



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE**

**INDUZIONE *IN VITRO* DI COLTURE EMBRIOGENICHE DI *Daucus carota* (L.)**

**Relatrice: Prof.ssa** Barbara Baldan

Dipartimento di Biologia

**Co-relatrice: Dott.ssa** Stefania Marcato

Dipartimento di Biologia

**Laureanda:** Elena Piovan  
2041729

Anno Accademico 2023/2024

# INDICE

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
1.1    Colture cellulari <i>in vitro</i> .....	1
1.2    Embriogenesi somatica .....	2
1.2.1    Embriogenesi somatica in <i>Daucus carota</i> (L.).....	3
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b> .....	5
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	6
3.1    Germinazione dei semi e allestimento e mantenimento di colture cellulari <i>in vitro</i> .....	6
3.2    Induzione dell'embriogenesi somatica.....	7
<b>4. RISULTATI</b> .....	9
4.1    Semina e germinazione .....	9
4.2    Allestimento coltura cellulare in solido .....	11
4.3    Allestimento coltura cellulare liquida .....	13
4.3.1    Coltura cellulare liquida da ipocotili proliferanti.....	13
4.3.2    Coltura cellulare liquida da callo .....	14
4.4    Embriogenesi somatica da linee in liquido già stabilizzate .....	15
4.5    Embriogenesi somatica in solido .....	18
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	19
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	20

## ABSTRACT

L'embriogenesi somatica è un processo attraverso il quale una cellula o un gruppo di cellule somatiche danno origine ad embrioni senza passare attraverso la fecondazione. Una delle piante modello in cui applicare e verificare questo processo è *Daucus carota* (L.).

Nel seguente elaborato sono illustrati i metodi per l'allestimento e il mantenimento *in vitro* di una linea cellulare embriogenica di *Daucus carota* (L.). In seguito viene illustrato il metodo per selezionare la frazione cellulare arricchita in masse pro-embriogeniche, le quali possono avviare il processo di sviluppo dell'embrione, che può formare una nuova pianta una volta maturo.

Le colture cellulari vengono mantenute in specifici terreni di crescita con l'aggiunta di fitormoni, particolari concentrazioni o privazioni di un ormone possono portare a fenomeni di differenziamento tali da indurre la formazione di embrioni somatici.

Gli embrioni somatici, oltre ad essere del tutto simili ad un embrione zigotico, sono più accessibili e più facili da isolare nei diversi stadi, non essendo all'interno dei tessuti materni. Principalmente per queste caratteristiche le linee embriogeniche verranno utilizzate per studi di tipo morfologico e molecolare.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Colture cellulari *in vitro*

Le cellule vegetali possono essere coltivate *in vitro*, in un ambiente asettico e controllato, per molteplici scopi, tra cui lo studio di particolari aspetti della biologia cellulare e la produzione di metaboliti di interesse commerciale, in campo medico e farmaceutico.

Il presupposto che permette l'utilizzo di tale tecnica è la capacità delle cellule vegetali di rigenerare individui con lo stesso patrimonio genetico dei tessuti di partenza. In condizioni di coltivazione *in vitro* risulta possibile rigenerare piante intere da singole cellule e piccoli pezzi di tessuto vegetale, proprio perché le cellule vegetali giovani sono totipotenti, cioè possono essere indotte attraverso adeguate condizioni di coltura, per svilupparsi lungo un percorso "programmato", che porta alla formazione di una intera nuova pianta identica a quella da cui sono derivate le cellule (Evans et al., 2003).

Per ottenere cellule vegetali *in vitro*, si prelevano frammenti di organi fotosintetici che, dopo essere stati sterilizzati, vengono posti in mezzi culturali idonei a stimolare la proliferazione cellulare. Tali mezzi sono costituiti da sali minerali, vitamine, fitormoni e zuccheri in un terreno di agar solido-gelatinoso (Pasqua et al. 2015).

Le piastre contenenti gli espianti vengono mantenute in camere di crescita aventi fotoperiodo luce/buio di 16:8 h e una temperatura costante di  $23 \pm 2$  °C.

I fitormoni necessari per la proliferazione cellulare *in vitro* sono la citochinina e l'auxina e il loro rapporto andrà a determinare il percorso morfogenetico che seguirà il tessuto coltivato. Attraverso la presenza di concentrazioni equilibrate dei fitormoni presi in esame, alcune cellule si dividono mitoticamente formando delle masse cellulari indifferenziate denominate calli.

I calli sono costituiti da cellule non differenziate e, se esposti nuovamente ad una appropriata concentrazione di fitormoni, sono in grado di indurre una nuova differenziazione delle cellule, rigenerando parti fogliari e radicali della pianta di partenza.

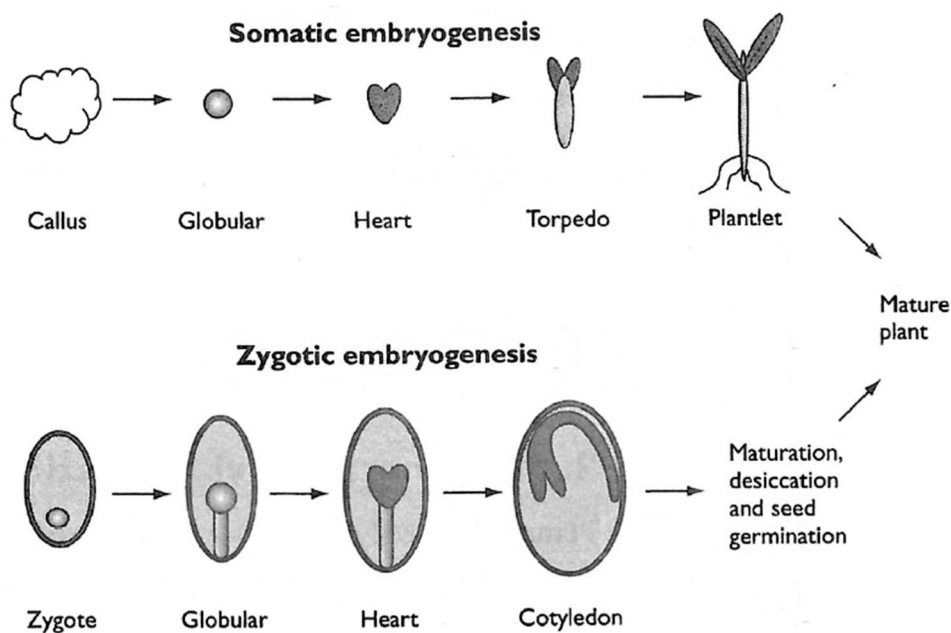
I calli ottenuti *in vitro* sono preservati sia in capsule Petri, sia in opportuni terreni liquidi all'interno di beute mantenute in agitazione. Inoltre, trasferendo regolarmente le cellule in mezzi rinnovati, le colture di callo possono essere mantenute *in vitro* per un tempo indefinito.

I principali vantaggi dei sistemi di coltura cellulare includono quanto segue: il materiale vegetale può essere generato indipendentemente dai fattori esterni (dalla composizione del suolo e dal clima), le cellule coltivate non sono minacciate dagli attacchi di microrganismi o degli insetti e i caratteri di qualsiasi pianta, anche quelle rare o in via di estinzione, possono essere facilmente conservati (Efferth, 2019).

