 diclorofenossiacetico (2,4-D), e acido 4-amino-3,5,6-tricloro-

2piridincarbossilico (picloram), mentre tra quelle naturali abbiamo l'acido indolacetico (IAA) e l'acido indolbutirrico (IBA);

- Le citochinine promuovono la divisione cellulare e stimolano l'induzione e la crescita dei germogli. A concentrazioni più elevate di 1-10 mg L⁻¹ esse inducono la formazione di germogli avventizi, ma inibiscono la formazione delle radici. Alla classe delle citochinine appartengono la benziladenina (BA), la zeatina (ZEA), la kinetina (KIN), e il tidiazuron (TDZ);

- Le gibberelline favoriscono l'allungamento degli internodi e l'accrescimento dei meristemi. La gibberellina più utilizzata è l'acido gibberellico (GA), sensibile al calore.

• L'Agar, altra importante componente organica del substrato di coltura che gli conferisce una consistenza gelatinosa, è un polisaccaride derivato da alghe marine in grado di legare molecole d'acqua. Esso assicura l'ancoraggio del materiale vegetale e permette di porre l'espianto a contatto con il substrato, mantenendo allo stesso tempo un buon grado d'aerazione. Ha però anche uno svantaggio perché rallenta la diffusione dei nutrienti all'interno del substrato permettendo alla pianta di assorbire solo i nutrienti presenti intorno alla propria base. Questo fattore rende indispensabile il rinnovo frequente del substrato, che generalmente è eseguito ogni tre settimane. È aggiunto al terreno di coltura prima del ciclo di sterilizzazione in autoclave a concentrazioni variabili da 0,5 a 1,0% (peso/volume).

Queste componenti sono disciolte in una soluzione con acqua deionizzata e microfiltrata, quindi priva di cationi, anioni, particelle di varia natura e microrganismi. La soluzione deve avere un valore di pH attorno a 5,6-5,7 per garantire le migliori condizioni di sviluppo alle piante. Infine, sono aggiunte soluzioni di KOH e HCl (1M o 0,5 M) con un contagocce fino a raggiungere il valore desiderato.

1.4 Tecnica della rigenerazione da tessuti vegetali

Il materiale ottenuto dalla prova di micropropagazione è stato poi oggetto di studio di un'altra tecnica *in vitro* utilizzata in questa tesi, chiamata **rigenerazione**. La rigenerazione *in vitro* è una delle tecniche che si è rilevata importante per il miglioramento genetico delle colture e si basa sulla capacità di rigenerazione delle piante da cellule coltivate, tessuti e/o organi. Con questa tecnica è possibile lo sviluppo dei germogli o radici da cellule differenziate o indifferenziate da callo (Hicks, 1980). Per innescare la rigenerazione *in vitro* dai tessuti è necessario l'uso di regolatori di crescita, che sono diversi nel tipo e in base alla concentrazione (Thorpe, 1994).

Il presente studio si è concentrato sull'organogenesi *in vitro* delle due cultivar di mora Loch Ness e Loch Tay. Lo studio dimostra come l'efficacia della rigenerazione dipenda da numerosi fattori quali: ormoni (tipo e concentrazione di fitoregolatori), composizione minerale del terreno, età e tipo di espianto (piccioli, foglie), origine degli espianti (*in vitro* o *in vivo*), orientamento dell'espianto durante le operazioni di rigenerazioni (lato adassiale della foglia rivolto sul terreno), nonché le condizioni di incubazione (durata dell'incubazione, fotoperiodo, intensità luminosa e temperatura). In ogni caso, il fattore principale che interessa l'efficienza di rigenerazione sembra essere l'interazione tra genotipo e la composizione ormonale del substrato.

I substrati di rigenerazione che sono stati impiegati per ottenere la più alta efficienza di rigenerazione di germogli delle due cultivar sono composti da Murashige e Skoog (1962) (MS) e integrati con 6-benzilaminopurina (BA) e 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea (thidiazuron; TDZ). In particolare, quest'ultimo ha la capacità di provocare un'alta efficienza di rigenerazione in tessuti vegetali di specie legnose (Huetteman e Preece 1993; Bhagwat e Lane 2004; Menge et al., 2004; Landi e Mezzetti, 2005). Oltre Loch Ness e Loch Tay, il TDZ è stato utilizzato anche su altre cultivar di mora dove ha dimostrato sempre un'elevata efficacia nell'indurre la formazione di callo da foglia.

Solitamente le citochinine BAP e TDZ sono addizionate al terreno di rigenerazione o da sole o combinate con le auxine: acido indo-3-butilico (IBA), acido naftilacetico (NAA) e l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), a diverse concentrazioni. L'equilibrio ormonale è un altro fattore chiave nella regolazione della morfogenesi in espienti coltivati. Le interazioni tra le auxine vegetali e le citochinine durante tutto lo sviluppo delle piante sono complesse, e

l'equilibrio tra le auxine e citochinine controlla la formazione di radici, germogli e il tessuto calloso in vitro, e la fuoriuscita di germogli avventizi (Landi e Mezzetti; 2005).

Per l'incubazione viene seguito il fotoperiodo, in quanto le ore di buio si rendono necessarie per risolvere il problema dell'imbrunimento della superficie degli espianti dei tessuti vegetali. L'imbrunimento è prodotto dall'ossidazione di composti fenolici che producono i chinoni, i quali reagiscono con i tessuti vegetali portandoli alla necrosi. Pertanto, l'incubazione al buio è consigliata per ridurre la necrosi degli espianti, inibendo l'attività enzimatica che è responsabile dell'ossidazione dei tessuti. Nella mora, l'incubazione al buio di espianti fogliari per almeno una settimana è necessaria per migliorare l'organogenesi (Zakaria et al., 2014). Obiettivo delle biotecnologie è modificare caratteri di interesse (come quello della rifioritura in questo caso) tramite l'ingegneria genetica.

2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi, sono state eseguite prove sperimentali di micropropagazione e rigenerazione *in vitro* su due varietà di mora (*Rubus fruticosus* L.) denominate Loch Ness e Loch Tay.

Primo obiettivo di questa tesi, è stato quello di ottimizzare un protocollo di propagazione per i due genotipi di mora oggetto di studio usando colture di germogli *in vitro* fornite direttamente dall'azienda Sant'Orsola Società Cooperativa Agricola (Trentino-Alto Adige). Al fine di identificare il substrato di propagazione più idoneo per ciascun genotipo, germogli giovani di Loch Ness e Loch Tay sono stati coltivati su due diversi substrati contenenti 6-benzilaminopurina (BAP) alla concentrazione di $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ in presenza o meno di $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ di gibberellina (GA_3). Il substrato di propagazione ottimizzato potrà così essere utilizzato per l'avvio della propagazione *in vitro* di entrambe le varietà di mora nel laboratorio di Biotecnologie Vegetali del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, dell'Università Politecnica delle Marche.

Ulteriore obiettivo di questo lavoro di tesi, è stato quello di ottimizzare un protocollo di rigenerazione *in vitro* di entrambi i genotipi di mora usando foglie espanse di germogli in allungamento e piccioli come espianti di partenza. Al fine di identificare la migliore combinazione genotipo/substrato di rigenerazione, entrambi i tipi di espianto di Loch Ness e Loch Tay sono stati posizionati su sei differenti substrati contenenti Thidiazuron (TDZ) o BAP a diverse concentrazioni. Il terreno di rigenerazione genotipo-specifico così ottimizzato potrà essere testato come terreno di rigenerazione in futuri esperimenti di trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens*.

3.MATERIALI E METODI

Oggetto di sperimentazione, condotta presso il laboratorio di Biotecnologie Vegetali del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, dell'Università Politecnica delle Marche, è stata la messa a punto di protocolli di micropropagazione e rigenerazione *in vitro* di due diverse varietà di mora (*Rubus fruticosus* L.) denominate Loch Ness e Loch Tay. Per lo svolgimento di tutte le attività di laboratorio sono necessarie le seguenti attrezzature:

- Contenitori per l'allevamento del materiale vegetale (tubi, magenta, vasi di vetro Bormioli o piastre Petri);
- Strumenti per la manipolazione dei tessuti vegetali (guanti, bisturi e pinze);
- Autoclave per la sterilizzazione dei substrati e della vetreria;
- Bilancia di precisione;
- Agitatore con ancorette magnetiche;
- pH-metro;
- Pipette di precisione di diversi volumi;
- Becher e cilindri per la preparazione di substrati;
- Bottiglie di vetro da 0,5 L, 1 L o 2 L;
- Cappa a flusso laminare (con filtro HEPA) con appositi sterilizzatori;
- Camera di crescita impostata per mantenere una temperatura costante di 25°C e un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

3.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale in proliferazione necessario all'avvio delle prove sperimentali di micropropagazione e rigenerazione *in vitro* è stato fornito dall'azienda Sant'Orsola Società Cooperativa Agricola (Trentino-Alto Adige).

