

COLTURA DI TESSUTI *IN VITRO* E RIGENERAZIONE DELLA PIANTA

Caratteristica fondamentale delle cellule vegetali

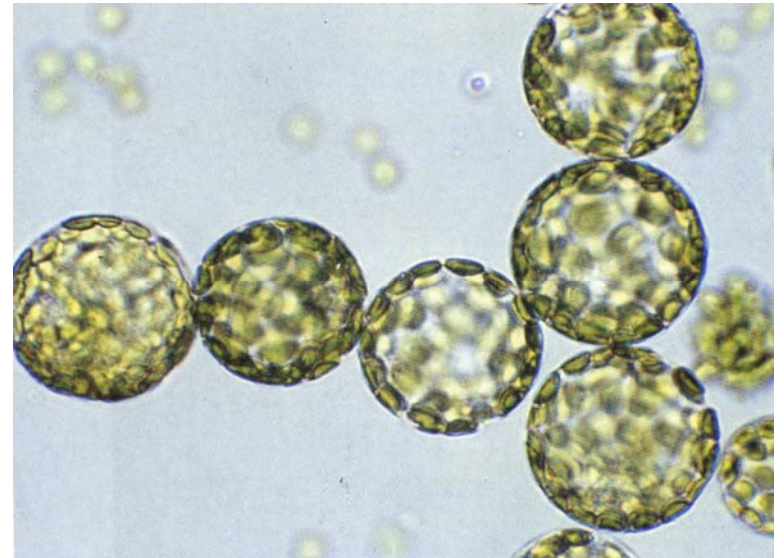
TOTIPOTENZA

È possibile rigenerare un'intera
pianta da singole cellule
differenziate

Tranne quelle che hanno perso il nucleo
(tracheidi, elementi del cribro)

Cellule in coltura private della parete
PROTOPLASTI possono propagarsi
indefinitamente

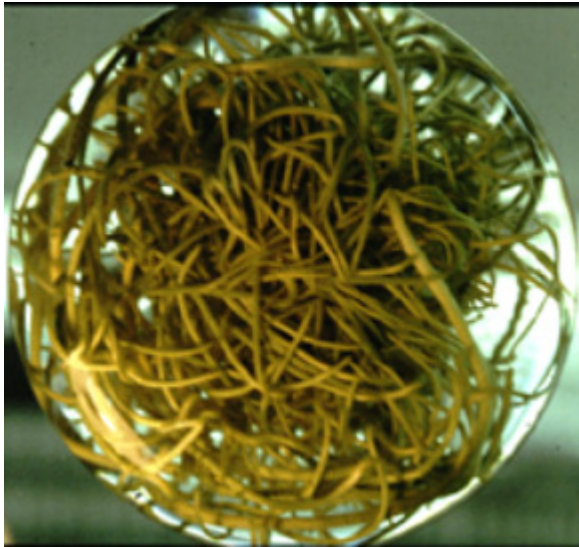
protoplasti di cellule del
mesofillo mantenute in
coltura in presenza di
mannitolo per evitare la lisi



In coltura possono essere mantenute anche
strutture organizzate

COLTURE DI TESSUTI

- meristemi
- germogli
- radici
- nodi
- embrioni
- antere



radici

germoglio



antere



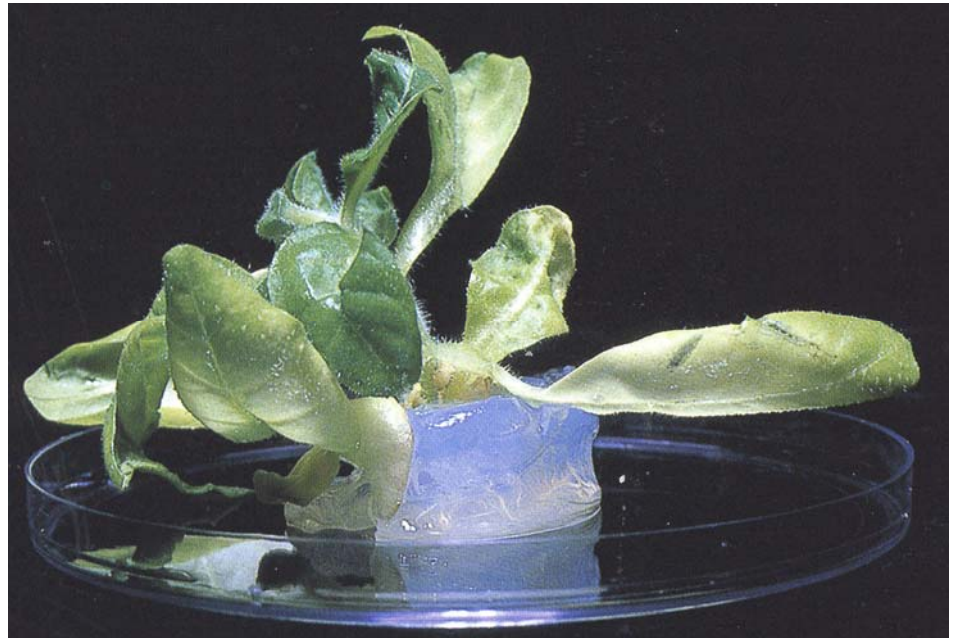
Dai tessuti in coltura è possibile rigenerare l'intera pianta

MORFOGENESI

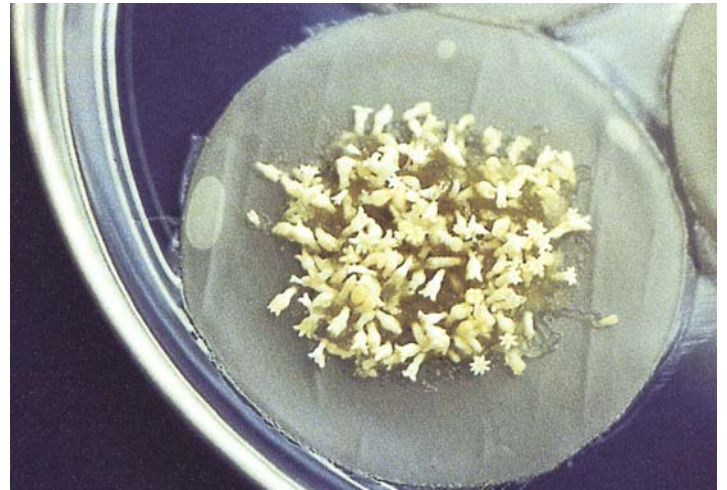
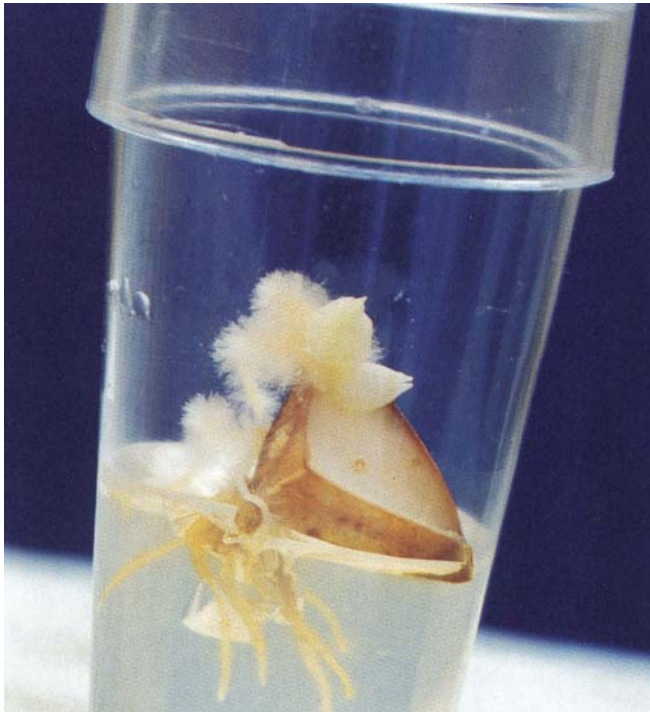


caulogenesi →

rizogenesi



embriogenesi somatica



MORFOGENESI DIRETTA

da cellule differenziate di tessuto
senza proliferazione di tessuto
indifferenziato

MORFOGENESI INDIRETTA

da cellule de-differenziate di
callo (proliferazione di tessuto
indifferenziato)