## 1.2 Embriogenesi somatica

L'embriogenesi somatica è un processo attraverso il quale è possibile ottenere un embrione, dal quale può derivare la pianta, da una cellula o un gruppo di cellule somatiche, anche senza la fecondazione. Nelle piante l'embriogenesi non dipende strettamente dalla fecondazione. Durante il corso dell'evoluzione, molte specie vegetali hanno evoluto differenti strategie per contrastare fattori ambientali e genetici che impedivano la fecondazione, tra cui l'embriogenesi somatica. Gli embrioni possono avere origine asessualmente in natura o possono essere indotti a formarsi *in vitro* da cellule provenienti da una vasta gamma di tessuti somatici (Evans et al., 2003).

Gli embrioni somatici assomigliano morfologicamente agli embrioni zigotici. Entrambi presentano lo stadio globulare, a cuore e a torpedino (Fig. 1), tuttavia quelli somatici non presentano una connessione vascolare con il tessuto originale, risultando più accessibili e facili da isolare per scopi scientifici e applicativi. Dal punto di vista applicativo, infatti, non essendoci rimescolamento genico, l'embriogenesi somatica può essere utilizzata per ottenere piante geneticamente identiche a quelle da cui derivano.



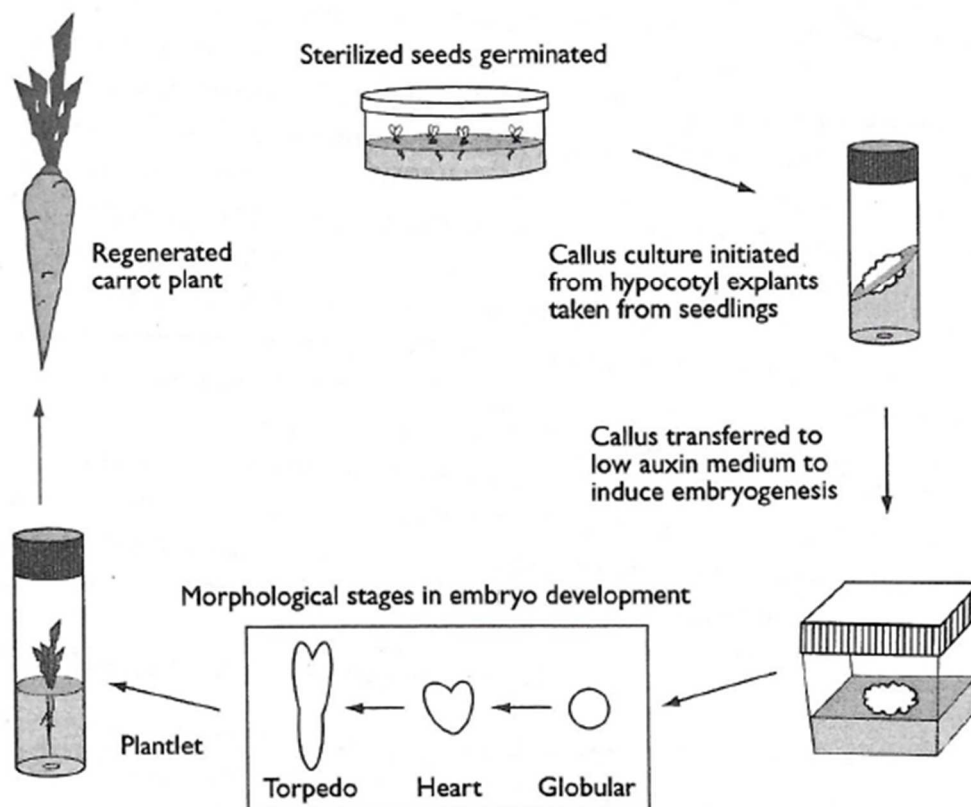
**Figura 1.** Comparazione tra l'embriogenesi somatica e zigotica, mostrando le fasi principali coinvolte (globulare, a cuore e a torpedino). Da Evans et al., 2003.

Gli embrioni somatici sono utilizzati per studiare la regolazione dello sviluppo embrionale, ma anche come strumento per la propagazione vegetativa su larga scala (Von Arnold et al., 2001).

In letteratura scientifica sono presenti numerosi lavori che descrivono il processo per la generazione di embrioni somatici. L'embriogenesi somatica può essere indotta per via diretta attraverso l'espianto, senza una fase di callo intermedia, o per via indiretta dopo una fase di callo. Una delle piante modello che per prima ha permesso lo studio dell'embriogenesi somatica è *Daucus carota* (L.).

### 1.2.1 Embriogenesi somatica in *Daucus carota* (L.)

L'embriogenesi somatica è indotta dalla coltura delle cellule di callo attraverso una manipolazione delle condizioni colturali. La procedura di tale tecnica in *Daucus carota* (L.) (Fig.2) consiste nella messa a punto di una linea cellulare di callo da espanti di ipocotili, reciso dalle singole piantine, e mantenuti in condizioni di sterilità e nel trasferimento del callo in un terreno appropriato in assenza dell'ormone auxina.



**Figura 2.** Fasi di induzione di embriogenesi somatica tramite callo in *Daucus carota* (L.). Da Evans et al., 2003.

Tuttavia è noto che non tutte le cellule presenti in una coltura *in vitro* siano capaci di formare embrioni. La competenza embriogenica risiede all'interno di masse cellulari pro-embriogeniche

definite PEM. Per arricchire una coltura di cellule embriogeniche è necessario selezionare la frazione cellulare costituita da masse pro-embriogeniche (PEM) prima di trasferire il materiale nel mezzo rinnovato in assenza di auxina.

L'auxina è il più importante regolatore di crescita coinvolto sia nell'induzione dell'embriogenesi somatica che nel corretto sviluppo morfogenetico dell'embrione. Le colture di cellule di carota richiedono l'utilizzo dell'auxina 2,4-D per la competenza embriogenica, ma la presenza continua del fitormone blocca l'ulteriore sviluppo oltre lo stadio PEM. Perciò, spostando la coltura in un mezzo privo di auxina, è permessa l'induzione dell'embriogenesi somatica (Evans et al., 2003; Rabiei et al., 2010).

La competenza embriogenica di una coltura non rimane tale per un tempo indefinito. Infatti, le colture che sono state mantenute in uno stato indifferenziato ad alte concentrazioni di auxina per molti anni possono perdere progressivamente la loro capacità di produrre embrioni somatici.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo principale di questo lavoro è quello di ottenere una nuova coltura *in vitro* avente la proprietà di embriogenesi somatica di *Daucus carota* (L.). Secondariamente, lo scopo, risulta anche quello di testare l'effettiva capacità embriogenica della frazione cellulare selezionata. Non essendo la tempistica del mio tirocinio abbastanza lunga per poter testare l'embriogenesi della linea cellulare che ho allestito, mi sono avvalsa delle colture embriogeniche *in vitro* già presenti in laboratorio di cui una è relativa all'anno 2022 e l'altra all'anno 2023.

