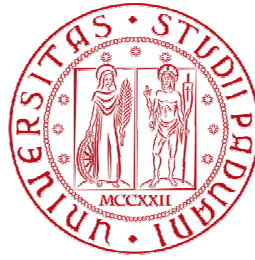


Università degli Studi di Padova



Corso di Laurea in Biotecnologie

Elaborato di Laurea

Embriogenesi somatica da espianti fiorali di portainnesti di vite

Tutor: Prof. ssa Fiorella Lo Schiavo

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott. ssa Elisabetta Barizza

Dipartimento di Biologia

Laureando: Matteo Marchiodi

Anno Accademico: 2011/2012

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Colture <i>in vitro</i> vegetali.....	5
1.2 Propagazione <i>in vitro</i> delle piante: EMBRIOGENESI SOMATICA...5	
2. SCOPO DELLA TESI.....	6
3. MATERIALI E METODI.....	6
3.1 Lavoro in sterilità.....	7
3.2 Origine e raccolta degli espianti fiorali.....	7
3.3 Origine e raccolta degli espianti fiorali.....	8
3.4 Terreni di coltura.....	8
3.5 Protocollo per i terreni di coltura di <i>Vitis vinifera</i>	11
3.6 Protocollo di messa <i>in vitro</i> degli espianti.....	13
3.7 Acquisizione delle immagini.....	14
3 RISULTATI.....	15
4.1 Contaminazioni.....	16
4.2 Osservazioni al microscopio.....	18
5 CONCLUSIONI.....	20
6 BIBLIOGRAFIA.....	21

1. INTRODUZIONE

1.1 Colture *in vitro* vegetali

Le tecniche di coltura *in vitro* consentono di coltivare cellule, tessuti ed organi vegetali su substrati artificiali, definiti terreni di coltura, in condizioni di sterilità e in ambiente controllato, in cui i parametri chimico-fisici (illuminazione, temperatura, pH, ecc.) sono monitorati dall'operatore. Il presupposto per lo sviluppo delle colture *in vitro* è la totipotenza delle cellule vegetali, ovvero la loro capacità di dare luogo, sotto l'influenza di opportuni stimoli, ad un intero individuo simile a quello in cui da cui provengono. Tale capacità è propria delle cellule vive, dotate di nucleo e prive di una rigida parete secondaria. Non tutte le cellule costituenti l'organismo pianta, infatti, sono vive a maturità e possiedono un nucleo: le cellule conduttrici dello xilema (tracheidi ed elementi delle trachee), le cellule sclerenchimatiche (fibre e sclereidi) e quelle del sughero sono alcuni esempi di cellule il cui differenziamento culmina con la deposizione della parete secondaria, seguita da morte cellulare ed eliminazione del protoplasto. Le cellule conduttrici del floema (cellule cribrose ed elementi dei tubi cribrosi), invece, sono vive a maturità, ma prive del nucleo.

Due processi biologici connessi con la totipotenza e ampiamente sfruttati nell'ambito delle colture *in vitro* sono il dedifferenziamento (o differenziamento) – ovvero l'uscita delle cellule dalla fase G₀ e il rientro nel ciclo mitotico, riacquistando le potenzialità proprie delle cellule meristematiche – e la rigenerazione – la capacità di singole cellule di generare organi o addirittura interi organismi.

1.2 Propagazione *in vitro* delle piante: EMBRIOGENESI SOMATICA

L'embriogenesi somatica è il processo attraverso il quale cellule somatiche, in opportune condizioni colturali induttive, passando attraverso una serie di cambiamenti morfologici e biochimici, danno origine ad embrioni. Quest'ultimo, pur non essendo avvenuta la fusione dei gameti (fecondazione), risulta del tutto simile ad un embrione zigotico e, rispetto a questi, risulta più accessibile; infatti, a differenza degli embrioni somatici, gli embrioni zigotici sono più difficili da isolare nelle diverse fasi di sviluppo in quanto posti all'interno dei tessuti materni. Inoltre, lo sviluppo dei due tipi di embrione è simile dallo stadio globulare fino allo stadio a torpedine e differisce solo nei primi eventi di divisione. Nell'embriogenesi zigotica, infatti, la prima divisione è asimmetrica e porta alla formazione di una cellula apicale piccola, scarsamente vacuolizzata (dalla quale si formerà per successive divisioni la testa embrionale) e di una cellula basale con un grande vacuolo (dalla quale si formerà il sospensore). Nell'embriogenesi somatica, invece, la prima divisione è generalmente simmetrica e si ha la formazione di un proembrione globulare.

L'embriogenesi somatica può avvenire per via diretta o indiretta. Nel primo caso non si ha la formazione del callo, l'embrione deriva direttamente da alcune cellule dell'espianto e le cellule pro-embriogeniche sono già determinate, richiedendo solo fitormoni e condizioni favorevoli per la crescita cellulare e l'espressione dell'embriogenesi; nel secondo caso è richiesta proliferazione di callo e rideterminazione di cellule già differenziate in uno stato

embriogenico. In questo caso i fitormoni sono necessari non solo per ripresa delle divisioni mitotiche ma anche per la determinazione dello stato embriogenico.

