

EMBRIOGENESI DA POLLINE

L'androgenesi può essere considerato un processo apomittico, poiché non si ha missia cioè fusione dei gameti. *In vitro* l'androgenesi riguarda la formazione dell'embrione a partire da granelli di polline, preferibilmente allo stadio di microspore uninucleate, senza il coinvolgimento del gamete femminile e quindi senza fecondazione. L'embrione che si forma con tale processo è aploide e presenta esclusivamente i caratteri genetici portati dal gamete maschile. Tale processo comporta la riprogrammazione del metabolismo cellulare delle microspore stesse e nuova espressione spazio-temporale di geni che regolano l'embriogenesi.

Perchè produrre Aploidi

- Produzione di linee omozigoti.
- L'aploidia delle piante presenta numerosi vantaggi, con tale tecnica sono state selezionate linee isogeniche dotate di resistenza a insetti, funghi e virus. La disponibilità di queste linee ha rappresentato un passo importante anche verso la costituzione di ibridi

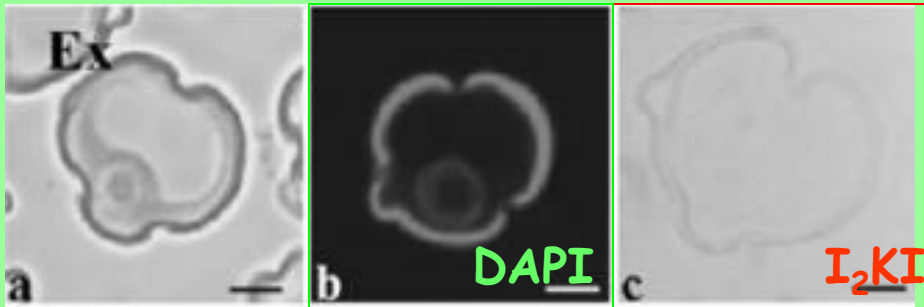
un metodo efficace per produrre piante diploidi omozigoti che potranno poi essere propagate per oganogenesi

Al fine di identificare e selezionare il materiale di partenza della coltura è necessaria un'analisi della morfologia del bocciolo florale, della misura delle antere e studiare lo stato di maturazione del polline per cogliere la fase di microspora uninucleata in vacuolizzazione tardiva, migliore per far partire il processo androgenetico. Si effettua colorando con DAPI le antere schiacciate su un vetrino.

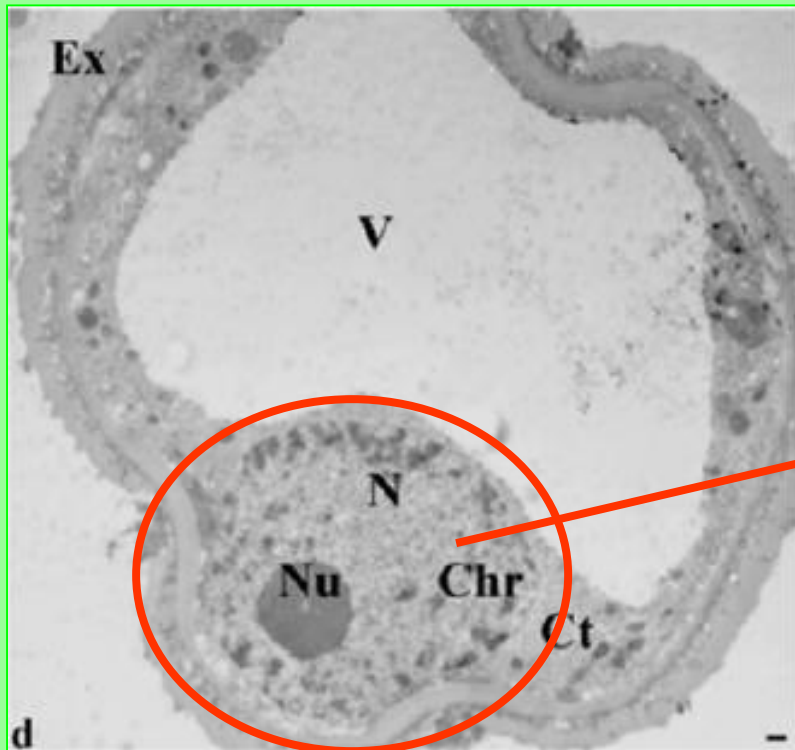
Il processo androgenico prevede tre fasi fondamentali:

- **FASE 1** acquisizione della potenzialità embriogenetica da parte della microspora mediante un fattore di stress: quindi da una parte repressione del normale sviluppo del gametofito maschile, dall'altra indirizzamento verso una via embriogenetica.
- **FASE 2** divisione cellulare della microspora che conduce ad uno stato multicellulare
- **FASE 3** passaggio dalla struttura multicellulare (definita embryo-like structure) ad un embrione vero e proprio

NORMALE SVILUPPO GAMETOFITICO



le microspore vacuolate esibiscono un grande vacuolo, nucleo periferico e nessun accumulo di amido, il citoplasma formato da un sottile strato al di sotto dell'intina.

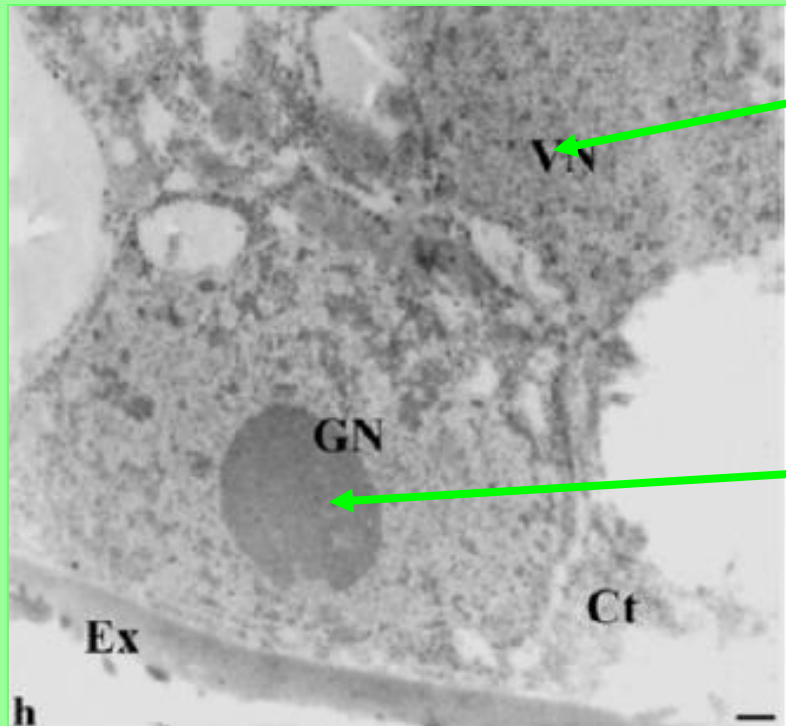
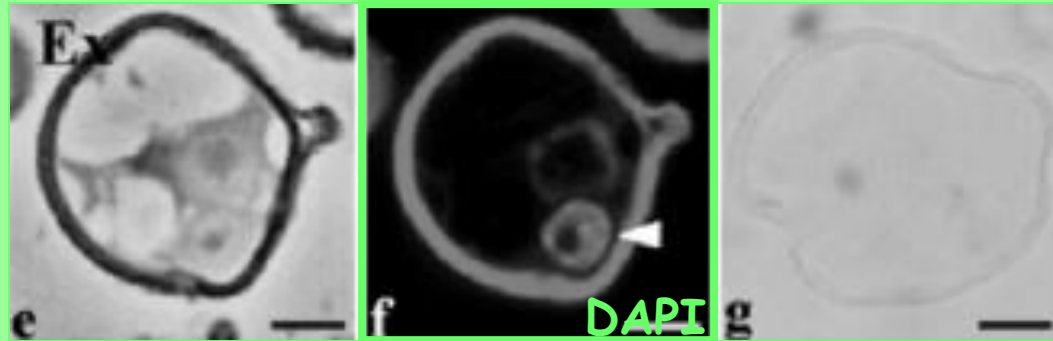


Il nucleo mostra cromatina decondensata, un nucleolo ben sviluppato simbolo di intensa attività di trascrizione.

