

**Le piante a seme (spermatofite) hanno sviluppato una strategia riproduttiva basata sulla produzione di semi che contengono gli EMBRIONI i quali sono spesso disidratati e dormienti**

**ANIMALI: durante l'embriogenesi sono definite le caratteristiche basilari del piano del corpo (assi di polarità) e vengono formati tutti gli organi dell'individuo adulto**

**PIANTE: durante l'embriogenesi viene definito il piano basilare del corpo, ma vengono abbozzati pochissimi organi: la maggior parte sono formati nello sviluppo post-embrionale**

Nelle piante l'embrione deriva solo da uno zigote fecondato?

# EMBRIOGENESI SOMATICA

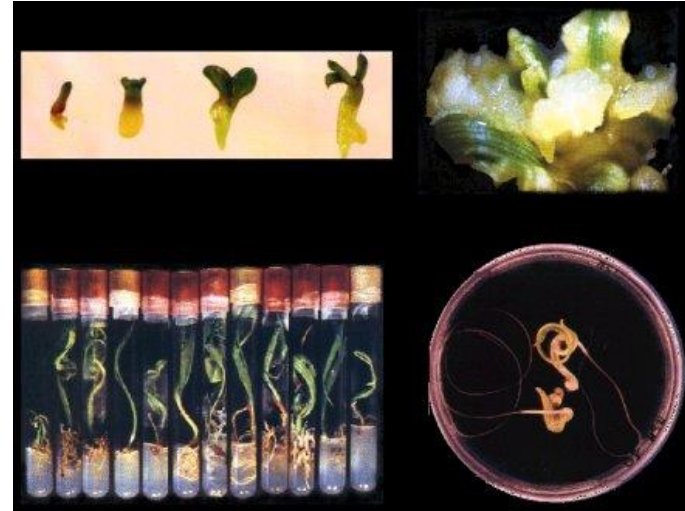
Generazione di embrioni da cellule diverse dallo zigote

## Per APOMISSIA:

- da cellule uovo non fecondate
- da cellule dei tessuti materni dell'ovulo

## Per TOTIPOTENZA *in vitro*: di alcune cellule vegetali:

Da colture embriogeniche per esempio da espianti di radici di *Daucus carota*,  
Da espianti di ipocotile trattati con auxina sintetica (2,4 D) o da giovani foglie



**IN NATURA l'embriogenesi può avvenire anche da tessuti somatici :Viviparia**

**PIANTA DELLA MATERNITA'**

**APOMISSIA**

**da cellule vegetative**



***Kalanchoe daigremontiana***

**La capacità delle piante di produrre embrioni non è limitata solo allo sviluppo della cellula uovo fecondata.**

**Cellule somatiche sono in grado di sviluppare una pianta completa passando attraverso stadi embrionali senza però passare attraverso la fusione dei gameti.**

**Questo processo è noto come**

## **EMBRIOGENESI AVVENTIZIA O SOMATICA**

**L'embriogenesi somatica quindi è il processo per cui cellule somatiche, e non, sviluppano interi organismi attraverso una serie di stadi molto simili a quelli dello sviluppo dell'embrione zigotico (fase globulare, a cuore, torpedo, cotiledonare).**

**In natura avviene naturalmente solo in pochissime specie, ed i tessuti competenti sono sia tessuti implicati nella riproduzione, ad es. le cellule della nucella (entro l'ovulo), le microspore, ma anche cellule somatiche quali tessuti fogliari.**



In *Crassula multicaeva* cellule dell'epidermide fogliare, dopo che la foglia è stata staccata dalla pianta, riprendono a dividersi e formano embrioni avventizi che successivamente differenziano piante. (Esempio di induzione di embrioni somatici mediante stress meccanico).

Le cellule della foglia in condizioni naturali non differenzierebbero mai embrioni, però il distacco dalla pianta (meccanicamente) riattiva alcune cellule epidermiche alla divisione ed alla successiva organizzazione di embrioni.

**Differenze fra embriogenesi zigotica e somatica:**

**I due processi sono morfologicamente identici dallo stadio globulare in poi.**

**Possono esserci piccole differenze perché gli embrioni somatici presentano spesso il fenomeno della “fasciazione”, o un numero di cotiledoni diverso rispetto a quello tipico della specie.**

**Però le prime fasi di sviluppo possono essere differenti nei due processi, in particolare manca il sospensore nell’embrione avventizio.**

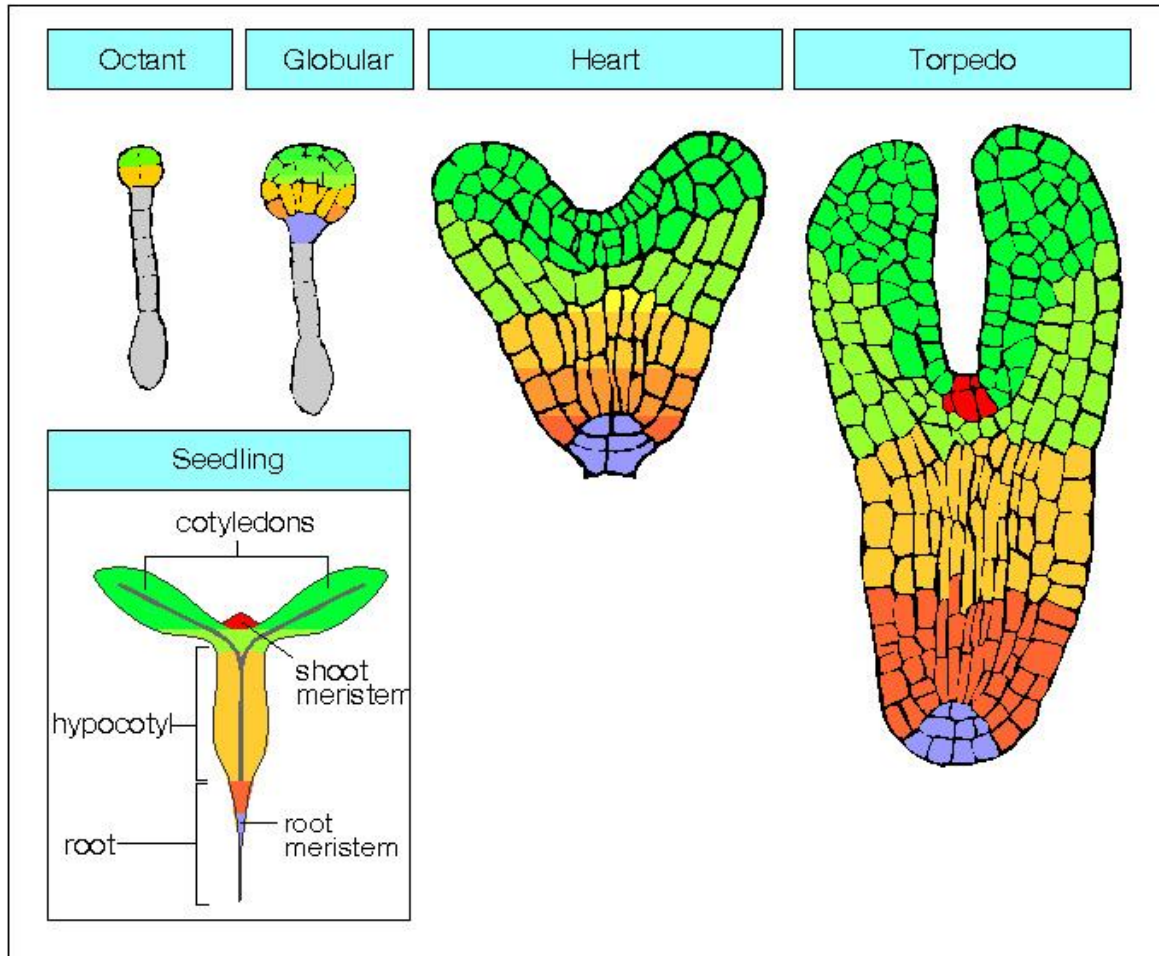
**Nell’embriogenesi somatica è frequente il fenomeno della formazione di embrioni a partire direttamente dall’epidermide di un altro embrione somatico.**