Per quanto riguarda la resa in embrioni prodotti, nell'embriogenesi diretta essa è inferiore rispetto all'embriogenesi indiretta e le rese più elevate si ottengono per embriogenesi da colture cellulari in mezzo liquido

Gli embrioni somatici, infine, possono essere usati come germoplasma da sottoporre a crioconservazione e nella rigenerazione di intere piante a partire da cellule trasformate: in alcune specie, come la canna da zucchero, il cacao e, nel nostro caso, della vite, le piante rigenerate da embrioni somatici risultano essere esenti da virus.

2. SCOPO DELLA TESI

Scopo della tesi è ottenere embriogenesi somatica da espianti floreali di portainnesti di Prosecco e Oppenheimer. A partire da tre tipi di espianti – antere, filamenti di antere, stilo e stigma – coltivati in quattro terreni di coltura che differiscono per la concentrazione di auxina/citochinina, si è voluta osservare la capacità che essi hanno nel dare origine ad embrioni somatici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Lavoro in sterilità

Al fine di evitare la proliferazione di organismi inquinanti (batteri, virus, funghi, etc.), tutte le tecniche di coltura *in vitro* richiedono l'asepsi, ovvero la completa eliminazione di microrganismi dagli strumenti di lavoro, dalla superficie degli espianti e dai mezzi colturali. È necessario, infatti, evitare in questi ultimi - a causa della presenza di zuccheri e altri composti nutritivi - la moltiplicazione incontrollata dei microrganismi, che generalmente hanno una crescita più veloce delle cellule vegetali. Per questo motivo si è usato un protocollo di sterilizzazione degli espianti (descritto successivamente), ponendo il terreno di coltura in autoclave (a 121°C, per 20 minuti, alla pressione di 1 atm) prima di distribuirlo nelle capsule Petri sterili – ciò è avvenuto sotto cappa di sicurezza biologica – e gli espianti sterilizzati sono stati maneggiati con strumenti precedentemente flambati con Bunsen. Quest'ultima fase si è svolta in una cappa a flusso laminare orizzontale (**Figura 1**), che garantisce la protezione del campione da contaminazione. Il flusso laminare è formato da filetti di aria sterile - filtrata attraverso filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) costituiti da fogli di microfibre di vetro saldate con resina epossidica - che si muovono con medesima velocità, direzione e verso in tutti i punti, generando una corrente omogenea priva di turbolenze che trascina lontano ogni contaminante libero, mantenendo sterile la zona di lavoro.



Figura 1

Cappa a flusso laminare orizzontale.

Il flusso unidirezionale di aria sterile protegge il campione da contaminazione.

3.2 Origine e raccolta degli espianti fiorali

Gli espianti fiorali usati provengono da 3 linee di portainnesti: 420A, Rupestris du Lot e SO4. Esse si differenziano per la loro adattabilità a vari tipi di terreno (argillosi, compatti, acidi, salini, calcarei, superficiali, profondi), per la sensibilità alle carenze (Ca, Mg, K, Fe etc.), per la resistenza alle malattie (*Agrobacterium tumefaciens*, nematodi, attacchi botritici) e per le caratteristiche di crescita (radicazione, affinità d'innesto, etc.).

Gli espianti sono stati raccolti direttamente in campo al momento della preantesi, ovvero prima dell'apertura delle corolle. Diverse infiorescenze per ogni tipo di portainnesto sono state fornite dal Centro di Ricerca per la Viticoltura (CRA) di Conegliano e, per la linea SO4,

alcune infiorescenze provenivano anche dall'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige. I campioni sono giunti in laboratorio all'interno di sacchetti di plastica mantenuti a bassa temperatura in borse termiche e, una volta aperti i sacchetti, sono stati trasferiti in capsule Petri e conservati in frigorifero, onde evitare il loro appassimento fino al momento della sterilizzazione.

3.3 Protocollo di sterilizzazione degli espianti

Durante la fase di sterilizzazione degli espianti fiorali delle linee di portainnesto si è seguito il seguente protocollo, che prevede:

- l'immersione dei grappoli in fase preantesica in una soluzione di etanolo al 75% per circa 3 minuti;
- l'immersione dei grappoli in una soluzione di sodio ipoclorito (2% cloro attivo) a cui viene aggiunto Tween20 per circa 15 minuti;
- il risciacquo dei grappoli in acqua distillata sterile per 2 o 3 volte al fine di rimuovere eventuali tracce di soluzione sterilizzante.

3.4 Terreni di coltura

Uno dei principali fattori che regolano la crescita e la morfogenesi delle colture vegetali *in vitro* è la composizione del mezzo colturale. Benché in teoria le sostanze richieste siano simili a quelle usate dalle piante in natura, in pratica le componenti nutrizionali che promuovono la crescita ottimale delle cellule vegetali in laboratorio possono variare in base alla specie considerata. La composizione del terreno di coltura viene dunque formulata tenendo in considerazione le richieste nutrizionali specifiche di una determinata coltura.