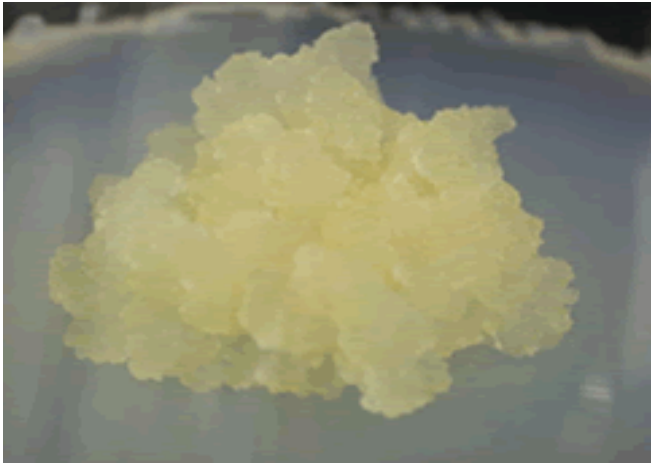
CALLO



**Tessuto vegetale
che si forma
intorno ad una
ferita**

CALLO

massa di tessuto amorfo formato da cellule che si moltiplicano in maniera disorganizzata



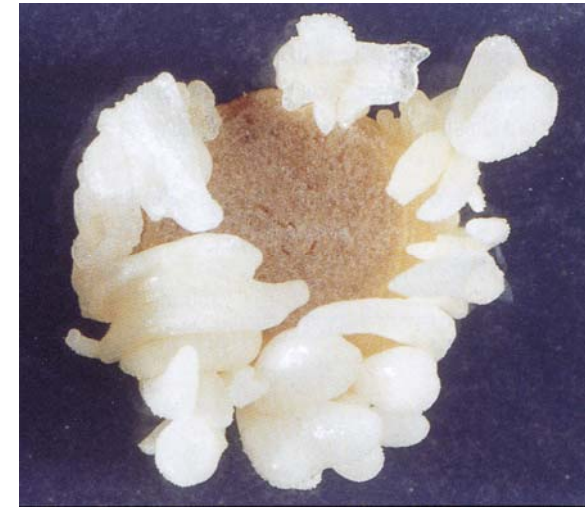
si può ottenere da espianti di tessuto o cellule in coltura

sotto lo stimolo di regolatori di crescita endogeni o presenti nel mezzo, le cellule di un espianto di tessuto vanno incontro a dedifferenziamento e formano un nuovo tessuto di cellule non specializzate



← **embriogenesi
somatica diretta** →

sviluppo di embrioni
somatici su espianto di
tessuto

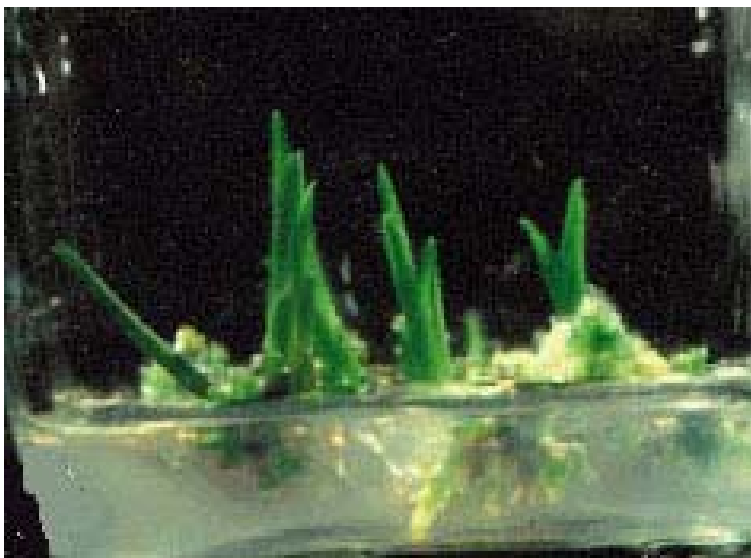


**embriogenesi
somatica indiretta**



sviluppo di embrioni
somatici su callo





sviluppo di germogli su callo



morfogenesi indiretta →





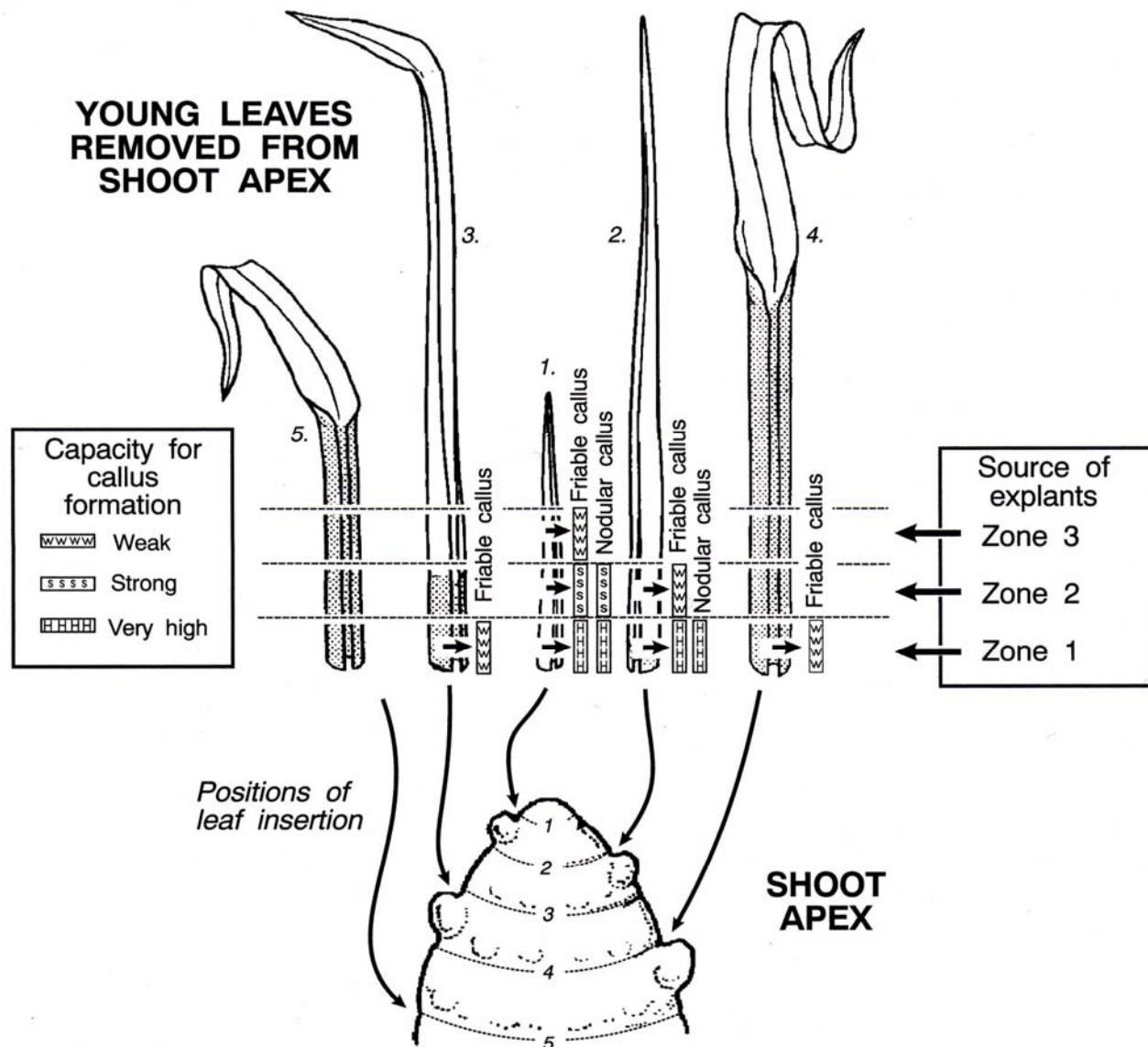
← **callo nodulare**
(embriogenico)

callo friabile →
(non-morfogenico)



la capacità di formare un callo è diversa da specie a specie e da tessuto a tessuto (particolarmente nelle monocotiledoni)

canna da
zucchero



la morfogenesi è stata osservata in numerose specie, ma non può essere indotta universalmente, anche all'interno di una stessa specie alcune varietà sono recalcitranti

cellule che hanno la capacità di dar luogo a morfogenesi sono dette COMPETENTI

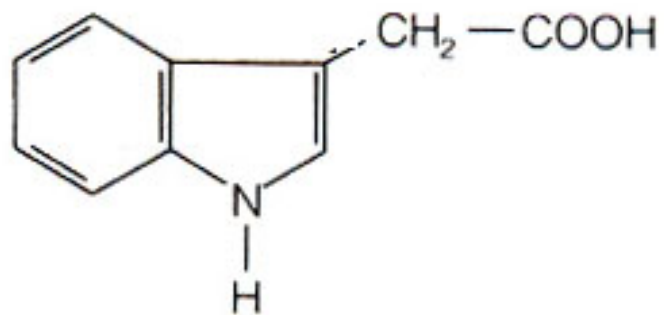
la competenza è generalmente verso una specifica via di sviluppo: una cellula competente per lo sviluppo dell'embrione somatico non lo è anche per lo sviluppo del germoglio

Le cellule possono essere indotte a diventare competenti aggiungendo nel mezzo di coltura opportuni regolatori di crescita

COME SI RIGENERA UNA PIANTA?