**Si chiamano embrioni secondari.**

**In genere la produzione di embrioni secondari è associata al fallimento dello sviluppo di quello primario**

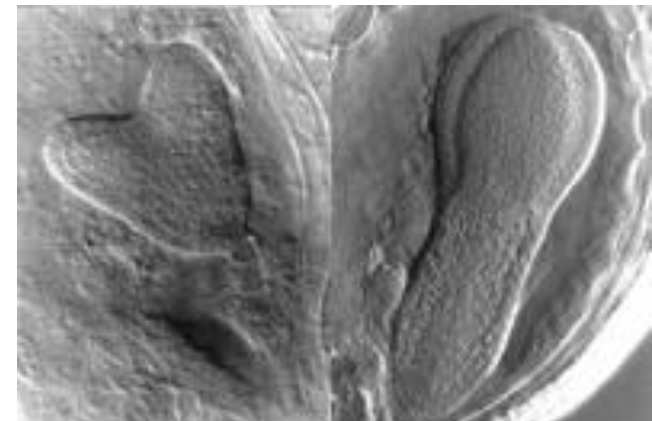


# PRINCIPALI FASI DELLA FORMAZIONE DELL'EMBRIONE



Preglobular

Globular



Early Heart

Torpedo



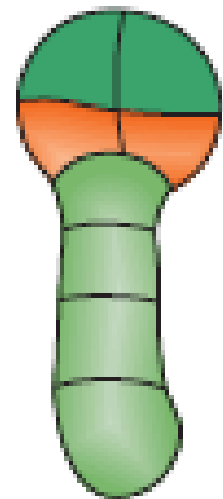
La prima divisione nucleare dello zigote è quasi sempre **TRASVERSALE** ed **asimmetrica** e genera una piccola cellula apicale ed una più grossa cellula basale. La cellula apicale darà origine alla maggior parte dell'embrione vero e proprio, la cellula basale darà origine al **sospensore**, ed all'**ipofisi**.

In alcune specie, tuttavia, il destino di queste due cellule può essere molto diverso.

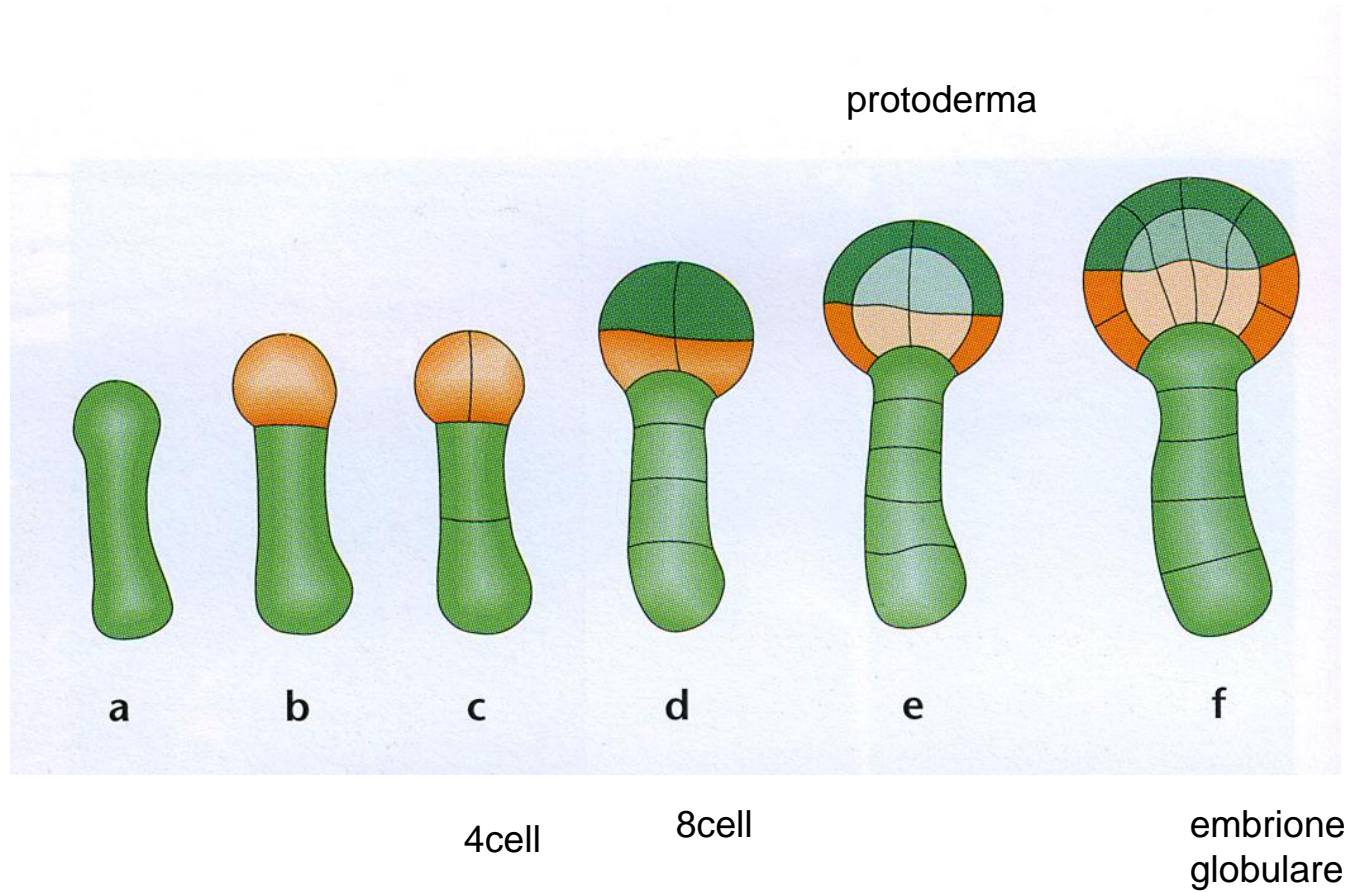
La cellula basale derivata dalla prima divisione dello zigote si divide ancora trasversalmente formando una fila di 7-9 cellule.