I principali componenti dei mezzi di coltura sono i macroelementi (o macronutrienti), i microelementi (o micronutrienti), i carboidrati, le vitamine, gli amminoacidi e altre fonti di azoto, gli agenti gelificanti e i regolatori di crescita (fitormoni).

I macroelementi sono nove elementi necessari alla cellula vegetale in quantità elevate e per tale motivo sono presenti nei mezzi di coltura come sali a concentrazioni millimolari. Essi sono azoto, potassio, fosforo, zolfo, magnesio, calcio, ossigeno (presente sotto forma di O₂, H₂O, CO₂), carbonio (disponibile come CO₂) e idrogeno (disponibile come H₂O).

I microelementi sono invece richiesti dalla cellula vegetale in quantità ridotte o in tracce e nei mezzi colturali sono presenti come sali a concentrazioni micromolari. Tra questi i più importanti sono ferro, manganese, zinco, boro, rame, cobalto, molibdeno, iodio e cloro.

Dal momento che le cellule vegetali in coltura presentano una ridotta attività foto sintetica anche se esposte alla luce, i carboidrati quali fonti di carbonio devono essere addizionati al mezzo colturale. Quello più frequentemente utilizzato è il saccarosio, solitamente alla concentrazione dell'1-5%, ma possono essere utilizzati anche il glucosio e il fruttosio.

Le vitamine sono cofattori enzimatici necessari per il regolare funzionamento degli organismi viventi. Le piante in natura sintetizzano autonomamente quelle di cui necessitano ma nelle

colture *in vitro* è richiesto un apporto esterno di vitamine, che vengono addizionate in diverse forme e concentrazioni. Quelle usate più spesso sono la tiamina (vitamina B1), l'acido nicotinico (B3), la piridossina (B6), l'acido pantotenico (B5) e il mioinositolo. Tra queste, la tiamina sembra essere l'unica vitamina universalmente richiesta nelle colture *in vitro* ed è perciò presente nella maggior parte dei mezzi colturali ad una concentrazione di 0,1-1 mg/L.

Benché le cellule vegetali siano in grado di sintetizzare tutti gli amminoacidi, l'aggiunta al terreno di coltura di singoli amminoacidi (ad es. L-glutamina, L-asparagina, adenina) oppure miscele contenenti questi ultimi (ad es. caseina idrolizzata) può stimolarne la crescita. Essi infatti rappresentano una fonte di azoto immediatamente disponibile, che può essere acquisito dalle cellule più velocemente rispetto all'azoto inorganico.

Talvolta è necessario aggiungere ai mezzi di coltura anche carbone attivo, che grazie al suo alto grado di porosità e una vasta area superficiale interna è usato come assorbente di sostanze inibitorie o tossiche.

Dal momento che alcune colture devono crescere su una superficie solida o semisolida e non in immersione, è necessario in questi casi aggiungere al mezzo di coltura un agente gelificante come l'agar. Esso è un polisaccaride ricavato da diverse specie di alghe rosse e, rispetto ad altri agenti gelificanti, si scioglie in acqua alla temperatura di 60-100°C e solidifica a circa 45°C. È quindi stabile alla temperatura di incubazione che, per le colture vegetali *in vitro*, è generalmente di 18-25°C ed inoltre non reagisce con i costituenti del mezzo colturale e non è digerito dagli enzimi vegetali.

I regolatori di crescita hanno un ruolo molto importante nei processi di differenziamento e morfogenesi e nelle colture *in vitro* la loro presenza nel mezzo colturale riveste un ruolo centrale. Gli effetti osservati sono la risultante dell'interazione tra i fitormoni esogeni (addizionati al mezzo) e gli ormoni vegetali endogeni (sintetizzati dalle cellule vegetali). I regolatori di crescita più utilizzati nelle colture *in vitro* appartengono alle classi delle auxine e delle citochinine, mentre meno usati sono le gibberelline e l'acido abscissico.

Le auxine promuovono la formazione di apici radicali (rizogenesi), stimolano l'embriogenesi somatica e inibiscono lo sviluppo delle gemme laterali; nei primi due casi la loro presenza è richiesta solo nelle fasi iniziali (fase di induzione) poiché successivamente può avere effetti inibitori. La principale auxina naturale è l'IAA (acido indol-3-acetico), ma essendo termo- e foto-labile è preferibile l'uso di auxine sintetiche più stabili come il 2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico) o l'IBA (acido indol-3-butirrico).

Le citochinine stimolano la divisione cellulare, lo sviluppo di gemme laterali, inducono la caulogenesi e inibiscono la rizogenesi. Quelle naturali impiegate nelle colture *in vitro* includono zeatina e 2-isopenteniladenina (2iP), ma a causa del costo e della scarsa stabilità vengono impiegate soprattutto citochinine sintetiche quali BAP (6-benzilaminopurina) e chinetina (o cinetina).