NORMALE SVILUPPO GAMETOFITICO

I divisione mitotica formazione del granulo pollinico bicellulare

La cellula generativa appare attaccata all'esina ed in stretta vicinanza al nucleo vegetativo che è circondato da grandi vacuoli

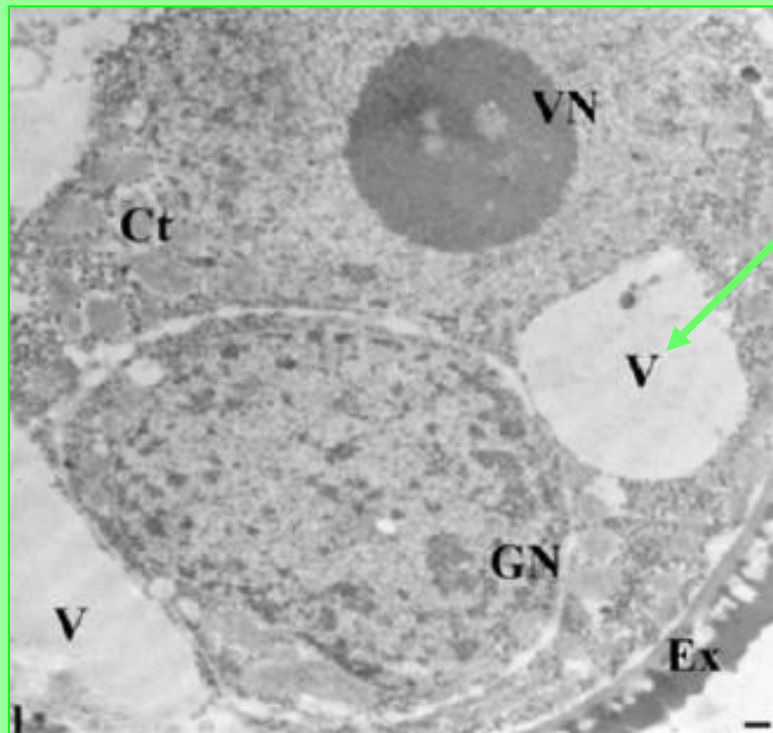
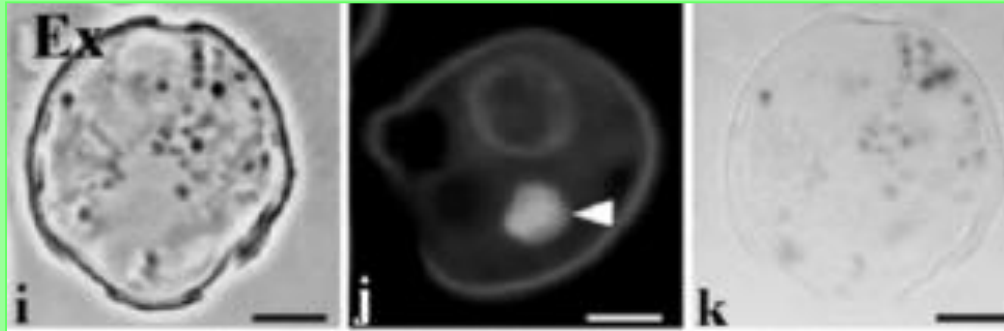


