

Alberto TOSCA<sup>1</sup>

## COLTURE IN VITRO PER LA CONSERVAZIONE DEL PATRIMONIO VEGETALE NATURALE

**RIASSUNTO:** Le colture *in vitro* sono tecniche che si stanno velocemente affermando per propagare specie minacciate da reintrodurre in ambiente. La scelta della tecnica, germinazione di semi e spore o clonazione, deve essere valutata sulla base della variabilità genetica della popolazione. Infatti la sopravvivenza di una specie dipende dall'adattamento a lungo termine permesso da un livello minimo di variabilità nell'ambito della popolazione. Le moderne tecniche di genetica molecolare permettono di ottenere informazioni sulla variabilità genetica e perciò, permettono una più oculata scelta delle strategie di intervento. Infatti, se come regola generale la clonazione va evitata, ci sono situazioni in cui la variabilità esistente è già notevolmente depauperata, come nel caso di deriva genetica o collo di bottiglia, cosicché incrementare il numero di individui significa permettere alla mutazione e alla selezione naturale di creare nuova variabilità e aumentare le possibilità di adattamento e quindi di sopravvivenza a breve e anche a lungo termine.

**SUMMARY:** The techniques of *in vitro* culture are increasingly used to propagate endangered plants in order to introduce them in the natural environment. Seed and spore germination techniques or clonal propagation must be evaluated on the basis of genetic variability of the population. In fact the preservation of natural plants depends upon long term adaptation allowed by the conservation of genetic variability of population. Modern techniques of molecular genetic could inform about the state of the population and thereafter on the strategies to use in plant reintroduction. In fact, if as a rule clonal propagation must be avoided, it could be applied in the case of low variability i.e. in situations resembling genetic drift or bottle neck in which the need of high numbers of individuals is request to permit the creation of new variability by mutation and natural selection and thereafter short term as well as long term adaptation and hence survival.

**PAROLE CHIAVE:** colture *in vitro*, genetica molecolare, variabilità genetica

**KEY WORDS:** *in vitro*, culture, molecular genetics. genetic variability.

---

<sup>1</sup> Centro MIRT - Fondazione Minoprio

**INTRODUZIONE.** La conservazione della diversità biologica è uno degli aspetti di maggior rilievo in campo ecologico. Ciò è tanto più rilevante nelle regioni mediterranee dove sono presenti un elevato numero di endemismi la cui sopravvivenza è minacciata dall'attività antropica (Bramwell 1990). A parte i problemi legati alla conservazione degli habitat, una attenzione particolare deve essere posta rispetto alla conservazione della variabilità genetica. Le tecniche tradizionali trovano però dei limiti di applicabilità nella scarsa efficienza e si stanno affermando con sempre maggior successo le colture *in vitro*, troppo spesso però identificate con la sola micropropagazione che di esse è solo una delle tante applicazioni. Oltre alla micropropagazione altri campi che coinvolgono direttamente le tecniche *in vitro* sono infatti la germinazione di semi recalcitranti a tecniche tradizionali, le manipolazioni genetiche (dalla produzione di piante aploidi alla trasformazione genetica, alla fusione di protoplasti intra- ed interspecifica, fertilizzazione *in vitro*, mutagenesi, ecc.) il risanamento da virus e batteri. Tutto questo ampio spettro di interventi non deve far pensare che siano sempre applicabili. Laddove sono state applicate hanno dimostrato un'indubbia superiorità sulle tecniche tradizionali, ma non sempre sono state individuate le metodologie adatte alle diverse specie.

**METODOLOGIE E VANTAGGI DELLE COLTURE *IN VITRO*.** Le tecniche *in vitro* che riguardano il campo della conservazione del patrimonio vegetale naturale sono la germinazione da seme e spore, la clonazione e la conservazione *in vitro* a lungo termine.