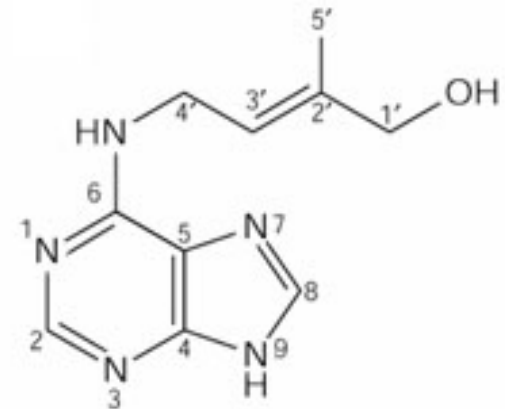
ORMONI

AUXINA



Acido 3-indolacetico

CITOCHININE

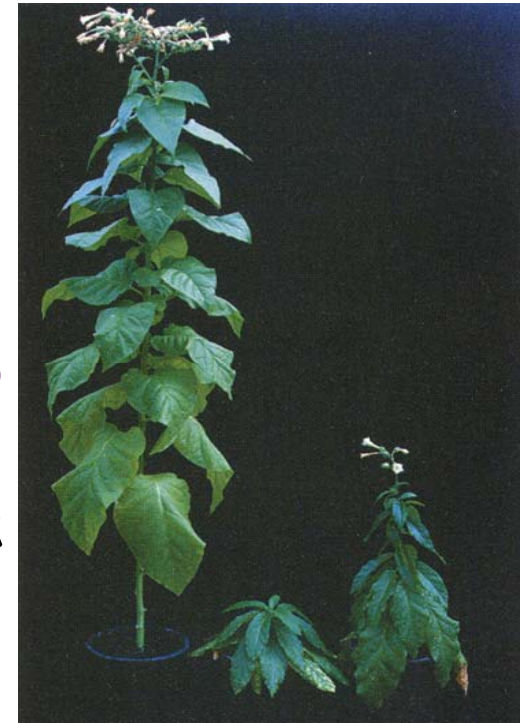


Zeatin

auxina e citochinine intervengono nella regolazione della divisione cellulare

Sovraespressione del gene che codifica per la citochinina ossidasi (ridotti livelli di citochinine) in tabacco

ritardo nello sviluppo del germoglio dovuto alla riduzione della velocità di proliferazione cellulare nel meristema apicale

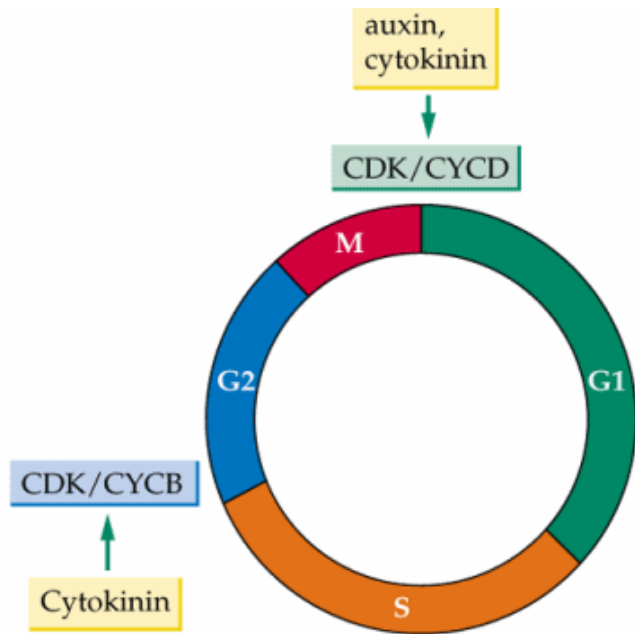


WT transgeniche

Sovraespressione del gene che codifica per la citochinina ossidasi (ridotti livelli di citochinine) in tabacco

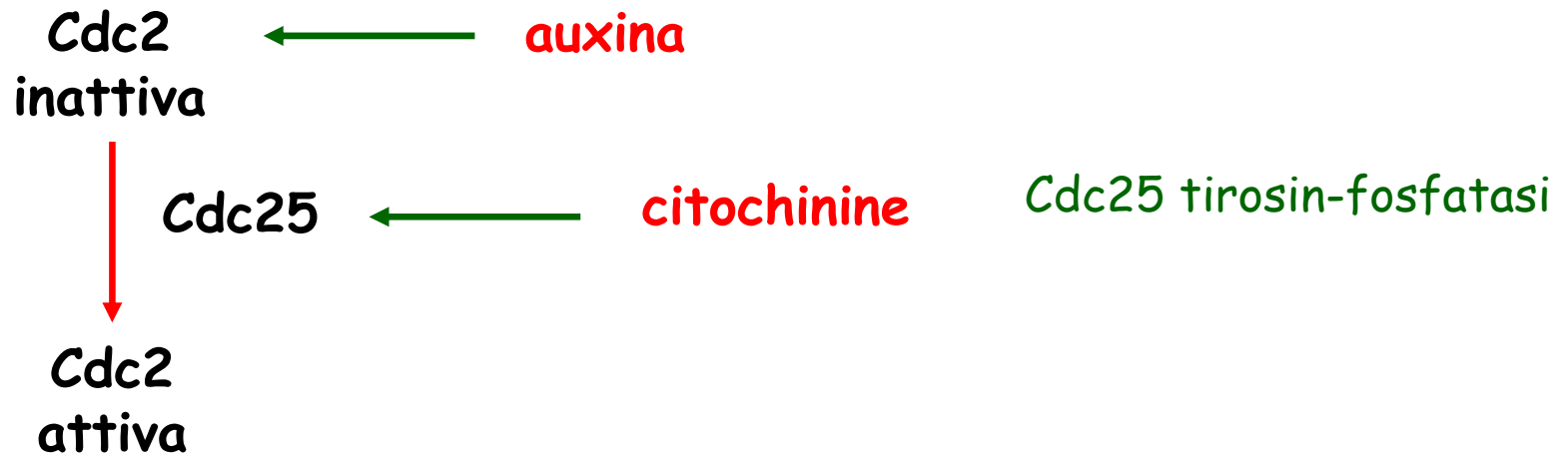


aumento della velocità di
crescita della radice
aumento della
proliferazione nel
meristema radicale



la carenza di auxina provoca l'arresto in fase G1
la carenza di citochinine provoca l'arresto in fase G2

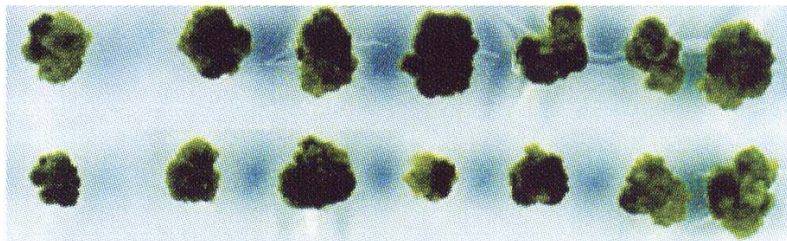
auxina e citochinine partecipano alla regolazione del ciclo cellulare controllando l'attività delle **CHINASI CICLINA-DIPENDENTI**



Recentemente è stato dimostrato che le citochinine incrementano l'espressione del gene *CYCD3* (negli animali le cicline di tipo D regolano il passaggio in fase G1)

In *Arabidopsis* *CYCD3* è espresso in tessuti proliferativi come i meristemi dei germogli

