

**Effetti morfogenetici della rimozione del meristema
periferico nella riorganizzazione del germoglio
di *Phaseolus coccineus* L. (*)**

Gli studi sulla rigenerazione della regione centrale dell'apice vegetativo del germoglio sono piuttosto limitati, in particolar modo quelli consecutivi alla rimozione totale del meristema periferico. Essi hanno lo scopo di analizzare sia le reazioni citologiche, sia le modificazioni organogenetiche che si accompagnano alla riorganizzazione del germoglio, per una migliore comprensione del normale funzionamento del meristema apicale.

Per quanto riguarda le Dicotiledoni, LOISEAU (1959) in *Impatiens roylei* trova che la rigenerazione è essenzialmente una conseguenza dei processi cicatriziali, compendosi per sdifferenziamento del periderma da ferita. Le nuove foglie che si formerebbero in seguito a tale sdifferenziamento precederebbero l'organizzazione della sommità apicale. A conclusioni analoghe era già pervenuto CAMEFORT (1956) in alcune specie di Gimnosperme.

Le osservazioni compiute da uno di noi (PELLEGRINI, 1959) sulla rigenerazione dell'apice vegetativo di *Phaseolus vulgaris* in seguito a bipartizione con tagli verticali, indicherebbero che la formazione del periderma cicatriziale e la rigenerazione sono due processi del tutto distinti; la riorganizzazione dell'apice avviene ad opera di un'attività segmentativa che s'instaura in cellule della *tunica* e del *corpus*, situate lontano dalla superficie

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Botanica dell'Università di Messina.

di ferita; successivamente, seppure a breve distanza di tempo, dal nuovo meristema prendono origine in posizione periferica i nuovi primordi fogliari.

Per tale discordanza di dati che alimentano due concezioni diverse relative al funzionamento dell'apice vegetativo del germoglio, ci è sembrato opportuno studiare le modalità rigenerative della regione distale del meristema apicale del germoglio, in seguito ad asportazione parziale e totale del meristema periferico.

La scelta è caduta su *Phaseolus coccineus*, sia per la semplicità della filotassi distica, che agevola lo studio della forma-

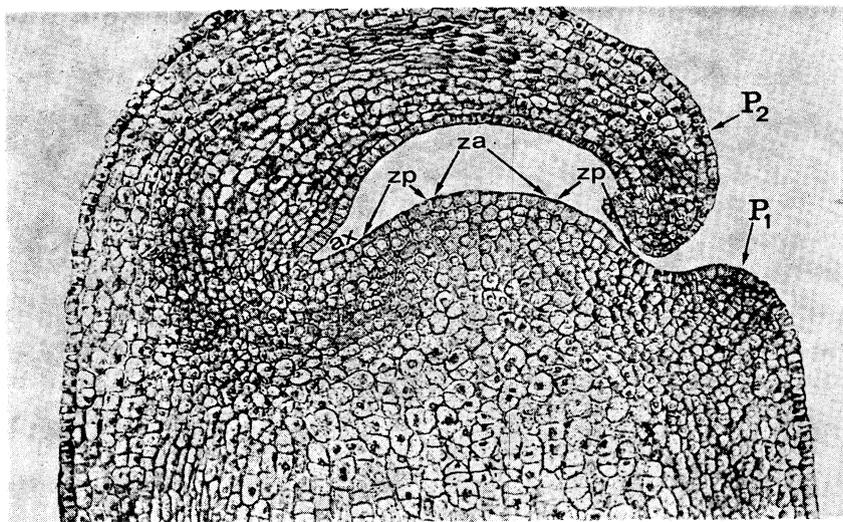


Fig. 1 - Sezione longitudinale mediana di un apice vegetativo del germoglio di *Phaseolus coccineus* nello stadio in cui furono eseguite le operazioni (P₂ e P₁, i più giovani abbozzi fogliari visibili; za, zona apicale; zp, zona periferica; ax, meristema ascellare di P₂).

zione dei nuovi primordi fogliari, sia per le notevoli dimensioni del meristema, il cui diametro nella fase di massimo accrescimento raggiunge circa 300 μ .