3.2. Influenza della gibberellina GA₃ sull'efficienza di propagazione di Loch Ness e Loch Tay

Al fine di valutare l'efficienza di propagazione delle due varietà di mora, germogli singoli di Loch Ness e Loch Tay sono stati coltivati in due diversi terreni di propagazione contenenti substrato MS di base (Murashige and Skoog, 1962) con vitamine incluse (Duchefa), 30 g L⁻¹ di saccarosio e 6 g L⁻¹ di plant agar (Duchefa), arricchiti con 0,5 mg L⁻¹ BAP in presenza o meno di 0,2 mg L⁻¹ GA₃ (Sigma-Aldrich) (Figura 5 e tabella 1). Il pH è stato aggiustato a 5.7-5.8 con KOH 1M prima del ciclo di sterilizzazione in autoclave a 121°C per 20 minuti; i substrati sono stati poi colati in vasi di vetro sterili. I germogli sono stati fatti crescere sotto luce diretta (fotoperiodo di 16-h ad un'intensità luminosa di 70 μmol/m²/s) a 25°C in camera di crescita per tre settimane e trasferiti su terreno fresco per un totale di tre subcolture. Nello specifico, i germogli devono essere ben puliti con bisturi e pinze sterili, sia dalle foglie più vecchie sia da possibili radici e calli formati. Una volta puliti, si procede con il bisturi al taglio delle parti neoformate e alla messa a dimora in vaso. Per ogni tipo di terreno e per ogni genotipo oggetto di studio, sono stati preparati tre vasi e sono stati usati un totale di sessanta espianti (venti per vaso). Quindi le prove sono state effettuate considerando il vaso di coltura (con all'interno venti germogli) come replica con un numero minimo di tre repliche per trattamento. Al termine di ogni subcoltura, è stato calcolato il tasso di proliferazione espresso come il numero di germogli ottenuti dal numero di germogli di partenza. I dati raccolti sono stati poi analizzati con test ANOVA a un fattore usando il software Statistica 7 (Statsoft Tulsa, CA, USA) ed eventuali differenze evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0,05$).

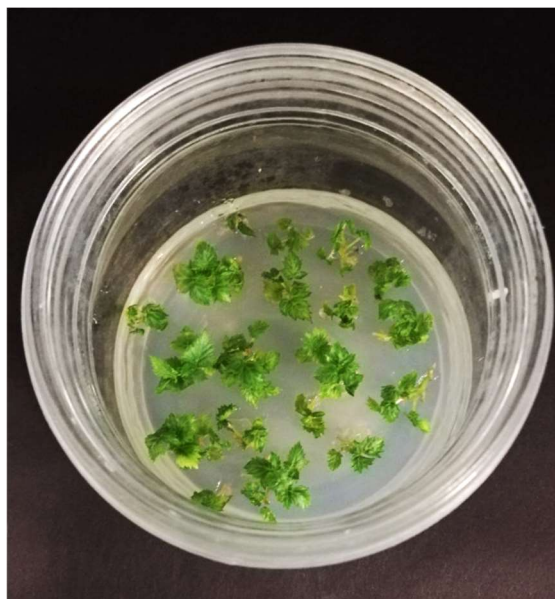


Figura 5- Espianti iniziali di Loch Tay posizionati su MS BA 0,5 mg L⁻¹

Tabella 1-Composizione dei terreni per la propagazione di Loch Ness e Loch Tay

	Terreno 1	Terreno 2
Sali	MS 4,4 g L ⁻¹	MS 4,4 g L ⁻¹
Carboidrati	Saccarosio 30 g L ⁻¹	Saccarosio 30 g L ⁻¹
Fitormoni	BAP 0,5 mg L ⁻¹	BAP 0,5 mg L ⁻¹ + GA ₃ 0,2 mg L ⁻¹
Agar	6 g L ⁻¹	6 g L ⁻¹
pH	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8

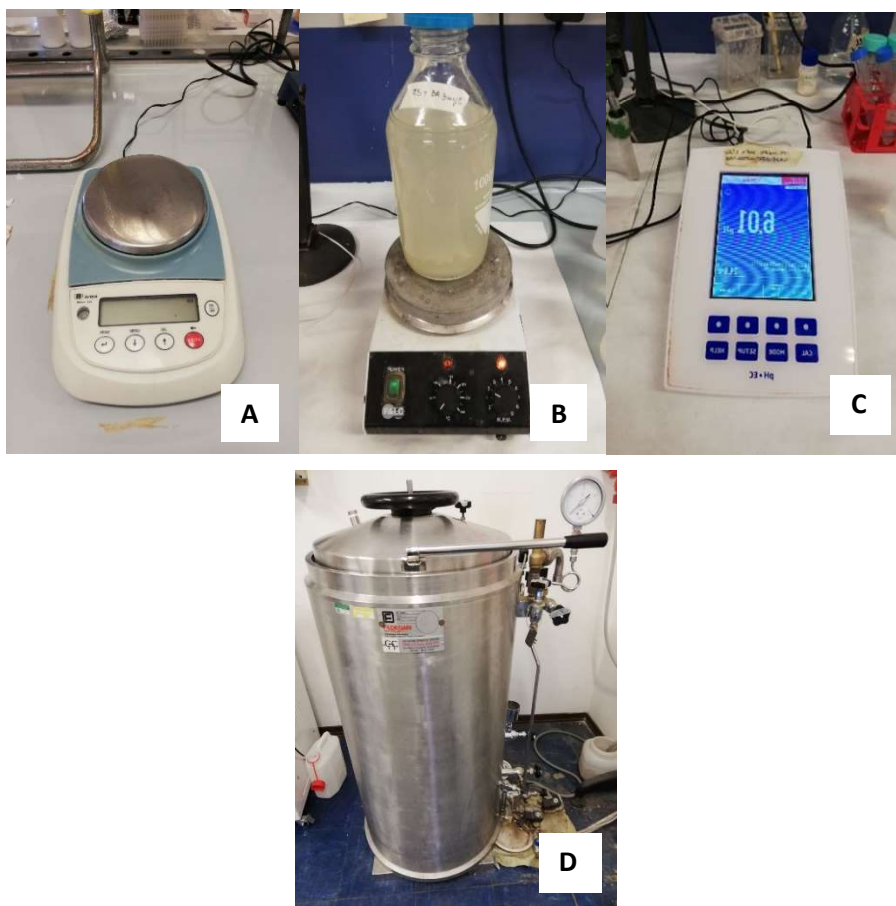


Figura 6- Strumenti necessari per la preparazione dei substrati: (A) bilancia; (B) substrato su agitatore magnetico; (C) pHmetro; (D) autoclave.

3.3. Approccio generale per la rigenerazione di Loch Ness e Loch Tay usando foglie e piccioli come espianti di partenza

I germogli in proliferazione delle due varietà di mora ottenuti dalla prova di propagazione descritta precedentemente, sono stati trasferiti su terreno di allungamento al fine di fornire foglie espanse e piccioli per questo studio (Figura 7A). Il substrato di allungamento è composto da MS di base (Murashige and Skoog, 1962) con vitamine incluse (Duchefa), 30 g L⁻¹ di saccarosio e 6 g L⁻¹ di plant agar (Duchefa), 0,5 g L⁻¹ di carbone attivo (Duchefa), arricchito con 1 mg L⁻¹ acido indol-3-butirrico (IBA), pH 5.7-5.8. I germogli *in vitro* sono stati fatti crescere per un mese nel terreno di allungamento alle stesse condizioni di luce e temperatura descritte sopra e quindi impiegati nella prova di rigenerazione. Nello specifico, foglie apicali espanse, prive di picciolo, provenienti da germogli in allungamento di Loch Ness

e Loch Tay, e i rispettivi piccioli, sono stati usati come espianti di partenza in questo studio (Figura 7B). La nervatura centrale della superficie abassiale di ogni foglia è stata tagliata perpendicolarmente per tre/quattro volte (Figura 7B) e le foglie (piccioli staccati inclusi) sono state messe con la superficie abassiale a contatto con il terreno di rigenerazione (Figura 7C). Foglie e piccioli di Loch Ness e Loch Tay sono stati posizionati su MS di base (Murashige and Skoog, 1962) con vitamine incluse (Duchefa), 20 g L⁻¹ di saccarosio e 7 g L⁻¹ di plant agar (Duchefa). Il pH è stato aggiustato a 5.7-5.8 prima del ciclo di sterilizzazione in autoclave a 121°C per 20 minuti; successivamente 25 mL di terreno di rigenerazione sono stati versati in piastre Petri sterili (9 cm × 1.5 cm). Dopo che gli espianti sono stati posizionati nel terreno, le piastre Petri sono state conservate al buio a 25°C per una settimana e poi esposte a luce diretta (fotoperiodo di 16-h ad un'intensità luminosa di 70 μmol/m²/s) in camera di crescita per trentotto giorni. Frequenza di rigenerazione e numero medio di germogli rigeneranti/espianto sono stati rilevati quarantacinque giorni dopo il trapianto e di coltura in ambiente controllato.