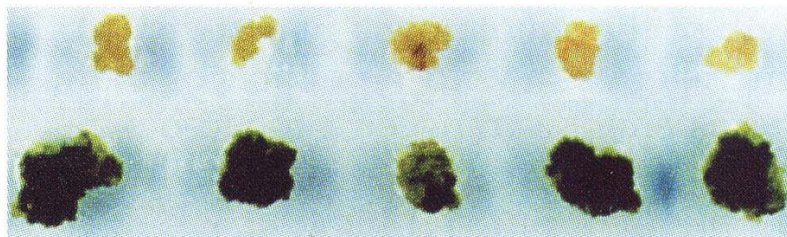
Auxin + cytokinin



wild type

CYCD3
overexpressor

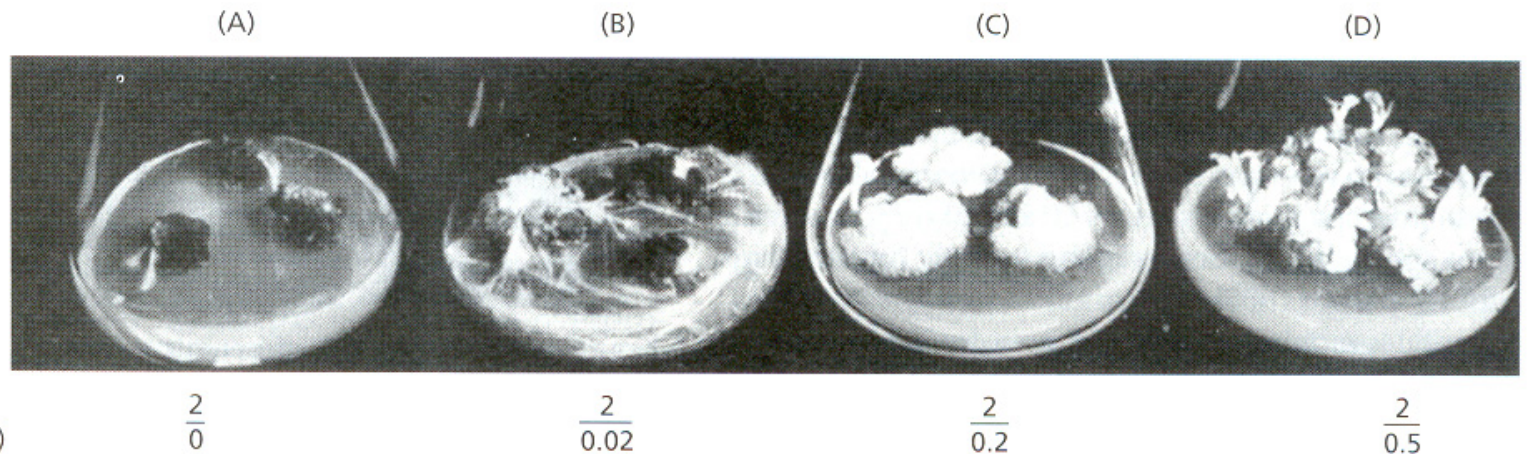
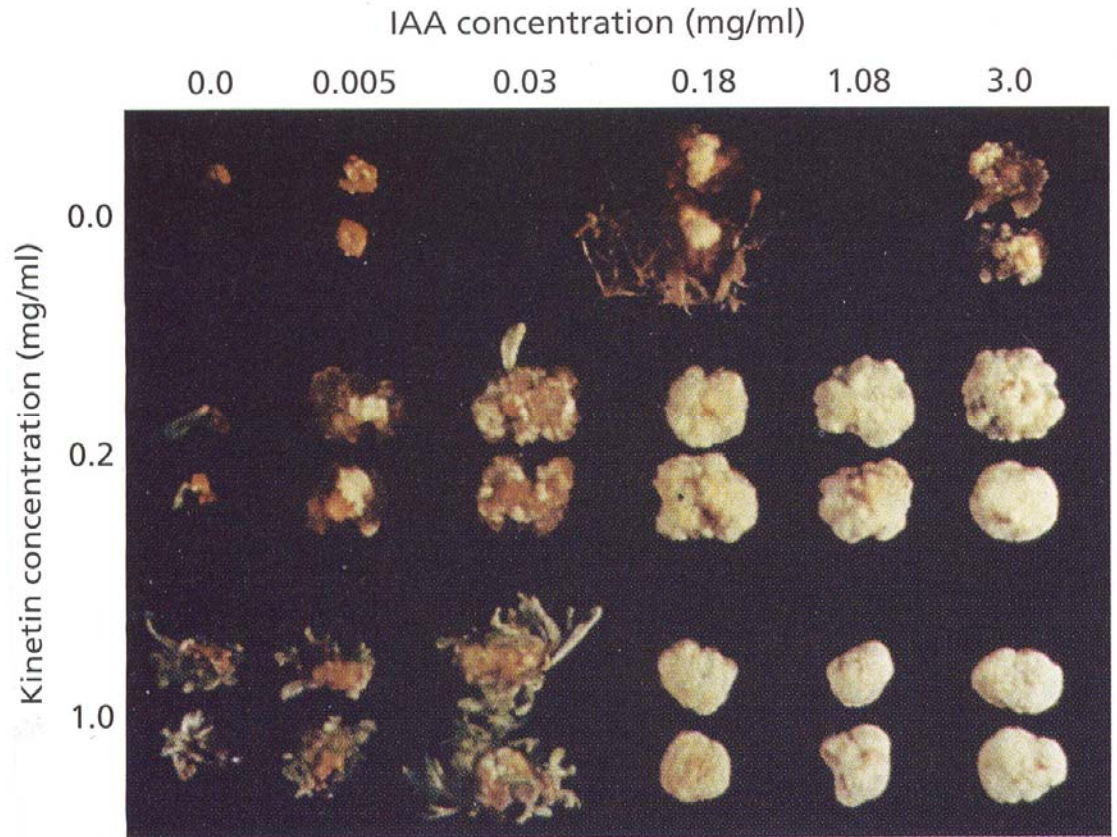
Auxin

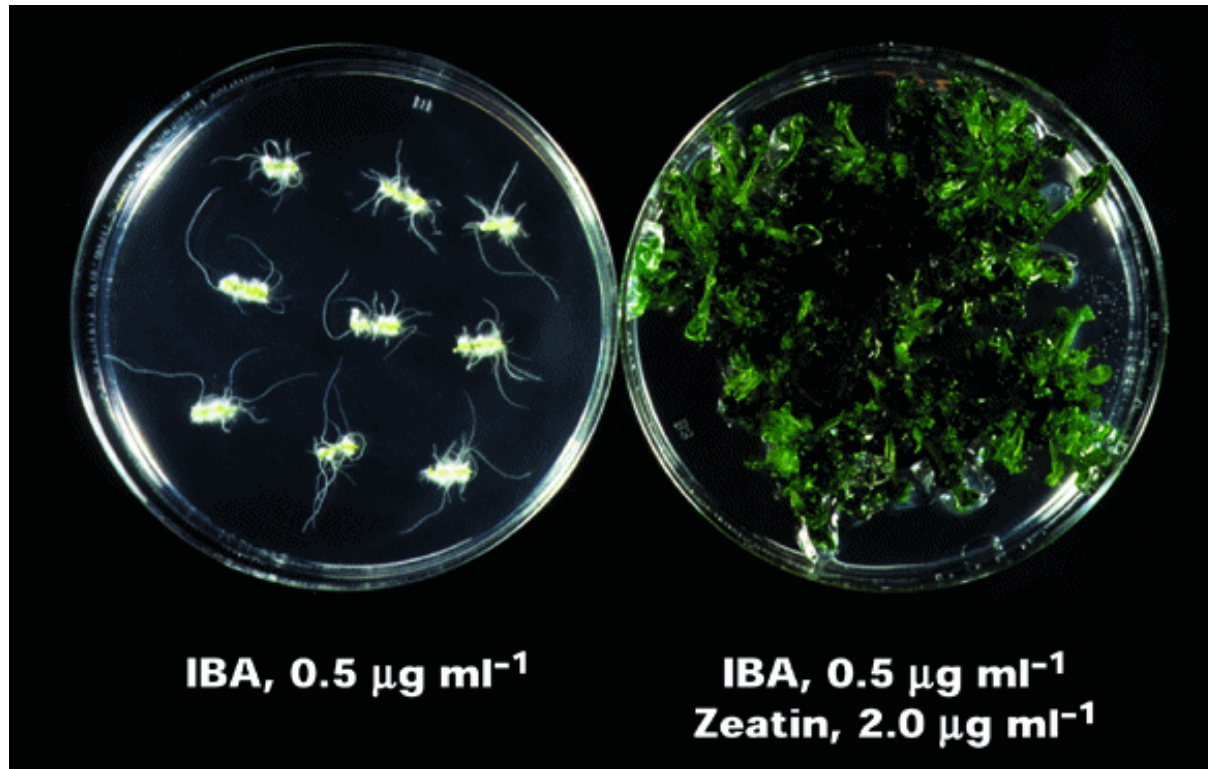


wild type

CYCD3
overexpressor

**Skoog e Miller
1957: alti livelli
di citochinine e
bassi livelli di
auxina inducevano
la formazione di
germogli in calli
di tabacco in
coltura**