MATERIALE E TECNICA

Le operazioni sul meristema apicale di *Phaseolus coccineus* sono state eseguite all'inizio della germinazione del seme, quan-

do la piumetta comprende, oltre alle due foglie primordiali, che si alternano con i cotiledoni, due abbozzi fogliari (P_2 , P_1) non coevi (1) disposti in un piano ortogonale rispetto a quello delle foglie precedenti (fig. 1). La regione indifferenziata del meristema presenta una *tunica* uniseriata ed un *corpus* formato da quattro o cinque strati di cellule che inglobano le iniziali midollari. In essa può distinguersi una zona centrale (*za*) ed una zona organogena laterale (*zp*), dove l'attività segmentativa è preminente. Alla base del primordio P_2 si notano le iniziali della gemma ascellare (*ax*).

La regione meristemica è stata messa a nudo con la rimozione delle foglie primordiali; successivamente sono state compiute due serie di operazioni:

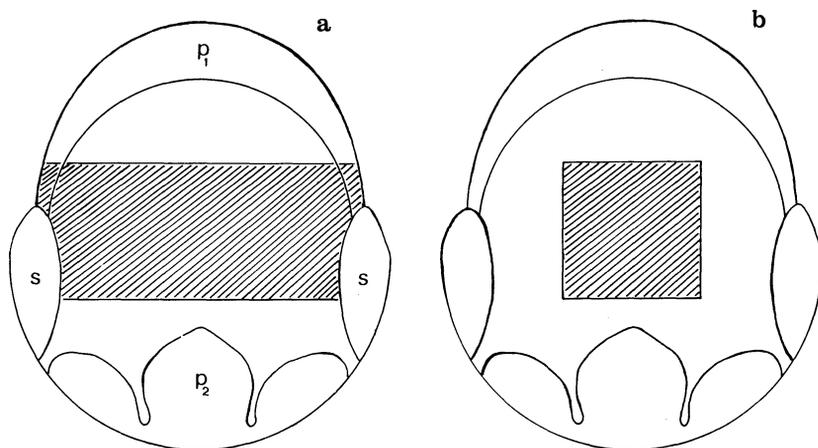


Fig. 2 - Disegno schematico per mostrare le due serie di operazioni eseguite sul meristema apicale del germoglio di *Phaseolus coccineus*: a, rimozione parziale; b, rimozione totale. Le aree tratteggiate rappresentano il meristema isolato, quelle in bianco le regioni asportate. P_2 e P_1 , primordi fogliari; s, stipole di P_2 .

I) *Rimozione parziale*. - Mediante due tagli verticali paralleli sono state separate dal meristema centrale le regioni meri-

(1) Con P_1 , P_2 , P_3 , ecc. s'intendono i più giovani primordi fogliari visibili, nel loro ordine crescente di sviluppo.

stematiche periferiche corrispondenti alle estremità distali delle due ortostiche fogliari; queste due regioni meristematiche sono state quindi asportate insieme ai due più giovani primordi fogliari P_2 e P_1 (fig. 2a).

II) *Rimozione totale.* - In questa seconda serie di operazioni sono stati praticati quattro tagli verticali ad angolo retto, in modo da separare interamente il meristema periferico, che veniva poi rimosso. In questi casi, ad evitare il disseccamento della regione isolata, le superfici di taglio sono state cosparse di lanolina (fig. 2b).

Tutte le operazioni sono state compiute a binolare da dissezione ad ingrandimento di 50x, adoperando adatti microbisturi montati su micromanipolatore Leitz. Il materiale operato è stato tenuto in frigorifero a 25°C. Gli apici sono stati fissati in FAA o in Karpeschenko ad intervalli regolari dopo l'operazione: 6, 12, 24, 48 ore, etc., fino ad un massimo di 7 giorni. Le sezioni longitudinali di 6 μ , sia parallele che ortogonali rispetto alle superfici di taglio, sono state colorate con la tecnica di Sharman.