Le gibberelline promuovono la fioritura, l'interruzione della dormienza di semi, gemme e bulbi, la degradazione delle riserve nutritive nei semi e l'allungamento degli internodi. Tra le gibberelline in commercio quella più usata è l'acido gibberellico (GA₃).

L'acido abscissico (ABA) è addizionato ai mezzi di coltura per inibire o stimolare – a seconda della specie – la crescita del callo, promuovere l'accrescimento di gemme vegetative o inibire gli stadi tardivi dello sviluppo embrionale.

Un ulteriore importante parametro da considerare è il pH. Prima di sterilizzare il terreno di coltura in autoclave esso viene portato ad un valore compreso tra 5,2 e 6,5 mediante l'aggiunta di NaOH o HCl diluiti. Il suo valore influenza infatti la solubilità dei sali (quelli ad alto peso molecolare possono precipitare se il valore è troppo basso), l'assorbimento di nutrienti e regolatori di crescita (instabilità delle vitamine in ambiente acido) e la solidificazione dell'agar (a valori troppo bassi e a causa delle temperature elevate dell'autoclave si ha idrolisi dell'agar e perdita del potere addensante).

3.5 Protocollo per i terreni di coltura di *Vitis vinifera*

I 3 espianti (antere, filamenti di antere, stili e stigmi) sono stati prelevati da fiori di vite dopo il trattamento di sterilizzazione e sono stati incubati in 4 differenti mezzi di coltura, ovvero V10, V11, V14, V15. Il mezzo di coltura usato è il "Nitsch Medium Including Vitamins 5L" (Duchefa, Cat: DUC-N0224.0005), la cui composizione è riportata in **Tabella 1**.

		mg/L
Macroelementi	CaCl ₂	166,00
	KH ₂ PO ₄	68,00
	KNO ₃	950,00
	MgSO ₄	90,27
	NH ₄ NO ₃	720,00
Microelementi	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
	FeNa EDTA	36,70
	H ₃ BO ₃	10,00
	MnSO ₄ · H ₂ O	18,94
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10,00
Vitamine	Biotina	0,05
	Acido Folico	0,50
	Glicina	2,00
	Mioinositolo	100,00
	Acido nicotinico	5,00
	Piridossina · HCl	0,50
	Tiamina · HCl	0,50

Tabella 1

Composizione del mezzo di coltura "Nitsch Medium Including Vitamins 5L"

(Duchefa, Cat: DUC-N0224.0005)

Per preparare 2 litri di mezzo di coltura sono stati usati 4,36 g di Nitsch Medium, 60 g di saccarosio e 16 g di Plant agar. Si è inizialmente riempito un cilindro graduato con 2000 ml di Milli-Q, a cui è stato aggiunto il Nitsch Medium e il saccarosio. Affinchè le sostanze si potessero sciogliere meglio è stato utilizzato un agitatore magnetico. Dopo aver suddiviso il mezzo in 4 becher (500 ml in ciascun becher), a questi ultimi sono stati aggiunti quantitativi differenti di acido β-naftossiacetico (NOA, β-naphtoxyacetic acid) e 6-benzilaminopurina (BAP), in modo da ottenere i quattro diversi terreni di coltura (**Tabella 2**).

	Terreni			
Fitormoni	V10	V11	V14	V15

NOA (μl)	500	500	1000	1000
NOA (μM)	5,00	5,00	9,90	9,90
BAP (μl)	510	1015	510	1015
BAP (μM)	4,50	9,00	4,50	9,00

Tabella 2

Volumi (μ l) e concentrazioni finali (μ M) dei fitormoni aggiunti ai mezzi culturali.

Ai 4 terreni sono stati aggiunti quantitativi differenti di NOA (acido 6-naftossiacetico) e BAP (6-benzilaminopurina)

Il NOA è un'auxina sintetica che promuove la divisione e la distensione cellulare ed è dunque fondamentale per la formazione del callo (callogenesi). Per preparare il NOA (sigma cod. N-3019, 2-Naphtoxyacetic acid, MW 202.2) 1 mg/ml sono stati sciolti 100 mg di NOA in alcune gocce di 1N NaOH e si è portato a volume finale di 100 ml aggiungendo acqua Milli-Q.

Il BAP è una citochinina sintetica che stimola la divisione cellulare, lo sviluppo di gemme di gemme laterali, induce la formazione di apici caulinari ed inibisce la rizogenesi. Viene fornito ad una concentrazione di 1 mg/ml (sigma cod. B-3274, 6-Benzylaminopurine solution, MW 225.3).

Dopo aver aggiunto gli ormoni a ciascun mezzo di coltura, usando un pH-metro si è regolato il livello del pH, portandolo ad un valore di 5,6 aggiungendovi KOH 0,1M oppure HCl 0,1M. I terreni sono quindi stati versati in 4 bottiglie alle quali, prima di essere autoclavate, sono stati aggiunti 4 mg di Plant agar. Sono state lasciate in autoclave per 20 minuti (alla temperatura di 121°C e alla pressione di 1 atm) e successivamente aperte sotto cappa e il terreno è stato distribuito versati in capsule Petri da 6 cm. Per ognuna di queste ultime sono stati aggiunti 8 ml circa di terreno e prima di chiuderle e di riporle in sacchetti sterili si è aspettato che il mezzo si raffreddasse e solidificasse.