La coltura più datata è risultata, come si leggerà di seguito, non più embriogenica e quindi inadatta a svolgere esercitazioni per scopi accademici e studi di tipo morfologico e molecolare che usualmente si compiono in ambito di ricerca. Questo perché, la competenza embriogenica di una coltura è al suo massimo quando la coltura è relativamente giovane, cioè fino a un anno dopo la sua iniziazione. In seguito, le colture che sono state mantenute in uno stato indifferenziato ad alte concentrazioni di auxina per molti anni possono progressivamente perdere la loro capacità embriogenica (Evans et al., 2003).

La coltura relativa all'anno 2023 è risultata embriogenica. Di conseguenza, verrà sfruttata fino a quando la nuova linea, la cui messa a punto ha permesso questo lavoro di tesi, non si sarà stabilizzata.



### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Germinazione dei semi e allestimento e mantenimento di colture cellulari *in vitro***

Le linee cellulari sono state ottenute a partire da i semi di tre diverse specie di *Daucus carota* (L.) ad uso commerciale: Flakkee '15 (semi acquistati nell'anno 2015), Flakkee '24 e Lunga Rossa (semi acquistati nell'anno 2024).

##### **Trattamento semi**

Per preparare la coltura si è resa necessaria la sterilizzazione dei semi. Il trattamento di pulizia e preparazione di questi ultimi si è svolto nel seguente modo:

- Il materiale è stato immerso in un becher contenente una soluzione di etanolo al 75% ed il tutto è stato posto su di un agitatore per 10 minuti.
- I semi, prelevati dal becher, sono stati poi sottoposti a due lavaggi in una soluzione di ipoclorito di sodio per 15 minuti ciascuno.
- Per eliminare i residui di ipoclorito di sodio il materiale è stato risciacquato per tre volte.

Le piastre Petri per i semi sono state preparate adagiando un dischetto di carta da filtro sterile e versando 5 ml di acqua sempre in condizione di sterilità.

Le piastre contenenti il materiale vegetale sono state conservate in una camera di crescita avente fotoperiodo luce/buio di 16:8 h, ad una temperatura costante di  $23\pm 2$  °C.

##### **Prelievo e mantenimento degli espianti**

Cresciuta la plantula, dopo 4-5 giorni, questa è stata tagliata sotto i cotiledoni e sopra la radichetta per separare l'ipocotile. Sono state prelevate anche le foglioline di alcune plantule.

Gli ipocotili e le foglioline sono state poste in piastre Petri con terreno appropriato (terreno Gamborg B5, saccarosio al 2%, pH 5,5, ormone 2,4-D-auxina 0,5 mg/L e 0,8 g/L di Plant Agar Duchefa). Tale terreno, denominato B5F, va rinnovato circa ogni 15 giorni spostando gli espianti in nuove piastre Petri. I calli si sono formati dopo circa 2 mesi.

##### **Passaggio in liquido e mantenimento**

Per ottenere la linea cellulare liquida si sono trasferiti parti di coltura cellulare solida nel mezzo B5F liquido per mantenere in modo ottimale ed efficace la linea cellulare. Le colture cellulari in liquido richiedono di avere il mezzo rinnovato ogni 7 giorni.

### **3.2 Induzione dell'embriogenesi somatica**

#### **Metodo per induzione dell' embriogenesi somatica in colture in sospensione**

La procedura per l'induzione dell'embriogenesi somatica si applica a colture cellulari in sospensione già avviate. Sono state utilizzate colture già presenti in laboratorio che per praticità vengono chiamate S22 e S23.

Le due beute, contenenti rispettivamente la coltura S22 e la coltura S23, richiedono di avere lo stesso volume di cellule per eseguire la procedura. Il volume viene calcolato mediante la tecnica del PCV (Packed Cell Volume). Il PCV è stato calcolato centrifugando 5 ml della coltura madre per 3 minuti a 2000 rpm. Il volume delle cellule impaccate espresso in cc consente di calcolare l'esatto volume da distribuire in ciascuna beuta in modo da avere la stessa quantità di materiale cellulare di partenza. Sono state allestite le beute da 100 ml con 0,8 cc di PCV.

La procedura si è svolta in parallelo nelle due colture nel seguente modo:

- La sospensione cellulare di S22 o di S23 è stata filtrata con una rete di nylon da 120 µm montata su un becher da 100 ml.
- La frazione cellulare rimasta sulla retina è stato poi lavata abbondantemente con il terreno di coltura liquido senza ormoni (terreno Gamborg B5, saccarosio al 2%, pH 5,5, Duchefa) denominato B5<sup>-</sup>.

Dopo aver gettato il filtro in nylon con il materiale residuo, tagliando l'elastico con cui era fissato sulla sommità, il contenuto del becher viene sottoposto a una seconda filtrazione:

- La sospensione cellulare viene filtrata attraverso una rete di nylon da 50 µm, montata su un becher da 200 ml.
- La frazione cellulare rimasta sulla retina è stata lavata abbondantemente con lo stesso mezzo utilizzato nella precedente filtrazione.

Attraverso l'uso di una pipetta sterile sono stati prelevati da sopra la rete di nylon circa 2-3 ml di cellule e sono state trasferite in una provetta sterile da 15 ml. In questo modo è stata selezionata la frazione cellulare (da 50 µm a 120 µm), arricchita in masse pro-embriogeniche (PEM) in grado di avviare il processo di sviluppo dell'embrione.

Le cellule risospese sono state diluite 40 volte trasferendo, in una provetta sterile da 15 ml, 7,8 ml di terreno B5<sup>-</sup> e 0,2 ml di sospensione cellulare.

Per il calcolo della concentrazione cellulare iniziale si è reso necessario contare con la camera di Nageotte al microscopio ottico le cellule contenute in 20 rettangoli.

Il materiale contenuto nella provetta sterile è stato trasferito alla concentrazione di 3000 cellule/ml in 25 ml di terreno di coltura liquido fresco senza ormoni in una beuta da 100 ml. Sono stati svolti i calcoli per definire il volume di cellule da trasferire.

Le beute sono state mantenute su un agitatore orbitale a 80 giri/min. Si è atteso lo sviluppo degli embrioni.

### **Metodo per induzione dell'embriogenesi somatica in solido**

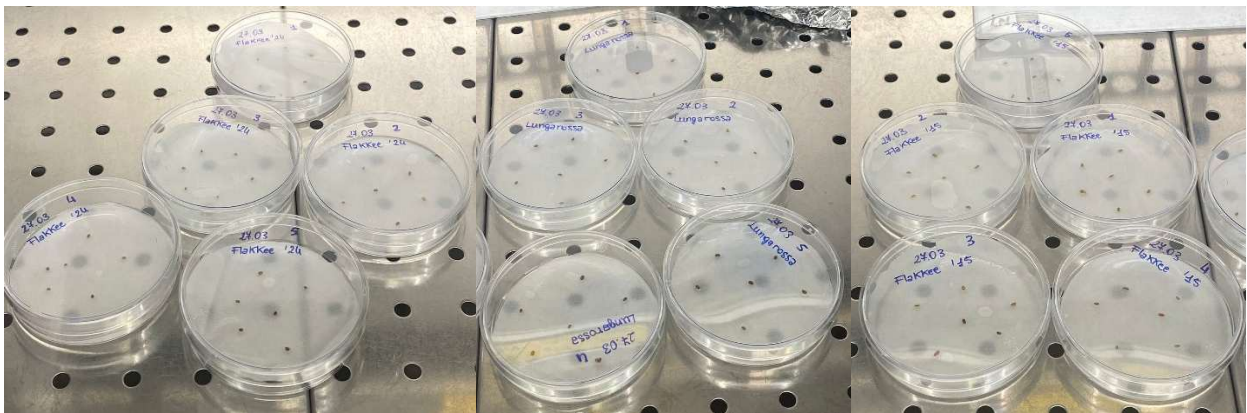
Parte degli ipocotili proliferanti dopo circa 5 settimane sono stati trasferiti in piastre Petri con terreno B5<sup>-</sup> addizionato di 0,8 g/L di Plant Agar (Duchefa), per verificare l'induzione dell'embriogenesi somatica in un mezzo solido.