nucleo vegetativo con cromatina lassa

nucleo germinativo con cromatina densa

NORMALE SVILUPPO GAMETOFITICO

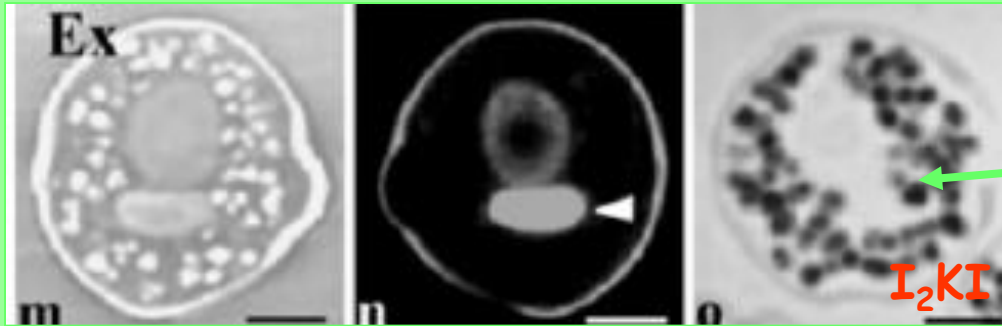
POLLINE BICELLULARE



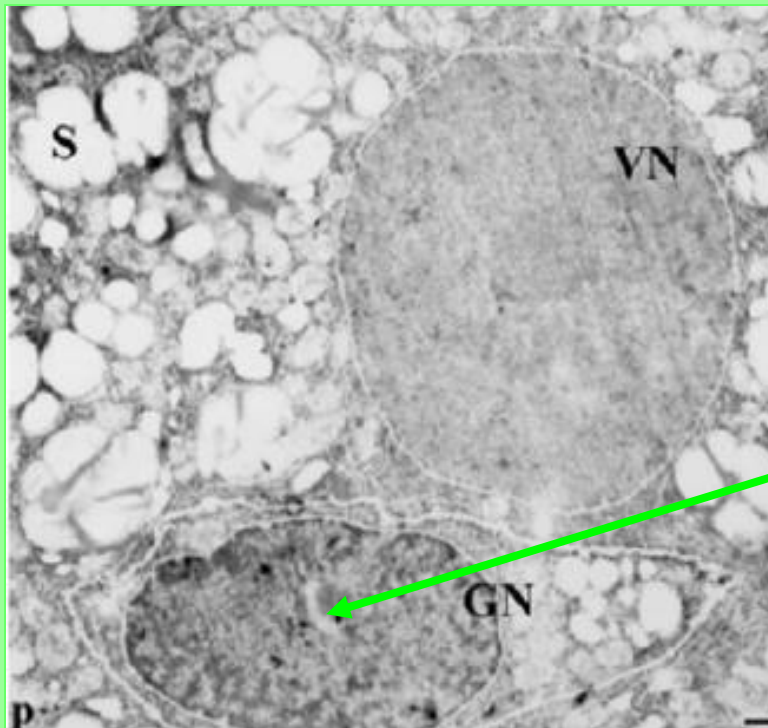
I vacuoli diminuiscono di dimensioni e aumentano gli amiloplasti, aumentano tutti gli organelli, RE e ribosomi. Un intenso accumulo di amido è stato osservato e si ritiene sia associato con lo stabilire la polarità ed il destino cellulare. La cellula generativa si stacca dall'intina e si colloca al centro del granulo di polline. La cellula generativa ed il suo nucleo assumono forma allungata con cromatina altamente condensata

NORMALE SVILUPPO GAMETOFITICO

Granuli di polline maturo



È evidente un citoplasma molto denso con un alto contenuto in amido



La cellula generativa mostra una forma allungata con cromatina altamente condensata

Un iniziale stress è la componente essenziale per indurre l'androgenesi.

EMBRIOGENESI DA POLLINE IN *Capsicum annum* L.: riarrangiamenti subcellulari durante le prime fasi dello sviluppo dell'embrione.

Biol. Cell (2005) **97**, 709-722

Le antere sono state pretrattate con uno shock termico a 35°C per 8 giorni

Esistono specifiche proteine a basso peso molecolare HSP (*Heat Shock Proteins*) prodotte dalle microspore dopo elicitazione che possono essere considerate marcatori molecolari dell'androgenesi, attraverso i quali verificare se le microspore stanno rispondendo allo stress o meno, in altre parole se sono potenzialmente androgeniche.