La germinazione dei semi ha trovato applicazione in molti generi, ma specialmente per le orchidee ha dimostrato una netta superiorità di efficienza. Infatti i substrati di coltura possono sopperire alla mancanza di infezione simbiotica, anche se il ricorso a micorrizze è sempre vantaggioso sia per velocizzare la crescita degli embrioni *in vitro*, sia per permettere una maggiore propagazione naturale dopo la reintroduzione in ambiente. Infatti la germinazione dei semi di orchidee in natura avviene solo dopo l'incontro fra il seme e la micorrizza.

Un campo a parte è poi la germinazione delle spore di felci per ottenere i protalli, e successivamente alla fecondazione delle oosfere, gli sporofiti. In questo caso uno dei vantaggi maggiori è ottenere colture pure.

La clonazione di materiale *in vitro* può avvenire per gemma ascellare cioè per sviluppo di gemme preformate e perciò permette una elevata fedeltà al genotipo di partenza. Si possono avere delle variazioni rispetto al fenotipo di partenza, dette variazioni epigenetiche, che non sono però ereditabili, ma sono solo la conseguenza delle influenze dei fitoregolatori usati durante la coltura *in vitro*. Di solito queste variazioni riguardano il portamento (in genere più ramificato per effetto delle citochinine), lo sviluppo vegetativo più veloce e il ritardo della fioritura per l'aumento della durata del periodo di giovanità indotto dalle colture *in vitro*.

In altri casi si può o si deve ricorrere a tecniche basate sulla neoformazione di gemme (gemme avventizie) o di embrioni somatici da sezioni di foglia, internodo, fiore, radice, bulbo, tubero. In questo caso si possono ottenere mutanti genetici detti somacloni con una frequenza anche piuttosto elevata (fino al 20%).

La conservazione di materiale *in vitro* (conservazione *ex situ*) può avvenire per mezzo di trasferimenti routineri delle piantine (o anche di calli o cellule) la cui crescita può essere rallentata per mezzo di basse temperature (generalmente 4°C) o con inibitori o ritardanti della crescita. La tecnica però più promettente è quella della crioconservazione a temperature dell'azoto liquido (-196°C) che permette la conservazione per tempi molto lunghi senza bisogno di periodiche manipolazioni come negli altri due casi. La crioconservazione ha però lo svantaggio di richiedere attrezzature specifiche per maneggiare l'azoto liquido.

**SVANTAGGI DELLE COLTURE *IN VITRO*.** La fase iniziale delle colture *in vitro* consiste nella preparazione delle piante madri (micropropagazione) e successivamente nella sterilizzazione, generalmente con ipoclorito di sodio, del materiale da porre in coltura. La condizione fondamentale delle colture *in vitro* è l'asepsi, perché i substrati di coltura permettono la crescita di microrganismi. In particolare le muffe trovano in essi condizioni ottimali (sali minerali e zuccheri) per svilupparsi. Temibili sono pure gli inquinamenti da batteri che, spesso interni ai tessuti e non raggiungibili con le tecniche di disinfezione, possono rimanere latenti per lunghi periodi prima di manifestarsi. Inoltre la determinazione delle metodologie deve essere fatta specie per specie e spesso sono necessari aggiustamenti delle concentrazioni di fitoregolatori anche per singoli genotipi. Una delle maggiori difficoltà nell'applicare queste tecniche alle piante minacciate o rare è la scarsa disponibilità di materiale di partenza per le prove necessarie.

Da non trascurare poi è la necessità di strutture, di attrezzature (laboratorio) e di personale con preparazione specifica. In genere si può stimare un impegno di personale per la propagazione *in vitro* variante fra 30 giorni /anno/uomo e i 5-6 mesi per specie in funzione della difficoltà e della necessità di sviluppare nuovi protocolli.