## 4. RISULTATI

Di seguito sono riportati i risultati che riguardano l'allestimento di colture cellulari *in vitro* (semina, allestimento della coltura cellulare solida, allestimento della coltura cellulare liquida) e i risultati ottenuti in seguito al processo di induzione degli embrioni somatici di *Daucus carota* (L.).

### 4.1 Semina e germinazione

La semina è stata allestita in triplicato per ognuna delle 3 linee di *Daucus carota* (L.) prese in esame, per ottenere dei dati statistici accurati. Sono stati posti 6 semi per piastra Petri (Fig. 3) in modo tale da avere le stesse condizioni per ogni semina. Si è attesa la germinazione delle plantule.



**Figura 3.** Disposizione dei semi in piastre Petri correttamente trattati in ambiente sterile.

I risultati relativi ai semi germinati sono stati i seguenti:

I semina				
<b>Lunga Rossa</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	5	3,6	6	1,14
14 giorni	5	4,6	6	0,89
<b>Flakkee '15</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	5	2,8	6	0,84
14 giorni	5	3,8	6	1,30
<b>Flakkee '24</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	5	3,6	6	1,52
14 giorni	5	4,4	6	2,07

**Tabella 1.** Media dei semi germinati e deviazione standard relativi alla prima semina.

<b>II semina</b>				
<b>Lunga Rossa</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	10	4	6	0,67
14 giorni	10	4,6	6	0,84
<b>Flakkee '15</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	10	2	6	0,47
14 giorni	10	2,9	6	0,99
<b>Flakkee '24</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	10	4,4	6	0,97
14 giorni	10	4,7	6	0,82

**Tabella 2.** Media dei semi germinati e deviazione standard relativi alla seconda semina.

<b>III semina</b>				
<b>Lunga Rossa</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	10	4,6	6	0,70
14 giorni	10	4,9	6	0,32
<b>Flakkee '15</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	10	2,5	6	1,18
14 giorni	10	3,1	6	1,20
<b>Flakkee '24</b>				
	N° Petri	Media semi germinati	Totali	Deviazione standard
7 giorni	10	4,5	6	0,85
14 giorni	10	4,6	6	0,84

**Tabella 3.** Media dei semi germinati e deviazione standard relativi alla terza semina.

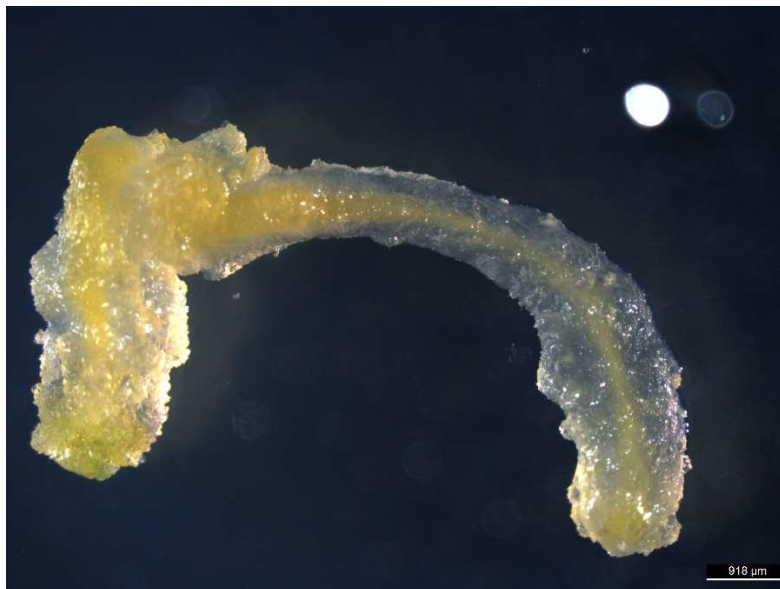
Questi risultati suggeriscono un trend ricorrente: la linea Lunga Rossa e la linea Flakkee '24 hanno una media di semi geminati simile e più elevata rispetto alla linea Flakkee '15.

#### 4.2 Allestimento coltura cellulare in solido

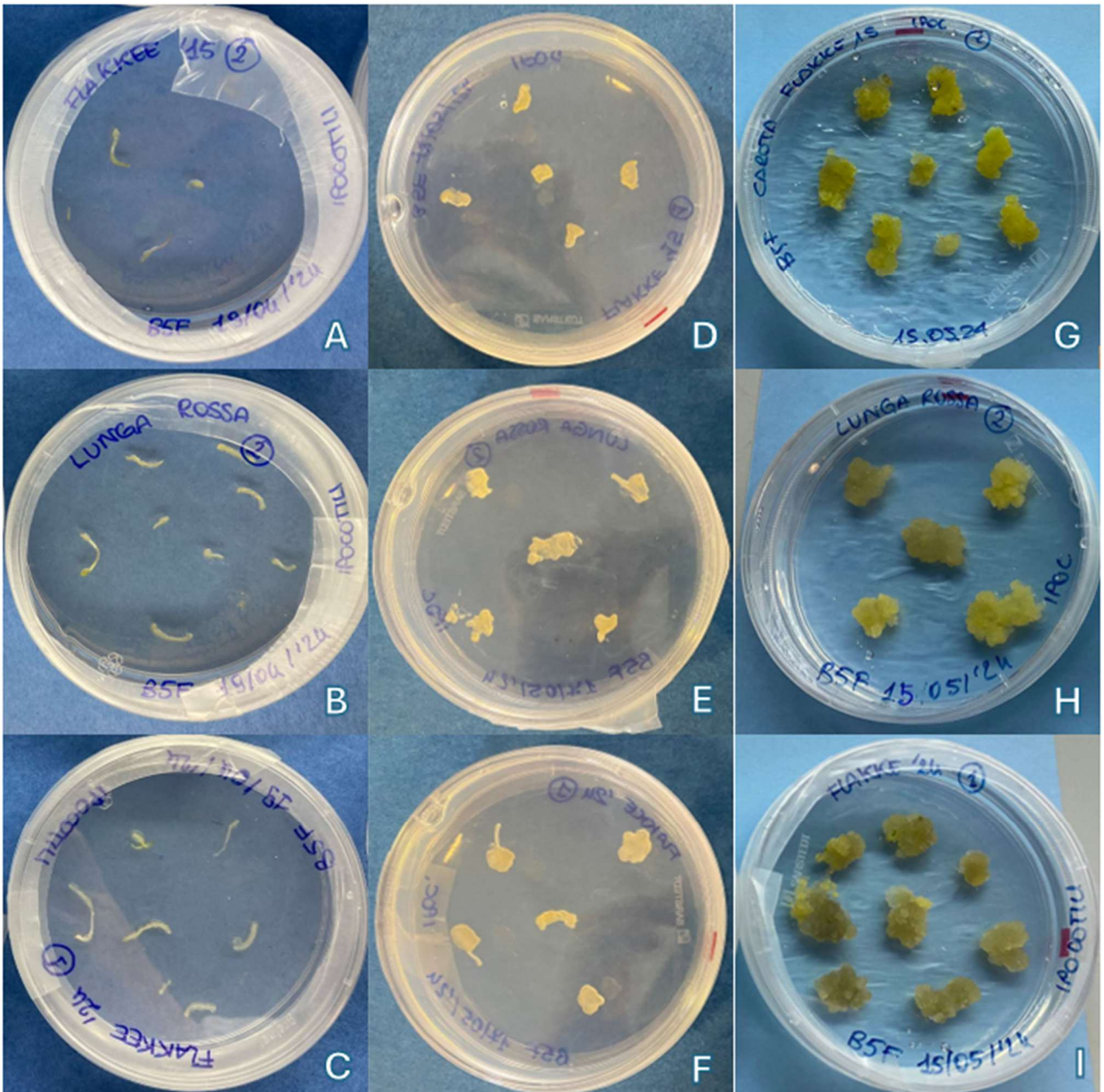
Dalle plantule germinate sono stati prelevati espianti di ipocotile che sono stati posti in 5 piastre Petri per ogni linea (5 piastre Petri per la linea Lunga Rossa, 5 piastre Petri per la linea Flakkee '15 e 5 piastre Petri per la linea Flakkee '24). Per indurre callogenesi viene usato il terreno B5F, arricchito con ormone come riportato in materiali e metodi. Lo stadio intermedio di callo è necessario per mantenere la coltura cellulare *in vitro* e per la formazione di embrioni somatici.