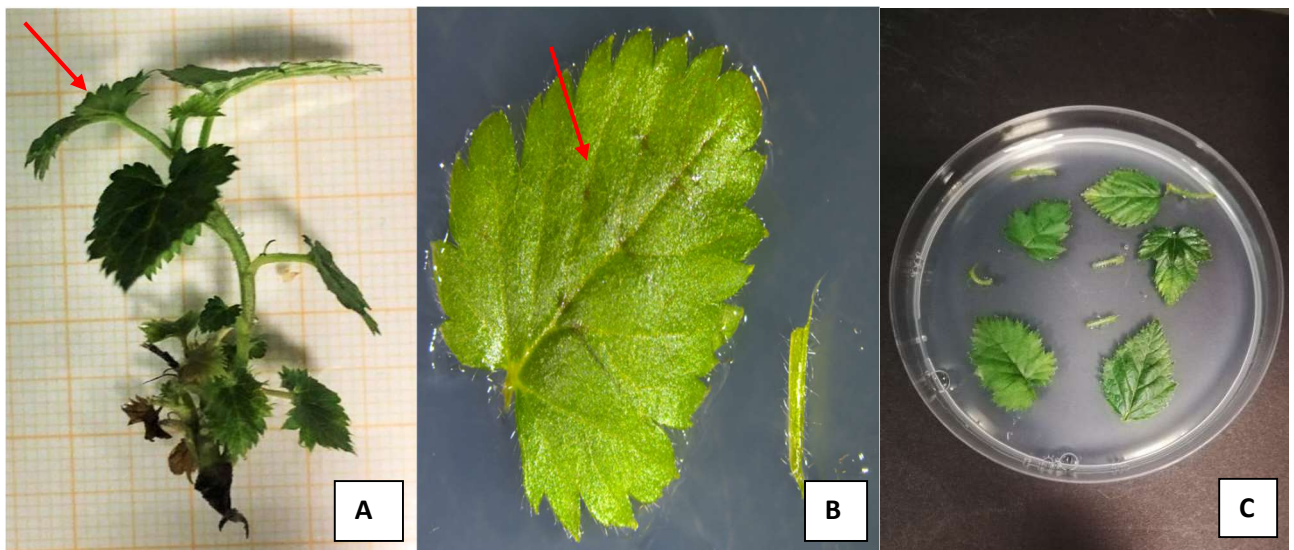


Figura 7- Materiale vegetale di partenza usato nella prova di rigenerazione in vitro: (A) germoglio in allungamento di Loch Ness. La freccia indica la tipologia di foglia usata come espianto di partenza; (B) foglia e picciolo di Loch Ness utilizzati come espianti di partenza posizionati sul substrato di rigenerazione. La freccia indica uno dei tagli trasversali praticati sulla superficie abassiale della nervatura centrale; (C) foglie e piccioli di Loch Ness posizionati sul terreno di rigenerazione.

3.4. Influenza di diverse concentrazioni e combinazioni ormonali sull'efficienza di rigenerazione di Loch Ness e Loch Tay utilizzando foglie e piccioli come espianti di partenza

In questo studio, sono stati utilizzati sei diversi substrati di rigenerazione contenenti una combinazione di sali e vitamine MS (Murashige and Skoog, 1962), addizionati con 20 g L⁻¹ di saccarosio, 7 g L⁻¹ di plant agar (Duchefa) e due tipi di regolatori di crescita, TDZ e BAP, a diverse concentrazioni come riportato in Tabella 2. Il pH è stato aggiustato con KOH 1M fino al raggiungimento di un valore pari a 5.8, prima del ciclo di sterilizzazione in autoclave ad una pressione di 1 Kg cm⁻² a 121 °C per 20 minuti. Per ogni tipologia di terreno di rigenerazione, sono state preparate cinque piastre Petri e un totale di venticinque espianti sono stati usati (cinque foglie e cinque piccioli per Petri). Per ogni combinazione ormonale, sono stati condotti due esperimenti indipendenti. La frequenza di rigenerazione espressa come (numero di espianti che rigenerano almeno un germoglio/totale degli espianti trattati) x 100, e il numero medio di germogli rigenerati/espianto, sono stati calcolati quarantacinque giorni dopo l'inizio della prova. I dati raccolti sono stati poi analizzati con test ANOVA a un fattore usando il software Statistica 7 (Statsoft Tulsa, CA, USA) ed eventuali differenze evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$).

Tabella 1- Substrati differenti impiegati nella prova di rigenerazione

	REGOLATORI DI CRESCITA
SUBSTRATO 1	TDZ 1 mg L ⁻¹
SUBSTRATO 2	TDZ 3 mg L ⁻¹
SUBSTRATO 3	TDZ 5 mg L ⁻¹
SUBSTRATO 4	BAP 1 mg L ⁻¹
SUBSTRATO 5	BAP 2 mg L ⁻¹
SUBSTRATO 6	BAP 3 mg L ⁻¹

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo sono riportati i risultati ottenuti, i dati acquisiti e la relativa analisi statistica per le prove sperimentali svolte. Nel dettaglio, sono stati analizzati il tasso di proliferazione, la frequenza di rigenerazione e il numero medio di germogli rigenerati/espianto per espianti dei due genotipi di mora Loch Ness e Loch Tay.

4.1 Influenza della gibberellina GA₃ sull'efficienza di propagazione di Loch Ness e Loch Tay

Nella prova di propagazione sono stati studiati due genotipi di mora (*Rubus fruticosus* L.), Loch Ness e Loch Tay, coltivati su due substrati diversi contenenti BAP alla concentrazione di 0,5 mg L⁻¹ in presenza o meno di 0,2 mg L⁻¹ di GA₃. Gli espianti sono stati prelevati da piante *in vitro* e conservati in camera di crescita a 25°C. L'esperimento di micropropagazione è costituito da tre repliche e ognuna di queste è formata da 20 unità sperimentali per un totale di 60 espianti per genotipo/tipologia di substrato. I dati sono stati rilevati al termine di ogni subcoltura (con intervalli di tre settimane ciascuna) ed espressi come media del tasso di proliferazione dei singoli germogli di partenza.

Da questo studio è emerso che i due genotipi hanno proliferato su entrambi i terreni con un incremento progressivo a ogni subcoltura, come dimostrato dai grafici 1 e 2.

Per quanto riguarda il genotipo Loch Ness, si è registrato un buon tasso di proliferazione già alla prima subcoltura dall'inizio della prova, sia per il primo che per il secondo substrato, con una media di 4 germogli ottenuti dall'espianto iniziale; alla seconda subcoltura, invece, il tasso di proliferazione dei germogli posti su terreno contenente gibberellina (GA₃) ha mostrato un valore significativamente più alto rispetto a quello rilevato nel terreno contenente soltanto BAP. Alla terza subcoltura dall'inizio della prova si è raggiunto un tasso di proliferazione massimo pari a 23 germogli da ogni singolo germoglio di partenza su terreno contenente 0,5 mg L⁻¹ BAP, e 40 germogli da singolo germoglio di partenza su terreno addizionato anche con GA₃. Un risultato simile, ma in assenza di GA₃ nel substrato di coltura, è stato osservato nel lavoro di Fira et al. (2011) dove la cultivar Loch Ness ha presentato un tasso di proliferazione pari 40,18 germogli per germoglio di partenza.

