

Matteo Giannattasio

**Sui fattori che regolano l'organogenesi dei tessuti di
Brassica oleracea var. *caulorapa* coltivati *in vitro*. ***

Abbiamo precedentemente descritto l'effetto dell'acido indolacetico e di alcune citochinine sul comportamento dei tessuti di *Brassica oleracea* var. *caulorapa* coltivati *in vitro* (GIANNATTASIO, 1967; GIANNATTASIO & KOVOOR, 1968). Queste sostanze, oltre che stimolare la crescita, esercitarono anche una forte azione organogenetica, la quale, però, risultò influenzata dallo stato fisiologico degli espianti. Infatti, tessuti prelevati da piante giovani formarono radici e germogli in presenza delle sostanze di crescita studiate, mentre quelli provenienti da piante adulte formarono solo radici nelle stesse condizioni di coltura. Queste osservazioni suggerivano l'intervento di fattori interni nei fenomeni di organogenesi *in vitro* dei tessuti di *Brassica*.

Nella presente nota sono riportati i risultati di uno studio più dettagliato sui fattori esterni ed interni responsabili dell'organogenesi *in vitro* di questi tessuti.

MATERIALE E METODO

Materiale vegetale: sono stati utilizzati tuberi caulinari di piante di *Brassica oleracea* var. *caulorapa* cultivar « Blanc hâtif de Vienne ». I semi furono messi a germinare in serra nel mese

* Lavoro eseguito presso l'Istituto Botanico della Facoltà di Agraria dell'Università di Napoli con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

di marzo e le piantine di uniforme sviluppo furono trapiantate in piena terra nel mese successivo. I tuberi furono prelevati in tre momenti successivi, precisamente in aprile (Esperienza con piante giovani), in giugno (Esperienza con piante adulte) ed infine in autunno al momento della fioritura (Esperienza con piante mature).

Preparazione degli espianti: espianti di circa 500 mg furono prelevati dal parenchima vascolare dei tuberi appena colti ed insemenzati asetticamente su un substrato nutritivo contenente la soluzione minerale di LINSMAIER & SKOOG (1965) e, come costituenti organici, saccarosio (3%) e vitamina B₁ (1 mg/l).

Sostanze saggiate: furono saggiate le seguenti sostanze (alle concentrazioni comprese tra 0,001 mg ed 1 mg/l): adenina, chinina, zeatina, gibberellina (tutte della Calbiochem), isopen-tenil adenina (amabilmente fornita dal Dott. KLAMBT), acido indolacetico (Merck); il latte di cocco, impiegato alle concentrazioni di 5, 10 e 20%, fu estratto da noci immature fornite dall'I.N.R.H.O. della Repubblica del Dahomey. Tutte queste sostanze furono aggiunte al substrato colturale prima della sterilizzazione all'autoclave (20' ad 1 Atm).

Tecnica di estrazione: 1 kg di tessuti prelevati da piante giovani, raccolte in aprile, fu omogenizzato con 4 litri di alcool etilico a 95°C e quindi trattato secondo la tecnica di estrazione riportata da LETHAM (1966) per le citochinine. Pertanto, l'estratto alcolico fu centrifugato ed il supernatante fu evaporato sotto vuoto a 38°C. Il residuo fu sottoposto a triplice estrazione con acqua ed il risultante estratto acquoso fu trattato 5 volte con volumi uguali di *n*-butanolo. L'estratto butanologico così ottenuto fu evaporato sotto vuoto. Il residuo fu incorporato, in quantità opportune, nel substrato di coltura prima della sterilizzazione all'autoclave.

Condizioni di coltura ed analisi dei risultati: le colture furono tenute in una cella termostatica alla temperatura costante di 26°C con 12 ore di luce (1500 lux) e 12 di buio. 24 colture furono destinate ad ogni condizione sperimentale. L'esame dei risultati fu fatto dopo 60 giorni di coltura.