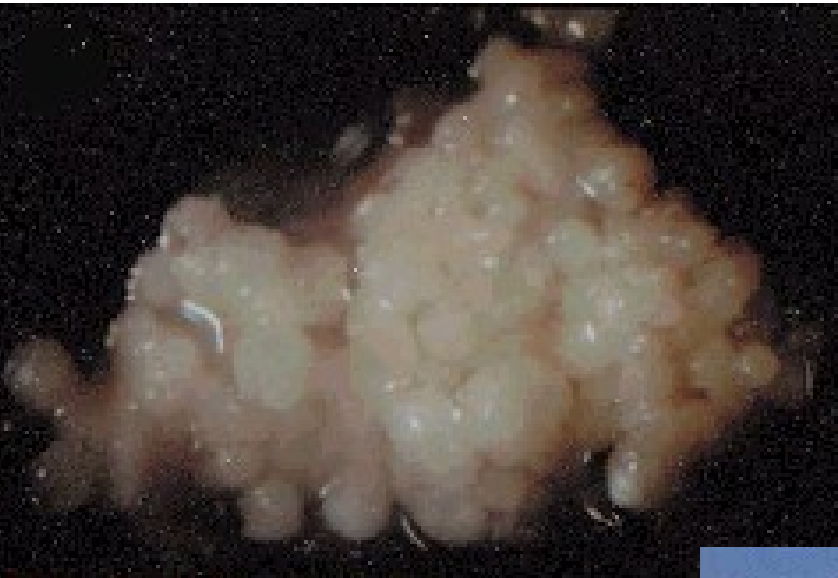




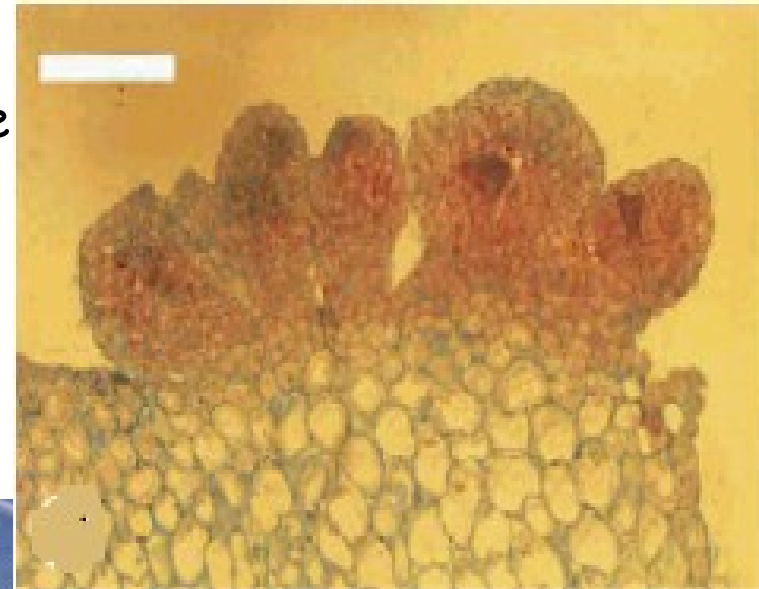
auxina

auxina + citochinina

Callo



+ citochinine



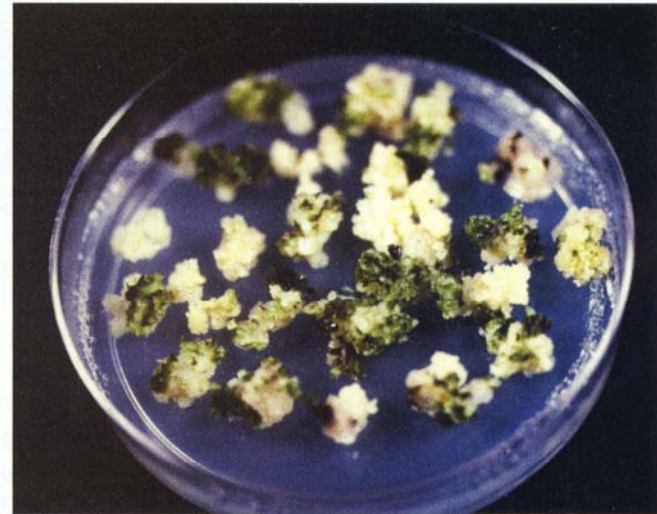
questo processo è
abbastanza semplice
per le dicotiledoni



sviluppo del germoglio



(a)



(b)



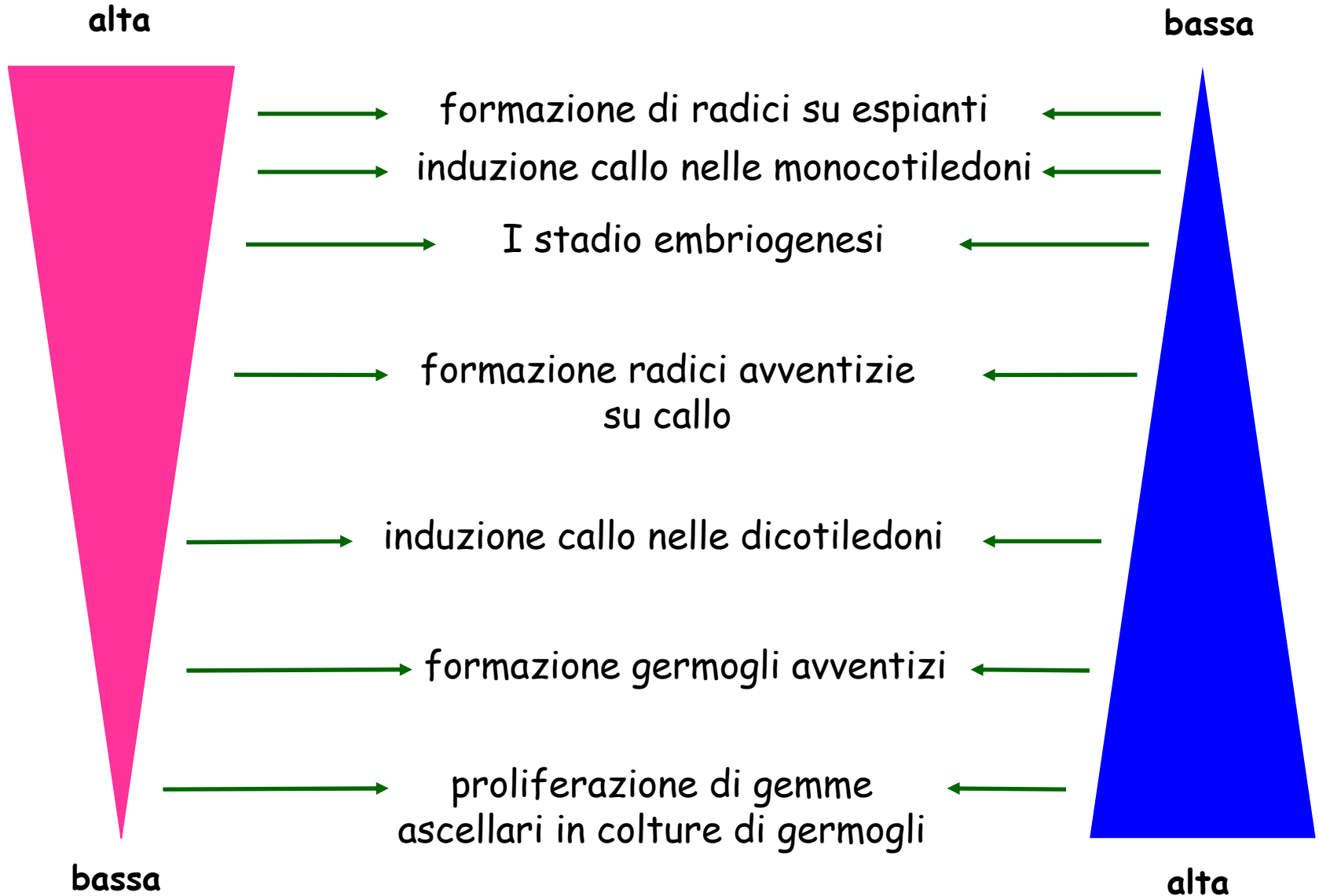
(c)



(d)