I vari stadi di de-differenziamento che raggiungono gli espianti sono riconoscibili in ognuna delle tre linee:

- Il primo stadio è stato raggiunto dopo 14 giorni (Fig.5A-B-C): la proliferazione di cellule indifferenziate è stata appena avviata.
- Il secondo stadio è stato raggiunto dopo 28 giorni (Fig.5D-E-F): si nota maggiormente la proliferazione di cellule indifferenziate e rimane evidente l'espianto di partenza (Fig.4).
- Il terzo stadio è stato raggiunto dopo 60 giorni (Fig.5G-H-I): si nota la formazione di calli. Questi sono masse di cellule non differenziate e in rapida divisione. Il callo in questo stadio risulta compatto e di consistenza friabile.



**Figura 4.** *Ipocotile relativo alla linea Flakkee '15 dopo 28 giorni. Si nota la proliferazione cellulare indotta dagli ormoni presenti nel terreno.*



**Figura 5.** Fasi del processo di callogenesi in *Daucus carota* (L.). (A-D-G) Relative alla linea Flakkee '15; (B-E-H) Relative alla linea Lunga Rossa; (C-F-I) Relative alla linea Flakkee '24. (A-B-C) Ipcotili proliferanti dopo 14 giorni; (D-E-F) Ipcotili proliferanti dopo 28 giorni; (G-H-I) Gli ipcotili hanno raggiunto lo stadio di callo dopo 60 giorni.



### 4.3 Allestimento coltura cellulare liquida

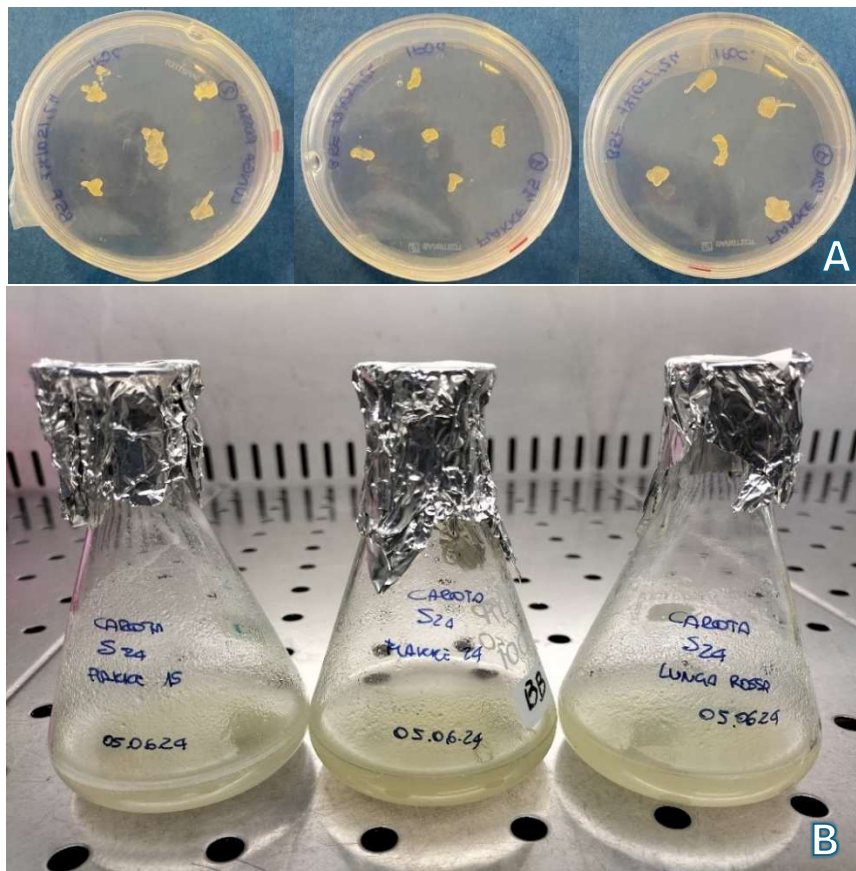
Di seguito sono riportati due metodi di allestimento di una coltura cellulare liquida di *Daucus carota* (L.). La prima derivante dagli ipocotili proliferanti e la seconda derivante dai calli. Sono entrambe parte del processo di embriogenesi somatica indiretta.

#### 4.3.1 Coltura cellulare liquida da ipocotili proliferanti

Gli ipocotili proliferanti dopo 28 giorni dalla deposizione nella piastra Petri sono stati posti in beuta. Questi ultimi sono stati posti in una beuta da 25 ml con terreno B5F, riempita solo per 1/5 del suo volume.

Nel seguente caso, per ottenere delle cellule stabilizzate, si è aumentata la dimensione della beuta progressivamente fino ad arrivare a quella del volume di 250 ml. Si è allestita una beuta per una piastra Petri delle tre linee.

Le linee cellulari nelle tre beute (Fig.6B) risultano ancora non stabilizzate dopo 28 giorni dal suo allestimento. Saranno necessari almeno altri due mesi di re-inoculi.