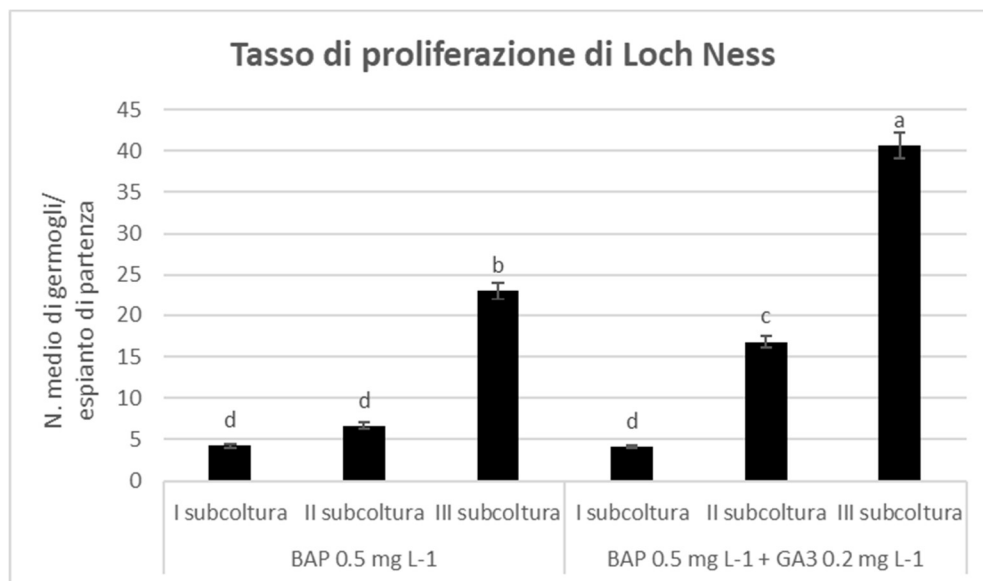


Grafico 1 - Tasso di proliferazione di tre subcolture di tre settimane ciascuna espresso come numero di germogli ottenuti dall'espianto di partenza rilevato sul genotipo Loch Ness. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard delle tre repliche.

Per Loch Tay il tasso di proliferazione è risultato inferiore rispetto a Loch Ness: la massima proliferazione è stata raggiunta alla terza subcoltura su terreno contenente GA₃ (26 germogli/espianto di partenza). Un discreto tasso di proliferazione è stato osservato alla terza subcoltura anche su substrato contenente solo BAP, con una media di 14 germogli/espianto di partenza. Un risultato simile è stato riportato anche nello studio sulla propagazione *in vitro* descritto da Bobrowsky et al. (1996), in cui il miglior tasso di proliferazione si è ottenuto per le cultivar Guarany (12,3 germogli/espianto) ed Ebano (7,2 germogli/espianto) su terreno con BAP usato alle concentrazioni di 1 e 2 mg L⁻¹, rispettivamente.

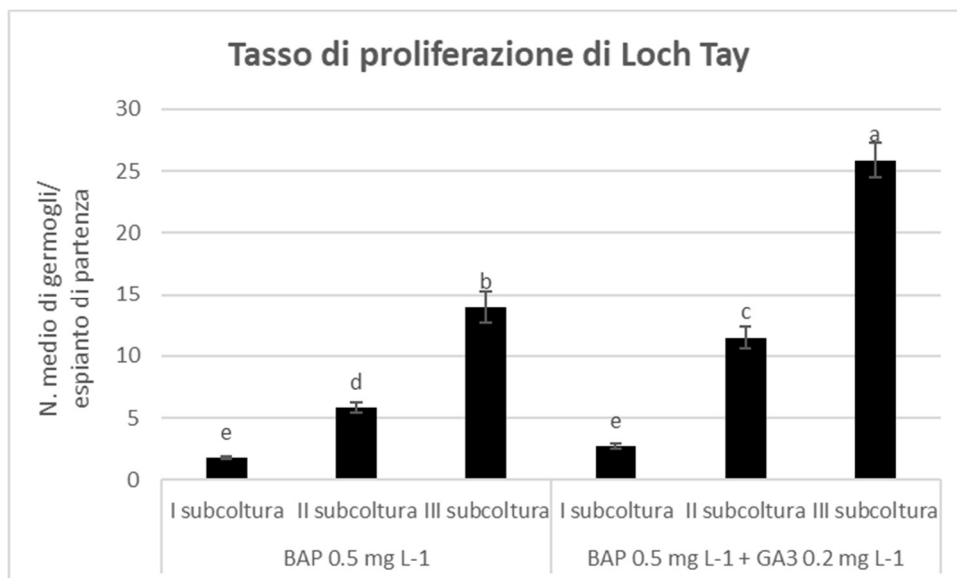


Grafico 2- Tasso di proliferazione di tre subcolture di tre settimane ciascuna espresso come numero di germogli ottenuti dall'espianto di partenza rilevato sul genotipo Loch Tay. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard delle tre repliche.

In sintesi, dai dati riportati nei grafici 1 e 2 si osserva come i tassi di moltiplicazione registrati siano stati variabili durante le tre successive subcolture. In particolare, il tasso di proliferazione riguardante gli espanti posti su substrato arricchito con GA₃ è risultato significativamente più alto rispetto alla proliferazione dei germogli su substrato privo di GA₃ per entrambi i genotipi oggetto di studio. Utilizzando la combinazione BAP 0,5 mg L⁻¹ + GA₃ 0,2 mg L⁻¹ si è ottenuto un incremento progressivo dalla 1° alla 3° subcoltura sia per Loch Ness che per Loch Tay e, nello specifico, questo substrato è risultato significativamente migliore in termini di tasso di proliferazione in particolare alla terza subcoltura (nove settimane) se paragonato al terreno privo di GA₃. Diversamente è accaduto in altri lavori su cultivars di mora (Bobrowsky et al., 1996) dove l'aggiunta di GA₃ nel terreno non ha migliorato il tasso di proliferazione e i migliori risultati sono stati ottenuti nei terreni con solo BAP, indipendentemente dalla concentrazione usata. Tuttavia, il trattamento con GA₃, in questa sperimentazione, ha fatto manifestare il risultato più elevato oltre che in termini di tasso di proliferazione anche in termini di qualità del materiale: i germogli di entrambi i genotipi sono risultati essere vigorosi e privi di vitescenza (“dati non mostrati”).

In conclusione, il materiale ottenuto da questa prima fase può essere considerato sufficiente per avviare la prova di rigenerazione. Inoltre, questi protocolli ottimizzati possono essere

utilizzati per la proliferazione di queste specie per produrre piante sane, ben sviluppate e che abbiano le giuste caratteristiche per essere utilizzate in vivaio come piante madri per una più estesa propagazione commerciale.

4.2 Influenza di diverse concentrazioni e combinazioni ormonali sull'efficienza di rigenerazione di Loch Ness e Loch Tay utilizzando foglie e piccioli come espianti di partenza

Dal terreno di proliferazione precedentemente ottimizzato, germogli singoli di Loch Ness e Loch Tay sono stati trasferiti sul terreno di allungamento così da ottenere foglie espanse per avviare la prova di rigenerazione *in vitro*. Quest'ultima è stata eseguita utilizzando sei differenti substrati (S1-6) contenenti tipologie e combinazioni diverse di regolatori di crescita (PGR):

- S1: TDZ 1 mg L⁻¹
- S2: TDZ 3 mg L⁻¹
- S3: TDZ 5 mg L⁻¹
- S4: BAP 1 mg L⁻¹
- S5: BAP 2 mg L⁻¹
- S6: BAP 3 mg L⁻¹

L'intero esperimento comprendeva, per ogni tipo di terreno cinque piastre per un totale di 25 unità sperimentali per tipo di espianto. Per ogni combinazione ormonale, sono stati condotti due esperimenti indipendenti. Foglie e piccioli, una volta intagliati e posti su terreno di rigenerazione, sono stati mantenuti in camera di crescita a temperatura controllata (25°C); inizialmente sono stati incubati per una settimana al buio e poi trasferiti alla luce per trentotto giorni.