La cellula apicale subisce due divisioni longitudinali rispetto all'asse micropilo-calazale dell'ovulo dando origine ad un embrione a 4 cellule allungate.

Le 4 cellule si dividono trasversalmente originando un embrione ad 8 cellule chiamato ottante.



# Stadi di sviluppo precoci dell'embrione di Arabidopsis



# Stadi di sviluppo embrionale

- **Proembrione (bicellulare)**
- **Stadio globulare (sferico)** (divisioni cellula apicale dello zigote asimmetrico)
- **Stadio a cuore** (cotiledoni, simmetria bilaterale)
- **Stadio a torpedine**(espansione delle cellule, sviluppo dei cotiledoni)
- **Stadio cotiledonare o di maturazione** (perdita di acqua, tolleranza alla disidratazione)
- **Nello stadio a cuore, l'embrione acquista la forma allungata che la pianta conserverà per tutta la vita.**

**Nello stadio a torpedine si evidenziano i due poli opposti di sviluppo (apice del germoglio ed apice radicale).**

Sebbene il controllo genico dello sviluppo degli embrioni zigotici e somatici sia simile, i meccanismi che portano alla fase di induzione embrionale è **molto diversa** nei due processi.

**Le cellule somatiche acquisiscono competenza embriogenica in seguito a trattamenti chimici e/o stimoli meccanici.**

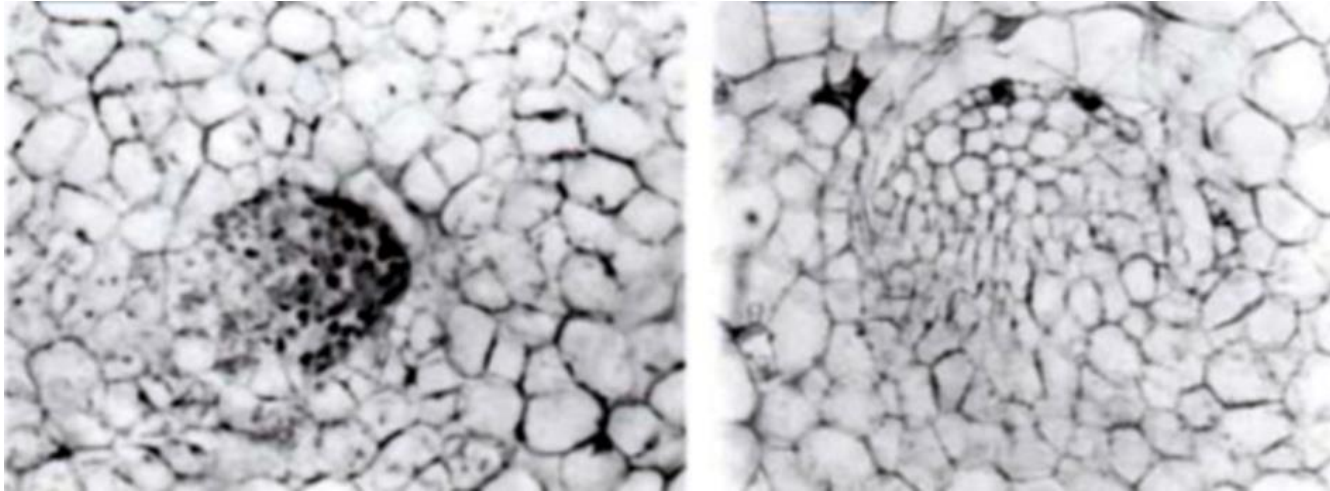
L'organizzazione di embrioni somatici richiede una **riprogrammazione dell'espressione genica con l'attivazione e/o spegnimento di una serie di geni** per permettere ad alcune cellule il passaggio dalla condizione vegetativa alla condizione embrionale.

L'embriogenesi somatica può essere indotta sia direttamente, in cellule appartenenti ad una struttura già differenziata (foglie, stelo, radici, cotiledoni ecc.) sia indirettamente in calli allevati su un mezzo agarizzato o in sospensioni cellulari.

**L'embriogenesi somatica diretta** avviene, in coltura *in vitro*, da tessuti o cellule già determinate a produrre embrioni, prima del prelievo dalla pianta madre. Questi espianti richiedono pochi regolatori di crescita (ormoni) o solo condizioni ambientali favorevoli alla ripresa delle divisioni cellulari e alla successiva espressione della loro competenza, cioè produrre embrioni.

Diversamente, **l'embriogenesi somatica indiretta** richiede che ai tessuti di partenza **venga modificato il loro destino**. Questo è possibile inducendoli a proliferare inizialmente in masse cellulari (callo) indifferenziate. Solo successivamente alcune cellule di callo vengono indotte a dare origine alle **PEM** (masse pro-embriogeniche), è a trasformarsi in embrioni somatici.

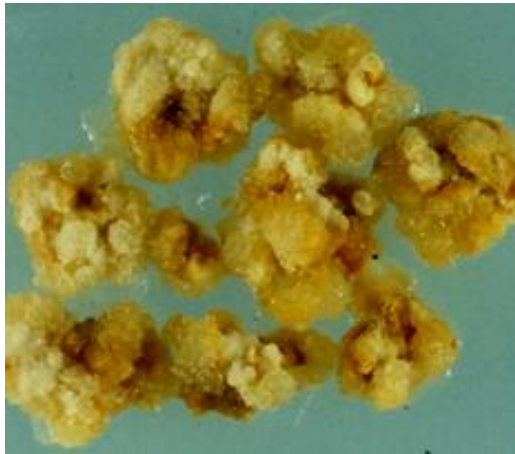
# Embriogenesi da callo



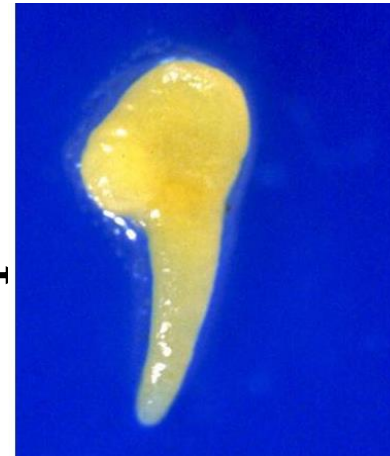
**Gruppi di cellule meristematiche  
nella massa del callo. Iniziali  
dell'embrione**