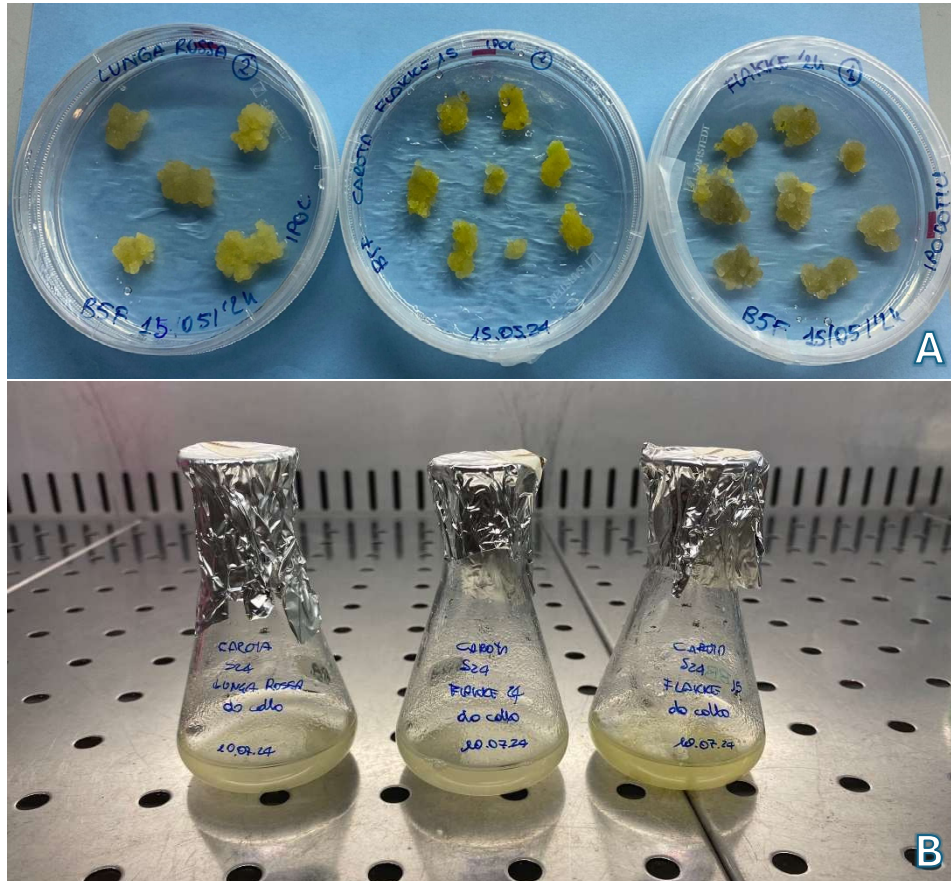


**Figura 6.** Allestimento di coltura cellulare liquida da ipocotili proliferanti. (A) Ipocotili proliferanti delle tre linee; (B) Beute allestite dai relativi ipocotili proliferanti dopo 28 giorni.



### 4.3.2 Coltura cellulare liquida da callo

I calli formatisi dopo 60 giorni dalla deposizione degli espianti nella piastra Petri sono stati posti in beuta in continua agitazione per ottenere la frammentazione del callo. Si è allestita una beuta per una piastra Petri delle tre linee (Fig. 7B).



**Figura 7.** Allestimento di coltura cellulare liquida da calli. (A) Calli delle tre linee; (B) Beute allestite dai relativi calli.

Le cellule indifferenziate cresceranno nel terreno liquido fino a stabilizzarsi (circa due-tre mesi). Una volta stabilizzatesi, si procederà a filtrare la frazione ricca in cellule proembriogeniche, a testarne l'effettiva capacità di embriogenesi somatica e a mantenerla tale.

#### 4.4 Embriogenesi somatica da linee in liquido già stabilizzate

Il protocollo di induzione di embriogenesi è stato applicato a due linee embriogeniche già stabilizzate, S22 e S23, non essendo possibile utilizzare le linee da me allestite. Dopo la procedura di doppia filtrazione, la frazione cellulare arricchita in masse proembriogeniche, la cui corretta concentrazione di inoculo è stata calcolata come indicato in tabella, è stata mantenuta in terreno B5<sup>-</sup>.

Di seguito è riportata la concentrazione cellulare iniziale delle colture prese in esame:

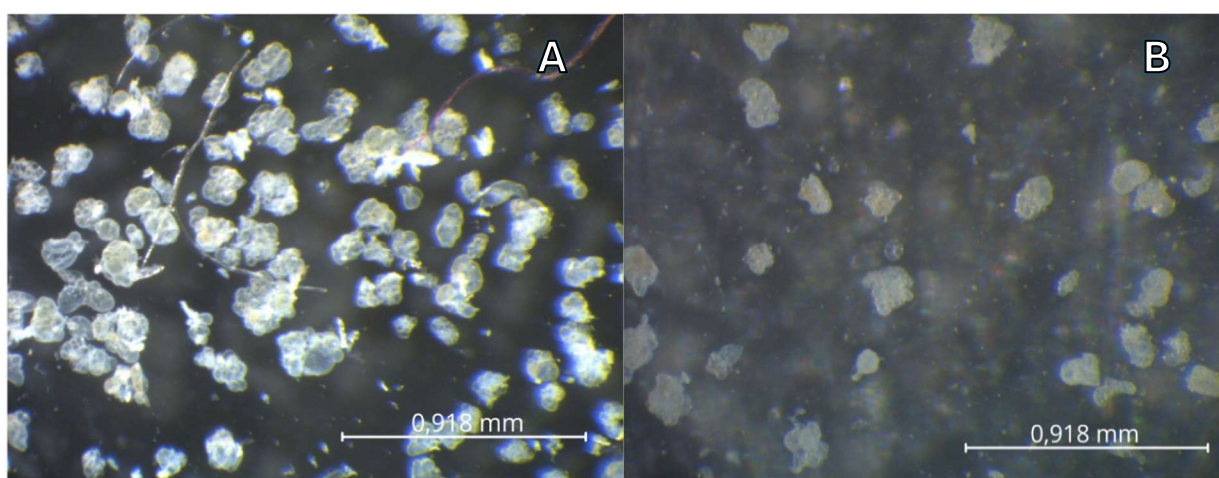
<b>Numero di cellule per ml = cellule contate in 20 rettangoli × 40 × fattore di diluizione</b>
$121 \times 40 \times 100 = \mathbf{486400 \text{ cellule S22/ml}}$
$89 \times 40 \times 100 = \mathbf{356000 \text{ cellule S23/ml}}$

Il volume di cellule trasferito per avere una concentrazione di 3000 cellule/ml in 25 ml di terreno:

<b><math>C_i \times V_i = C_f \times V_f</math></b>
$486400 \times V_i = 3000 \times 25$ <b><math>V_i = 154 \mu\text{l S22/25 ml}</math></b>
$356000 \times V_i = 3000 \times 25$ <b><math>V_i = 254 \mu\text{l S23/25 ml}</math></b>

Si è monitorato periodicamente il processo di sviluppo degli embrioni somatici in entrambe le linee.