La percentuale di rigenerazione e numero medio di germogli rigeneranti per espianto per ogni terreno sono stati determinati dopo 45 giorni. Osservando il grafico sottostante (grafico 3) è emerso che:

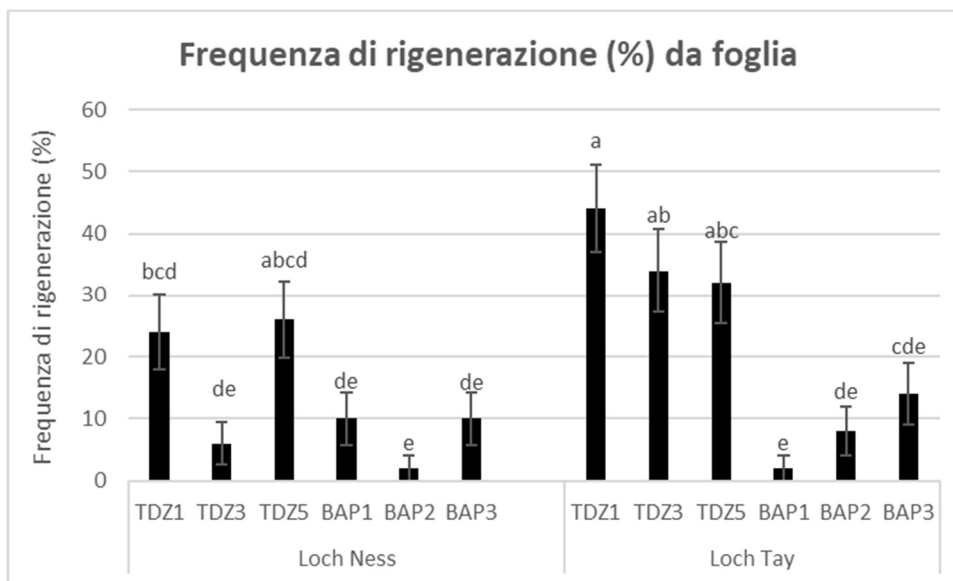


Grafico 3- Percentuale di germogli ottenuti da espunti di foglie di Loch Ness e Loch Tay dopo 45 giorni dall'inizio della prova di rigenerazione. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard dei valori ottenuti da esperimenti indipendenti.

- L'efficienza di rigenerazione da foglia della cultivar Loch Ness posta su substrato contenente diverse concentrazioni di citochinine è risultata molto variabile; in particolare, si è ottenuto un'efficienza di rigenerazione del 25% da foglie di entrambe le cultivar poste su substrati addizionati con TDZ 1 mg L⁻¹ (Figura 8A) e TDZ 5 mg L⁻¹ (S1 e S3), i quali sono risultati essere in generale substrati più efficienti rispetto a quelli contenenti BAP, dove invece si è osservata una frequenza di rigenerazione compresa tra il 2% e il 10% (Figura 8B). Altri studi effettuati in precedenza (Fiola et al., 1990) hanno riportato una percentuale di rigenerazione da foglia dell'8% da espunti delle cultivars Loch Ness e Shawnee posti su substrati contenenti concentrazioni analoghe di TDZ (5 mg L⁻¹).
- L'efficienza di rigenerazione da foglia del genotipo Loch Tay ha mostrato un andamento decrescente all'aumentare della concentrazione di TDZ nei substrati di rigenerazione. In particolare, si è ottenuto un picco di efficienza di rigenerazione pari al 43% su substrato S1 (TDZ 1 mg L⁻¹). Mentre l'efficienza di rigenerazione da foglia di Loch Tay poste su substrati contenenti concentrazioni crescenti di BAP, ha avuto un andamento crescente con una rigenerazione massima del 15% quando il BAP è usato alla concentrazione finale di 3 mg L⁻¹.

Nel complesso, le foglie di entrambi i genotipi hanno rigenerato meglio su terreni contenenti TDZ, ma anche le concentrazioni di BAP più alte testate (S6) sono risultate favorevoli alla formazione di germogli avventizi. Infatti, è stato appurato da fonti bibliografiche (Lazić T. and Đ. Ružić, 2007) che, nella cultivar di mora Čačanska Bestrna, il TDZ applicato singolarmente o in combinazione con auxine è più efficiente nell'induzione della rigenerazione rispetto al BAP.

Un simile andamento si è osservato anche relativamente al numero medio di germogli ottenuti da foglia di Loch Tay, come dimostra il grafico 4. Infatti, il TDZ 1 mg L⁻¹ (Figura 8C) ha indotto un'efficienza di rigenerazione significativamente più alta rispetto al BAP, producendo un numero medio di germogli di 2,0 per foglia. Discreti sono stati anche i risultati ottenuti da espunti posti sul substrato contenente TDZ 3 mg L⁻¹ (S2) e TDZ 5 mg L⁻¹ (S3) in Loch Tay. In linea generale il BAP ha prodotto una media di 0,4 germogli per espunto in entrambi i genotipi oggetto di studio.

Invece, per Loch Ness non ci sono differenze statisticamente importanti, per cui il terreno dove ha ottenuto un maggior numero di germogli è il TDZ 1 mg L⁻¹ con una media di 0,7 germogli.

Da lavori precedenti è stato osservato come la rigenerazione di germogli avventizi da espunti fogliari di mora sia stata osservata entro tre settimane dal distacco del picciolo dalla lamina fogliare e come l'età dell'espunto abbia influenzato il tasso di rigenerazione. Infatti, da espunti della cultivar Black Satin sono state osservati 17,3 germogli/foglia dopo 8 settimane di coltura su un substrato contenente TDZ 0,002 mg L⁻¹ (Gupta e Mahalaxmi, 2008); mentre Swartz et al. (1990) e Turk et al. (1994), dopo 18 settimane, hanno registrato nella foglia di MD-ETCE-1 la formazione di 7,7 germogli/espunto coltivati su MS + 1,1 mg L⁻¹ TDZ.

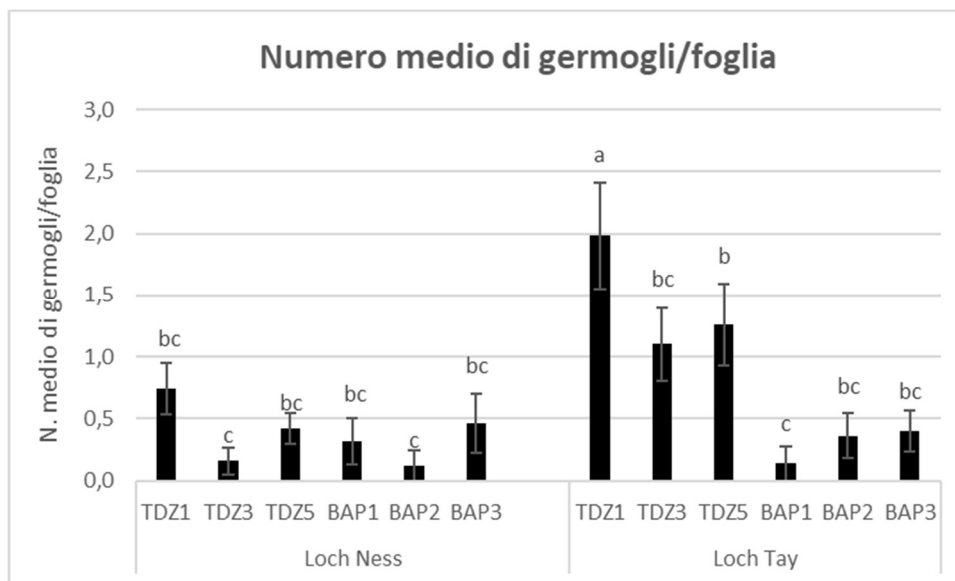


Grafico 4- Numero medio di germogli ottenuti da foglie di Loch Ness e Loch Tay dopo 45 giorni dall'inizio della prova di rigenerazione. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti.

I piccioli delle due varietà hanno rigenerato germogli in tutte le repliche e su tutti i substrati utilizzati e in percentuali elevate (grafico 5). Anche in questo caso, come lo è stato per la rigenerazione da foglia, il TDZ è risultata la citochinina più efficace in termini di frequenza di rigenerazione:

- in Loch Ness il 55% dei piccioli ha rigenerato germogli su TDZ 5 mg L⁻¹ (S3); sui substrati con TDZ 1 mg L⁻¹ (S1) e TDZ 3 mg L⁻¹ (S2) la rigenerazione è stata, rispettivamente, del 25% e del 39%. Per quanto riguarda le combinazioni di BAP con questo genotipo hanno prodotto pari frequenza (circa 20%) indipendentemente dalla concentrazione addizionata al substrato;
- Situazione analoga è stata per i risultati ottenuti sulla frequenza di rigenerazione da piccioli della cultivar Loch Tay, che hanno prodotto un'elevata quantità di germogli sul substrato TDZ 1 mg L⁻¹ (S1), quasi il 70%, mentre quelli posti sui rimanenti due terreni hanno presentato una percentuale di rigenerazione minore, 29 % su TDZ 3 mg L⁻¹ (S2) (Figura 8E) e 42% su TDZ 5 mg L⁻¹ (S3). Con l'ormone BAP il valore più elevato (20%) è stato registrato con il substrato BAP

2 mg L⁻¹ (S5); le altre due concentrazioni di questo ormone hanno prodotto valori più bassi, 11% su BAP 1 mg L⁻¹ (S4) (Figura 8D) e 17% su BAP 3 mg L⁻¹ (S6).