Per indurre la microspora all'androgenesesi bisogna agire con uno stress che induce la microspora a cambiare il suo programma di sviluppo e formare due cellule uguali che daranno l'avvio dell'embriogenesi aploide. Nell'orzo è stato utilizzato uno stress osmotico, attraverso incubazione delle antere con mannitolo. Ma recenti esperimenti hanno dimostrato che si può ricorrere anche a stress con calcio e acido abscissico; per il frumento è stato utilizzato uno stress da calore. E' stato osservato che quando c'è meno contatto tra le microspore e quando viene distrutta la loro organizzazione ordinata nello spazio c'è più possibilità di deviare il loro sviluppo verso una via androgenica.

E' sufficiente un trattamento di calore (32°C) durante le prime 8 ore di coltura delle microspore per indurre l'androgenesesi. Per il tabacco è stato utilizzato come stress la privazione di alcuni nutrienti come la glutammina e lo zucchero e poi trasferimento in un terreno con elevato glucosio. Ma altri stress abiotici possono essere utilizzati come uso di colchicina, mancanza di azoto, auxina, bassa temperatura e radiazioni gamma in associazione a calore.

16.6 OTTENIMENTO DI APLOIDI MEDIANTE ANDROGENESI E GINOGENESI

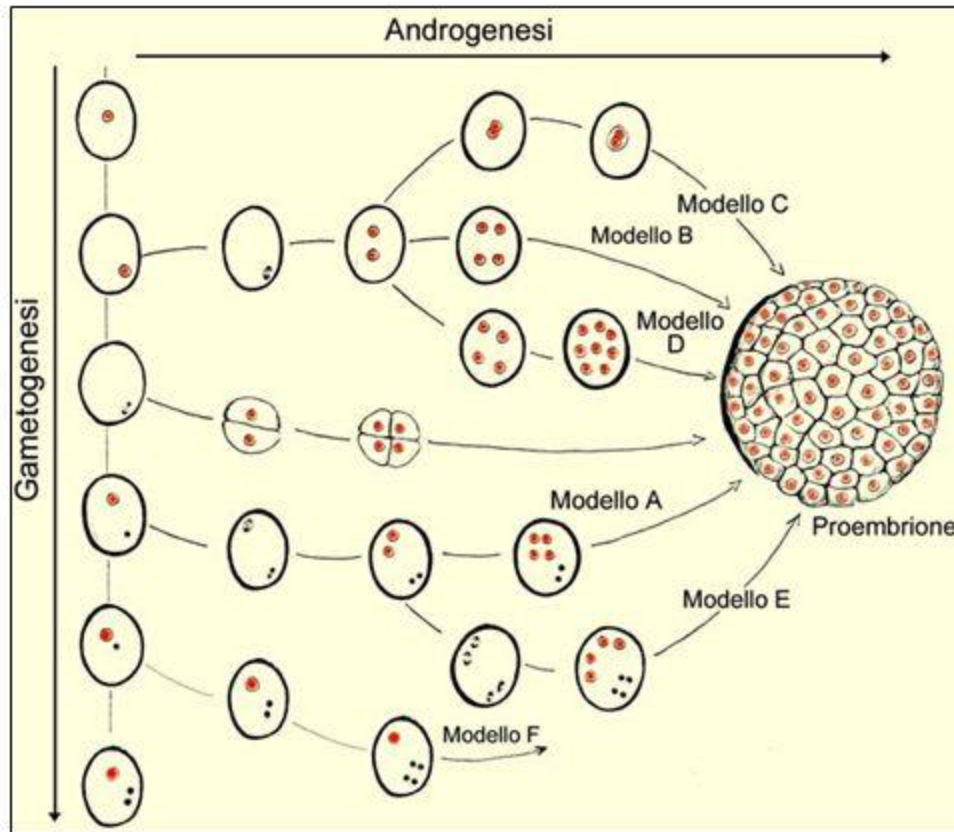


Figura 16.26
Modelli di sviluppo
della microspora
fino alla formazione di un
proembrione androgenetico.

MATERIALI E METODI



Capsicum annuum L.