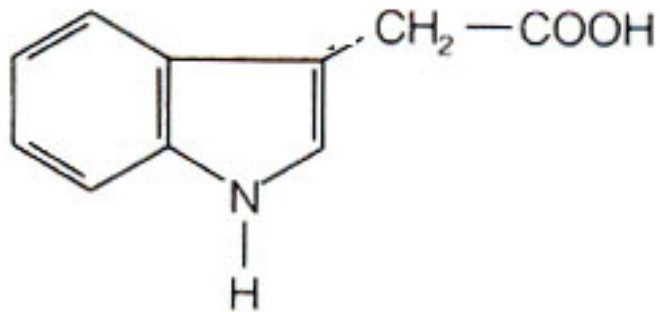
AUXINA

CITOCHININA



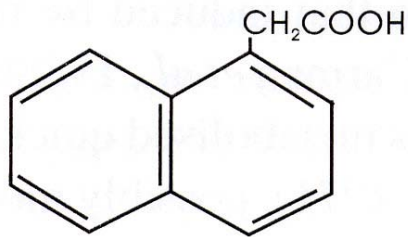
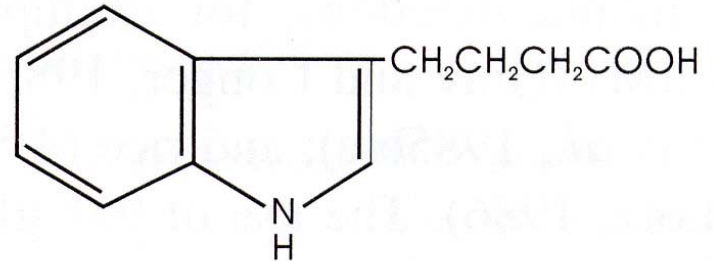
AUXINE

IAA

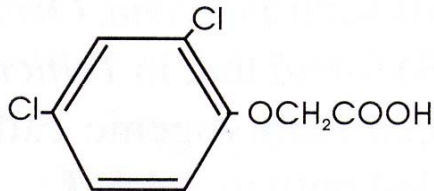


Acido 3-indolacetico

IBA (acido 3-indolbutirrico)

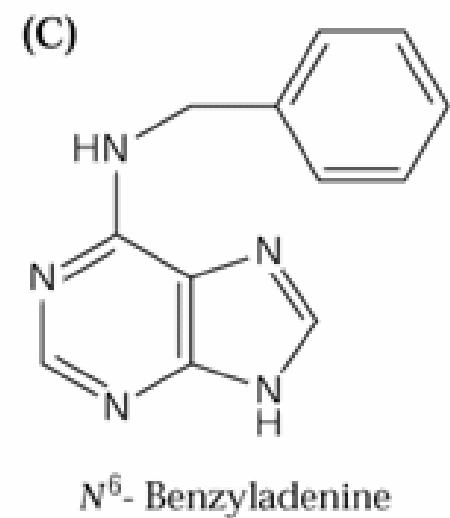
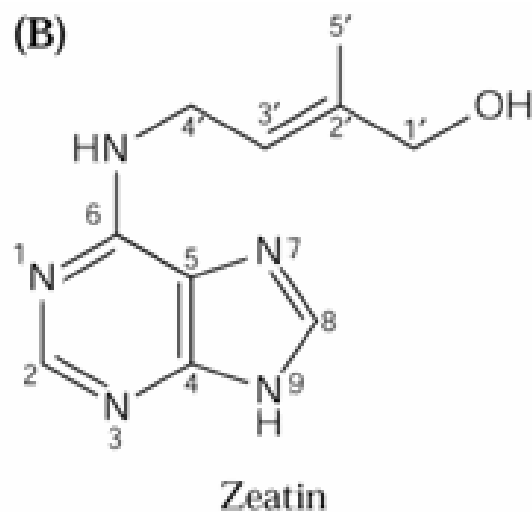
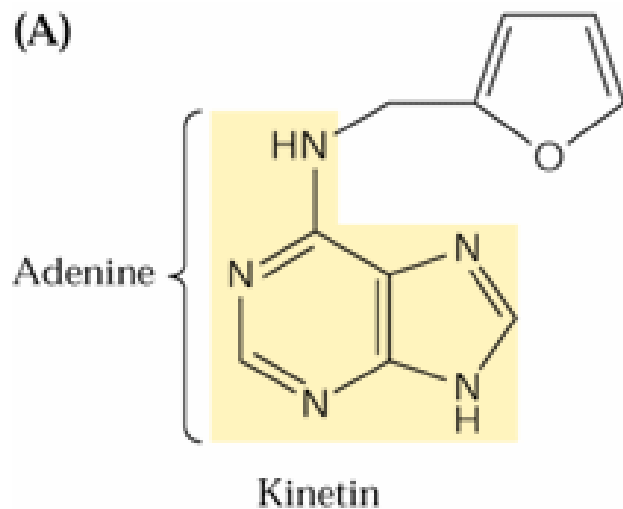


NAA (acido 1-naftalenacetico)

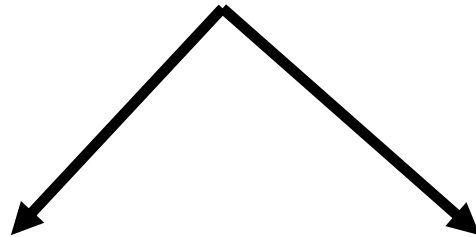


2,4 D (acido 2,4-diclorofenossiacetico)

CITOCHININE



Come si propagano le piante



Riproduzione
sessuale

Riproduzione
asessuale

PROPAGAZIONE VEGETATIVA

riproduzione asessuale

cactus
opuntia bigelovii



kalanchoe



la progenie è costituita
da "cloni" geneticamente
identici alla pianta
madre

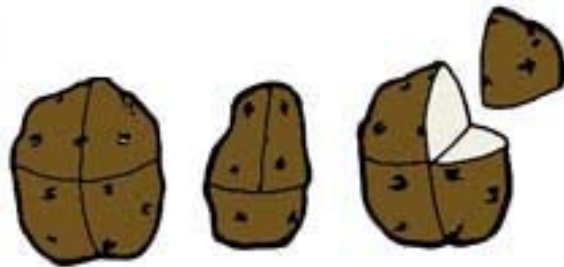


stoloni

fragola



patate



Specie propagate vegetativamente

banana

alberi da frutto (mele, pere, agrumi)