EFFETTI MORFOGENETICI DELLE OPERAZIONI

Le prime fasi del processo rigenerativo sono pressochè identiche in tutti i tipi di operazioni. Dopo 6 ore dall'intervento nessun segno di ripresa è possibile riconoscere nella regione isolata (Tav. I, 1). Dopo 24 ore si può notare che l'attività cicatriziale è già abbastanza rilevante ed è soprattutto localizzata nelle regioni basali, dove il differenziamento cellulare al momento del taglio era già in atto. Il periderma che ne deriva consta di circa 4 strati di cellule appiattite e vacuolizzate, con piani di segmentazione paralleli alle superfici di taglio (Tav. I, 2). Questa attività s'intensifica successivamente e si estende in direzione acropeta senza però interessare mai la regione distale del meristema (Tav. I, 3, 4, 5, dopo 30 ore). In questo stadio, nella regione sommitale, dove le cellule sono completamente indifferenziate, si nota chiaramente un'accentuazione dei caratteri meristema-

tici: citoplasma più denso, nuclei e nucleoli più voluminosi rispetto alla corrispondente zona di un apice normale, oltre ad un'importante attività mitotica (Tav. I, 4, 6). Questa fase iniziale del processo rigenerativo corrisponde a quella di sdifferenziamento riportata da LOISEAU per *Impatiens*. L'attività segmentativa che si è instaurata tanto nella *tunica* quanto nel *corpus* ha però caratteri essenzialmente diversi da quelli che si osservano nell'attività cicatriziale, sia per la direzione delle mitosi, che per le cellule squisitamente embrionali che ne derivano.

Per quanto riguarda la ripresa dell'attività meristemica che conduce alla ricostituzione del germoglio, occorre distinguere nelle ulteriori fasi del processo, i seguenti comportamenti, sensibilmente diversi in relazione all'importanza della zona periferica rimossa.

I) *Rimozione parziale*. - Nei casi di rimozione parziale la rigenerazione è rapida. Il processo di sdifferenziamento è preminente nelle due regioni periferiche non interessate dal taglio. Esse acquistano i caratteri di zone organogene ed in effetti è in questa sede che si formano i primi due nuovi abbozzi fogliari, cioè in posizione alterna rispetto al piano delle normali ortostiche. Nessuna sostanziale modifica si osserva nella struttura del meristema rispetto ad un apice normale. Nella fig. 7 (Tav. II) si può osservare un apice dopo 48 ore dall'intervento, sezionato in un piano longitudinale mediano, parallelamente alle superfici di taglio. Gli abbozzi delle prime due nuove foglie presentano già evidenti i cordoni procambiali raccordati con il tessuto vascolare sottostante. Il meristema apicale ha conservato la sua normale stratificazione. Le regioni meristematiche situate in corrispondenza delle superfici di taglio si accrescono contribuendo alla ricostituzione del germoglio (Tav. II, 8); esse partecipano alla formazione delle zone laterali delle foglie, in particolare a quella delle stipole.

II) *Rimozione totale*. - La ricostituzione del germoglio consecutiva all'ablazione totale del meristema periferico è decisamente più lenta, per il notevole trauma che la regione isolata deve superare. Il suo disseccamento si riesce ad evitare con l'impiego della lanolina che si cosparge sulle quattro superfici di

taglio. Una certa percentuale di apici tuttavia abortisce per l'insufficiente territorio centrale isolato. In questi casi la rigenerazione è limitata alla formazione di tessuto cicatriziale, che può anche essere imponente.

Per quanto riguarda l'attività che s'instaura nel meristema e che è sola responsabile della rigenerazione dell'apice, anche nell'ambito di questa seconda serie di operazioni il comportamento appare diverso in relazione all'entità della zona periferica rimossa; distingueremo pertanto i due seguenti casi:

a) *Regione centrale isolata di 220-250 μ* ; la rimozione interessa soltanto una sottile fascia periferica della zona organogena fogliare, oltre naturalmente i due primordi P_2 e P_1 .