# Rigenerazione di pianta di peperone attraverso embriogenesi somatica indiretta



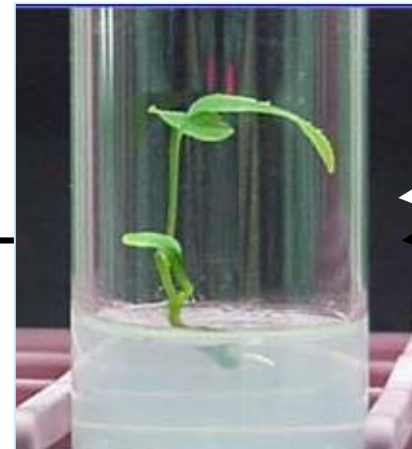
**Callo**



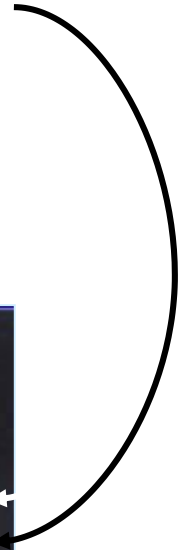
**Embione somatico**



**Pianta sviluppata**



**Plantula**



**Esempi di tessuti che producono embrioni somatici direttamente: l'epidermide dell'ipocotile, e le cellule della nucella.**

**Nell'embriogenesi indiretta, una singola cellula del callo o, nella maggior parte dei casi, un aggregato di cellule detto complesso pro-embrionale può originare uno o più embrioni.**

**Ogni embrione che si sviluppa passa attraverso le stesse fasi di sviluppo dell'embrione zigotico.**

**Importante è la composizione del mezzo di coltura per indurre embriogenesi somatica.**

**In genere sono richiesti due tipi diversi di mezzi, uno per l'induzione delle cellule embriogeniche ed un secondo per il successivo sviluppo dell'embrione.**

**Il primo mezzo deve contenere auxina, il secondo ne deve essere privo o ne deve contenere una concentrazione notevolmente inferiore rispetto al primo**

**Se non intervengono eventi che inducano variazione genetica nelle cellule che danno origine all'embrione somatico, le piante ottenute da embrioni somatici sono geneticamente identiche ai tessuti somatici di partenza.**

**però**

**Eventi di variazione somaclonale sono frequenti nelle colture *in vitro*.**

# Il rimodellamento della cromatina è un prerequisito per lo stabilirsi della totipotenza nelle cellule staminali durante l'embriogenesi somatica

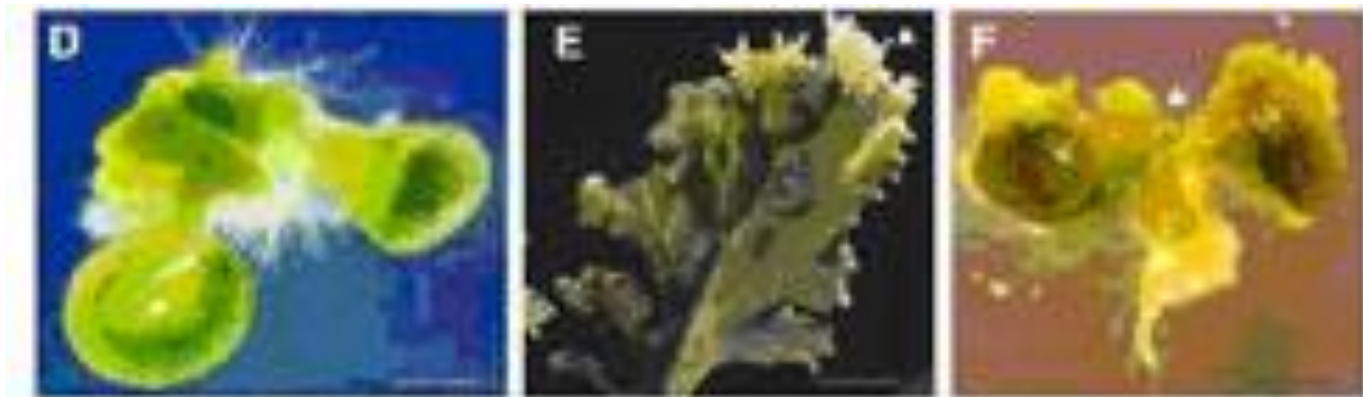
- **Negli animali il rimodellamento della cromatina è un importante strumento di conversione staminale.**
- **Nelle piante la struttura della cromatina si rimodella continuamente durante lo sviluppo, ed il silenziamento genico dipendente dalla cromatina è coinvolto nel mantenimento dello stato differenziato.**

# WOX

- I geni *WOX* svolgono ruolo importante nel coordinare la trascrizione nelle prime fasi dell'embriogenesi somatica in *Vitis vinifera*. *VvWOX2* e *VvWOX9* sono quelli più espressi, vengono definiti geni di **identità embrionale**.
- Nell'embriogenesi somatica di *Arabidopsis* *WOX5* and *WUS* si esprimono **prima** dei geni di identità embrionale, *ad es. di WOX2*

# Analisi molecolare dell'embriogenesi

Sono stati identificati geni inducibili dagli ormoni come i geni *PIN*. *PIN1* che codifica per un trasportatore dell'auxina, è il primo espresso in cellule proembriogeniche. Un altro gene associato alla competenza embriogenica delle cellule e marcatore precoce del processo è *SERK*, isolato in singole cellule (competenti a formare embrioni somatici) in una sospensione cellulare di *Daucus e Dactylis*. Si ipotizza che le proteine SERK possano agire come recettori transmembrana per segnali nel mezzo di coltura e per innescare l'embriogenesi. Studi di trascrittoma hanno identificato alcuni geni per fattori di trascrizione coinvolti nell'embriogenesi somatica, come i membri della famiglia **BABY BOOM (BBM)** che codifica per il fattore di trascrizione AP2/ERF (APETALA"/Ethylene-responsive factor) espresso negli embrioni in via di sviluppo e nei semi. Nella pianta gioca un ruolo chiave nell'induzione e mantenimento dello sviluppo dell'embrione. Over-espressione ectopica (espressione di un gene con una differente localizzazione da quella normale) di BBM, in *Arabidopsis* e *Brassica napus*, induce lo sviluppo spontaneo, indipendentemente dall'auxina, di embrioni somatici in tessuti vegetativi.