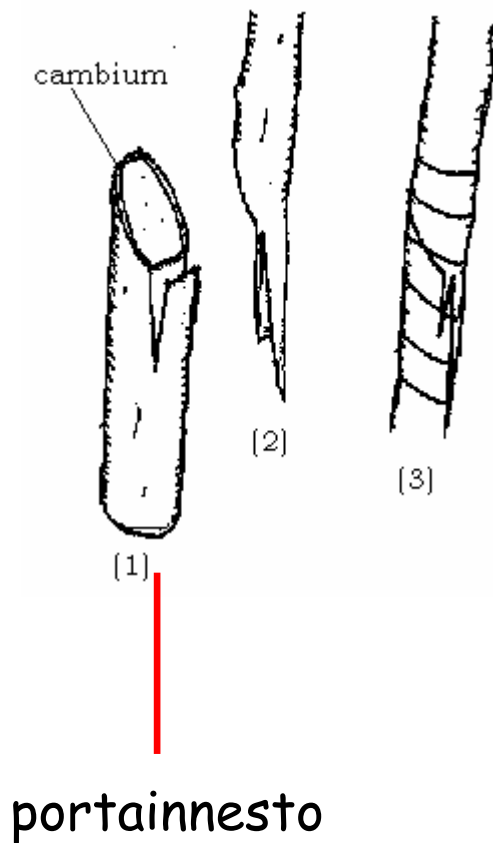
manioca

patata

fragole

cacao

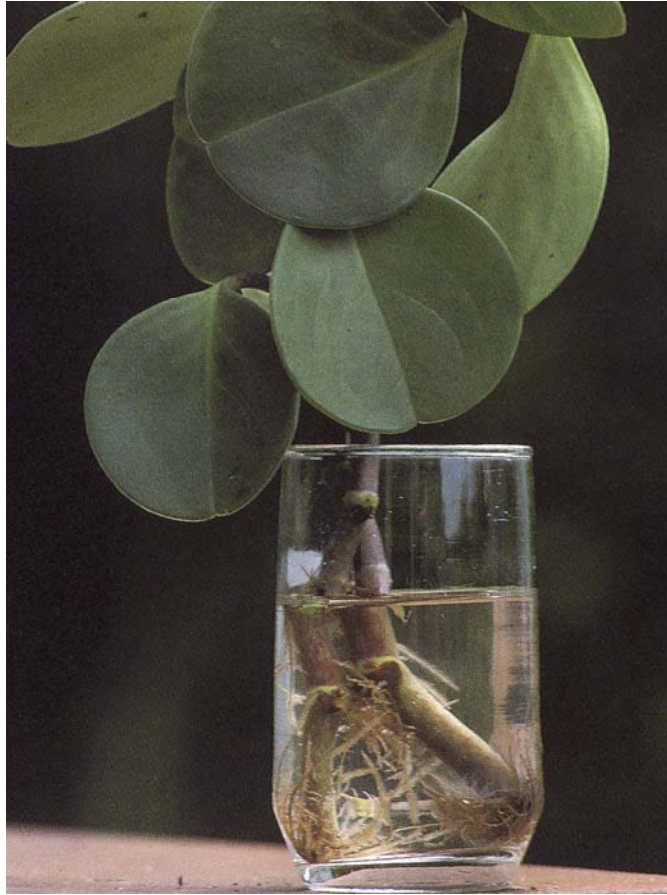
canna da zucchero



INNESTO

il portainnesto determina
l'**altezza** dell'albero da
frutto

selezionati per la **resistenza**
a malattie

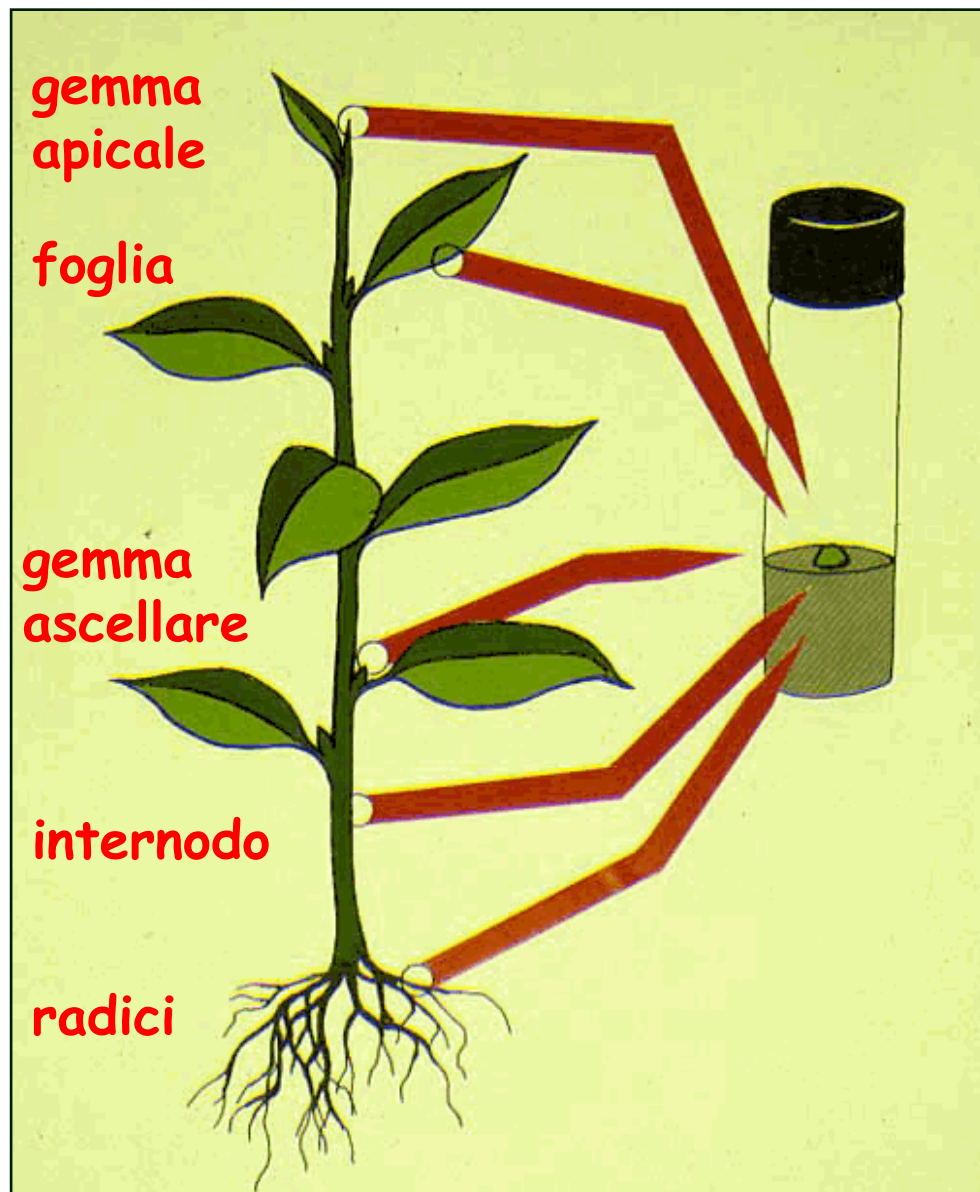


propagazione mediante TALEA

auxina per indurre la
formazione delle
radici

PROPAGAZIONE *IN VITRO* (MICROPROPAGAZIONE)

Permette di ottenere un elevato numero di piantine identiche sia **genotipicamente** che **fenotipicamente** alla pianta madre



**Materiale di partenza
per la
micropropagazione**

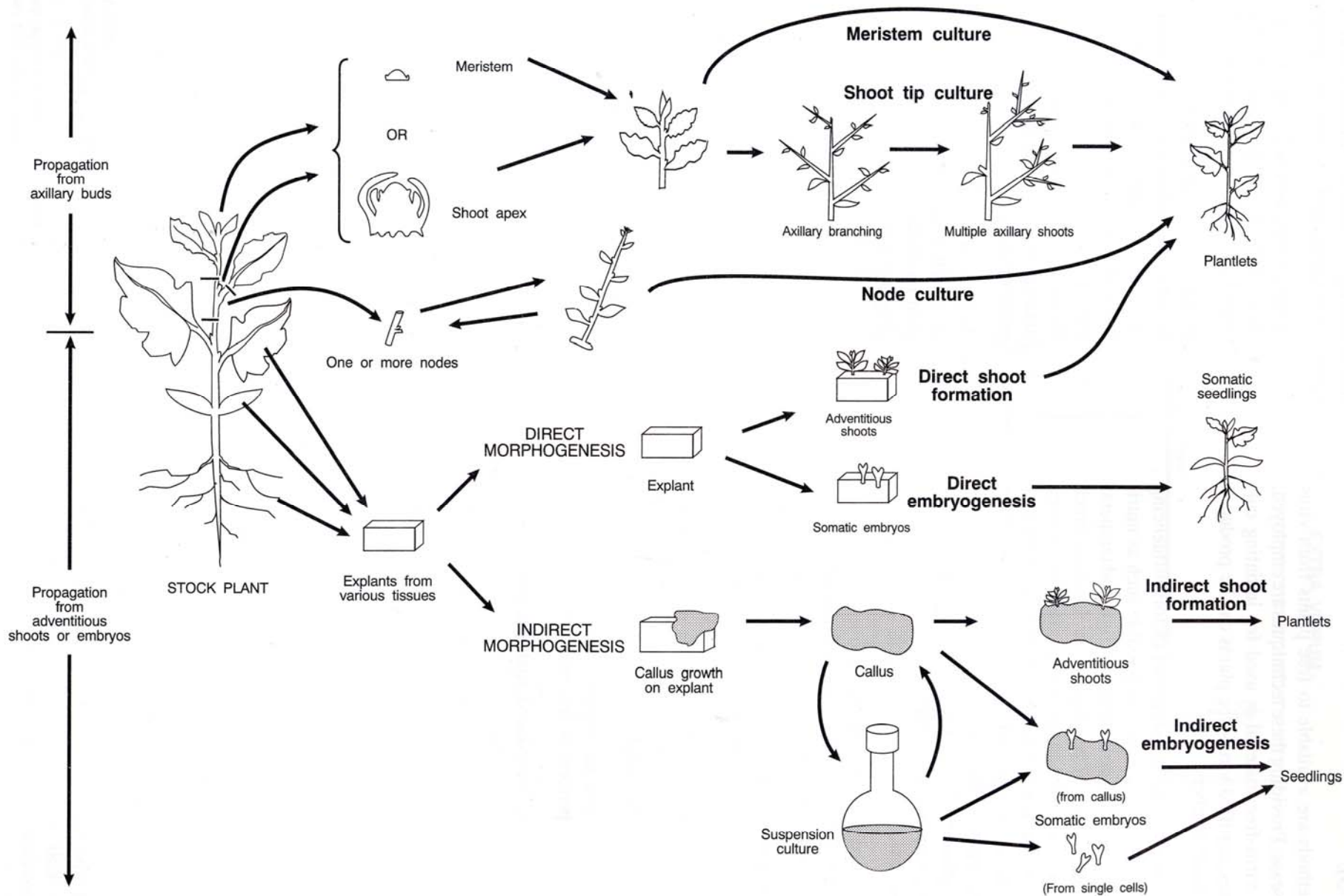
- moltiplicazione di germogli da gemme ascellari
- formazione di germogli avventizi
- formazione di embrioni somatici avventizi

direttamente

su espianti della
pianta madre

indirettamente

da colture in
sospensione o calli



la crescita e la proliferazione di gemme
ascellari è indotta in seguito alla diminuzione di
dominanza apicale