Preparati istologici: i tessuti furono fissati in KARPETSCHENKO, imparaffinati e sezionati; le sezioni furono colorate con safranina o con safranina-ematossilina.

RISULTATI

A) ESPERIENZA CON TESSUTI DI PIANTE GIOVANI

Azione dell'acido indolacetico: come è riportato nella Tabella I, l'acido indolacetico è capace di indurre, in assenza di

Tab. I - AZIONE DELL'ACIDO INDOLACETICO (AIA) SULL'ORGANOGENESI DEI TESSUTI PRELEVATI DA PIANTE GIOVANI

Concentrazione di A I A (mg/l)	Espianti produttori solo radici (in %)	Espianti produttori solo germogli (in %)	Espianti produttori radici e germogli (in %)	Totale espianti produttori organi (in %)
0	0	0	0	0
0,001	0	0	0	0
0,01	3	0	0	3
0,1	20	5	5	30
1	10	5	30	45

altre sostanze di crescita, la formazione di organi. Alla concentrazione di 0,01 mg/l, l'auxina esplica un'azione prevalente sulla rizogenesi, mentre, a più forte concentrazione (0,1 ed 1 mg/l) stimola anche la formazione di germogli (Tav. II, A). L'esame istologico degli espianti mostra che, sotto l'influenza dell'auxina, i tessuti formano, dopo pochi giorni di coltura, un cambio diffuso alla periferia dell'espianto (Tav. I, A). Successivamente, si ha la comparsa, all'interno dell'espianto, di formazioni vascolari (Tav. I, B) e quindi di radici (Tav. I, C). Le gemme compaiono più tardi, verso il ventesimo giorno di coltura, ed hanno sempre origine esogena (Tav. I, D).

Azione delle citochinine: è stata studiata l'azione della chi-

Tab. II - AZIONE DELL'ISOPENTENIL ADEMINA (2iP) E DELLA CHINETINA (Ch)
SULL'ORGANOGENESI DEI TESSUTI PRELEVATI DA PIANTE GIOVANI

Concentrazione di citochinina (mg/l)	Espianti produttori solo radici (in %)	Espianti produttori solo germogli (in %)	Espianti produttori radici e germogli (in %)	Totale espanti produttori organi (in %)
AIA=0 2iP	0	0	0	0
	0,01	0	0	0
	0,1	0	0	0
	1	0	0	0
AIA=0,1 2iP	0	20	5	30
	0,01	24	3	32
	0,1	30	1	33
	1	32	1	34
AIA=1 2iP	0	10	5	45
	0,01	12	6	54
	0,1	12	3	55
	1	15	2	52
AIA=0 Ch	0	0	0	0
	0,01	0	0	0
	0,1	0	0	0
	1	0	0	0
AIA=0,1 Ch	0	20	5	30
	0,01	22	2	31
	0,1	25	1	33
	1	25	1	32
AIA=1 Ch	0	10	5	45
	0,01	10	8	45
	0,1	11	2	51
	1	12	1	47

netina e dell'isopentenil adenina. I risultati, riportati nella Tabella II, mostrano che entrambe sono del tutto inattive; in

Tab. III - AZIONE DEL LATTE DI COCCO SULL'ORGANOGENESI DEI TESSUTI
PRELEVATI DA PIANTE GIOVANI

Concentrazione di latte di cocco (ml/l)	Concentrazione di acido indolacetico (mg/l)	Espianti produttori solo radici (in %)	Espianti produttori solo germogli (in %)	Espianti produttori radici e germogli (in %)
0	0	0	0	0
100	0	25	5	10
150	0	25	8	15
200	0	30	15	19
0	0,1	20	5	5
100	0,1	10	19	25
150	0,1	15	25	35
200	0,1	7	20	50

presenza dell'acido idolacetico, stimolano l'effetto organogenetico di questo.

Azione del latte di cocco: risulta evidente dalla Tabella III che il latte di cocco svolge una potente azione organogenetica, in particolar modo quando è associato all'auxina.