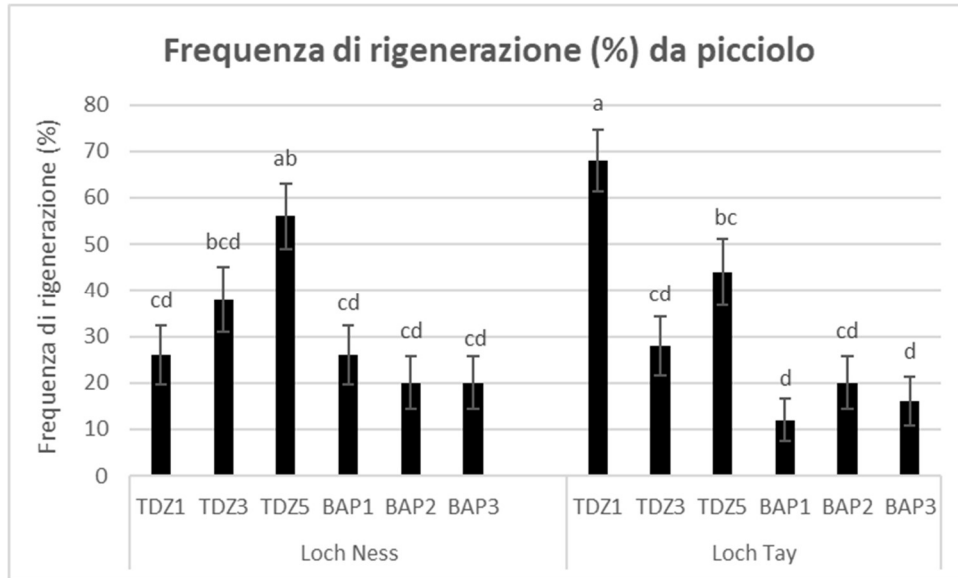


Grafico 5 - Percentuale di germogli rigenerati da piccioli di Loch Ness e Loch Tay dopo 45 giorni dall'inizio della prova di rigenerazione. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Dal grafico sottostante (grafico 6) si può osservare l'andamento del numero medio dei germogli rigenerati da piccioli dei due genotipi testati.

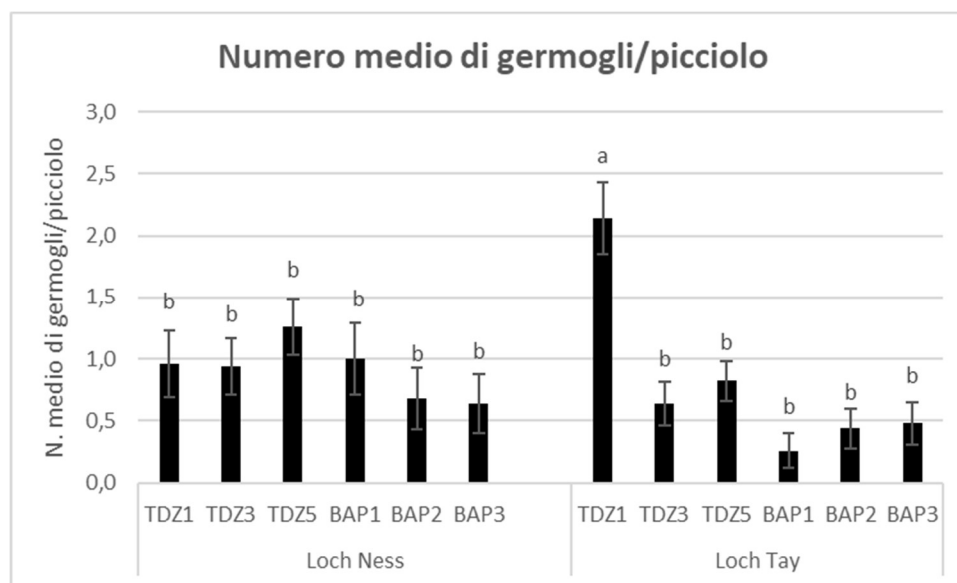


Grafico 6 - Numero medio di germogli ottenuti da foglie di Loch Ness e Loch Tay dopo 45 giorni dall'inizio della prova di rigenerazione. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti.

In termini statici il valore più significativo è dato da Loch Tay su substrato TDZ 1 mg L⁻¹ con una media di 2,2 germogli/espianto. Infatti, i genotipi che hanno mostrato i valori più elevati in termini di numero medio di germogli rigeneranti/picciolo sono risultati: Loch Tay su TDZ 1 mg L⁻¹ (S1) con 2,2 e Loch Ness su TDZ 5 mg L⁻¹ (S3) con 1,3, anche se quest'ultimo non è significativamente diverso dagli altri. Questi genotipi hanno risposto in modo molto efficiente alla concentrazione di TDZ aggiunta al substrato di rigenerazione che è risultata dunque ottimale per l'induzione della rigenerazione. Una media più ridotta di germogli è stata rilevata, invece, in Loch Tay coltivato su BAP 1 mg L⁻¹ (S4) con 0,3, su BAP 2 mg L⁻¹ (S5) con 0,4 e su BAP 3 mg L⁻¹ (S6) con 0,5.

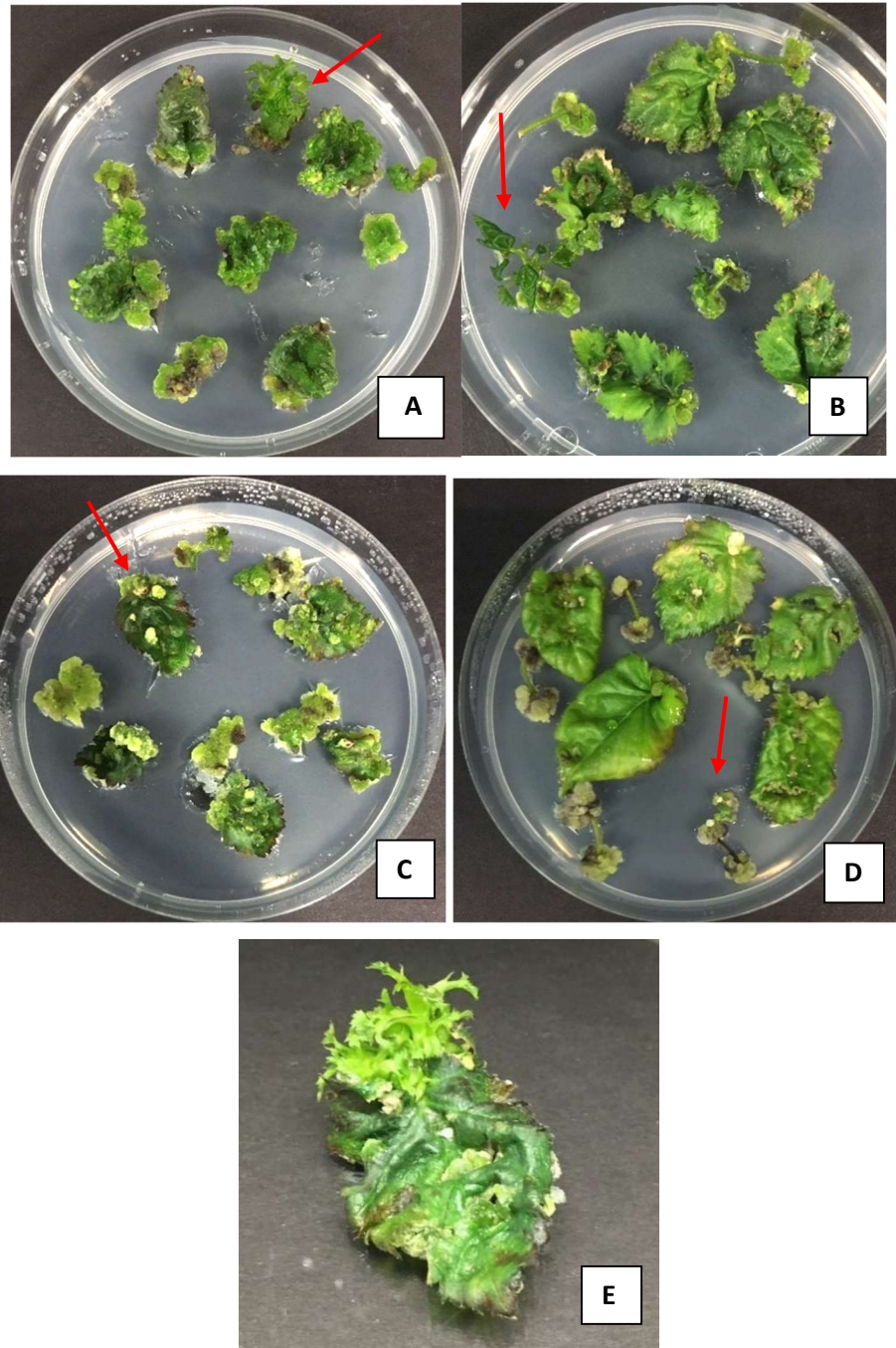


Figura 8- Foglie e piccioli in rigenerazione dopo 45 giorni di: A) Loch Ness posizionato su terreno MS+TDZ 1 mg L⁻¹; B) Loch Ness su MS+BAP 3 mg L⁻¹; C) Loch Tay su MS+TDZ 1 mg L⁻¹; D) Loch Tay su MS+BAP 1 mg L⁻¹. E) Germoglio di Loch Tay su MS+TDZ 3mg L⁻¹. Le frecce delle foto A, B, C e D indicano i germogli che hanno rigenerato da foglie e piccioli.

