



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**ALLESTIMENTO E MANTENIMENTO DI LINEE CELLULARI
DA *Betula utilis* (L.) E *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH**

Tutor: Prof.ssa Barbara Baldan

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Stefania Marcato

Dipartimento di Biologia

Laureando: Matteo Boron
2008736

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

Abstract

1. Introduzione	1
1.1 Ecologia e importanza di <i>Betula utilis</i> (L.)	1
1.2 Ecologia e importanza di <i>Echinacea purpurea</i> (L.) MOENCH	2
1.3 Colture di linee cellulari vegetali <i>in vitro</i>	3
2. Scopo del lavoro	6
3. Materiali e metodi	7
3.1 Allestimento e mantenimento di calli da <i>Betula utilis</i> (L.)	7
3.2 Allestimento di una curva di crescita da <i>Echinacea purpurea</i> (L.)	9
4. Risultati e conclusioni	11
4.1 Induzione di callogenesi da tessuti fotosintetici di <i>Betula utilis</i> (L.)	11
4.2 Curva di crescita di una linea cellulare di <i>Echinacea purpurea</i> (L.)	14
5. Bibliografia	19

ABSTRACT

Betula utilis (L.), conosciuta comunemente come betulla dell'Himalaya, è un'importante specie dell'ecosistema Himalayano, ampiamente utilizzata dalle popolazioni asiatiche come fonte di legname, foraggio per animali e sostanze utili per curare malattie; inoltre è di rilevante importanza ecologica per la sua capacità di assorbire la CO₂ data l'elevata massa fogliare, maggiore rispetto a quella di altre specie di *Betula*.

Nel seguente elaborato vengono illustrati i metodi per allestire e mantenere linee cellulari vegetali *in vitro* (procedure, trattamenti e terreni per la crescita cellulare) che sono stati adoperati per indurre callogenesi su tessuti fotosintetici di partenza da *Betula utilis*, quali gemme e giovani foglie.

Successivamente a questa attività, segue l'allestimento di una curva di crescita cellulare a partire da cellule conservate in liquido di *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, specie ampiamente utilizzata per l'estrazione di principi attivi ad uso farmaceutico e cosmetico.

1. INTRODUZIONE

1.1 Ecologia e importanza di *Betula utilis* (L.)

Betula utilis, conosciuta comunemente con il nome commerciale di “Betulla dell’Himalaya” (Figura 1), è una specie legnosa caratterizzata da un portamento dei rami allargato fin dalla base del tronco.

Può raggiungere altezze fino a 30 m, presenta una corteccia rosso scuro-marrone con lenticelle orizzontali biancastre, tendente ad esfoliare in scaglie sottili.

Rami e ramoscelli sono rosso bruni glabri, le foglie sono ovato-ellittiche lunghe 5-6 cm densamente resinose punteggiate e pubescenti nella pagina inferiore, molto meno pubescenti nella pagina superiore.

È una pianta angiosperma monoica, con fiori dati da infiorescenze pendule poco appariscenti con impollinazione anemofila.

I frutti sono acheni glabri penduli simili a piccole pigne generalmente riuniti in gruppi di due o tre alla base di un racemo, la fioritura va da giugno a luglio e fruttifica da luglio ad agosto, pianta a foglie caduche in inverno.

La pianta cresce in terreni acidi neutri e alcalini, in mezz’ombra o in assenza d’ombra, in terreno ben umidificato. La betulla dell’Himalaya è una specie longeva che può sopravvivere fino a 400 anni, con un areale di distribuzione facente parte delle foreste temperate di latifoglie ad alta quota fino a circa 3500 m, dalla Mongolia interna a nord della Cina, alla provincia dello Yunnan a sud e oltre le regioni Himalayane di Afghanistan, Bhutan, India e Nepal.

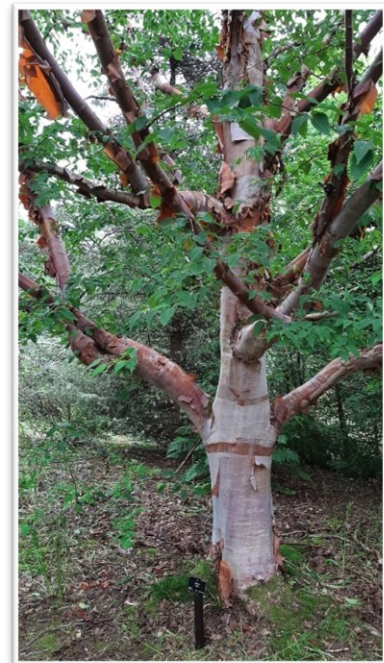


Figura 1. *Betula Utilis*.

Questa specie si presenta molto rustica e robusta e nel suo areale svolge il compito di aiutare a mantenere il fragile ecosistema dell’Himalaya proteggendo il suolo dall’erosione, inoltre presenta una notevole tolleranza al gelo formando così il limite del bosco nell’Himalaya. L’analisi fitochimica di questa specie evidenzia la presenza di alcaloidi e carboidrati con attività antibatterica, possiede inoltre altre attività farmacologiche come, antinfiammatorie, antiossidanti e contro l’HIV (Ghimire et al., 2021).

Questa specie produce un composto chiamato betulina, un triterpene avente attività antitumorale nei confronti di melanomi maligni e cancro al fegato e ai polmoni.

Questa pianta viene utilizzata molto anche per la prevenzione e il trattamento di infezioni della pelle e del tratto urinario, per curare ferite e ustioni, febbre, raffreddore e tosse, il tutto impiegando cortecce, foglie e succo, facendo infusi, impasti e altre preparazioni.

Altri utilizzi di *Betula utilis* vedono l'impiego della cortecchia come carta per scrivere, del legname e della cortecchia per realizzare coperture e tetti, per la costruzione di case e ponti. Il fusto e i rami si utilizzano come legna da ardere e il fogliame come foraggio di animali. Per il suo massiccio utilizzo questa specie ha subito una elevata diminuzione della popolazione associata ad un concomitante degrado dell'habitat; tuttavia, non è considerata globalmente una specie a rischio e le categorie di minaccia che vi si associano variano da paese a paese.