Negli apici appartenenti a questo primo gruppo, dopo appena 48 ore l'attività è già ripresa in tutto il meristema, ma particolarmente in due regioni laterali opposte, dove si ha un'intensificazione dei caratteri embrionali. Nella fig. 9 (Tav. II) si può notare che in una di tali zone è iniziato lo sviluppo di un abbozzo fogliare, il cui cordone procambiale non ha ancora stabilito i rapporti con il tessuto conduttore sottostante. La regione centrale del meristema, pur presentando un'attivazione delle segmentazioni negli strati della *tunica* e del *corpus*, conserva una netta delimitazione fra questi due territori.

b) *Regione centrale isolata di 150-200 μ* ; la rimozione interessa buona parte o tutta la zona organogena fogliare.

Negli apici appartenenti a questo secondo gruppo i processi rigenerativi sono più lenti, le reazioni cito-istologiche che si verificano nel meristema isolato sono più imponenti. Nella fig. 10 (Tav. II) è rappresentato un apice dopo 4 giorni dall'operazione. Nessun accenno di primordio fogliare è ancora visibile. L'attività segmentativa che si è instaurata nella regione isolata ha portato al sollevamento di un nuovo apice a forma sub-conica che appare completamente indifferenziato e privo ancora della stratificazione e della zonazione caratteristiche del meristema apicale del germoglio. Nelle cellule della *tunica* in posizione di-

stale si sono prodotte segmentazioni anche in direzione periclinal e ciò ha portato alla parziale perdita della individualità fra *tunica* e *corpus*. I nuclei, i nucleoli appaiono voluminosi, specie nella zona distale, dove l'attività mitotica è molto intensa (Tav. II, 11).

È chiaro che tale attività concorre alla formazione delle zone periferiche dell'apice con l'apporto di nuovi materiali cellulari. Tali zone, in un primo tempo risultano relativamente poco attive, ma successivamente, in corrispondenza di due aree opposte, si determina quello sdifferenziamento che le fa assumere il carattere di regioni organogene. Gradualmente il meristema apicale riprende la sua primitiva struttura e solo dopo che sono state ripristinate le zone organogene laterali, in esse ha luogo lo sviluppo dei nuovi primordi fogliari. Tale sviluppo è caratterizzato, oltre che dal sollevamento della gobba fogliare, determinato dall'attività della tunica e del corpus in quella sede, dalla formazione delle relative iniziali procambiali (Tav. III, 12, 13). Talora il secondo primordio non si sviluppa in posizione rigorosamente opposta al primo ed è solo dopo il terzo o il quarto primordio che il germoglio riprende la normale fillotassi distica. Nella fig. 14 (Tav. III) si può osservare un apice dopo 7 giorni dall'operazione. Il meristema apicale che ha già formato tre abbozzi fogliari, ha completamente ripreso la sua normale struttura regolarizzando la originaria fillotassi distica dopo una evidente iniziale alterazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei precedenti risultati è possibile affermare che la rigenerazione dell'apice vegetativo del germoglio di *Phaseolus coccineus* consecutiva alla rimozione del meristema periferico si rivela come un processo ben distinto da quello cicatriziale e che dipende unicamente dalla ripresa dell'attività del meristema isolato. Ciò si desume oltre tutto dalla diversità dell'orientamento delle mitosi e dalle diverse caratteristiche strutturali degli elementi cellulari derivanti dalle due sorta di attività segmentative. L'affermazione è fra l'altro suffragata dalla osserva-

zione che frammenti di meristema insufficienti per dare origine ad un nuovo germoglio presentano nondimeno un'attività cicatriziale che può anche essere imponente.

La distribuzione dell'attività meristemica nella regione isolata, che conduce alla ricostituzione del germoglio, è diversa a seconda dell'importanza della regione periferica asportata. Nei casi di rimozione parziale la rigenerazione dell'apice è rapida e coincide con la formazione dei nuovi primordi fogliari che possono subito svilupparsi nelle due aree meristematiche laterali non interessate dal taglio, che acquistano i caratteri di zone organogene. Non molto diverso è il processo rigenerativo consecutivo alla rimozione totale ma limitata; la ripresa dell'attività è anche in questo caso soprattutto periferica; di scarso rilievo sono le modificazioni nella regione centrale del meristema.