3.6 C

Dopo aver sterilizzato le infiorescenze delle diverse linee di portainnesto si è proseguiti con la messa in vitro degli espianti. Lavorando sotto cappa a flusso laminare (**Figura 1**) e utilizzando uno stereo-microscopio, le pinzette e il bisturi (precedentemente sterilizzati e flambati al Bunsen), sono state aperte le corolle dei singoli fiori. Sono stati recisi i filamenti con le antere (in alcuni casi solo le antere), gli stili e gli stigmi e si sono depositi nei terreni di coltura. Per ogni terreno sono state prese ogni volta due capsule Petri, contrassegnate con le scritte "Fil&Ant" oppure "St", sulle quali è stata riportata la data della messa in vitro, il tipo di terreno e la linea di portainnesto usata. In ciascuna capsula sono stati posizionati 5-6 espianti dello stesso tipo provenienti da 5-6 fiori diversi. Per le linee di portainnesto provenienti dal CRA di Conegliano sono state ottenute 10 capsule Petri per ogni terreno (5

"Fil&Ant" e 5 "St"), mentre per la linea fornita dall'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige il numero di capsule finale è stato pari a 29 (V10), 14 (V11), 26 (V14), 23 (V15). In conclusione, per ogni singola piastra contenente 5-6 stigmi è presente un'altra piastra con 25-30 filamenti e/o antere, ovvero per ogni stigma posizionato sono stati espianati 5 filamenti con antere rapporto 1:5, **Figura 2**).

Per permettere l'embriogenesi somatica questi espianati devono essere mantenuti al buio in una camera di crescita, dove la temperatura viene mantenuta a 25°C.



2A

2B

Figura 2

Esempio di espianati in V15.

Per ogni stilo e stigma nella piastra "St" (2A) ci sono 5 filamenti con antere nella piastra "Fil&Ant" (2B).

3.7 Acquisizione delle immagini

Per comparare i calli sviluppatasi dai diversi espianati è stato necessario osservarli al microscopio. Quello utilizzato in questo caso è stato lo stereomicroscopio a fluorescenza Leica MZ 16 F (**Figure 3, 4, 5, 6**)

4. RISULTATI

Nel periodo maggio-giugno è iniziata l'esperienza in laboratorio e i dati riportati nel **Grafico 1** e nel **Grafico 2** sono stati registrati all'inizio del mese di luglio. L'ordine di espianto delle infiorescenze delle diverse linee di portainnesto è stato il seguente: 420A (18, 21, 22, 23 maggio), SO4 – CRA – (21, 23 maggio), Rupestris du Lot (24, 25, 28 maggio), SO4 Azed – Istituto Agrario S. Michele all'Adige – (4, 6, 8, 11, 12 giugno).

È stata valutata la percentuale delle piastre contenenti calli sviluppatasi dagli espianti floreali nel periodo compreso tra la messa in vitro di filamenti e/o antere, stili e stigmi e il giorno di rilevamento delle immagini in data 4 luglio 2012.

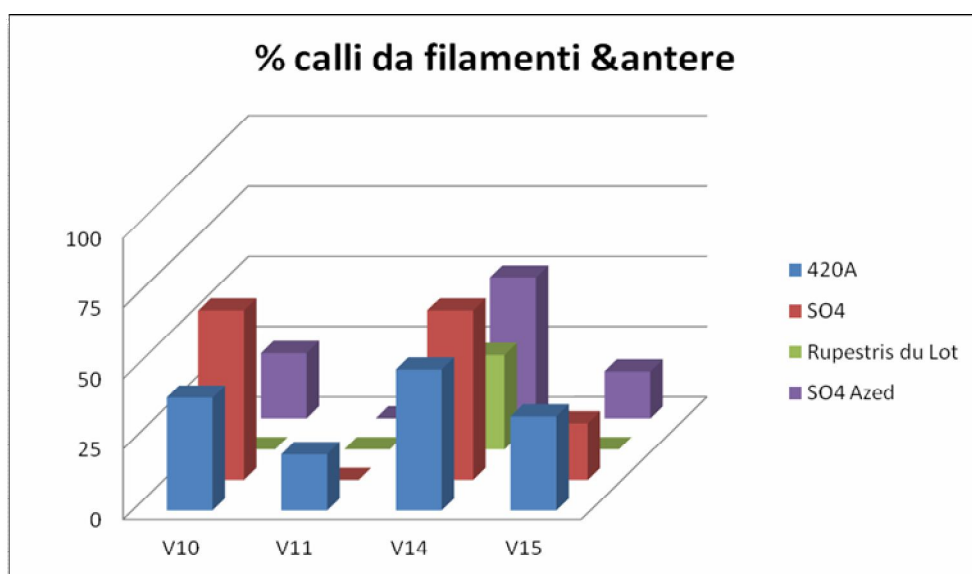


Grafico 1: Percentuale di callo formatosi da espianti di filamenti e antere nei diversi terreni di coltura