1.2 Ecologia e importanza di *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH

Echinacea purpurea è una pianta da fiore angiosperma erbacea perenne conosciuta comunemente come Echinacea viola facente parte della famiglia delle Asteraceae (Figura 2). Questo genere è originario del Nord America ma le sue specie sono largamente distribuite ovunque.

La pianta raggiunge un'altezza di 100-150 cm, il fusto è ramificato, conferisce alla pianta un aspetto cespuglioso, è ruvido e pubescente con macchie bruno-rossastre.

Le foglie si presentano lanceolate, ruvide e pubescenti, il fiore ermafrodita caratteristico delle Asteraceae è un'infiorescenza formata da piccoli fiori tubulari di color rosso-bruno raggruppati insieme formanti una struttura detta capolino accerchiata dai fiori del raggio di colore rosa, essi sono ligulati simili apparentemente a petali, i frutti sono acheni bianco-grigi a sezione quadrangolare.

Sono conosciute nove specie di Echinacea ma solamente tre sono utilizzate come piante officinali con svariati usi terapeutici, le varie specie vengono coltivate anche come orticole, ornamentali o per la produzione di olio.



Figura 2. Illustrazione di *Echinacea purpurea*.

Sono diversi i gruppi di composti bioattivi con proprietà farmacologiche che sono stati isolati dalle specie di Echinacea, composti come, alchilammidi, polisaccaridi, glicoproteine, flavonoidi e composti fenolici.

I composti chimici adoperati nella medicina derivano principalmente da radici e da germogli della pianta e in modo minore da tutti gli altri organi, hanno lo scopo di prevenire e curare, raffreddori, tosse, bronchiti, infezioni polmonari o patologie più invasive come l'immunodeficienza cronica dovuta alle sue proprietà immunostimolanti.

In medicina Echinacea è in grado di stimolare l'attività del sistema immunitario favorendo la produzione di cellule T, fagocitosi, attività linfocitaria e respirazione cellulare contro le cellule tumorali.

Le sostanze fitochimiche estratte da *Echinacea purpurea* hanno mostrato proprietà, antiossidanti, immunomodulatrici, antinfiammatorie, antibatteriche, antivirali e altri effetti biologici positivi che rendono il genere Echinacea e le specie di interesse medico, grande materiale di studio e ricerca.

1.3 Colture di linee cellulari vegetali *in vitro*

La coltivazione di tessuti vegetali *in vitro* rappresenta una tecnica di elevata importanza nella ricerca scientifica, in applicazioni commerciali, in campo medico e per le biotecnologie.

Con queste tecniche si possono originare linee cellulari da espianti di tessuti fotosintetici, potendo ottenere successivamente individui clonali aventi stesso patrimonio genetico posseduto nei tessuti di partenza.

La metodologia che viene attuata per ottenere cellule in grado di differenziarsi e portare potenzialmente ad interi organismi, prevede l'esposizione dei tessuti vegetali prelevati a determinate concentrazioni di fitormoni quali auxine e citochinine. I fitormoni vengono aggiunti, all'interno di piastre Petri, alle matrici solido-gelatinose di terreno, come ad esempio, MS (Murashige and Skoog, Duchefa), sulle quali vengono adagiati i tessuti. Questi preparati, oltre agli ormoni aggiunti, contengono sali inorganici, saccarosio, amminoacidi, vitamine, acqua distillata, agar, e composti antibatterici e antifungini per mantenere l'ambiente di crescita sterile, sicuro e fornire il corretto nutrimento alle cellule.

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 ± 2 °C.

Regolando le concentrazioni ormonali è possibile indurre il processo di “callogenesi” che consente alle cellule dei tessuti prelevati di dividersi rapidamente proliferando in tutte le direzioni e originando nel tempo agglomerati di cellule in continua divisione di vari colori o incolore che vengono denominati “calli”. (Efferth, 2019)

Questi calli sono costituiti da cellule che non sono più differenziate come quelle presenti nei tessuti di partenza ma risultano pluripotenti con la capacità, dunque, di generare tessuti vegetali diversi quando verranno esposte a concentrazioni di fitormoni in grado di indurre una nuova differenziazione delle cellule inducendo i calli *in vitro* a produrre “shoot” fogliari e primordi radicali. (Fehèr, 2019)

Il processo che permette alla cellula di perdere la propria funzione e differenziazione e di replicarsi assumendo quindi uno stato di pluripotenza è detto “de-differenziamento” ed è favorito dalla presenza di auxine e citochinine, che in particolari concentrazioni inducono le cellule a regredire dallo stato differenziato nei tessuti a cui appartengono verso uno stato di pluripotenza (Figura 3).



Figura 3. Calli ed espianti di una specie arbustiva. Possono essere utilizzati per la callogenesi quasi tutti i tessuti della pianta, come foglie, gemme, semi e steli. Foto a cura di Efferth, 2019.

I calli ottenuti possono essere mantenuti sia in piastre Petri in appositi terreni solidi, sia in terreni liquidi all'interno di beute mantenute in agitazione; inoltre, effettuando a tempo debito il rinnovo dei terreni e mantenendo l'ambiente di crescita sterile e sicuro, i calli possono essere conservati a tempo indeterminato. (Fehèr, 2019. Efferth, 2019)

Queste tecniche offrono grandi vantaggi come: la possibilità di coltivare cellule e ottenere organismi vegetali indipendentemente dai fattori ambientali esterni sia biotici che abiotici, le cellule *in vitro* sono molto più controllate rispetto a possibili attacchi di microrganismi o insetti; si possono coltivare e mantenere cellule di piante rare o in via di estinzione. Le linee cellulari in sospensione da specie di piante utilizzate per l'estrazione di sostanze utili possono produrre anche i metaboliti secondari specifici che generalmente sono secreti nel mezzo di coltura o si possono estrarre dalla massa cellulare stessa. Questa modalità di crescita può essere regolata in modo automatico utilizzando bioreattori robotizzati di notevole capienza per la produzione di metaboliti con costi ridotti e elevata produttività. (Efferth, 2019)

È importante ricordare che le vie e le modalità d'azione delle molecole che mediano e partecipano alla differenziazione e/o alla de-differenziazione delle cellule non sono ancora completamente comprese e possono essere molto diverse per ogni specie vegetale. Per ogni specie è necessario quindi uno studio e una sperimentazione preliminare per stabilire le concentrazioni ottimali sia dei nutrienti che degli ormoni per il corretto sviluppo e mantenimento delle linee cellulari.