# **Ruolo dell'AUXINA nell'embriogenesi somatica**

**FONDAMENTALE PER L'INDUZIONE  
DELL'EMBRIOGENESI E PER I PRIMI STADI DI  
SVILUPPO DELL'EMBRIONE**

## **PIN1; PIN4; PIN7; (PIN3)**

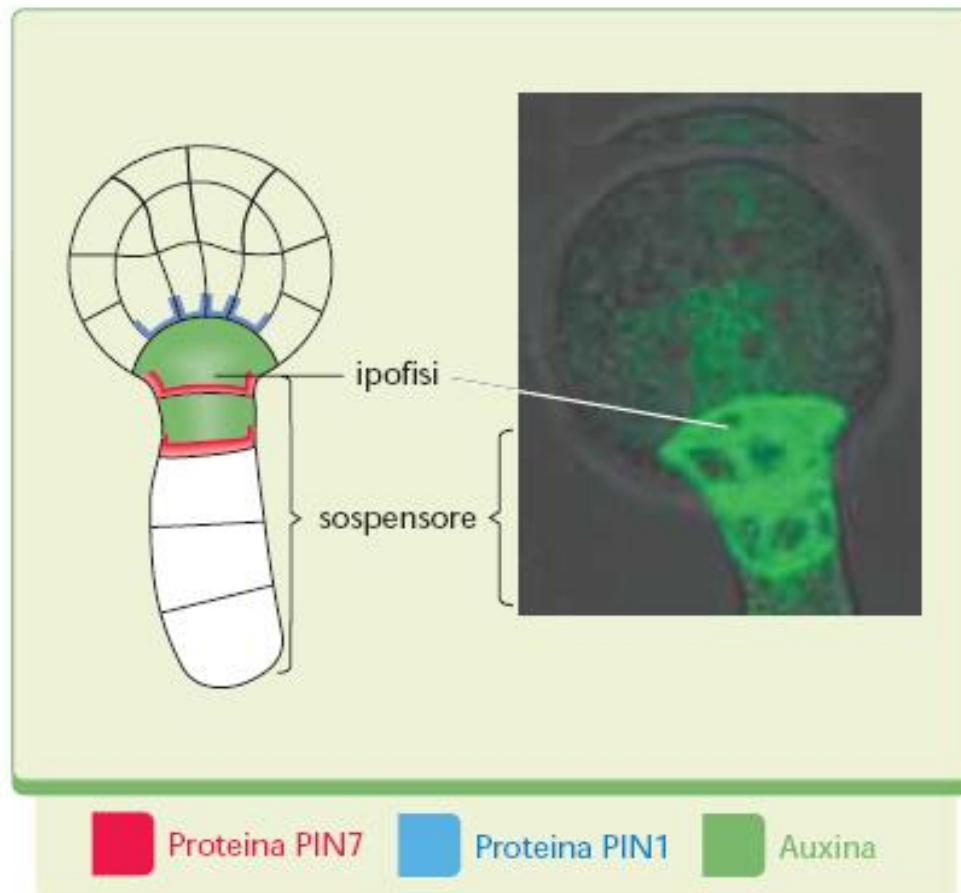
Espressi con diversa localizzazione in tempi diversi dello sviluppo dell'embrione.

La sequenza di espressione regolata temporalmente e spazialmente, è responsabile della variazione nella direzione del flusso di IAA durante l'embriogenesi.

In stadi precoci il flusso di IAA è verso l'apice, lontano dal sospensore;

dallo stadio globulare tardivo il flusso è invertito, verso l'ipofisi e la radice in sviluppo.

PIN7, PIN1 i primi geni PIN espressi nell'embrione.



**A questo stadio si può osservare come l'auxina si localizzi nella parte basale dell'embrione, nelle cellule dell'ipofisi e nella parte alta del sospensore.**

Marcatura con GFP ed osservazione a fluorescenza è stato possibile evidenziare che nelle primissime fasi di sviluppo dell'embrione c'è già una distribuzione asimmetrica dell'auxina.

Si è potuto osservare come varia la distribuzione di questo ormone nelle successive fasi di sviluppo dell'embrione.

# FATTORI INDUTTIVI

- Per regolare efficientemente il processo di rigenerazione di una pianta attraverso l'embriogenesi somatica, è importante comprendere i fattori (marcatori morfologici e molecolari) che giocano un ruolo nelle diverse fasi di induzione, transizione e sviluppo di un embrione somatico. Cellule somatiche possono avviare il processo di embriogenesi quando sono poste in condizioni opportune. Per molte specie vegetali vengono usati alti livelli di auxina, come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), un analogo sintetico dell'auxina; tuttavia per avviare l'embriogenesi somatica sono stati usati anche altri fattori induttivi come alte concentrazioni di minerali, zuccheri, metalli pesanti e stress osmotici. Tutti questi tipi di stress possono promuovere una riprogrammazione genomica dell'attività trascrizionale richiesta affinché cellule somatiche diventino embriogeniche.
- I regolatori di crescita sono sostanze chiave nell'induzione dell'embriogenesi somatica e quasi tutti i tipi di coltura *in vitro* usati per ottenerla ne richiedono un'alta concentrazione. Il tempo di esposizione dell'espianto all'auxina varia, per esempio espunti di picciolo, ipocotile o singole cellule isolate da sospensioni cellulari richiedono rispettivamente 1, 2 o 7 giorni, prima di diventare competenti ad effettuare l'embriogenesi.

La distribuzione dell'auxina durante l'embriogenesi ha un ruolo fondamentale nella definizione degli assi embrionali.

Anche la bilateralità dell'embrione delle piante dicotiledoni è controllata dalla distribuzione dell'auxina.

Durante il passaggio dallo stadio globulare a quello a cuore è stato osservato che l'ormone si concentra all'apice degli abbozzi dei cotiledoni. Questa localizzazione è dovuta all'attività dei geni *PIN*.

Mutanti di questi geni presentano un'alterata organizzazione del piano di simmetria.

Es. i mutanti *gnom*.

# MORFOGENI

Negli animali segnali chimici svolgono un ruolo determinante durante l'embriogenesi

 MORFOGENI

Informazione posizionale mediante gradienti di concentrazione

Nelle piante l'AUXINA è il principale morfogeno durante l'embriogenesi



Auxine naturali



# L'auxina:livelli, trasporto e biosintesi

- Gradienti di auxina attivano nel callo embriogenico il trasportatore polare di auxina PIN1, e la soppressione di *WUS* e *PIN1* mostra che **entrambi i geni sono necessari all'induzione dell'embriogenesi somatica.**
- ...e *LEC*???