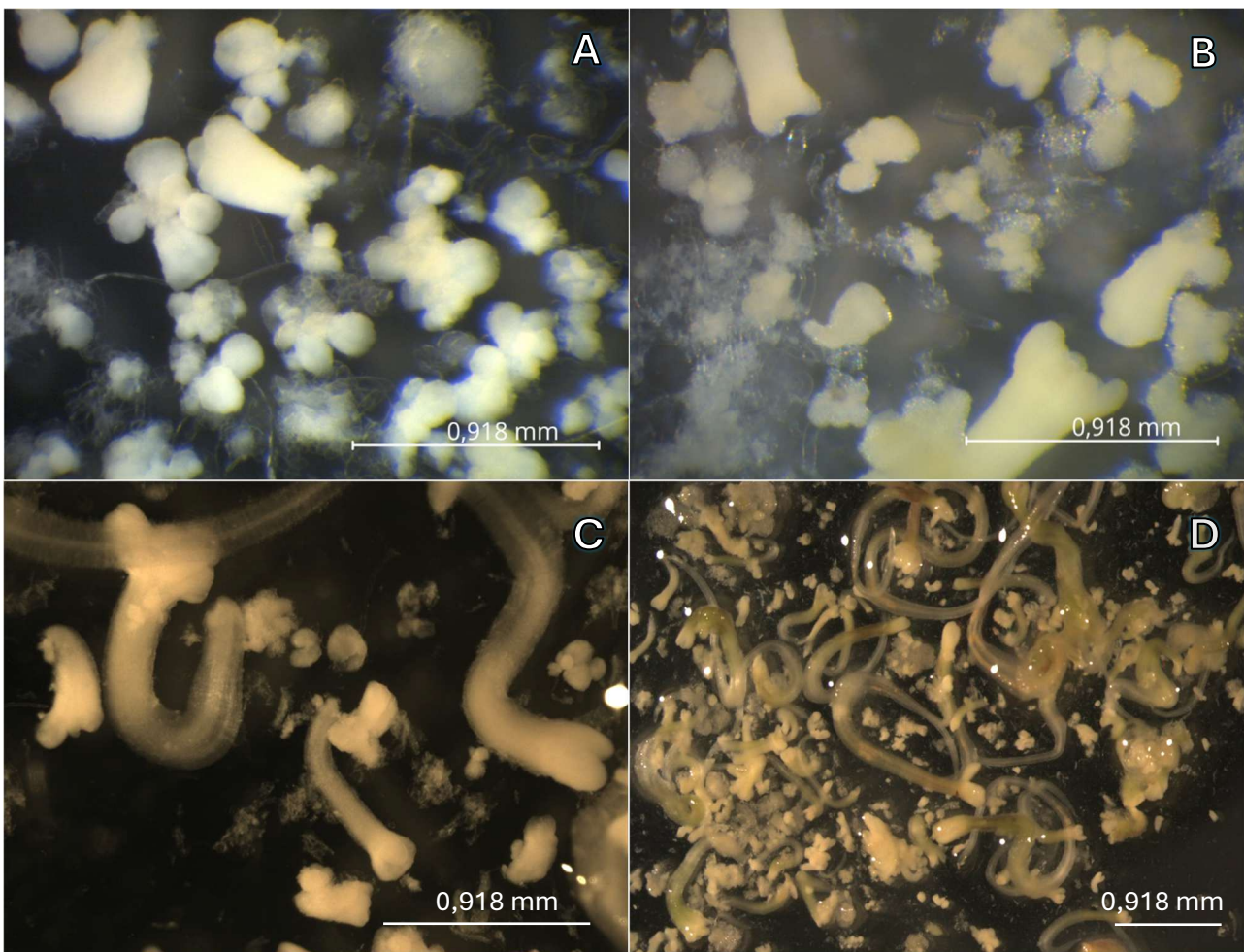
Le cellule della linea S22 sono risultate sia dopo 12 giorni (Fig. 8A) sia dopo 20 giorni (Fig. 8B) trasparenti e mancanti del primo stadio di sviluppo di un embrione somatico: lo stadio globulare.



**Figura 8. Embriogenesi somatica da linea in liquido S22.** La linea testata non è risultata embriogenica. (A) Cellule dopo 12 giorni; (B) Cellule dopo 20 giorni.

Nelle cellule della linea S23 risulta evidente la formazione di embrioni somatici e i loro vari stadi di sviluppo:

- Nelle cellule dopo 12 giorni (Fig. 9A) si nota lo stadio globulare e lo stadio a cuore. Nello stadio globulare l'embrione è sferico e si origina dai PEM entro 5-7 giorni, dopo che le colture sono state trasferite in un mezzo senza auxina. Lo stadio a cuore è caratterizzato dall'espansione dei due cotiledoni e l'asse embrionale assume una forma oblunga (Evans et al. 2003).
- Alcuni embrioni dopo 20 giorni (Fig. 9B) si presentano allo stadio di torpedino, stadio dello sviluppo riconoscibile dall'allungamento dell'ipocotile e dall'inizio della formazione della radichetta.
- Dopo 28 giorni (Fig. 9C) l'allungamento dell'ipocotile e i due cotiledoni risultano ben visibili.
- Dopo 33 giorni (Fig. 9D) le piantine sono distinguibili. Queste piantine hanno cotiledoni verdi, ipocotili allungati e radichette con peli chiaramente sviluppati (Fig.10).



**Figura 9. Embriogenesi somatica da linee in liquido S23. (A) Cellule dopo 12 giorni; (B) Embrioni dopo 20 giorni; (C) Embrioni dopo 28 giorni; (D) Embrioni dopo 33 giorni.**





**Figura 10.** *Piantina formatasi dopo 33 giorni. Sono chiaramente riconoscibili i cotiledoni, l'ipocotile e la radichetta.*