B) ESPERIENZA CON TESSUTI DI PIANTE ADULTE

Azione dell'acido indolacetico e delle citochinine: i tessuti si sono mostrati incapaci di dare germogli in presenza dell'auxina e delle citochinine, variamente combinate tra di loro. La formazione di radici invece è indotta dalla sola presenza dell'a-

Tab.IV - AZIONE DELL'ACIDO INDOLACETICO (AIA), DELL'ISOPENTENIL ADENINA (2iP) E DELLA CHINETINA (Ch) SULL'ORGANOGENESI DEI TESSUTI PRELEVATI DA PIANTE ADULTE

I tessuti non hanno mai prodotto germogli

Concentrazione di A I A (mg/l)	Concentrazione di citochinina (mg/l)	Espianti prodotti radici (in %)	Numero di radici perespianto
0	0	0	0
0,01	0	0	0
0,1	0	10	1
1	0	60	7
0	2iP 0,1	0	0
0	1	0	0
0,1	0,1	40	8
0,1	1,0	60	9
1,0	0,1	80	20
1,0	1	90	25
0	Ch 0,1	0	0
0	1,0	0	0
0,1	0,1	10	1
0,1	1,0	10	1
1	0,1	60	7
1	1	70	10

cido indolacetico ed è ulteriormente stimolata dalle due citochinine (Tab. IV e Tav. II, B).

Azione del latte di cocco: il latte di cocco provoca sia la comparsa di radici che di germogli (Tav. II, C) con un effetto

Tab. V - AZIONE DEL LATTE DI COCCO SULL'ORGANOGENESI DEI TESSUTI
PRELEVATI DA PIANTE ADULTE

Concentrazione di latte di cocco (ml/l)	Concentrazione di acido indolacetico (mg/l)	Espianti prodotti solo radici (in %)	Espianti prodotti solo germogli (in %)	Espianti prodotti radici e germogli (in %)
0	0	0	0	0
100	0	20	5	5
150	0	20	7	9
200	0	25	6	10
0	0,1	10	0	0
100	0,1	20	6	20
150	0,1	10	5	35
200	0,1	5	9	50

meno evidente di quello osservato nell'esperienza precedente (Tab. V).

Azione di altre sostanze: adenina e gibberellina sono risultate incapaci di provocare la formazione di germogli quando sono state associate all'auxina ed alle citochinine.

C) ESPERIENZA CON TESSUTI DI PIANTE PERVENUTE A MATURITÀ

Azione dell'acido indolacetico, delle citochinine e dell'adenina: tutte queste sostanze sono risultate inattive sull'organogenesi. In questa esperienza è stata anche utilizzata una terza citochinina, la zeatina, che, come le altre due, non ha manifestato alcuna attività. Risultati negativi si sono avuti anche quando l'auxina, l'adenina e le tre citochinine sono state variamente combinate tra di loro (Tav. III).

Azione del latte di cocco: come è riportato nella Tabella VI, il latte di cocco ha indotto la formazione di organi. I germogli

Tab. VI - AZIONE DI DIVERSE SOSTANZE DI CRESCITA SULL'ORGANOGENESI
DEI TESSUTI PRELEVATI DA PIANTE MATURE

Sostanza	Concentrazione di acido indolacetico (mg/l)	Espianti producenti solo radici (in %)	Espianti producenti solo germogli (in %)	Espianti producenti radici e germogli (in %)
Nessuna	0	0	0	0
	0,01	0	0	0
	0,1	0	0	0
	1	0	0	0
L.di cocco (ml/l)	100	2	4	6
	200	5	5	10
100	0,1	7	6	15
	200	9	4	18
Estratto ^{oo}	0	0	0	0
	0,1	5	0	0
	1	15	0	3

^{oo} L'estratto (per la tecnica di estrazione vedi in "Materiale e Metodo") è stato aggiunto in quantità equivalente a 200 grammi di tessuto fresco per litro di substrato.

sono appena abbozzati ed incapaci di svilupparsi normalmente (Tav. III).