# LEC e LEC-like

- *LEC1* codifica una proteina simile ad una subunità di *Heme-Activated Proteins 3 (HAP3)*. *LEC1-LIKE (LIL)* è anche richiesto per lo sviluppo dell'embrione somatico in numerose piante, es. cacao. I geni *LEC-like* sembrano importanti per coordinare eventi primari che portano alla competenza embriogenica. La formazione di embrioni somatici da parte dell'auxina richiede la funzione dei geni *LEC 2* che controllano i carrier di efflusso dell'auxina *PIN1* e *PIN2*, i geni della biosintesi dell'auxina *YUCCA2 (YUC2)* e *YUCCA4 (YUC4)* ed i fattori di risposta all'auxina ***ARF5***.

# **Analisi molecolare dell'embriogenesi**

**Altri geni sono espressi nelle fasi tardive dell'embriogenesi somatica, come quelli indotti dall'ABA. L'accumulo di proteine di riserva, considerate marcatori delle fasi di maturazione, è seguito dall'accumulo di proteine LEA (Late-Embryogenesis Abundant per la tolleranza al disseccamento). Queste proteine espresse *in vivo* tardivamente nell'embriogenesi zigotica, giocano un ruolo importante nella protezione dell'embrione dalla disidratazione. Tutti i geni *LEA* sono espressi nel callo, mentre solo alcuni negli embrioni somatici e la trascrizione aumenta negli embrioni allo stadio a cuore.**

# Analisi molecolare dell'embriogenesi

Alcuni mutanti di *Arabidopsis* hanno permesso di isolare, identificare e comprendere le funzioni di alcuni geni coinvolti nei primi stadi dell'embriogenesi somatica. L'avvento di tecniche molecolari sono state fondamentali per identificare altri geni come *DGE* (*Dactylis glomerata embryogenesis*) con possibile funzione regolatoria nucleare, espressi solo in colture di callo embriogenico. Lo studio dell'espressione dei geni *EP2* e *EP3* (endochitinasi proteine extracellulari glicosilate) in colture di carota embriogeniche e non, ha dimostrato che essi sono espressi in una piccola percentuale di cellule non embriogeniche. *EP2* codifica per una proteina extracellulare di trasporto dei lipidi. L'mRNA di *EP2* si accumula soprattutto nelle cellule del protoderma dove sembra essere coinvolto nella cutinizzazione dell'epidermide dell'embrione. In vivo *EP3* è espresso nei tessuti materni (nucella ed endosperma), cellule nutrici capaci di produrre le molecole necessarie per lo sviluppo dell'embrione. Quindi è possibile ipotizzare che anche nel callo alcune cellule non embriogeniche fungano da cellule nutrici. È stato visto che le cellule che formano le PEM, esprimono già molti dei geni che sono codificati fino allo stadio globulare.

# RUOLO DEGLI ORMONI

Sebbene il processo di induzione non sia ancora del tutto chiaro, si ritiene che in presenza continua di auxina le “**massa pro-embriogenica**” o **PEM**, sintetizzino tutti i prodotti genici necessari a completare lo stadio globulare e che in più esse producano molti altri mRNA e proteine che generalmente inibiscono l’elaborazione del programma di embriogenesi. Quindi la rimozione di auxina determina l’inattivazione di una serie di geni che bloccano l’embrione allo stadio globulare e l’embriogenesi può così continuare. Superato lo stadio a torpedine, i processi somatici e zigotici divergono. Gli embrioni zigotici entrano nello stadio cotiledonare, seguito dallo stadio di maturazione, nel quale si ha una sostanziale sintesi di proteine di riserva e la preparazione alla disidratazione e alla dormienza. Una proporzione significativa di questo processo sembra essere regolata a livello ormonale, in primis dall’acido abscissico (ABA). Al contrario, gli embrioni somatici si sviluppano in modo continuo, attivando i meristemi apicali senza passare per lo stadio di quiescenza. Sebbene ci siano queste differenze, anche gli embrioni somatici sintetizzano ed accumulano ABA, ed essi esprimono anche un certo numero di geni ABA inducibili generalmente associati con la tolleranza al disseccamento (es. geni *LEA*). Ciò fa logicamente supporre che il segnale per prepararsi alla disidratazione è intrinseco e precoce, dato che questi geni sono espressi in embrioni somatici che non andranno incontro a disseccamento.

- ***La morte cellulare programmata è essenziale all'embriogenesi somatica***

- Le cellule del sospensore (quando c'è) muoiono per PCD come nell'embriogenesi zigotica.



- *Abies alba* dimostra che la PCD deve però avvenire anche prima, e quest'ondata di PCD è specifica dell'embriogenesi somatica ed essenziale per il suo successo.
- Dove avviene? Nelle **PEM (masse proembriogeniche)**

## Perché nelle PEM?

- Dalle PEM non possono partire troppi embrioni, perchè se no nessuno arriverà a compimento!
- Esperimenti con linee cellulari composte di PEM deficienti nel programma di PCD lo dimostrano, infatti queste linee sono incapaci di formare embrioni, indipendentemente dal trattamento.

# IL POTENZIALE EMBRIOGENICO DI UNA COLTURA

E' più alto quando la coltura è abbastanza giovane (cioè nel suo primo anno di vita) e risiede principalmente all'interno di una sua sottopopolazione chiamata **“massa pro-embriogenica” o PEM**, composta da cellule che mostrano caratteristiche tipiche di cellule meristematiche in attiva divisione: piccole dimensioni, denso citoplasma, grandi nuclei e nucleoli, piccoli vacuoli, numerosi granuli d'amido, intensa sintesi di RNA ed intensa attività metabolica. Questi gruppi di cellule possono essere selezionate a partire dalla popolazione totale setacciando la coltura e/o mediante frazionamento in gradiente di densità in modo da ottenere una popolazione che sia per più del 90% embriogenica e relativamente sincrona nello sviluppo, almeno per i primi stadi della morfogenesi. Sebbene la sincronia venga meno man mano che lo sviluppo della coltura procede, stadi embrionali più avanzati possono essere isolati da colture meno sincrone setacciando di nuovo le cellule e selezionando gli embrioni più grandi.

# L'embriogenesi somatica come risposta allo stress

- L'embriogenesi somatica può essere considerata una **risposta adattativa allo stress**, perchè vari stress la inducono. Per esempio, in carota è stimolata dall'applicazione di sali di metalli pesanti ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ), alta pressione osmotica, alte temperature, tutto in assenza di fitormoni esogeni.

Anche il 2,4-D può funzionare come agente di stress per l'espanto

- Durante l'embriogenesi della patata indotta da 2,4-D si osserva sovra-regolazione di geni dello **stress ossidativo e della difesa.**

# Quindi

- L'embriogenesi somatica è accentuata da livelli aumentati di **ROS**, ad esempio nel grano, e l'applicazione di antiossidanti al mezzo induttivo **riduce** l'embriogenesi somatica in *Eucalyptus globulus*

# I ROS sono in relazione con l'ABA e con il Boro

- L'ABA incrementa i livelli di ROS negli embrioni di mais
- Anche il micronutriente Boro mette in moto i pathway mediati dallo stress durante l'embriogenesi somatica con un diretto impatto **sui livelli di ABA, che aumentano**, come osservato nell'embriogenesi somatica di carota.