Quando invece la zona organogena fogliare viene più o meno interamente rimossa, il meristema centrale, dopo un certo periodo di stasi, va incontro ad un'intensa attività segmentativa sia nello strato della *tunica* che nel *corpus*, attività che porta come prima cosa alla ricostituzione di un nuovo apice vegetativo nel quale vengono successivamente ripristinate le zone organogene laterali. Solo allora in queste regioni può avere inizio lo sviluppo dei primordi fogliari.

Questi rilievi, a conferma della totipotenza del meristema apicale, permettono di concludere che gli organi fogliari possono svilupparsi in qualsiasi regione laterale del meristema, purchè di sufficiente ampiezza. Queste regioni laterali, che possiedono o sono in grado di acquisire proprietà organogene, sono però costruite e dipendono dall'attività della regione distale del meristema. Viene così confermata anche per altra via l'importanza della regione distale del meristema nella produzione di materiale cellulare destinato a far parte delle zone organogene fogliari.

RIASSUNTO

E' stato dimostrato che la ricostituzione dell'apice vegetativo del germoglio di *Phaseolus coccineus* in seguito a rimozione del meristema periferico è un processo totalmente distinto da quello cicatriziale e dipendente dalla ripresa dell'attività meristemica nella regione centrale isolata.

La distribuzione di tale attività dipende dall'entità della zona periferica asportata: nei casi di ablazione totale della zona organogena periferica, la regione centrale isolata subisce importanti modificazioni strutturali che conducono alla ricostituzione di un nuovo apice indifferenziato, il cui meristema ripristina le zone organogene laterali. Solo in un secondo tempo tali regioni laterali diventano sede di sviluppo dei nuovi primordi fogliari.

In base a tali rilievi è stato possibile concludere che nella morfogenesi del germoglio, mentre le zone laterali dell'apice sono sede dell'attività organogena fogliare, la loro formazione è strettamente legata alla attività segmentativa del meristema centrale.

SUMMARY

The reconstitution of the shoot apex of *Phaseolus coccineus* after the removal of the peripheral meristem is a process entirely distinct from the cicatricial one; it is dependent on the renewal of the meristematic activity in the central zone.

The distribution of such activity is related to the importance of the peripheral zone removed: in the cases of total ablation of the lateral organogenous zone the central isolated region undergoes important modifications that give rise to reconstitution of a new indifferentiated apex. Such an apex reproduces the lateral organogenous zones and only successively in the latter the growing of the foliar primordia takes place.

On the base of the above remarks it is possible to conclude that in the morphogenesis of the shoot while the lateral zones of the apex are seat of the foliar growing, its formation is closely related to the segmentative activity of the central meristem.

BIBLIOGRAFIA

- CAMEFORT, H., 1956. *Etude de la structure du point végétatif et des variations phyllotaxiques chez quelques Gymnospermes.* Ann. Sc. Nat. Bot., **17**: 1-185.
- LOISEAU, J. E., 1959. *Observations et expérimentations sur la phyllotaxie et le fonctionnement du sommet végétatif chez quelques Balsaminacées.* Ann. Sc. Nat. Bot., **20**: 1-214.
- PELLEGRINI, O., 1959. *Esperimenti microchirurgici sul funzionamento del meristema apicale del germoglio di Phaseolus vulgaris L..* Delpinoa, n.s., **1**: 205-230.