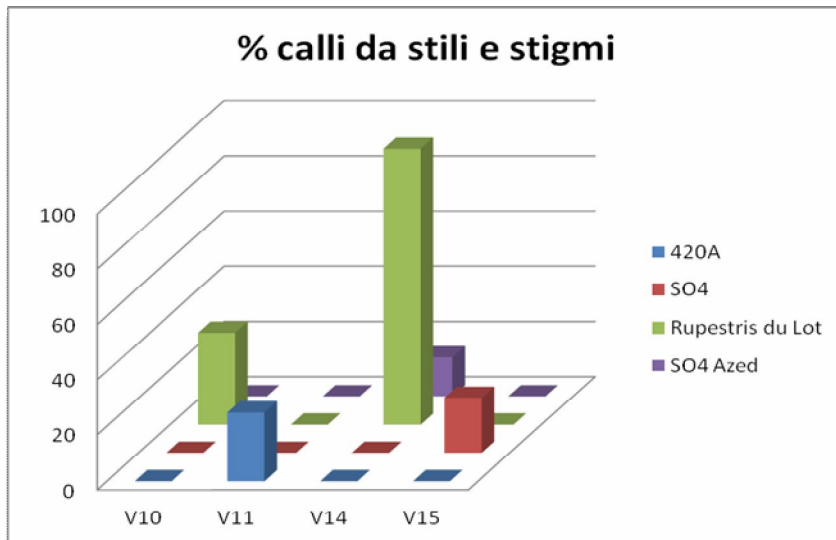


Grafico 2: Percentuale di callo formatosi da espianti di stili e stigmi nei diversi terreni di coltura

Come si può vedere lo sviluppo del callo è molto variabile e i calli derivati da filamenti e/o antere oppure da stili e stigmi non si formano con la stessa frequenza. Si sono infatti riscontrati più calli sviluppati da filamenti e antere rispetto a quelli originatisi da stili e stigmi. Considerando i primi (**Grafico 1**), si può notare come dalla linea 420A si siano sviluppati i calli in tutti e 4 i terreni di coltura, mentre per le due linee SO4 non li troviamo nel terreno V11 e per la linea Rupestris du Lot li osserviamo solo in V14. Considerando invece i secondi (**Grafico 2**), possiamo notare che la linea Rupestris du Lot, rispetto alle altre, è stata quella ad aver una maggior percentuale di calli e di averne sviluppati in più di un terreno (V10, V14).

A parità di terreno, inoltre, quello in cui si è riscontrata una percentuale maggiore di callo è stato il V14, seguito da V10, V15 e V11.

4.1 Contaminazioni

Benché il lavoro sia stato svolto usando una cappa a flusso laminare orizzontale, per evitare che funghi (**Figura 3**) o batteri (**Figura 4**) inquinassero i terreni di coltura, sono state comunque riscontrate contaminazioni (**Grafico 3**).

Il motivo può essere sia la poca aggressività del protocollo di sterilizzazione (necessaria per non danneggiare i tessuti delle infiorescenze) sia l'impossibilità dell'operatore di mantenere un ambiente completamente sterile.