Lo stress ed i ROS stimolano l'induzione di embriogenesi somatica, **ma poi devono essere detossificati**

# L'ossido nitrico

- L'ossido nitrico è un fattore critico per lo sviluppo e le risposte allo stress nelle piante, ed è uno “stressor” per l'induzione dell'embriogenesi somatica, forse influenzando la disponibilità di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  entro le cellule attraverso l'attività di proteine-chinasi.
- In alternativa, potrebbe incrementarla aumentando la produzione di auxina attraverso la repressione del gene *MYC2*, che è un repressore di biosintesi dell'auxina, come dimostrato nell'embriogenesi somatica di *Arabidopsis*.



# SEMI SINTETICI

I semi sintetici sono ottenuti incapsulando artificialmente embrioni somatici. All'inizio la tecnica è stata applicata solo agli embrioni somatici, di recente anche a gemme vegetative e calli embriogenici o organogenici. L'attuazione di questa tecnica richiede manipolazione *in vitro* e la sua finalità è il mantenimento a lungo termine e la produzione su larga scala di piante clonate. L'incapsulamento si è reso necessario per proteggere embrioni somatici e gemme vegetative dall'essiccamento e dai patogeni quando esposti all'ambiente naturale ed è una tecnica applicata sia a specie di angiosperme che di gimnosperme. Nonostante tutto, il loro numero è piuttosto piccolo rispetto al numero totale di specie nelle quali è stato stabilito un protocollo di rigenerazione *in vitro*. La produzione di semi artificiali ha aperto nuovi orizzonti alle biotecnologie vegetali; essa combina i vantaggi della propagazione clonale con quelli della dispersione e conservazione dei semi, ma purtroppo ci sono ancora delle limitazioni per un suo uso più ampio.

**Il rivestimento, “endosperma artificiale”, di un seme sintetico deve essere preparato in relazione alle caratteristiche della specie e delle potenzialità di germinazione.**

**L'unità di propagazione formata dall'embrione somatico più l'involucro, seme sintetico, può anche essere “criopreservato” per lunghi periodi in azoto liquido o conservato in condizioni di sviluppo rallentato a temperature comprese tra 7 °C e 10 °C. Questa potenzialità rappresenta una strategia per la conservazione del germoplasma in programmi di protezione della biodiversità.**

**La produzione di semi sintetici è un obiettivo biotecnologico per una specie di rilevanza dal punto di vista economico come potrebbero essere le piante agronomicamente importanti o quelle ornamentali.**

# SEMI SINTETICI

I semi sintetici essiccati sono prodotti da embrioni somatici nudi o incapsulati in poliossietilenglicole (Polyoxr) e successivamente disidratati. L'essiccazione può essere raggiunta o lentamente in un periodo di una o due settimane, o rapidamente, dissigillando le capsule Petri e lasciandole su un piano per una notte per farle seccare. Questa tecnica si applica solo ad embrioni di specie i cui semi sono tolleranti alla disidratazione, mentre in quelle non tolleranti i semi prodotti sono idratati. Questi ultimi sono ottenuti incapsulando gli embrioni somatici in capsule di idrogeli. Una serie di sostanze, come l'alginato di potassio, l'alginato di sodio, la carragenina, l'agar, ecc. sono state testate come idrogeli, ma l'alginato di sodio è il più impiegato. Gli embrioni sono mescolati con alginato di sodio e poi fatti gocciolare in una soluzione di sali di calcio, come il  $\text{CaCl}_2$ , dove avvengono reazioni di scambio ionico e gli ioni sodio sono sostituiti dagli ioni calcio. Si formano così le palline di alginato di calcio che circondano gli embrioni



# **CRIOCONSERVAZIONE**

# TECNICA DELLA CRIOCONSERVAZIONE

Consiste nello STOCCAGGIO DI GERMOPLASMA A TEMPERATURA ULTRA-BASSA ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), propria dell'azoto in fase liquida

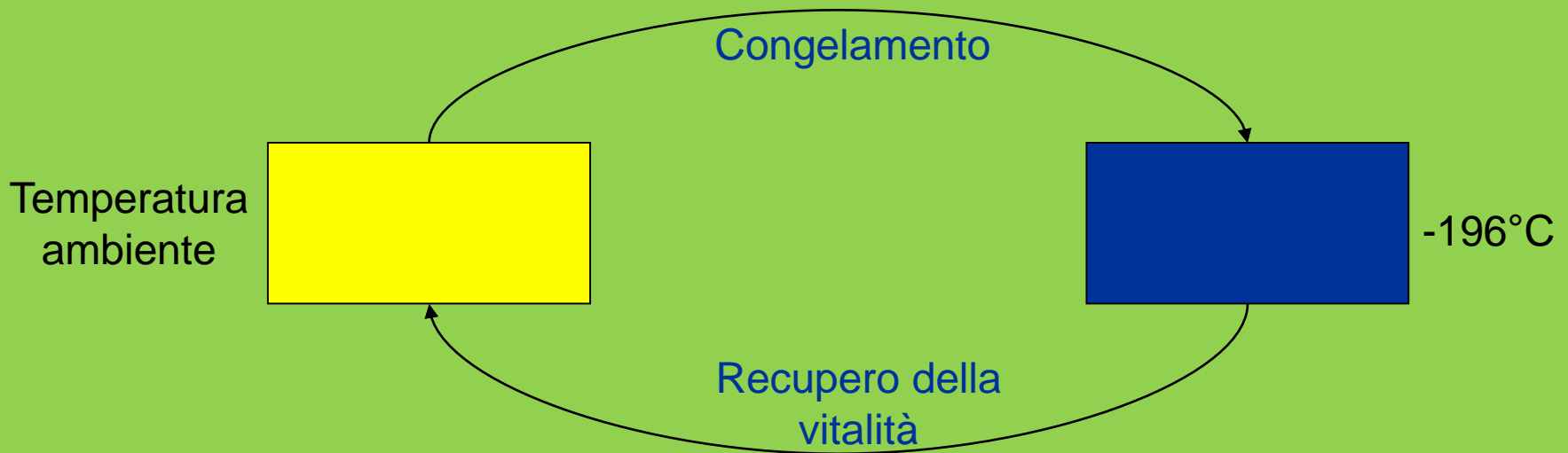


# VANTAGGI DELLA CRIOCONSERVAZIONE

1. SPAZI RELATIVAMENTE CONTENUTI per la conservazione (in un contenitore da 35 litri di azoto liquido si possono stoccare oltre 6.000 espianti),
2. BASSI COSTI DI CONSERVAZIONE (in pratica, solo quelli necessari al mantenimento del livello di azoto liquido, sostanza facilmente reperibile e di costo contenuto)
3. possibilità di porre in conservazione un AMPIO RANGE DI ORGANI E TESSUTI provenienti da coltura *in vitro*, (Lambardi e De Carlo, 2003),
4. il mantenimento del materiale vegetale in assoluta SICUREZZA GENETICO-SANITARIA
5. possibilità di operare una CONSERVAZIONE A TEMPO ILLIMITATO