**GENETICA DELLE PICCOLE POPOLAZIONI.** Gli interventi di reintroduzione di piante minacciate devono partire da considerazioni circa la dinamica genetica delle popolazioni onde poter scegliere il tipo di strategia da adattare, sia alla conservazione *in situ* che *ex situ* (Mistretta 1994). Ciò significa comprendere quale sia il grado ottimale di imparentamento dei potenziali incroci, che ruolo giochi la depressione da *inbreeding* rispetto al mantenimento di geni adattati all'ambiente e quale invece la depressione da *outbreeding* derivante dall'introduzione di popolazioni non tipiche. Inoltre, bisogna valutare la possibilità di piani di incrocio programmati per ottenere materiale adatto alla reintroduzione in ambiente. Non da ultimo è da valutare se gli sforzi necessari possano servire a salvaguardare o meno una specie. Infatti bisogna rispondere alla domanda se sia più conveniente concentrarsi su popolazioni che, sebbene già geneticamente depauperate, possiedono ancora un certo grado di variabilità da far presupporre una evoluzione o su quelle che già soffrono fortemente da depressione da *inbreeding*. Questa valutazione non può prescindere dalle disponibilità finanziarie che, essendo scarse, si devono sfruttare nei modi migliori.

Dato il presupposto che l'unità da conservare non è il singolo individuo ma un insieme di essi che costituisce la "minima popolazione vitale", cioè una popolazione la cui dimensione le permetta l'adattamento e perciò la sopravvivenza a lungo termine, si

devono compiere studi preliminari volti a valutare la variabilità delle popolazioni di partenza. Le maggiori conoscenze di genetica delle piccole popolazioni derivano dagli studi su sistemi animali. Da queste esperienze si desume che una popolazione con meno di 500 individui sia in una situazione di "deriva genetica", dove cioè la perdita di variabilità non è più bilanciata dalla mutazione. Nel caso poi che la popolazione sia ridotta a circa 10 esemplari, si verifica una situazione definita a "collo di bottiglia".

Questi dati possono però valere per piante autoincompatibili, come per gli animali. Nelle specie vegetali troviamo però diversi gradi di autoincompatibilità, da quella più assoluta di specie dioiche, a vari gradi di autocompatibilità, fino alla perfetta autocompatibilità (specie che perciò raggiungono anche il 90% di autofecondazione) delle specie autogame. Se le specie sono autocompatibili è ragionevole pensare che il numero minimo di individui per popolazione debba essere notevolmente aumentato.

**METODOLOGIE DI GENETICA MOLECOLARE PER LA DETERMINAZIONE DELLA VARIABILITÀ DI POPOLAZIONE.** Per studiare la variazione di un singolo gene erano disponibili solo mutanti morfologici e comportamentali, prima che si affermassero le tecniche elettroforetiche basate sugli alloenzimi. Oggi oltre a queste, tecniche ancor più sofisticate permettono lo studio della genetica di popolazione a partire direttamente dal DNA. Queste tecniche ricorrono al polimorfismo del DNA e in particolare sfruttano determinati "marker" quali gli RFLP, i RAPD, i mini e microsattelliti o la sequenziazione del DNA per valutare la variabilità genetica (per una trattazione generale vedi Hoelzel 1992). Sulla base dei dati ottenuti con queste tecniche è possibile valutare il grado di eterozigosità e la variabilità delle popolazioni studiate, oltre alla distanza genetica fra popolazioni diverse. La conoscenza di questi dati permette una valutazione della situazione genetica della popolazione su cui basare le strategie di intervento.

**QUANDO INTERVENIRE CON LE COLTURE *IN VITRO*.** In genere si considera utile intervenire con tecniche *in vitro* ove la specie presenti difficoltà e scarsità di germinazione. E' però necessario definire la situazione genetica della popolazione in quanto gli interventi devono ad essa essere adeguati.

Laddove la specie, pur essendo minacciata, è presente con un numero di individui elevato, comunque superiore alla dimensione definita per la situazione di deriva genetica, ogni intervento di clonazione deve essere evitato. Infatti si appiattirebbe velocemente la variabilità genetica compromettendo così l'adattamento a lungo termine e perciò la sopravvivenza della specie. E' anche probabile che sia meglio non intervenire affatto in queste situazioni, se non nel caso di riportare la specie in luoghi in cui era scomparsa, fatto salvo naturalmente la condizione base per la reintroduzione e cioè il ripristino degli habitat.