- rimozione dell'apice



- aggiunta di citochinina nel terreno di coltura



impatiens

ciclamino





orchidea

pino



VANTAGGI della micropropagazione

- specie che non si possono propagare altrimenti
- spazi ristretti
- condizioni asettiche: assenza di batteri, funghi e altri microorganismi
- metodiche per ottenere piante prive di virus (orchidee)
- produzione indipendentemente dalla stagione vegetativa
- maggiore possibilità di variare i fattori che influenzano la crescita
- acquisizione di nuove caratteristiche (es. stoloni fragole)

SVANTAGGI della micropropagazione

- le piantine hanno bisogno di un periodo di adattamento per diventare autotrofe
- cresciute in alta umidità sono più suscettibili alla perdita di acqua

- variazione somaclonale

epigenetica



transiente
non si
eredita

ereditabile

perdita della richiesta
di ormoni e vitamine

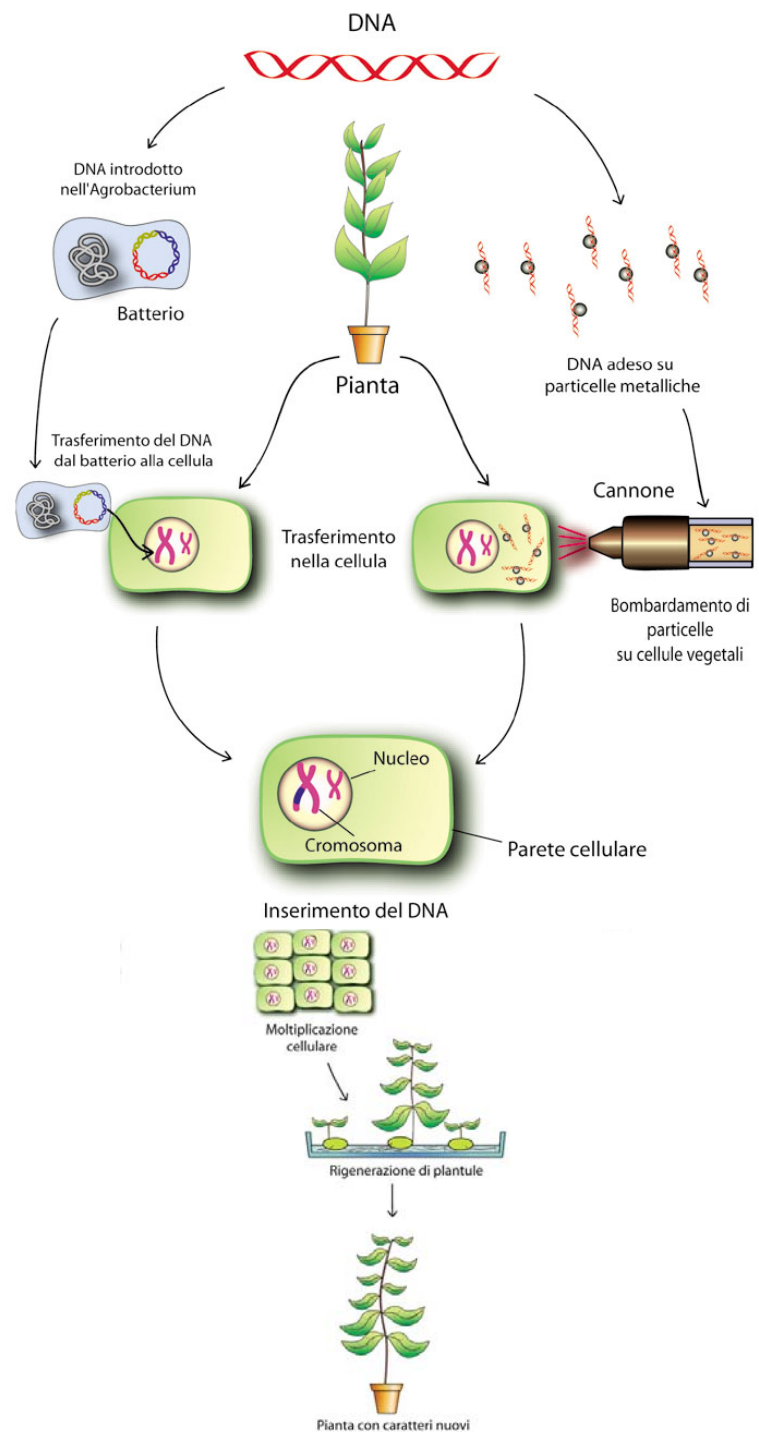
Aberrazioni cromosomali

- alterazioni nel numero e nella struttura dei cromosomi
- riarrangiamenti cromosomici
- differenze nel numero di copie di sequenze di DNA (amplificazione o diminuzione di sequenze ripetute)
- metilazione del DNA

camera climatica



Spesso la limitazione maggiore alla trasformazione delle piante non è la metodica di trasferimento del DNA, quanto la **rigenerazione** della pianta



Quando si effettua una trasformazione, sia con *Agrobacterium* che con il sistema biolistico, vista la bassa efficienza della rigenerazione, sarà necessario utilizzare un numero elevato di espianti per essere certi di ottenere piantine trasformate

I cloni trasformati ottenuti vengono poi
MICROPROPAGATI

**E' possibile evitare la coltura dei tessuti
e la rigenerazione della pianta?**

Trasformazione "in planta"

non richiede coltura di tessuti e rigenerazione della pianta

Esclusivamente per *Arabidopsis thaliana*

- trasformazione di semi

- inoculazione DNA in pianta

- infiltrazione nel fiore
(floral dip)

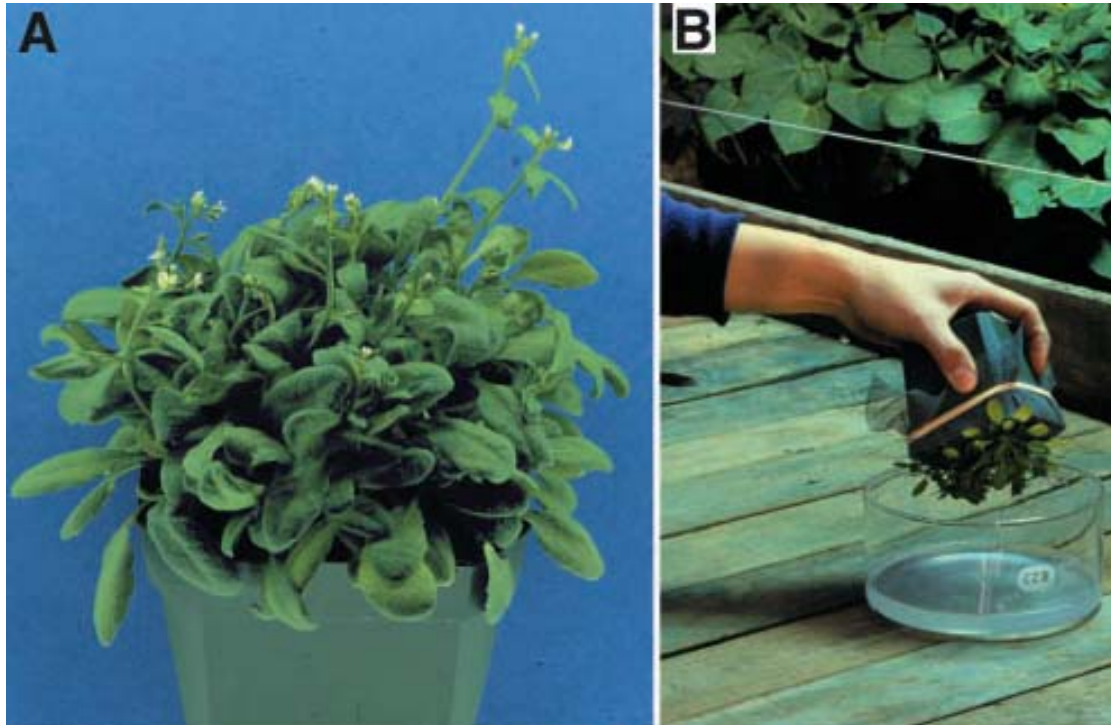
Agrobacterium

co-coltivazione dei
semi con
Agrobacterium

rimozione del germoglio
apicale e infiltrazione con
Agrobacterium del
tessuto meristematico
ferito
5% dei nuovi germogli
sono trasformati

immersione dei fiori
nella sospensione
batterica o
infiltrazione sotto
vuoto nel periodo della
fecondazione

Floral dip



immersione delle infiorescenze
nella sospensione batterica

Si produrranno semi transgenici da cui si otterranno le piante trasformate senza dover passare per la fase di rigenerazione e coltura in vitro dei tessuti

Le piante possono essere poi propagate da seme

sistema per recuperare i semi da Arabidopsis

i semi si raccolgono nel cono