Da queste prove è emerso che entrambe le cultivars hanno rigenerato germogli su tutti i substrati e inoltre, anche se non riportato, si è rilevata la formazione di calli su tutti gli espianti. Infatti, secondo Turk et al. (1994), nei genotipi di *Rubus* (cultivar di mora e lampone) le gemme si sono formate principalmente da calli che si erano sviluppati all'estremità dei piccioli e lungo i tagli trasversali della nervatura centrale.

Mettendo a confronto l'efficienza di rigenerazione dei due espianti per ognuna delle due cultivar, i risultati migliori sono stati ottenuti dai piccioli posti su substrati contenenti l'ormone TDZ 5 mg L^{-1} (S3) in Loch Ness e TDZ 1 mg L^{-1} (S1) in Loch Tay (grafico 7 e 8). Con queste concentrazioni la frequenza di rigenerazione raggiunta è stata rispettivamente del 51% e 69%. Una discreta efficienza è stata indotta dall'ormone BAP sui piccioli, il quale ha dato complessivamente un 20% di rigenerazione.

Dai dati si può evincere che i piccioli hanno mostrato un'efficienza di rigenerazione più elevata rispetto alle foglie. Questa non è una novità perché da ricerche bibliografiche (Meng et al.; 2004) è stato osservato che anche se si combinano le citochinine con auxine (IAA o IBA) la rigenerazione da foglie resta bassa.

In quest'ultime la percentuale più elevata è stata raggiunta in Loch Tay su terreno TDZ 1 mg L^{-1} (S1) e in Loch Ness su TDZ 5 mg L^{-1} (S3), rispettivamente 41% e 25%. Molto bassa è stata la frequenza rigenerativa da foglie poste su substrati contenenti l'ormone BAP, i cui valori sono stati: nel genotipo Loch Ness 10% con BAP 1 mg L^{-1} (S4) e 3 mg L^{-1} (S6), e 2% con BAP 2 mg L^{-1} (S5); nel genotipo Loch Tay il minimo raggiunge un 2% di rigenerazione con il terreno BAP 1 mg L^{-1} (S4) e il massimo del 15% con BA 3 mg L^{-1} (S6). Questa bassa frequenza ottenuta dalle concentrazioni di BAP è stata riscontrata, sempre nelle prove di rigenerazione da foglie, anche in lavori precedenti (Mezzetti et al., 1997; Graham et al., 1997; Meng et al., 2004), in presenza o meno di auxine che potevano influenzare l'induzione dell'organogenesi o anche inibirli.

Da questo studio è stata confermata l'importanza dell'interazione genotipo-combinazione di PGR per avere un'elevata efficienza rigenerativa dei tessuti fogliari e dei piccioli.

Grafico 7

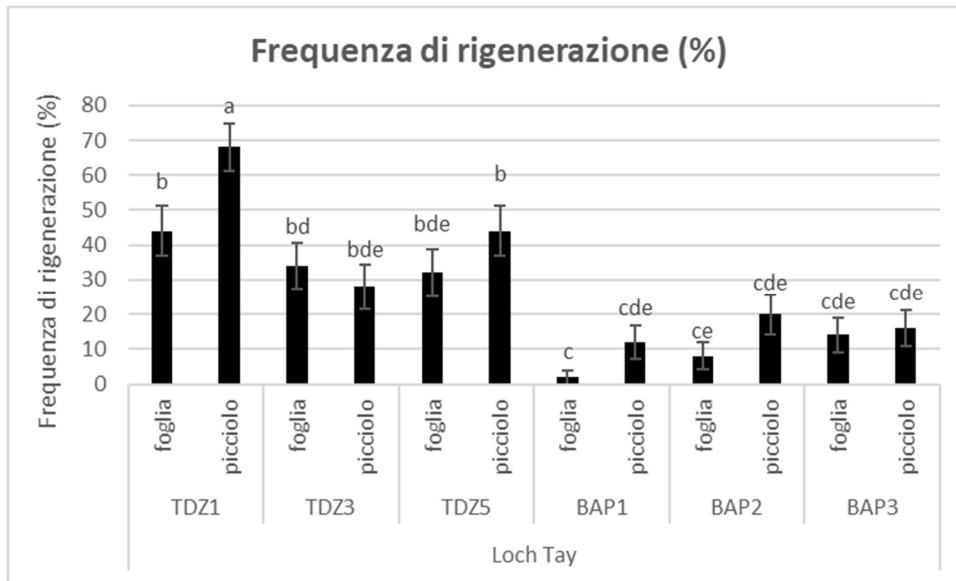


Grafico 8

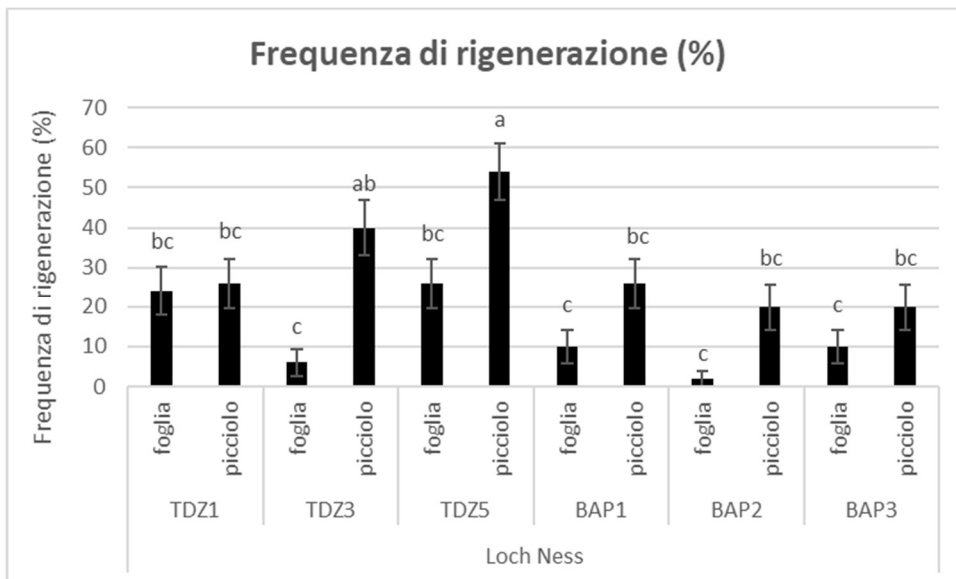


Grafico 7 e 8- Confronto dei valori della frequenza di rigenerazione tra piccioli e foglie di Loch Tay e Loch Ness. I dati raccolti sono stati analizzati con il test ANOVA a un fattore ed eventuali differenze sono state evidenziate usando il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$). Ogni valore rappresenta la media \pm errore standard dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti.

5. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto ha seguito due prove sperimentali su due cultivar di mora: Loch Ness e Loch Tay. Le prove hanno riguardato l'ottimizzazione di un protocollo di micropropagazione e di rigenerazione *in vitro* per ciascuno dei due genotipi. L'obiettivo è stato quello di verificare l'efficienza di proliferazione e rigenerazione di questi due genotipi sui vari terreni di coltura testati.