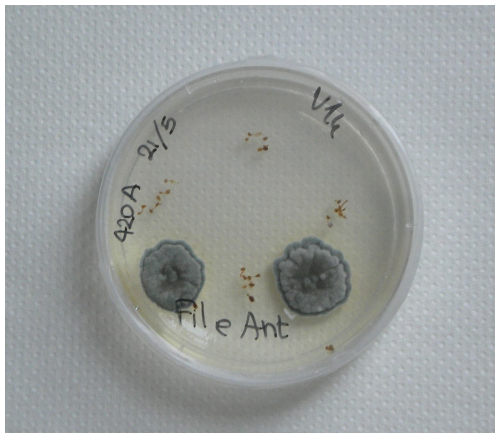


Figura 3
Contaminazione da muffe in un terreno di coltura V14



Figura 4
Contaminazione da batteri

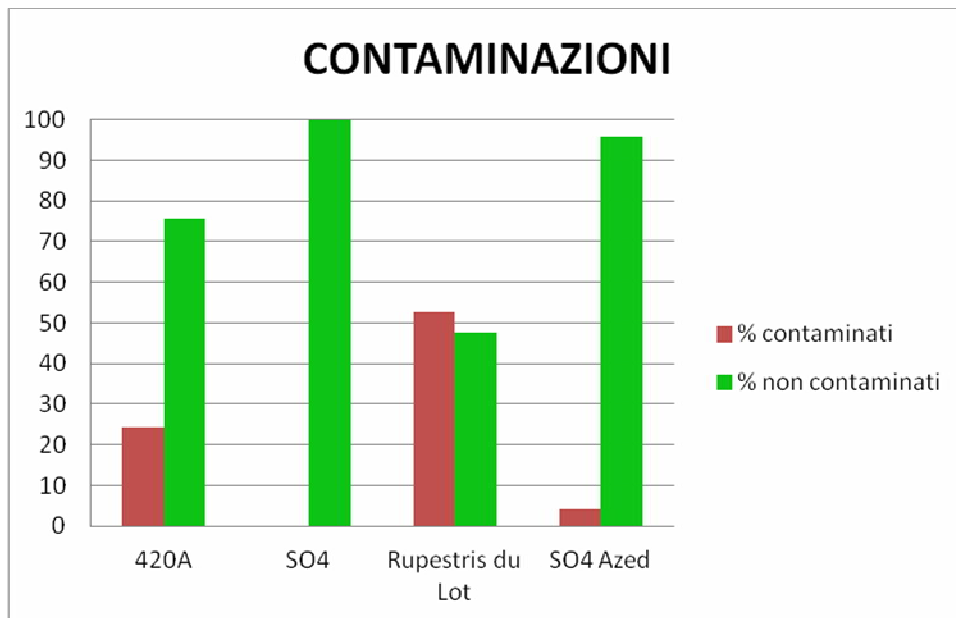


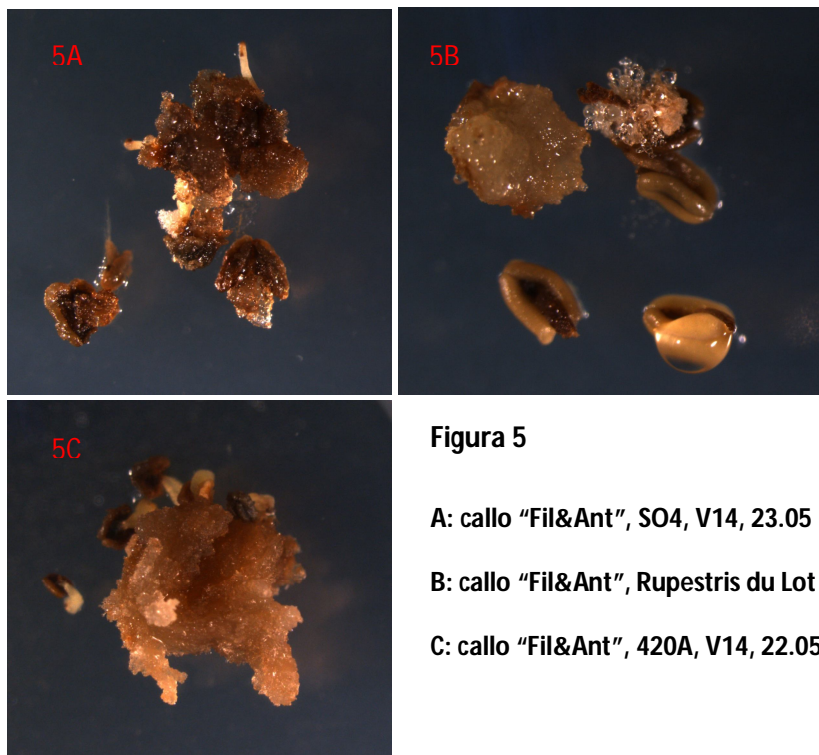
Grafico 3
Percentuale contaminazioni (rosso) per le diverse linee di espianti
Si è notata una contaminazione pari al 24% (10 capsule Petri su 41) nella linea 420A,

52,5% (21 capsule su 40) nella linea *Rupestris du Lot* e 4,25% (4 capsule su 94) nella linea *SO4 Azed*.

Il fatto di non essere riusciti ad eliminare completamente le contaminazioni ha portato ad una diminuzione del materiale finale su cui osservare i risultati di formazione dei calli embriogenesi. La perdita peggiore di informazione si è riscontrata per la linea di portainnesto 420A e *Rupestris du Lot*, dove sono andate perse rispettivamente 10 capsule Petri su 41 e 21 piastre su 40 (**Grafico 3**).

4.2 Osservazioni al microscopio

Qui di seguito si riportano le immagini ottenute con lo stereomicroscopio a fluorescenza Leica MZ 16 F dei diversi calli osservati.