2. SCOPO DEL LAVORO

Colture cellulari da *Betula utilis* (L.)

La produzione di organismi vegetali *in vitro* risulta un ottimo metodo di propagazione e mantenimento di specie vegetali, alternativo alle classiche tecniche utilizzate nelle colture convenzionali da seme, da innesto o da talea soprattutto nel caso di piante arboree che hanno un ciclo vitale generalmente lungo.

L'azienda Agricola Vivai Boesso ha riscontrato difficoltà nell'ottenere la propagazione attraverso tecniche colturali convenzionali e per questo motivo si è rivolta alla facility PGE (Plant Genome Editing) del Dipartimento di Biologia, commissionando la produzione di esemplari della specie *Betula utilis* da tessuti vegetali, gemme e foglie, forniti dall'azienda stessa. Nello svolgimento di parte di questo progetto ho potuto apprendere e applicare le tecniche di coltura che hanno portato all'ottenimento da gemme e foglie di linee di cellule pluripotenti formanti i calli, passaggio fondamentale per successivamente indurre organogenesi (formazione di germogli e radici dai calli) o embriogenesi somatica con formazione di nuovi individui clonali.

La velocità e il trend di crescita *in vitro* di una linea cellulare sono sicuramente tra i parametri più importanti da valutare per conoscere le fasi e le tempistiche di moltiplicazione e sviluppo di una popolazione di cellule. Una buona determinazione della crescita ci permette inoltre di capire quale sia il momento migliore per utilizzare le cellule proliferanti a seconda dei diversi esperimenti.

Non essendo la tempistica dello stage adatta ad ottenere una linea cellulare in sospensione di *Betula utilis*, è stata utilizzata una linea cellulare in sospensione da *Echinacea purpurea*, presente in laboratorio e stabilizzata da tempo in terreno liquido.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento e mantenimento di colture cellulari in *Betula utilis* (L.)

Le linee cellulari sono state ottenute utilizzando come materiale di partenza espianti da gemme e foglie di *Betula utilis*. Gli espianti hanno subito lo stesso trattamento ad eccezione di piccole variazioni dettate dalla diversità morfologica, dallo stadio di sviluppo e dalle caratteristiche del tessuto tegumentale.

Tutte le operazioni richiedenti sterilità, quali la preparazione dei terreni, i processi di sterilizzazione e pulizia del materiale vegetale e messa a dimora e trasferimento, sono stati condotti sotto cappa biologica a flusso laminare.

I rami di *Betula utilis* utilizzati per gli espianti stati forniti dall'azienda esterna: Azienda agricola vivai Boesso.

Trattamento gemme

Il materiale ha subito un trattamento preliminare che consisteva nell'asportare le perule più esterne delle gemme così da diminuire la contaminazione batterica e fungina, successivamente sono state lasciate in una soluzione di acqua distillata contenente PPM al 2% per tutta la notte, (Plant Preservative Mixture-Duchefa), un antibiotico e antifungino ad ampio spettro per il controllo della contaminazione batterica e fungina.

Il giorno seguente le gemme sono state sciacquate per tre volte con acqua distillata per poter eliminare i residui di PPM, successivamente il trattamento di pulizia e preparazione delle gemme si è svolto nel seguente modo:

- Il materiale è stato immerso in un beaker contenente una soluzione di etanolo al 70% e il tutto è stato posto su di un agitatore per 10 minuti.
- Le gemme prelevate dal beaker sono state lavate con acqua distillata tre volte per eliminare i residui di etanolo.

A questo punto metà delle gemme sono state mantenute intere, mentre l'altra metà è stata tagliata sia longitudinalmente sia in dischetti circolari.

È stata seguita poi un'ulteriore fase di sterilizzazione delle gemme:

- Sono state poste le gemme intere in un beaker contenente una soluzione di ipoclorito di sodio al 20% e sono state posizionate in un agitatore per 15 minuti.
- le gemme tagliate hanno subito lo stesso trattamento con ipoclorito di sodio in agitazione per 10 minuti.
- Il tutto poi è stato risciacquato tre volte per eliminare i residui di ipoclorito di sodio e successivamente si è proceduto con la messa a dimora delle gemme su piastre per la crescita di cellule vegetali.

Le piastre Petri per le gemme sono state preparate con un terreno MS (Murashige and Skoog, Duchefa) con 2% di saccarosio, 2 mg/L di 2,4D (AUXINA, acido 2,4-diclorofenossiacetico), 0,5 mg/L di 6BAP (CITOCHININA, 6-benzilaminopurina) e agar allo 0,8%, pH a 5,7 e il tutto denominato MS2B per praticità negli usi successivi.

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 ± 2 °C.

Trattamento foglie

Le foglie sono state trattate similmente alle gemme con eccezione dei tempi in soluzione di etanolo al 70%, nella quale sono rimaste per 8 minuti e in soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 10 o 5 minuti.

Le foglie, prima della sterilizzazione, sono state tutte tagliate in piccole porzioni per poi essere depositate in piastre Petri contenenti il mezzo di crescita MS2B.

I primi calli (agglomerati di cellule de-differenziate) si sono formati dopo circa 3 settimane. Una volta avviato il processo di callogenesi con una produzione di massa cellulare sufficiente si è reso necessario spostare i calli in nuove piastre Petri con mezzo di crescita rinnovato.