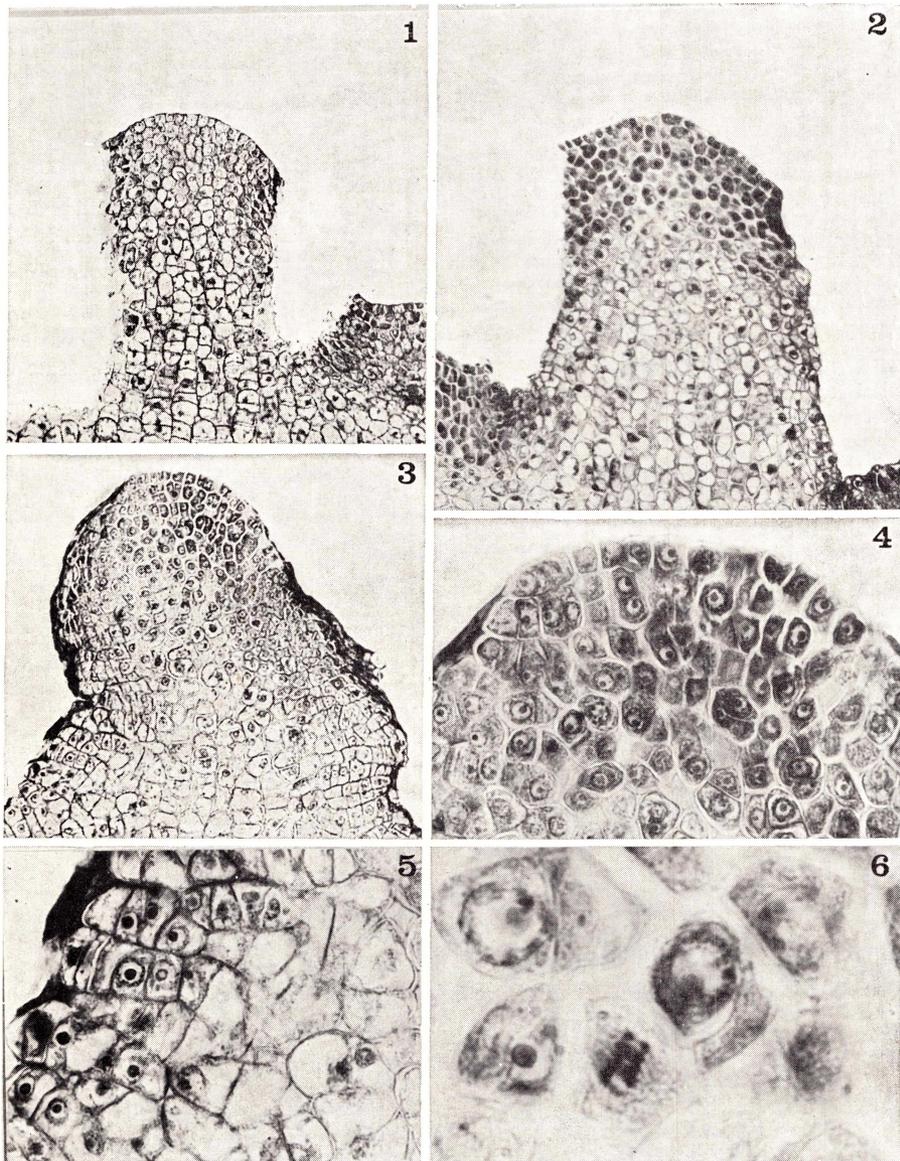
TAV. I

Fig. 1 - Apice vegetativo dopo 6 ore dalla rimozione totale del meristema periferico.

Fig. 2 - Apice dopo 24 ore dalla rimozione parziale. Incomincia a notarsi l'attività cicatriziale nelle regioni basali delle due superfici di ferita.

Fig. 3 - Apice dopo 30 ore dalla rimozione parziale.

Figg. 4-6 - Particolari della figura precedente, che mettono in evidenza la diversità dei caratteri e della localizzazione relativamente all'attività cicatriziale (fig. 5) ed a quella rigenerativa della regione distale (figg. 4, 6).