Azione di un estratto di piante giovani: un estratto di tessuti prelevati da piante giovani è capace di indurre, in presenza dell'auxina, la formazione di radici e di qualche gemma (Tab. VI e Tav. III).

DISCUSSIONE

Tra le sostanze di crescita studiate, l'acido indolacetico ha manifestato la più forte influenza organogenetica, che è stata caratterizzata da una varietà di effetti dipendenti dallo stato fisiologico delle piante utilizzate. Infatti, l'auxina si è rivelata capace di provocare la comparsa di radici e di germogli in espanti prelevati da piante giovani (Tab. I e Tav. II, A), mentre ha indotto solo la rizogenesi nei tessuti di piante adulte (Tab. IV e Tav. II, B); infine, è risultata del tutto inattiva sui tessuti di piante pervenute a maturità (Tab. VI e Tav. III). Le

citochinine, invece, non hanno prodotto nessun effetto significativo in assenza dell'acido indolacetico; associate all'auxina, hanno stimolato l'azione organogenetica di questa.

SKOOG & MILLER (1957) hanno riportato che l'organogenesi dei tessuti di tabacco può essere regolata dal rapporto delle concentrazioni di auxine e citochinine presenti nel substrato di coltura: un rapporto favorevole alle auxine determinerebbe la rizogenesi, un rapporto inverso la caulogenesi. I risultati qui esposti suggeriscono che l'interazione auxina-citochinina, proposta da SKOOG & MILLER, si realizzi nei tessuti di *Brassica* tra l'acido indolacetico proveniente dal substrato di coltura ed una citochinina endogena. La diversità di comportamento dei tessuti di fronte all'acido indolacetico sarebbe allora il risultato di variazioni quantitative di questo rapporto, dovute al progressivo esaurimento della citochinina nel corso della maturazione della pianta. Pertanto quest'ultima sarebbe presente nei tessuti delle piante giovani in quantità tali da realizzare con l'acido indolacetico rapporti favorevoli sia alla formazione di radici che di germogli, mentre si abbasserebbe a livelli limitanti la caulogenesi nei tessuti prelevati da piante adulte, e qualunque fenomeno di organogenesi in quelli di piante pervenute a maturità.

Tale interpretazione è sostenuta dai risultati dell'esperienza condotta sui tessuti prelevati da piante mature (Tab. VI e Tav. III): questi, quando sono stati coltivati in presenza dell'acido indolacetico e di un estratto di piante giovani, ottenuto mediante l'impiego di una tecnica valida per le citochinine (LETHAM, 1966), hanno formato radici e germogli. Nessun effetto si è invece avuto quando l'auxina e l'estratto sono stati impiegati separatamente; ciò prova che l'azione dell'acido indolacetico e quella del fattore presente nell'estratto sono interdipendenti.

I germogli formati in queste condizioni non si sono sviluppati normalmente, per cui, alla fine dell'esperienza, sono risultati appena abbozzati. Un analogo fenomeno è stato osservato da PAULET (1965) per i germogli formati su tessuti di tabacco ed è stato da quest'Autore messo in relazione al basso livello degli zuccheri presenti nei tessuti. Il ruolo della concen-

trazione zuccherina sullo sviluppo dei germogli è stato confermato recentemente da NITSCH & NITSCH (1967) per i tessuti di *Plumbago*.

L'effetto organogenetico dell'estratto vegetale non è stato riprodotto da nessuna delle citochinine che noi abbiamo impiegato (Tav. III). Infatti la chinetina, l'isopentenil adenina e la zeatina si sono rivelate inattive quando sono state sostituite all'estratto; similmente inattiva è risultata l'adenina, alla quale diversi Autori hanno attribuito proprietà organogenetiche. Pertanto, sulla base di questi risultati, noi riteniamo che il fattore attivo presente nell'estratto sia una citochinina specifica dei tessuti di *Brassica*.