Sono stati usati due tipi di terreni:

il primo terreno di rinnovo è stato lo stesso MS2B nel quale sono stati posti metà dei tessuti provenienti da gemme e metà da foglie, il secondo terreno di rinnovo utilizzato denominato MS2 con differenti concentrazioni di ormoni; 0,5 mg/L di 2,4D, 0,25 mg/L di 6BAP.

TERRENO	AUXINA	CITOCININA
(1) MS2B	2 mg/L di 2,4D	0,5 mg/L di 6BAP
(2) MS2	0,5 mg/L di 2,4D	0,25 mg/L di 6BAP

(1) Terreno utilizzato per indurre de-differenziazione e successivo mantenimento delle cellule.

(2) Terreno utilizzato solamente per mantenere le cellule de-differenziate.

3.2 Allestimento di una curva di crescita da *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH

L'allestimento della curva di crescita delle cellule di *Echinacea purpurea* ha visto l'utilizzo di materiale cellulare già presente all'interno del laboratorio di biologia, ovvero cellule mantenute in coltura liquida in beute.

Per la realizzazione della curva sono state utilizzate le cellule coltivate in sospensione in un mezzo liquido denominato M2:

MS con 2% di saccarosio, 2 mg/L di 2,4D, 0,5 mg/L di 6BaP, pH a 5,7.

Per la preparazione del materiale da utilizzare per la curva di crescita è stata allestita una grande beuta da 1L, con il mezzo liquido sopra citato in modo da avere dopo 7 giorni materiale sufficiente per preparare 51 beute da 50 ml, potendo fare così 3 misure per 17 volte nell'arco di 20 giorni,

Ciascuna delle 51 beute conteneva la stessa quantità di materiale cellulare calcolato mediante la tecnica del PCV (Packed Cell Volume), ciò ha consentito di preparare tutte le piccole beute con 0.4 cc di volume cellulare impaccato.

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 lo stesso quantità di materiale cellulare di partenza.

È stato utilizzato un PCV di 0,4 cc perché derivante dalle colture in liquido già presenti in laboratorio che mostravano come un volume inferiore avrebbe causato un importante rallentamento nella fase di partenza della curva di crescita.

Preparate tutte le beute e conservate in agitazione all'interno della camera di crescita citata in precedenza si è potuto dare il via al monitoraggio della crescita.

Per ogni tempo, stabilito a priori, sono stati effettuati 3 campionamenti, uno per beuta quindi ogni prelievo era dato da 3 campioni denominati con un numero e una lettera dell'alfabeto (ad esempio: 1A, 2A, 3A)

Ogni campionamento prevedeva le seguenti fasi:

- Prelievo tramite una pipetta tarata da 5ml di sospensione cellulare da ognuna delle 3 beute da 50 ml a disposizione ad ogni giornata di misurazione.
- L'aliquota prelevata veniva versata in un dispositivo (Figura 4) contenente un filtro circolare in plastica coperto da un disco di carta da filtro precedentemente pesato e fungente da tara.
- Filtrazione tramite una pompa a vuoto.



Figura 4. Sistema di filtrazione a vuoto.

La sospensione cellulare veniva versata all'interno dell'imbuto nel quale la carta filtrante tratteneva le cellule, mentre la soluzione scorreva attraverso il filtro, richiamata dal vuoto che veniva generato nella beuta adiacente grazie al flusso d'acqua del rubinetto.

Alla fine della filtrazione ogni dischetto di carta da filtro avente le cellule concentrate su di esso è stato pesato utilizzando una bilancia analitica e se ne è registrato il "peso fresco".

Successivamente i dischetti sono stati posti ad essiccare in stufa per 4 h a 60 °C, ogni dischetto poi è stato nuovamente pesato dando così il "peso secco", una volta sottratto il peso del dischetto vuoto precedentemente registrato. Tutte le beute a disposizione sono state processate in questo modo così da ottenere un numero statisticamente significativo di pesate per elaborare una curva di crescita attendibile.

4. RISULTATI E CONCLUSIONI

Di seguito sono riportati i dati e i risultati riguardanti la de-differenziazione che è stata indotta su tessuti vegetali da *Betula utilis* (L.) e la curva di crescita di *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH.

4.1 Induzione alla callogenesi in tessuti da *Betula utilis* (L.)

Il processo di de-differenziamento dei tessuti fogliari e dalle gemme che ha portato alla formazione dei calli è stato indotto in piastre Petri contenenti il terreno MS2B (MS con 2% di saccarosio, 0,8% di agar, 2 mg/L di 2,4D, 0,5 mg/L di 6BAP e pH a 5,7), come descritto nei materiali e metodi (Figura 5).

I calli sono stati ottenuti in circa tre settimane di coltivazione dalle gemme e in circa dieci giorni dalle foglie.

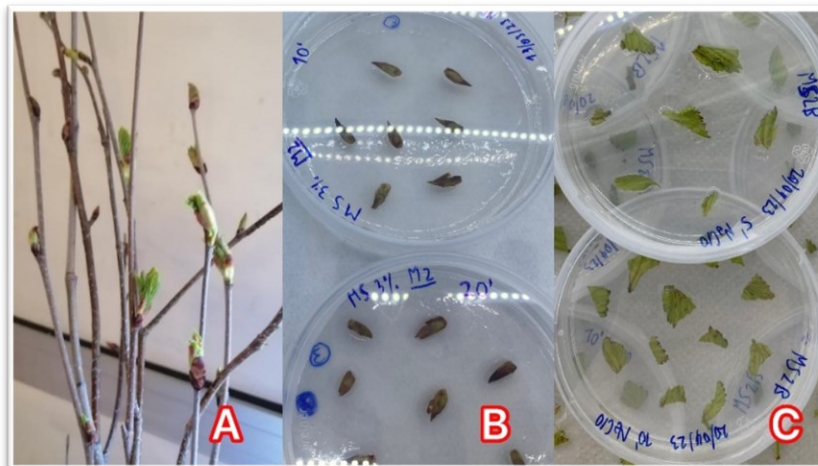


Figura 5. (A) Materiale vegetale di partenza, l'azienda ha fornito piccole porzioni di rami aventi gemme e successivamente piccole foglie. (B) Gemme intere all'interno delle piastre Petri per induzione dei calli. (C) Porzioni di foglie all'interno delle piastre Petri per induzione dei calli.