Nel caso una specie sia definita in situazioni di deriva genetica è auspicabile intervenire favorendo lo sviluppo di semi, anche avvalendosi delle tecniche *in vitro* se la germinabilità è scarsa. E' inoltre possibile intervenire anche con la clonazione, a patto però di moltiplicare quanti più genotipi possibile.

Nelle situazioni definite a collo di bottiglia ogni remora riguardante la clonazione è accantonata in quanto la variabilità genetica è minima. Perciò in questo caso è

necessario immettere quanti più individui possibile per dar modo alla mutazione e alla selezione naturale di incrementare la variabilità. L'utilizzo di tecniche che favoriscono la mutazione somaclonale è auspicabile (Bramwell 1990).

Un cenno a parte riguarda la conservazione *ex situ*. Tradizionalmente, per ovvie disponibilità di spazio, la conservazione *ex situ* implica la costituzione artificiale di popolazioni piccole e perciò a bassa variabilità. Questo materiale quindi non è adatto alla reintroduzione in ambiente perché altererebbe i rapporti fra geni appiattendolo la variabilità (ovviamente si escludono i casi di deriva genetica e di collo di bottiglia). Inoltre queste popolazioni non sono sempre tipiche della zona da ripopolare. La crioconservazione, qualora messa a punto per le specie di interesse, permetterebbe di conservare in poco spazio, per lunghi tempi e con scarsi interventi di manutenzione, un numero potenzialmente elevato di genotipi.

Non da ultimo si deve tener conto del possibile apporto delle colture *in vitro* quando si eseguano incroci manuali fra popolazioni tipiche e atipiche in cui il rischio è quello di introdurre nella popolazione tipica geni deleteri per la sopravvivenza della specie; ad esempio in ambiente freddo e con terreni salini gli alleli per la tolleranza alle situazioni estreme devono essere mantenuti. E' quindi possibile intervenire con la selezione *in vitro* su semi in germinazione per selezionare gli individui tolleranti necessari a quegli ambienti.

**CONCLUSIONE.** Le urgenze ambientali richiedono interventi rapidi e i criteri esposti possono servire da guida. Esistono però numerose lacune sulla conoscenza delle dinamiche genetiche delle piccole popolazioni di specie vegetali. E' perciò auspicabile che gli interventi di protezione della flora naturale minacciata siano accompagnati da studi di genetica avvalendosi delle moderne tecniche molecolari onde poter disporre di una mole di dati adeguata e scientificamente valida per valutare lo stato delle popolazioni, i tipi di interventi richiesti e poter monitorare le dinamiche genetiche dopo la reintroduzione delle specie. Ovviamente la predisposizione dei piani di reintroduzione non può prescindere dalle condizioni ecologiche e dalla protezione degli habitat e non da ultimo dall'affermarsi di una cultura ambientale sia a livello di amministrazioni del territorio sia a livello di singolo cittadini senza la quale ogni sforzo verrebbe vanificato.

Consegnato gennaio 1996

#### BIBLIOGRAFIA

- BRAMWELL D., 1990 - The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. In: Conservation techniques in Botanic Gardens, Hernandez-BERMEJO J.E., CLEMENTE M., HEYWOOD V. Eds., Koeltz Scientific Books, Koenigstein
- HOELZEL A.R. (Ed.), 1992 - Molecular genetic analysis of populations. A practical approach. IRL Press, Oxford
- MISTRETTA O., 1994 - Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. Biodiversity and Conservation, 3: 184-190

**INDIRIZZO DELL'AUTORE:**Fondazione Minoprio  
Viale Raimondi, 54  
22070 Vertemate (CO) - ITALY -