Il latte di cocco ha sempre stimolato l'organogenesi, in particolar modo quando è stato associato all'acido indolacetico (Tabb. III e V; Tav. II, C); nell'esperienza condotta sui tessuti di piante mature, ha manifestato un'azione più potente di quella dell'estratto (Tab. VI).

L'attività del latte di cocco sulla crescita e sulla morfogenesi dei tessuti vegetali coltivati *in vitro* è stata più volte riportata (VAN OVERBEEK et Al., 1941; STEWARD, 1963; STEWARD et Al., 1964; REINERT, 1963), ed è stata messa in relazione alle numerose sostanze di crescita che esso contiene. In particolare, da quest'albume liquido sono state isolate recentemente alcune sostanze con attività citochinica (KOOVOR, 1964; LOEFFLER & VAN OBERBEEK, 1964). E' quindi probabile che il potente effetto organogenetico manifestato dal latte di cocco sugli espianti di *Brassica* sia dovuto all'attività di una citochinina analoga a quella presente nei tessuti.

RIASSUNTO

E' stata studiata l'azione di alcune sostanze di crescita sull'organogenesi *in vitro* di espianti di *Brassica oleracea* var. *caulorapa* prelevati da piante di diversa età.

L'acido indolacetico ha esercitato la più forte influenza organogenetica, che è stata caratterizzata da una varietà di effetti dipendenti dalla condizione fisiologica dei tessuti utilizzati. Infatti, l'auxina ha provocato la comparsa di radici e germogli in espianti prelevati da piante giovani, mentre ha indotto solo la rizogenesi in quelli provenienti da piante adulte; infine, è risultata del tutto inattiva sui tessuti di piante pervenute a maturità.

L'interazione auxina-citochinina, proposta da SKOOG e MILLER per i fenomeni di organogenesi dei tessuti vegetali coltivati *in vitro*, si realizzerebbe in questo caso tra l'acido indolacetico del substrato nutritivo ed una citochinina presente nei tessuti. Le differenze osservate nel comportamento dei tessuti sarebbero allora il risultato di variazioni quantitative di questo rapporto, determinate dalla progressiva scomparsa della citochinina endogena durante la maturazione della pianta.

Questa citochinina sembra essere specifica dei tessuti di *Brassica* in quanto la sua azione non è stata riprodotta da nessuna delle citochinine naturali e sintetiche studiate.

Il latte di cocco ha sempre stimolato la formazione di radici e di germogli, specialmente quando è stato associato all'acido indolacetico. La sua azione potrebbe allora essere dovuta ad una citochinina analoga a quella presente nei tessuti di *Brassica*.

SUMMARY

This study concerns the action of certain growth-promoting substances on organogenesis *in vitro* of explants of *Brassica oleracea* var. *caulorapa* made from plants during different stages of maturity.

The strong influence of indoleacetic acid on organogenesis is characterized by a variety of effects that depend on the physiological state of the explants used.

Auxin-cytokinin interaction, as proposed by SKOOG and MILLER, may be imagined as being realised between the indoleacetic acid supplied in the medium and any endogenous cytokinin of the tissues. The varia-

tions observed in the behaviour of tissues may thus be a result of a quantitative change in the final growth-hormone balance due to the progressive depletion of endogenous cytokinin during maturation of the plant.

Such an endogenous cytokinin appears to be somewhat specific for these tissues for it cannot be replaced by the known synthetic or natural cytokinins that were employed, such as kinetin, isopentenyl adenine and zeatin.

However coconut milk consistently promotes the formation of roots and buds in all cases, especially in conjunction with indoleacetic acid. Its action can hence be considered as analogous to that of the natural cytokinin in tissues of *Brassica*.