Esperimenti su gemme

Il processo di ottenimento del callo a partire da gemme si è articolato in due esperimenti paralleli:

- Nel primo esperimento sono state impiegate 12 piastre Petri contenenti 10 gemme intere e 45 frammenti di gemme il tutto distribuito equamente.
- Nel secondo esperimento sono state utilizzate 14 piastre Petri su cui sono stati distribuiti 58 frammenti di gemme, non sono state impiegate gemme intere.

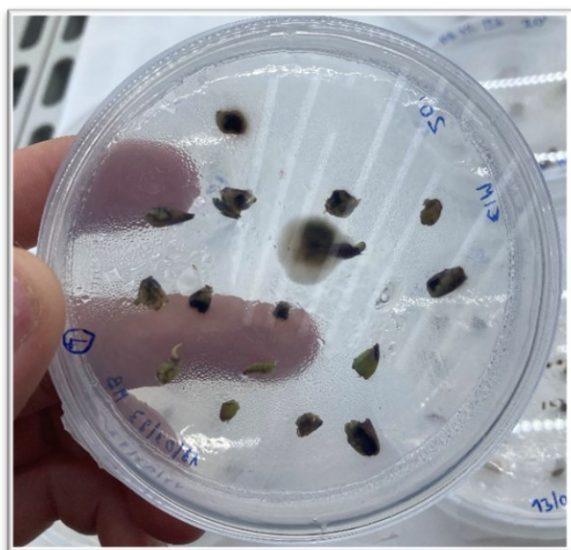


Figura 6. Muffe in crescita su diverse porzioni di gemme in vitro.

Trascorse circa tre settimane alcune gemme e frammenti mostravano l'inizio del processo di de-differenziazione mentre altre risultavano come bloccate o morenti, infette da muffe o batteri (Figura 6).

Il conteggio effettuato ci ha permesso di trarre una conclusione riguardo la capacità delle condizioni di crescita applicate e dei metodi di sterilizzazione impiegati per indurre la de-differenziazione del materiale vegetale utilizzato (Figura 7).

TURNO	MATERIALE	CALLI OTTENUTI	PERCENTUALE DI SUCCESSO
PRIMO	10 gemme intere	1	10 %
	45 frammenti di gemme	6	13,3 %
SECONDO	58 frammenti di gemme	16	27,6 %

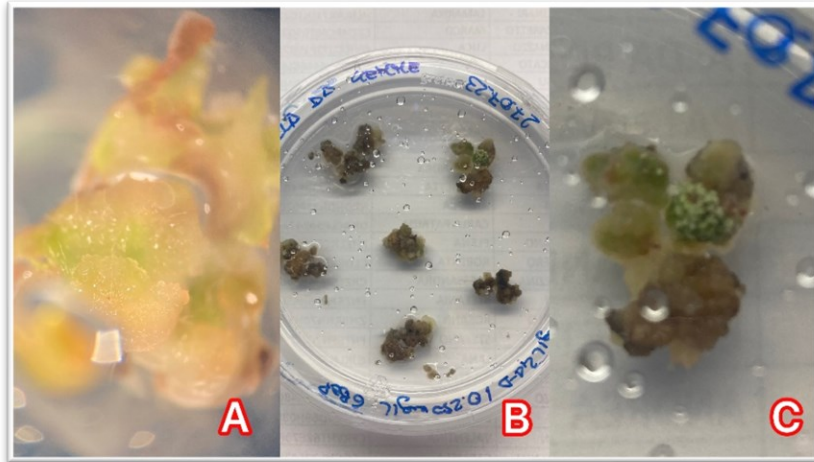


Figura 7. (A) Processo di de-differenziazione in atto su frammento di gemma, si notano piccoli agglomerati di cellule biancastre che formano il callo. (B) e (C) Calli mantenuti in vitro dopo circa 4 mesi dalla loro insorgenza.

Esperimenti su foglie

L'induzione di callogenesi a partire da tessuti fogliari si è svolta utilizzando 10 piastre Petri sulle quali sono state posizionate 7-8 frammenti di foglie per ogni piastra (Figura 8).

L'insorgenza di de-differenziazione da foglie ha richiesto molto meno tempo rispetto alle gemme, essa infatti è avvenuta dopo poco più di una settimana ed è avvenuta per quasi la totalità dei frammenti impiegati.

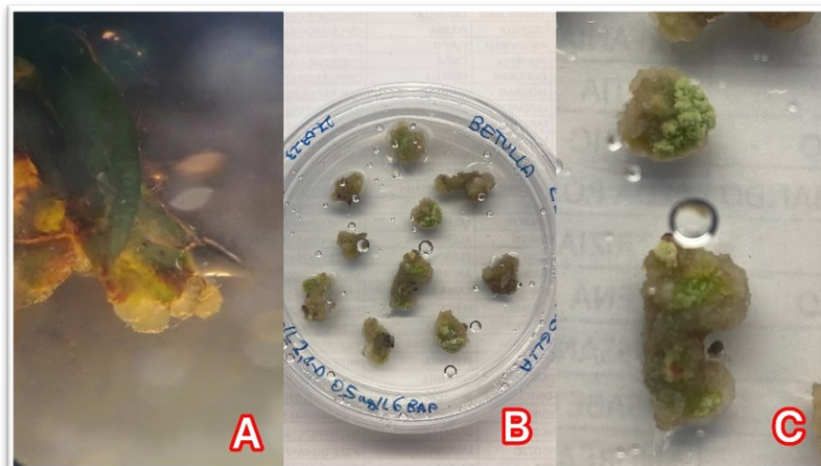


Figura 8, (A) Presenza su frammento di foglie di cellule biancastre de-differenziate che andranno a formare il callo. (B) e (C) Calli mantenuti in vitro dopo circa 3 mesi dalla loro insorgenza.