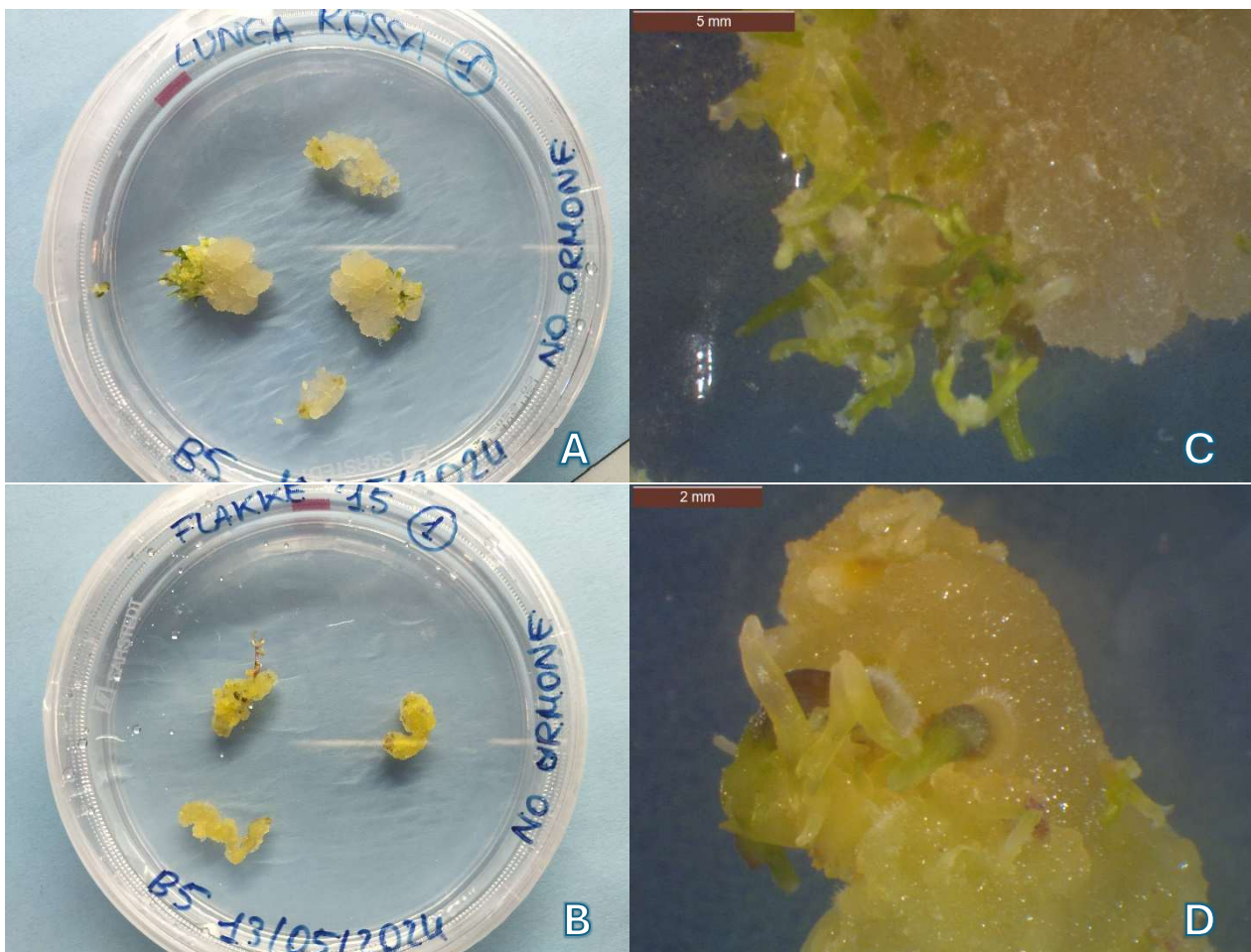
#### 4.5 Embriogenesi somatica in solido

Gli ipocotili proliferanti sono stati posti nel terreno senza ormoni per testare l'embriogenesi somatica diretta. L'embriogenesi somatica diretta è stata utilizzata per indurre piantine rigenerate intatte. Si è applicata l'embriogenesi somatica diretta in due fasi alla propagazione di massa delle carote (Takeda et al. 2008).

La coltura di induzione in embriogenesi somatica diretta in due fasi include un trattamento con auxina simile all'embriogenesi tramite cellule di callo (Takeda et al., 2008).

Nella prima fase gli ipocotili proliferanti si sono sviluppati in terreno con ormoni B5F.

Nella seconda fase il materiale è stato trasferito in un nuovo mezzo solido senza 2,4-D. Si osserva la formazione di embrioni somatici in Flakkee '15 (Fig. 11A-C) e in Lunga Rossa (Fig. 11B-D).



**Figura 11. Embriogenesi somatica in solido. (A)** Ipocotili proliferanti di Lunga Rossa dopo 21 giorni; **(C)** Relativo ingrandimento. **(B)** Ipocotili proliferanti di Flakkee '15 dopo 21 giorni; **(D)** Relativo ingrandimento.

## 5. CONCLUSIONI

*Daucus carota* (L.) è una specie cardine nella ricerca scientifica. Infatti, la formazione di embrioni somatici è stata per la prima volta osservata proprio nelle sospensioni cellulari di *Daucus carota* (L.) da Steward et al. (1958) e Reinert (1958). In seguito il potenziale per l'embriogenesi somatica è stato dimostrato in una vasta gamma di specie vegetali (Von Arnold et al., 2001).

Questo lavoro di tesi ha permesso di ottenere con successo una nuova coltura avente la proprietà di embriogenesi somatica *in vitro* di *Daucus carota* (L.).

Per ragioni di tempo, dopo aver messo a punto la coltura *in vitro* nel mezzo solido opportuno (Paragrafo 4.2) e nel rispettivo mezzo liquido (Paragrafo 4.3), si è monitorato lo sviluppo degli embrioni somatici da colture già stabilizzate in laboratorio (Paragrafo 4.4).

Tale procedura ha permesso di comprendere il motivo per il quale è necessario rinnovare circa ogni due anni le colture cellulari con proprietà embriogeniche presenti in laboratorio. La linea di coltura cellulare S22, la più datata tra le due, non è risultata più con proprietà di embriogenesi somatica e verrà sostituita nei prossimi esperimenti.

La nuova linea di coltura cellulare *in vitro* (Paragrafo 4.5) ha permesso di testare con successo la capacità in *Daucus carota* (L.) di ottenere embrioni somatici in modo diretto attraverso espianti di ipocotili, senza passare attraverso lo stadio di callo.

Questi esperimenti provano la versatilità di tale tecnica, che verrà ulteriormente perfezionata in laboratorio, in modo da ampliarne le possibili applicazioni e cercare di indagare la regolazione di questo processo.

Risulta necessario ricordare, infatti, che i meccanismi che controllano la differenziazione cellulare durante l'embriogenesi somatica sono tutt'altro che chiari. Perciò è fondamentale continuare la ricerca in questo campo ed identificare i geni specifici che permettono la formazione di embrioni somatici.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- **Efferth T.** (2019) Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* 5: 50-59.
- **Evans D. E., Coleman J.O.D., Kearns A.** (2003) Plant cell culture. BIOS Scientific.
- **Pasqua G., Abbate G., Forni C.** (2019) Botanica generale e diversità vegetale. Piccin.
- **Rabiei K., Polyakov A., Khodambashi M., Sharafova O., Kalashnikova E., Hooshmand S., Omid M.** (2010) Carrot (*Daucus carota L.*) *in vitro* regeneration. *Vegetable Crops Research Bulletin* 73: 13-22.
- **Takeda T., Mizukami M., Matsuoka H.** (2008) Characterization of two-step direct somatic embryogenesis in carrot. *Biochemical Engineering Journal* 38: 206-211.
- **Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L.** (2001) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare la relatrice di questa tesi, la professoressa Barbara Baldan, che oltre ad avermi seguito con grande disponibilità in questo lavoro, mi ha permesso di apprezzare il suo rigore scientifico, maturato da una evidente passione verso questa materia.

Un ringraziamento sentito va anche alla correlatrice, la dottoressa Stefania Marcato, che mi ha seguito durante gli esperimenti di laboratorio e mi ha permesso di arricchire le mie conoscenze in questo ambito con grande pazienza e dedizione.

Un ringraziamento speciale lo dedico a mia mamma, la mia prima sostenitrice, a mia sorella, a mia nonna e a Giuseppe che quotidianamente supportano le mie scelte, dandomi piena fiducia. Il vostro sostegno è stato fondamentale in ogni occasione, fin dalla scelta del mio percorso di studi.

Infine, ringrazio chi ha reso più divertenti e spensierati questi tre anni: a partire da Francesco, grazie per aver sempre creduto in me, soprattutto quando io non ci credevo, a Maddalena e a Denise, parte integrante della mia vita universitaria, a Lucrezia e a Matilde, grazie per essermi accanto in questo periodo intenso e per gioire insieme a me dei traguardi raggiunti.