BIBLIOGRAFIA

- GIANNATTASIO, M., 1967. *The action of some cytokinins on tissues of Brassica oleracea var. caulorapa cultured in vitro*. Gior. Bot. Ital., **101**: 301.
- , & A. KOVOOR, 1968. *Action de quelques cytokinines sur la prolifération et l'organogenèse de tissus de Chou-rave cultivés in vitro*. 93^e Congrès Soc. Savantes, Tours.
- KOVOOR A., 1964. *Action du lait de coco sur la prolifération des tissus de Topinambour cultivés in vitro*. In: Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S., Paris: 83-96.
- LETHAM D. S., 1966. *Regulators of cell division in plant tissues. II. A cytokinin in plant extracts: isolation and interaction with other growth regulators*. Phytochemistry, **5**: 269-286.
- LOEFFLER, J. E. & J. VAN OVERBEEK, 1964. *Kinin activity in coconut milk*. In: Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S., Paris: 77-81.
- NITSCH, C. & J. P. NITSCH, 1967. *The induction of flowering in vitro in stem segments of Plumbago indica. I. The production of vegetative buds*. Planta, **72**: 355-370.
- PAULET, P., 1965. *Etude de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux*. Rev. Gen. Botan., **72**: 697-792.

- REINERT, J., 1963. *Experimental modification of organogenesis in plant tissue cultures*. In: Plant tissue and organ culture (Maheshwari and Ranga Swamy Ed.): 168-177.
- SKOOG, F. & C. O. MILLER, 1957. *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*. In: Symp. Soc. Exp. Biol., **11**: 118-130.
- STEWART, F. C., 1963. *Carrots and Coconuts. Some investigations on growth*. In: Plant tissue and organ culture (Maheshwari and Ranga Swamy Ed.): 178-197.
- , E. M. SHANTZ, M. O. MAPES, A. E. KENT & R. D. HOLSTEN, 1964. *The growth-promoting substances from the environment of the embryo. I. The criteria and measurement of growth-promoting activity and responses induced*. In: Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S., Paris: 45-58.
- VAN OVERBEEK, J., M. E. CONKLIN & A. F. BLAKESLEE, 1941. *Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos*. Science, **94**: 350-351.