Alla temperatura di  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , le cellule vegetali entrano in uno stato di “QUIESCENZA ASSOLUTA”, in quanto tutte le TRASFORMAZIONI FISICHE e REAZIONI BIOCHIMICHE sono praticamente arrestate

Se le cellule sono portate nella condizione di ultra-raffreddamento seguendo opportune “PROCEDURE PREPARATORIE”, la VITALITÀ non ne risulta compromessa e, al ritorno a condizioni standard di coltura, possono riassumere la loro piena funzionalità



# PRINCIPI DELLA CRIOCONSERVAZIONE:

## Disidratazione

Se il materiale vegetale fosse posto direttamente in azoto liquido subirebbe **DANNI IRREVERSIBILI** per la **FORMAZIONE DI CRISTALLI DI GHIACCIO INTRA- ED EXTRA-CELLULARI** che romperebbero le membrane, il nucleo e tutti gli altri organelli

Per questo è necessario che il materiale vegetale sia **DISIDRATATO** fino ad un livello in cui **LE MOLECOLE D'ACQUA RESIDUE NON SIANO PIÙ IN GRADO DI GENERARE CRISTALLI DI GHIACCIO** e la soluzione citoplasmatica vada incontro a **VITRIFICAZIONE**



# PRINCIPI DELLA CRIOCONSERVAZIONE:

## Vitrificazione

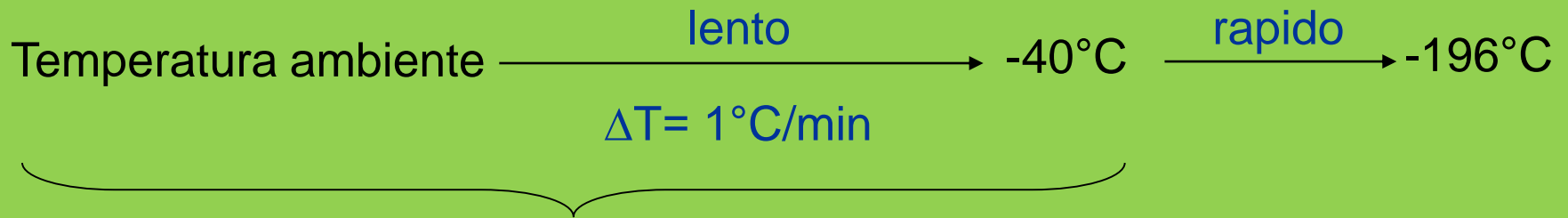
Il termine “**VITRIFICAZIONE**” si riferisce al processo fisico di TRANSIZIONE DI UNA SOLUZIONE ACQUOSA AD UNO STATO AMORFO (=non cristallino) durante ultra-raffreddamento

La vitrificazione del citoplasma cellulare PREVIENE LA FORMAZIONE DI CRISTALLI DI GHIACCIO INTRA-CELLULARI

Gli espianti sottoposti a vitrificazione si mantengono **INTEGRI E VITALI ALLA TEMPERATURA DELL’AZOTO LIQUIDO** e sono in grado di ricostituire una coltura di gemogli o una linea cellulare quando reintrodotti in coltura *in vitro*

# TECNICA CLASSICA:

## Slow cooling (raffreddamento controllato)



**In sostanza crioprotettiva (ad es. glicerolo, DMSO, etilenglicole, abbassano la temperatura di congelamento di una soluzione. Glicerolo e DMSO hanno anche funzione di “scavenger” dei radicali liberi che si possono formare durante l’ultra-raffreddamento)**

L’acqua presente negli spazi extra-cellulari inizia a congelare per prima, determinando una concentrazione della soluzione residua e tras migrazione per osmosi di molecole d’acqua dall’interno verso l’esterno della cellula, con conseguente aumento della concentrazione della soluzione citoplasmatica “criodisidratazione”.

# TECNICA CLASSICA:

## Slow cooling (raffreddamento controllato)

La tecnica presenta alcuni inconvenienti:

- necessità di servirsi di **ATTREZZATURE PARTICOLARI** (i criorefrigeratori a decremento termico controllato)
- SCARSA RIPETIBILITÀ** dei risultati quando impiegata per la conservazione di **ORGANI COMPLESSI** (quali le gemme)



criorefrigeratore a decremento termico controllato

# TECNICHE MODERNE:

## Trattamento con soluzione vitrificante

Questa tecnica si è rivelata una tra le più efficaci.

Consiste nel trattare il materiale vegetale con una miscela, molto efficace nel proteggere e promuovere la disidratazione, formata da 3 crioprotettivi:

1. Glicerolo

2. DMSO

3. Glicol etilenico

4. Una miscela di formammide con DMSO, glicole propilenico e un colloide è stata per molti anni il più efficace di tutti i crioprotettori creati artificialmente. Le miscele di crioprotettori sono state usate per la vetrificazione, cioè la solidificazione senza alcuna formazione di cristalli di ghiaccio. La vetrificazione ha importanti applicazioni nella preservazione degli embrioni, dei tessuti biologici e degli organi per il trapianto.

# TECNICHE MODERNE: Incapsulazione-disidratazione

OGNI SPECIE ED OGNI TIPO DI ESPIANTO RICHIEDONO DIVERSI TEMPI DI TRATTAMENTO

Il tempo deve essere SUFFICIENTEMENTE LUNGO per garantire la protezione ma NON ECCESSIVAMENTE LUNGO per evitare l'intossicazione degli espianti



# TECNICHE MODERNE: Incapsulazione-disidratazione

## TECNOLOGIA DEI SEMI SINTETICI

Immersione degli espianti in alginato di sodio

Si fa gocciolare l'alginato in una soluzione di cloruro di calcio (ogni goccia contiene un espianto)

Le gocce solidificano (scambio cationico) e si formano capsule sferiche solide (semi sintetici)

Disidratazione in flusso di aria secca sterile

Immersione in azoto liquido

Scongelamento e reintroduzione in coltura



# SEMI SINTETICI



Embrioni inclusi in pallini di alginato di calcio