TAV. II

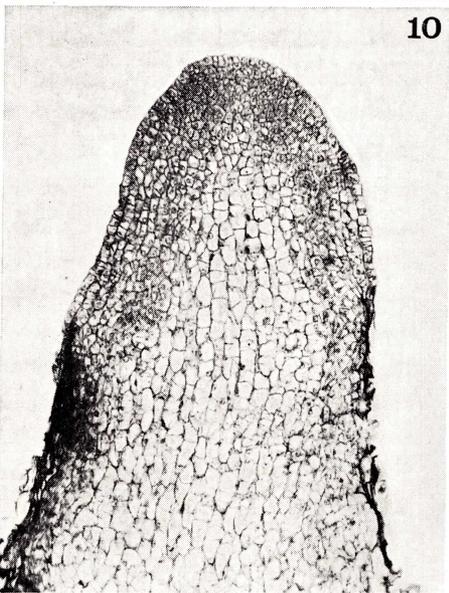
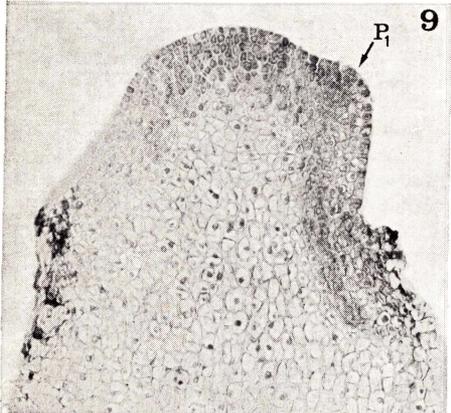
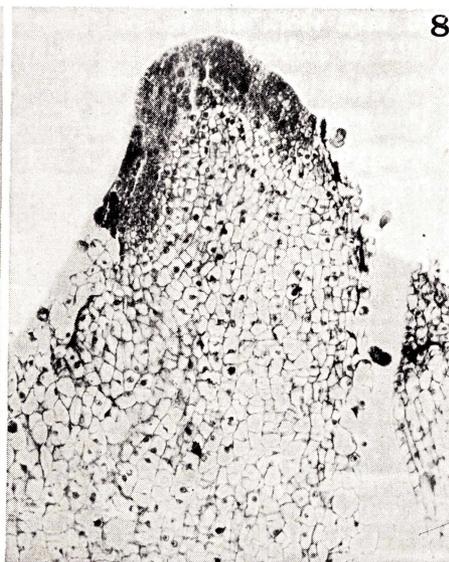
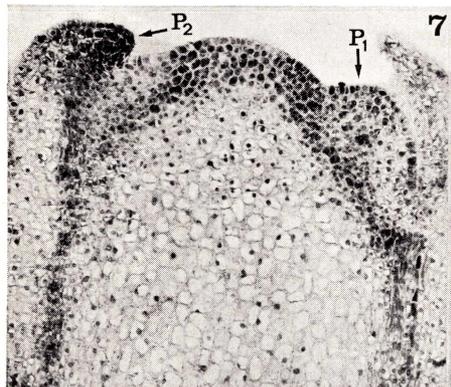
Fig. 7 - Sezione longitudinale mediana parallela alle superfici di taglio di un apice dopo 48 ore dalla rimozione parziale del meristema periferico. Sviluppo rapido dei primi due nuovi abbozzi fogliari P_2 e P_1 nelle due regioni periferiche non interessate dal taglio.

Fig. 8 - Sezione longitudinale mediana ortogonale alle superfici di taglio di un apice dopo 3 giorni dalla rimozione parziale. Nelle regioni interessate dal taglio non si formano primordi fogliari.

Fig. 9 - Apice dopo 48 ore dalla rimozione totale, ma limitata ad una sottile fascia periferica del meristema. L'attività segmentativa che conduce alla ricostituzione dell'apice è preminente nelle zone organogene fogliari non interamente asportate.

Fig. 10 - Apice dopo 4 giorni dalla rimozione dell'intera zona organogena fogliare. Non vi è ancora accenno di primordi fogliari. L'attività segmentativa che conduce alla ricostituzione di un nuovo cono vegetativo è preminente nella regione distale.

Fig. 11 - Particolare della figura precedente: attività mitotica in prossimità dell'estrema punta dell'apice.



TAV. III

Fig. 12 - Apice vegetativo dopo 5 giorni dalla rimozione totale della zona organogena fogliare. Sviluppo iniziale del primo nuovo abbozzo fogliare (P_1) che si forma dal ricostituito meristema periferico.

Fig. 13 - Apice operato nello stesso modo della figura precedente con sviluppo di due primordi fogliari. Alla base di P_2 si notano le iniziali del relativo cordone procambiale (*ip*).

Fig. 14 - Apice vegetativo dopo 7 giorni dalla rimozione completa della zona organogena fogliare. Il meristema apicale ha formato tre abbozzi fogliari riprendendo completamente la sua normale struttura (*s*, stipola di P_3 , che non è orientato nel piano dei successivi primordi fogliari P_2 e P_1).