T A V O L E

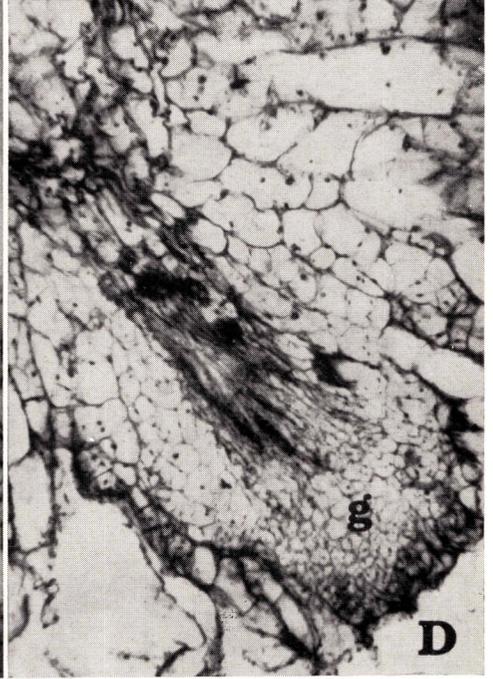
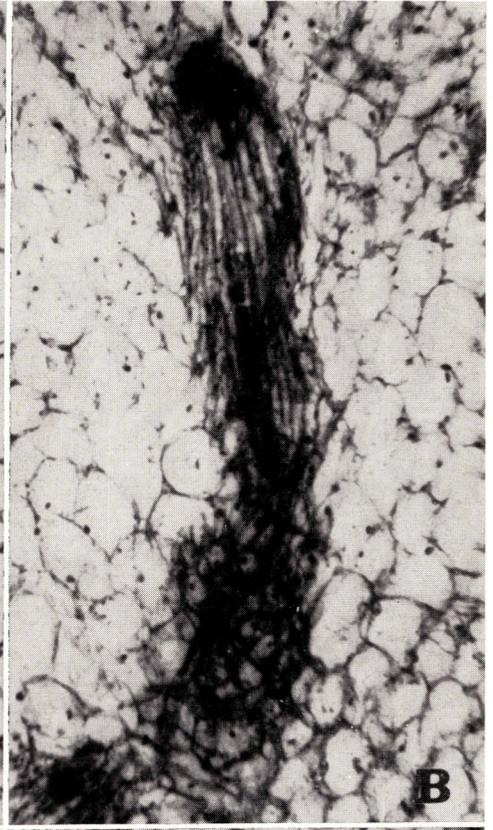
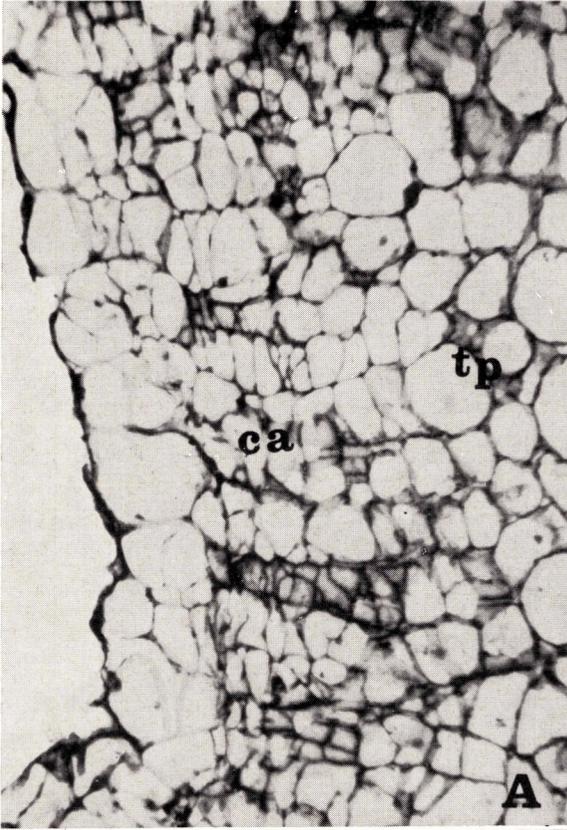
Tav. I - Istogenesi in espianti prelevati da piante giovani e coltivati su un substrato contenente, come unica sostanza di crescita, l'acido indolacetico.

A: neoformazione di una regione meristematica (ca) nel tessuto parenchimatico preesistente (tp).

B: formazione vascolare apparsa all'interno dell'espianto.

C: Struttura di una radice neoformata.

D: Neoformazione di una gemma (g) alla periferia dell'espianto.