I risultati di questi esperimenti mostrano come il tessuto fogliare sia più adatto a questo processo nelle condizioni adoperate. Le foglie giovani rappresentano un tessuto di partenza più plastico e molto meno contaminato, diversamente da quanto visto per le gemme, circondate da perule protettive che si presentavano coriacee, molto tomentose e facilmente contaminate da muffe e batteri, costituendo un materiale di partenza più difficile da sterilizzare, manipolare ed indurre a callogenesi. Questo è in accordo con quanto evidenziato da altri autori su altre specie di *Betula*. (Kurtèn et al., 1990. Yang et al., 2021)

Sarà necessario migliorare la tecnica di callogenesi riguardo questa specie ed ottenere un maggior numero di calli ma già questi esperimenti preliminari sono incoraggianti.

I calli ottenuti da queste colture cellulari e le procedure utilizzate possono essere considerati come punto di partenza per ottenere un'adeguata quantità di materiale vegetale sul quale lavorare per indurre organogenesi e ottenere dunque quanto richiesto dall'Azienda agricola vivai Boesso.

Quando i calli saranno in numero sufficiente con cellule in attiva proliferazione, la sperimentazione proseguirà con la messa a punto delle condizioni migliori per indurre organogenesi, stimolando la produzione di shoot fogliari e primordi radicali attraverso la somministrazione di determinate concentrazioni di fitormoni. Alcuni protocolli disponibili in letteratura utilizzano specifiche concentrazioni di auxina e citochinina (Kurtèn et al., 1990. Yang et al., 2021), ma non è quasi mai automatico che le stesse concentrazioni siano adatte per l'organogenesi in *Betula utilis*; sarà quindi necessario un adeguato periodo di prove per saggiare quali siano i migliori rapporti auxina/citochinina capaci di generare rispettivamente radici e germogli.

4.2 Curva di crescita cellulare da *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH

L'allestimento di una curva di crescita cellulare necessita di una grande quantità di materiale cellulare. Non è stato possibile impiegare cellule di *Betula utilis*. per la quale si possedevano solamente i calli appena generati e non una linea cellulare in sospensione stabilizzata che in genere si ottiene in 4-6 mesi dai calli stessi. Per imparare ad allestire una curva si è optato per l'utilizzo di una linea cellulare in sospensione di *Echinacea purpurea*, così da riuscire facilmente a monitorare e valutare la crescita. Produrre una curva di crescita risulta fondamentale per conoscere le fasi e le tempistiche di crescita e sviluppo di una popolazione di cellule, analizzando i dati si è potuto ricostruire la curva riportante:

- Fase di latenza, caratterizzata da un periodo di adattamento delle cellule all'ambiente e una crescita lenta.
- Fase di sviluppo esponenziale che ha visto le cellule nella loro massima attività mitotica. Questa fase risulta il periodo ottimale per effettuare esperimenti, lavorare con le cellule in fase di crescita esponenziale significa sottoporle alle varie attività nell'esatto momento in cui possiedono la loro miglior vitalità riuscendo a reagire al meglio ai vari stimoli e stress a cui vengono sottoposte.
- Fase di plateau in cui la crescita della popolazione risultava bilanciata dalla morte di altre cellule.
- Superata la capacità portante dell'ambiente la popolazione di cellule avrebbe raggiunto la fase di morte, caratterizzata da una costanza del peso dato per la maggior parte da cellule morte, nel caso riportato il monitoraggio è cessato durante la fase di plateau.

I dati raccolti sono stati utilizzati per elaborare due grafici riportanti la tendenza di crescita delle cellule, una curva derivante dal peso fresco su 5ml di sospensione cellulare, un'altra curva dal peso secco anch'esso su 5 ml di sospensione cellulare (Figura 9).

La costruzione dei grafici si è basata sulle medie dei tre pesi per ogni giornata di campionamento e loro conseguente deviazione standard.

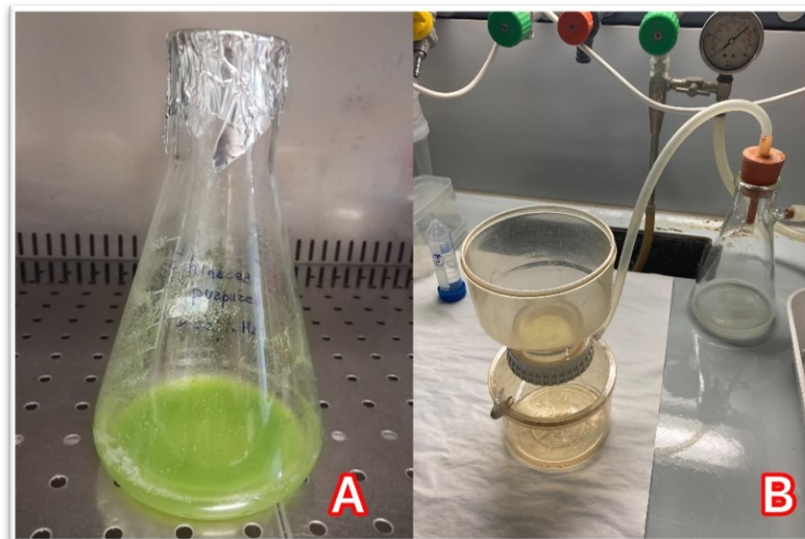


Figura 9. (A) Beuta madre da 1 L dalla quale è stato prelevato l'inoculo per le 51 beute. (B) Sistema di filtrazione a vuoto dove veniva inserito il dischetto filtrante sul quale si depositavano i 5ml di sospensione cellulare.

- La Tabella 1 ed il Grafico 1, mostrano i dati riferiti al **peso fresco** delle cellule ovvero solo dopo aver filtrato con la pompa a vuoto.