Nella fase di proliferazione si è visto come Loch Ness e Loch Tay abbiano mostrato un tasso di proliferazione sempre crescente nelle tre subcolture. In modo particolare sia Loch Ness che Loch Tay hanno proliferato efficientemente sul terreno con BAP 0,5 mg L⁻¹ + GA₃ 0,2 mg L⁻¹. Mentre sul terreno con solo BAP hanno mostrato un tasso di proliferazione sufficiente per la produzione di materiale di base da coltura *in vitro*. Ciò che differenzia le due cultivar è la loro risposta ai substrati testati, cioè il numero medio dei germogli ottenuti partendo dall'espianto iniziale. Infatti, Loch Ness ha mostrato un tasso di proliferazione maggiore su entrambi i terreni rispetto a Loch Tay.

Il materiale ottenuto dalla micropropagazione *in vitro* è stato utilizzato nella prova di rigenerazione. Per questa prova sono stati prelevati due tipi di espanti da Loch Ness e Loch Tay, i piccioli e le foglie, e posti su sei substrati diversi per tipo e concentrazione di ormoni con l'obiettivo di valutarne l'efficienza di rigenerazione.

Per Loch Ness il risultato migliore è stato ottenuto dall'espianto di picciolo con una frequenza di rigenerazione del 51% su terreno con TDZ 5 mg L⁻¹ (S3). Invece, per Loch Tay la frequenza più alta si è registrata sempre su picciolo sul terreno TDZ 1 mg L⁻¹ con il 69%. Per il tessuto fogliare non ci sono differenze significativamente importanti in entrambe le cultivar, difatti si è ottenuta una discreta frequenza rigenerativa. Inoltre, si è visto come le basse concentrazioni del BAP abbiano indotto una bassissima rigenerazione sia in Loch Ness che Loch Tay. Quindi, Le due cultivar hanno dimostrato grande variabilità nella capacità di differenziazione dei loro tessuti somatici, e gli effetti dei trattamenti con PGR per l'induzione di questo processo sembrano essere correlati a fattori genetici specifici (Graham et al., 1997).

In conclusione, dallo studio della micropropagazione svolto in questi mesi è stato possibile capire a fondo l'importanza dell'individuazione e dell'applicazione del giusto protocollo per ottenere piante *in vitro* sane e ben sviluppate da ambientare con successo. A seguito dei risultati ottenuti è importante capire quale sia il substrato più idoneo per la propagazione dei

due genotipi di mora. Il materiale avviato *in vitro* può essere utilizzato per la produzione di piante micropropagate, sane da un punto di vista sanitario e destinate, poi, o in pieno campo o come in questo caso come materiale di partenza per la rigenerazione *in vitro*.

Dalla prova di rigenerazione è stato possibile identificare la combinazione di regolatori di crescita da impiegare nel substrato per garantire un'induzione della rigenerazione e per essere quindi testato come terreno di rigenerazione/selezione in esperimenti futuri di trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens*.

6. BIBLIOGRAFIA

- M. Zia-Ul-Haq, M. Riaz, V. De Feo, Hawa Z. E. Jaafar and M. Moga, *Rubus Fruticosus L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses*. *Molecules* 2014.
- C. Nina, C. Alina, L. Mariana, M. Alexandru, T. Mariana, *Blackberry – Importance, Origin and Value*. *Journal of botany* Vol. IX, Nr. 2 (15), 2017.
- M. Diemoz, *Manuale tecnico pratico. La coltivazione del lampone*. Institut Agricole Régional 2013.
- Awatef M. Badr-Elden, Ahmed A. Nower, Adel A. Abdallah and Hind A. Albeah, *In vitro direct and Indirect propagation of blackberry (Rubus sp.)* *Research Journal of Applied Biotechnology (RJAB)* 26-29 April, 2016.
- BOBROWSKI, Vera L.; MELLO-FARIAS, Paulo C.& PETERS, José A. *Micropropagation of blackberries (Rubus sp.) cultivars*. *Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA*, v.2, nº 1, 17-20, Jan. -Abr., 1996.
- Matthew C. Pelto & John R. Clark, *In vitro shoot tip culture of Rubus part 1., Small fruits review*, Vol. 1(2) 2000.
- D. Petrini. *Fasi micropropagazione. Micropropagazione*. <http://micropropagazione.blogspot.it/p/fasi-micropropagazione.html>.
- C. Damiano, G. De Paoli, M. Lambardi, (2007). *The new challenges of large micropropagation in Italy*.
- A. Fira, D. Clapa, M. Simu, *Studies Regarding the Micropropagation of Some Blackberry Cultivars*. *Bulletin UASVM Horticulture* 71(1) / 2014

- G. Edwin F., M. A. Hall., G. J. De Klerk. Plant propagation by tissue culture. Springer Verlag.
- G. Edwin F. (1993). Plant Propagation by Tissue Culture Part 1: The Technology. Edington, England.
- H.T. Hartman, D.E.Kester. Propagazione delle piante. Edizioni agricole.
- H.T. Hartmann, Kester D.E., (2002). Plant propagation Principles and practices. Prentice Hall, cap.9.
- H.T. Hartmann; Kester, D.E. (1990). “Propagazione delle piante”. Edizioni Ed agricole.
- D. Muñoz-Concha, J. Quintero and S. Ercişli, Media and hormones influence in micropropagation success of blackberry cv. ‘Chester’. Research Journal of Biotechnology Vol. 16 (5) May (2021).
- J. Wu, S. A. Miller, H. K. Hall, P. A. Mooney, Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of Rubus. Plant Cell Tiss Organ Cult (2009) 99:17–25.
- S. Kefayeti, E. Kafkas, S. Ercisli, Micropropagation of ‘Chester thornless’ Blackberry Cultivar using Axillary Bud Explants. Not Bot Horti Agrobo, 2019.
- A. Fira, D. Clapa, L. A. Vescan, Direct ex Vitro Rooting and Acclimation in Blackberry Cultivar ‘Loch Ness’. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies 69(1-2) /2012.
- Gina E. Fernandez and John R. Clark, In Vitro Propagation of the Erect Thornless ‘Navaho’ Blackberry. HORTSCIENCE 26(9):1219. 1991.

- P. Lucchi. Tecniche vivaistiche. Coltura & cultura. <http://www.colturaecultura.it/content/tecniche-vivaistiche>.
- R. Heller, (1953). 'Recherches sur la nutrition minerales des tissues ve egetaux cultives, in vitro' Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14, 1-223.
- R. N. Trigiano; D.J. Gray; (1996). "La coltura dei tessuti vegetali". Edizioni Edagricole. Eds. "Plant tissue culture concepts and laboratory excercises", prima edizione CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- G.L. Beccaro, L. Giongo, F.R. De Salvador, V. Ughini, L. Folini, P. Draicchio, T. Eccher, G. Granelli, M. Baudino, I. Mignani, S. Caterino, A.K. Cerutti, L. Palmieri, G. Bounous, Scegliere la cultivar di lampone, mirtillo e rovo per il 2011. L'Informatore Agrario 20/2011.
- G. Bounous, G. Beccaro, M. Baudino, F.R. De Salvador, T. Eccher, R. Giordano, B. Mezzetti, A. Pititto, Piccoli Frutti. L'Informatore Agrario 24/2004.
- G.L. Beccaro, C. Carli, R. De Salvador, P. Draicchio, L. Folini, L. Giongo, R. Giordano, M.G. Mellano, I. Mignani, A. Spinardi, Piccoli Frutti "made in Italy": un comparto in aumento. L'Informatore Agrario 26/2017.
- L. Giongo Mirtillo, Lampone, Mora: serve specializzazione produttiva. Frutticoltura -n.6- 2013.
- T. Vujovic', Đ. Ruz'ic', R. Cerovic', G. S'urlan Momirovic, Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. Springer Science + Business Media B.V. 2010.
- B. Mezzetti, G. Savini, F. Carnevali e D. Mott., Plant genotype and growth regulators interaction affecting in vitro morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biologia Plantarum* 39 (1): 139-150, 1997.

- Lazić T. and Đ. Ružić (2007): Organogenesis in vitro from the leaf of blackberry cv Čačanska bestrna. *Genetika*, Vol. 39, No. 1, 69- 78.
- S. Gupta, V. Mahalaxmi, In vitro high frequency direct plant regeneration from whole leaves of blackberry. *Scientia Horticulturae* 120 (2009) 22–26.
- R. Meng, Tony H.H Chen, Chad E. Finn, Yonghai Li, Improving in vitro plant regeneration from leaf and petiole explants of “Marion” blackberry. *HortScience* Vol. 39(2), April 2004.
- Lorenzetti F., Ceccarelli S., Rosellini D., Veronesi F., 2011. *Genetica agraria. Genetica e biotecnologie per l’agricoltura*. Pàtron Editore, Bologna.