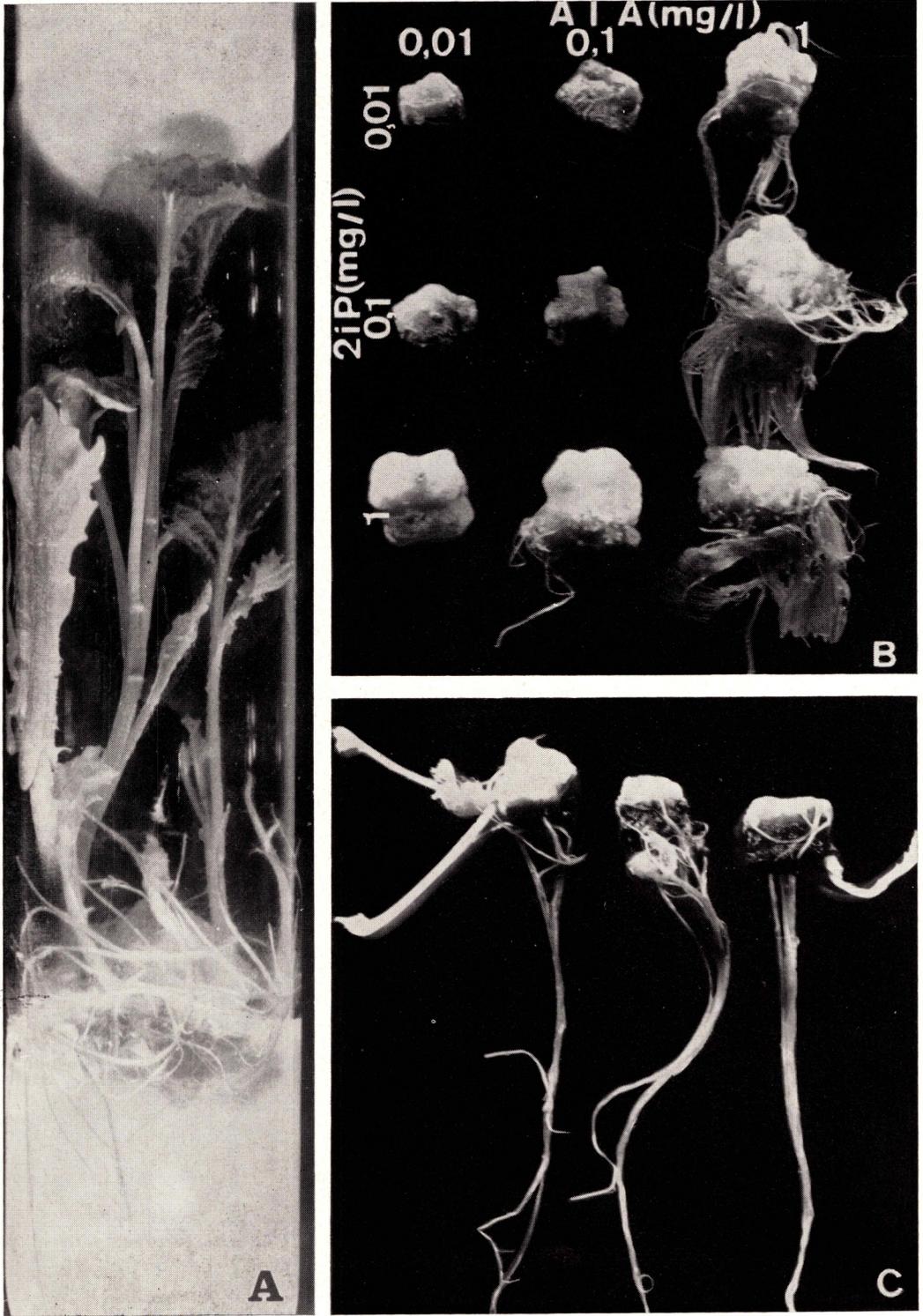


Tav. II - Organogenesi in espianti prelevati da piante di diversa età.

A: espianti prelevati da piante giovani e coltivati su un substrato contenente, come unica sostanza di crescita, l'acido indolacetico. I tessuti hanno formato radici e germogli.

B: espianti prelevati da piante adulte e coltivati su un substrato contenente diverse combinazioni di acido indolacetico (AIA) e di isopentenil adenina (2iP). I tessuti hanno formato solo radici.

C: espianti prelevati da piante adulte e coltivati su un substrato contenente latte di cocco. I tessuti hanno formato radici e germogli.



Tav. III - Organogenesi in espianti prelevati da piante pervenute a maturità e coltivati in presenza dell'acido indolacetico (AIA) associato, in diverse concentrazioni, ad altre sostanze di crescita.

C: controllo con diverse concentrazioni di acido indolacetico. I tessuti non hanno formato organi.

CM: il substrato conteneva latte di cocco (10%). I tessuti hanno formato organi.

E: il substrato conteneva un estratto ricavato da tessuti prelevati da piante giovani. I tessuti hanno formato organi.

2iP: il substrato conteneva isopentenil adenina (1 mg/l). I tessuti non hanno formato organi.

Z: il substrato conteneva zeatina (1 mg/l). I tessuti non hanno formato organi.

A: il substrato conteneva adenina (1 mg/l). I tessuti non hanno formato organi.