Il peso è indicato come **mg di cellule su 5 ml** di soluzione al netto della tara.

giorno	1	2	3	media	dev st.	giorno	1	2	3	media	dev st.
0	273,7	261,6	269,5	268,3	6,1	11	674,0	709,1	742,3	708,5	34,2
1	283,6	255,4	239,7	259,6	22,2	12	735,0	778,7	665,1	726,3	57,3
2	210,0	183,7	228,2	207,3	22,4	13	823,9	881,2	717,7	807,6	83,0
3	248,1	247,8	298,1	264,7	29,0	14	724,6	632,0	656,2	670,9	48,0
4	332,8	376,2	333,6	347,5	24,8	15					
5	516,9	409,4	359,0	428,4	80,7	16					
6	441,5	450,2	489,2	460,3	25,4	17	792,0	763,6	724,9	760,2	33,7
7	535,6	589,6	475,0	533,4	57,3	18	795,6	720,5	734,4	750,2	40,0
8						19	778,4	741,4	745,2	755,0	20,4
9						20	745,5	851,6	756,9	784,7	58,2
10	876,3	754,3	732,9	787,8	77,4						

Tabella 1. Pesi e deviazioni standard delle cellule in mg su 5 ml di soluzione, dopo sola filtrazione a vuoto.

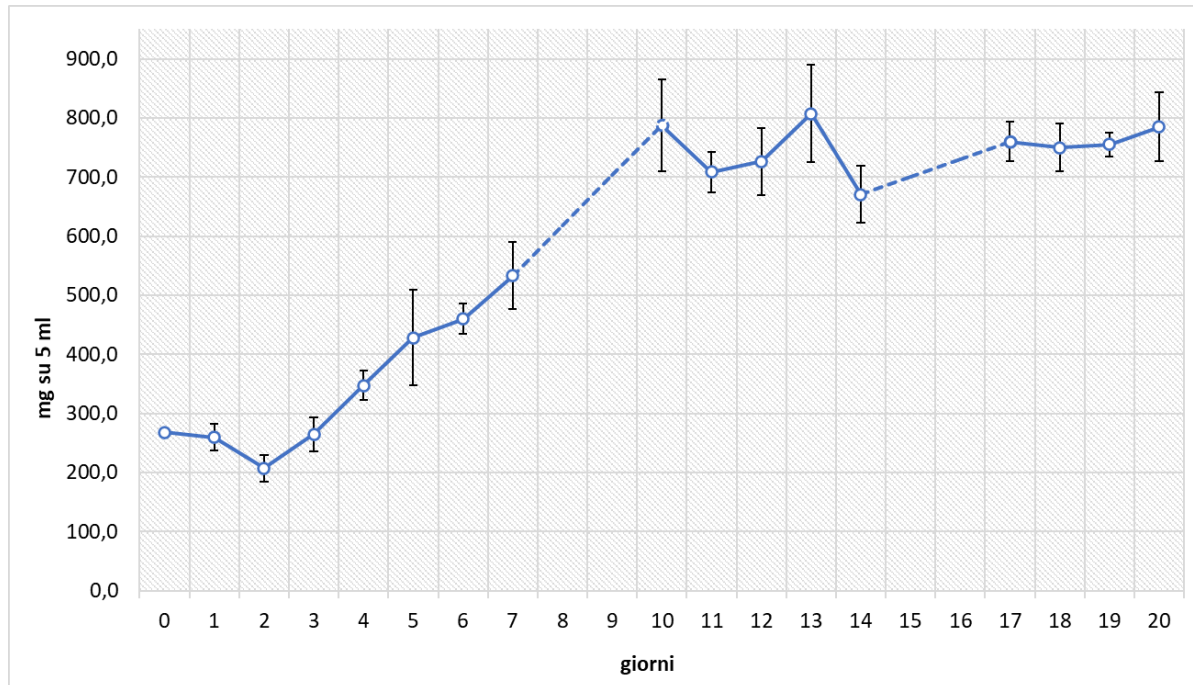


Grafico 1. Curva di crescita: andamento registrato dal peso fresco, le rette tratteggiate servono a dare continuità durante i giorni in cui non si è potuto campionare.

- La Tabella 2 ed il Grafico 2, mostrano i dati riferiti al **peso secco** delle cellule ovvero dopo aver filtrato con la pompa a vuoto e dopo averle lasciate ad essiccare per 4 h a 60 °C. Il peso è indicato come **mg di cellule su 5 ml** di soluzione al netto della tara.

giorno	1	2	3	media	dev st.	giorno	1	2	3	media	dev st.
0	1,4	1,1	2	1,5	0,5	11	50,1	44,6	43,9	46,2	3,4
1	3,9	1,7	2,2	2,6	1,2	12	42,7	51,6	48,1	47,5	4,5
2	0,6	0,4	3,9	1,6	2,0	13	85,6	105,2	44,2	78,3	31,1
3	5,4	7,6	10,9	8,0	2,8	14	40,9	31,2	40,1	37,4	5,4
4	14,8	16,3	13,1	14,7	1,6	15					
5	17,9	14,2	12,7	14,9	2,7	16					
6	21,8	27,8	24,3	24,6	3,0	17	38,8	43,4	39,6	40,6	2,5
7	26,2	31,3	33,4	30,3	3,7	18	39,6	34,9	40,9	38,5	3,2
8						19	44,2	42,8	38,7	41,9	2,9
9						20	35,1	40,0	36,4	37,2	2,5
10	54,2	51,3	48,9	51,5	2,7						

Tabella 2. Pesi e deviazioni standard delle cellule in mg su 5 ml di soluzione, dopo filtrazione a vuoto ed essiccazione in stufa.