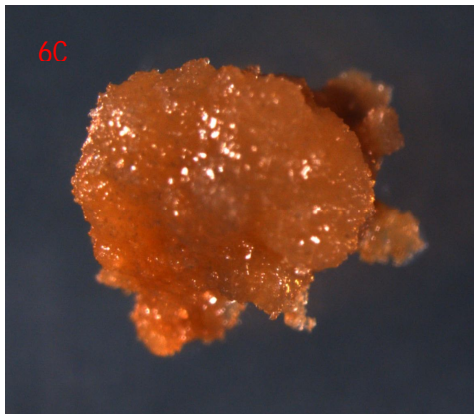
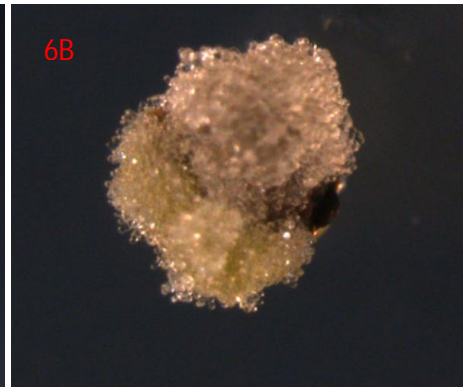
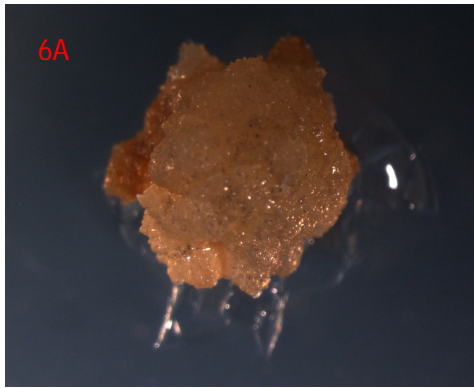


Figura 6

A: callo "St", Rupestris du Lot, V10, 24.05

B: callo "St", SO4 Azed, V14, 12.06

C: callo "St", Rupestris du Lot, V14, 24.05

Come si può osservare dalle immagini, i calli non sono tutti simili per colore, dimensione e consistenza. Possiamo infatti trovare calli con una colorazione tendente al giallo pallido (**Figura 6B**), marrone chiaro (**Figura 6A**) oppure marrone scuro (**Figura 5A**). Alcuni sono piccoli (**Figure 5,6B**), altri invece hanno dimensioni maggiori (**Figure 5,6C**). Confrontando la dimensione tra un callo che origina da antere (**Figura 5B**) e uno che origina da filamenti di antere (**Figura 5C**) a parità di tempo trascorso dalla messa in vitro, si può osservare che il primo è più piccolo e meno sviluppato del secondo. Per quanto riguarda la consistenza, i calli risultano essere generalmente friabili (**Figura 6B**) oppure grumosi (**Figura 5C**).

5. CONCLUSIONI

Nel periodo di attività in laboratorio ho avuto la possibilità di approfondire tecniche e procedure riguardanti le coltivazioni *in vitro* precedentemente apprese nei corsi curricolari. Lo scopo di questa tesi è stato di ottenere calli embriogenici da espunti fiorali di portainnesti di Prosecco e Oppenheimer, e i risultati mostrano che i primi calli sono comparsi dopo circa un mese dall'espunto nei diversi tipi di terreno preparati. Non si è potuto però verificare se essi fossero realmente embriogenici e per poterlo dire si dovranno osservare durante il loro sviluppo nei prossimi mesi.

Durante la raccolta dei dati si è dovuta tenere in considerazione anche la presenza di contaminazioni, che non è stato possibile eliminare completamente (ad eccezione della linea SO4-CRA, dove non sono state riscontrate) e che hanno ridotto la quantità di materiale disponibile. Ciò è successo nelle linee di portainnesto 420A e Rupestris du Lot, dove sono andati persi rispettivamente il 24% e il 52,5% dei campioni. Con l'ultima linea di portainnesto SO4-Azed si sono ottenuti più campioni poiché maggiore è stata sia disponibilità di terreno rimasto alla fine dell'esperienza sia la quantità di infiorescenze che si sono potute conservare. In conclusione, nella **Tabella 3** ho voluto riportare per ogni linea di portainnesti il numero di capsule Petri sulle quali continuerà la raccolta dati nei mesi successivi.

Linea portainnesto	Terreno di coltura	"Fil&Ant"	"St"
420A	V10	5	5
	V11	5	4
	V14	2	3
	V15	3	4
SO4	V10	5	5
	V11	5	5
	V14	6	4
	V15	5	5
Rupestris du Lot	V10	3	1
	V11	3	2
	V14	3	3
	V15	3	1
SO4 Azed	V10	12	13
	V11	7	7
	V14	14	14
	V15	15	12

Tabella 3

Per ciascuna linea di portainnesti vengono riportati, per ogni tipo di terreno, i numeri delle capsule Petri sulle quali verranno fatte nei prossimi mesi ulteriori osservazioni di embriogenesi somatica.

6. BIBLIOGRAFIA

- Gambino G. et al. (2007), Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC: Journal of Plant Biotechnology)*, 90: 79-83
- Carimi F. et al. (2005), Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine, *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 41: 249-252
- Morando A. (2009), *Vigna in tasca*, 2° edizione, Torino, Edizioni Vit.En.
- Pasqua G. et al. (2011), *Biologia cellulare & biotecnologie vegetali*, Padova, Piccin
- Razdan M. K. (2003), *Introduction to plant tissue culture*, 2nd edition, New Hampshire, Science Publisher
- Trevisan A. (2011), *I rischi da agenti chimici, fisici e biologici*, Padova, Libreria Progetto