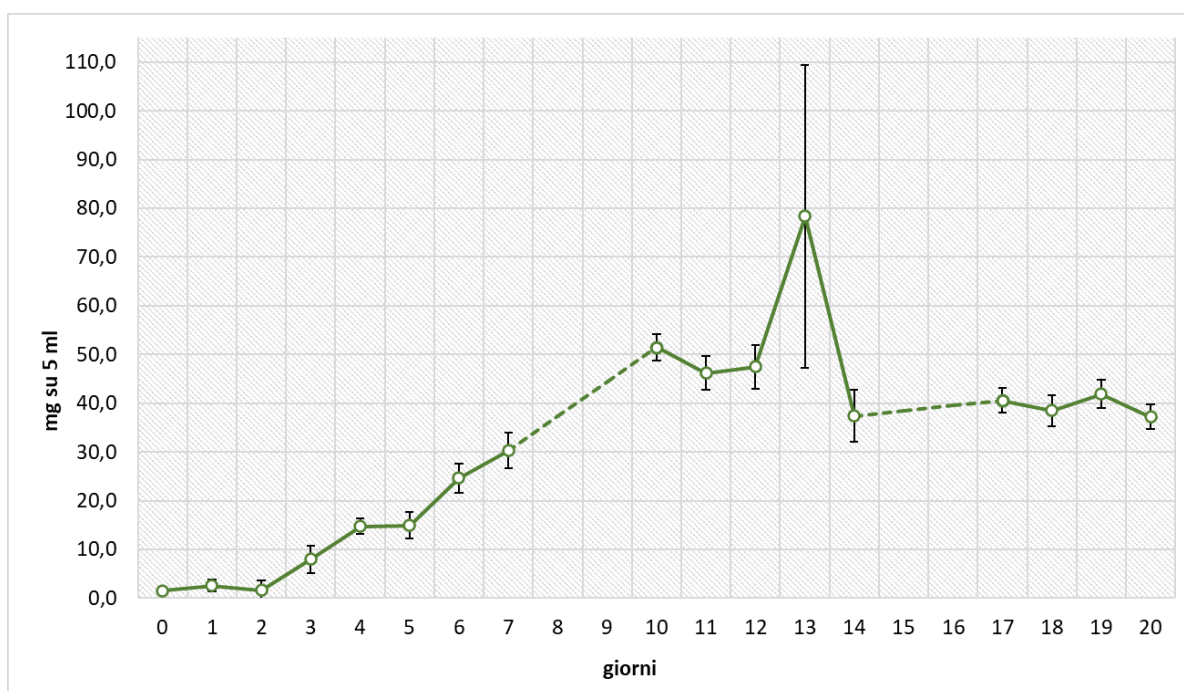


Grafico 2. Curva di crescita: andamento registrato dal peso secco, le rette tratteggiate servono a dare continuità durante i giorni in cui non si è potuto campionare.

Entrambi i grafici mostrano la stessa tendenza nonostante alcuni inevitabili errori sistematici durante i tre campionamenti giornalieri, è possibile comunque riconoscere le varie fasi di crescita cellulare permettendoci di individuare:

- Fino al giorno 3, la fase di latenza ove le cellule si sono adattate all'ambiente di crescita ritardando in primis la propria replicazione.
- Successivamente si riconosce la fase di crescita cellulare esponenziale che va ad esaurirsi intorno al giorno 10, questo lasso di tempo in cui le cellule espletano il loro massimo sviluppo e la loro massima attività, risulta come periodo ottimale per sottoporre le cellule a qualunque attività sperimentale.
- Segue a questa fase si nota quella di plateau, in cui l'attività cellulare risulta costante ed equilibrata con la morte cellulare ed il monitoraggio ha rilevato minime variazioni.

I dati raccolti confermano dunque la buona crescita cellulare, registrando un incremento giornaliero di circa il 30% come media tra i due grafici lungo la fase di crescita esponenziale avvenuta fra il giorno tre e il giorno dieci, arrivando ad una fase di plateau in cui il materiale cellulare riferito in peso secco è risultato essere circa 34 volte maggiore rispetto al peso secco registrato il giorno zero.

Questi risultati sono di fondamentale importanza per garantire rigore e precisione negli esperimenti futuri riguardanti la linea cellulare ed il suo mantenimento.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abbate, G.; Acosta, A.; Baldan, B.; Basile, A.; Caporali, E.; Cozzolino, S.; Felicini, G. P.; Forni, C.; Giovi, E.; Iberite, M.; Maggi, O.; Mazzuca, S.; Navazio, L.; Pasqua, G.; Perrone, C.; Selvi, F.; Signorini, M. A.; Spada, A.; Trainotti, L.; Valletta, A. *Botanica generale e diversità vegetale*. Piccin, **2015**.
- Burlou-Nagy, C.; Bănică, F.; Jurca, T.; Vicaș, L. G.; Marian, E.; Muresan, M. E.; Bácskay, I.; Kiss, R.; Fehér, P.; Pallag, A. *Echinacea Purpurea (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties. A Review. Plants* **2022**, *1*, 1244.
- Choffe K.L., Victor J.M., Muruch S.J., Saxena P.K. *In vitro regeneration of Echinacea purpurea L.: direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture*. In Vitro Cell Dev Biol Plant **2000** *36*, 30-36.
- Efferth, T. *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures*. Engineering **2019**, 50–59.
- Fehér, A. *Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?* Front. Plant Sci. **2019**, *10*, 536.
- Ghimire, N.; Kunwar, R. M.; Hussain, W.; Abbasi, A. M.; Bussmann, R. W.; Paniagua-Zambrana, *Betula utilis D. Don Betulaceae*. In Ethnobotany of the Himalayas Springer International Publishing: Cham, **2021**; pp 369–379.
- Kurtén, U; Nuutila, A. M.; Kauppinnen V.; Rousi M. *Somatic embryogenesis in cell cultures of birch (Betula pendula Roth.)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **1990** 101-105
- Monika Kunwar; Shalini Varshney; Yogita Munjal. *Conceptual and Literary Analysis on Bhurjah (Betula utilis D. Don)*. Int J Ayu Pharm Res **2022**, 24–31.
- Yang, J.; Yang, D.; Lü, W.; Zhang, X.; Ma, M.; Liu, G.; Jiang, J.; Li, C. *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Betula platyphalla*. J. For. Res. **2021**, *32*, 937–944.