Mezzo Cp
2.4D 0.01 mg/l
Kinetina 0.01 mg/l

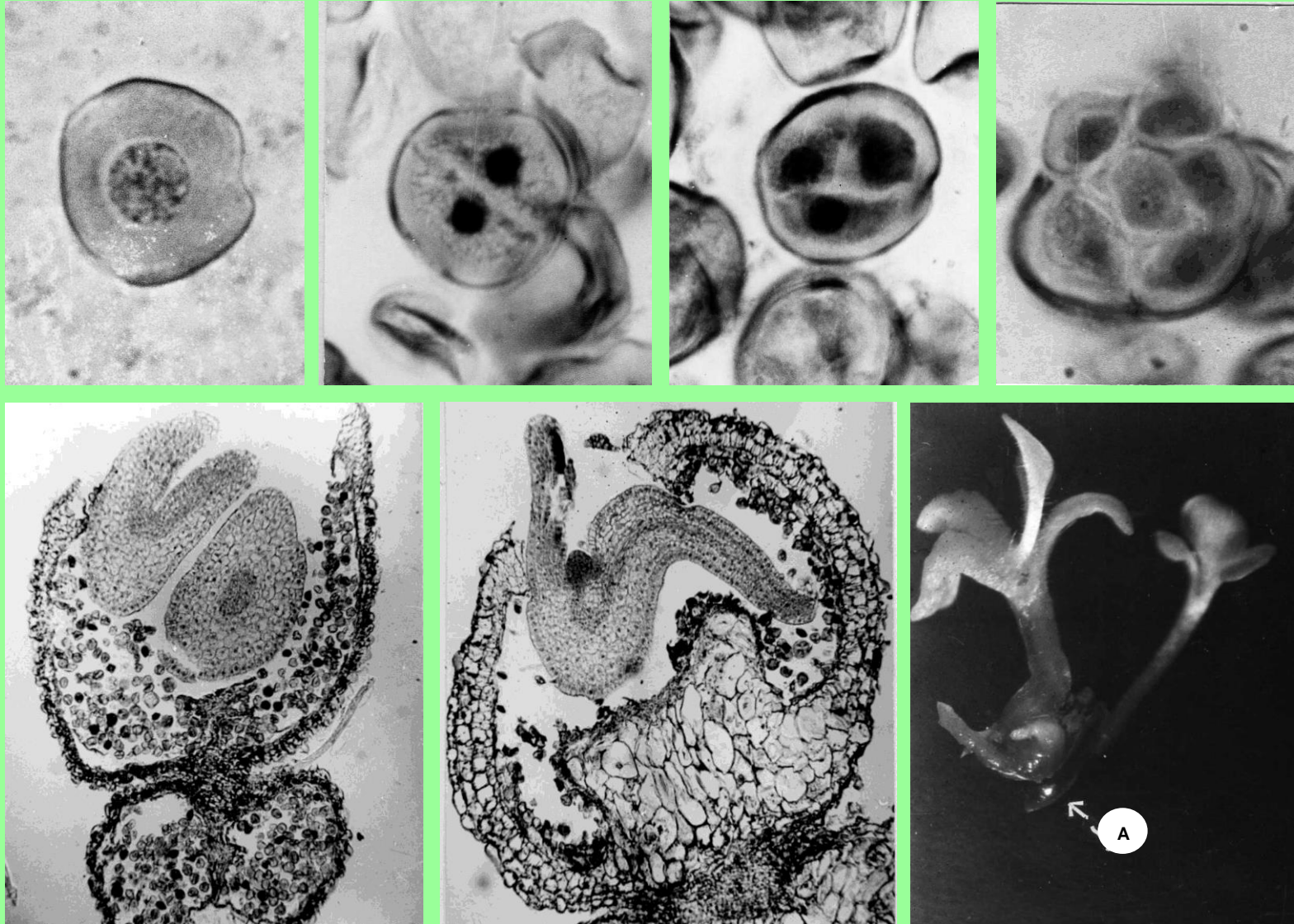
Mezzo R1
Kinetina 0.1 mg/l

12 giorni

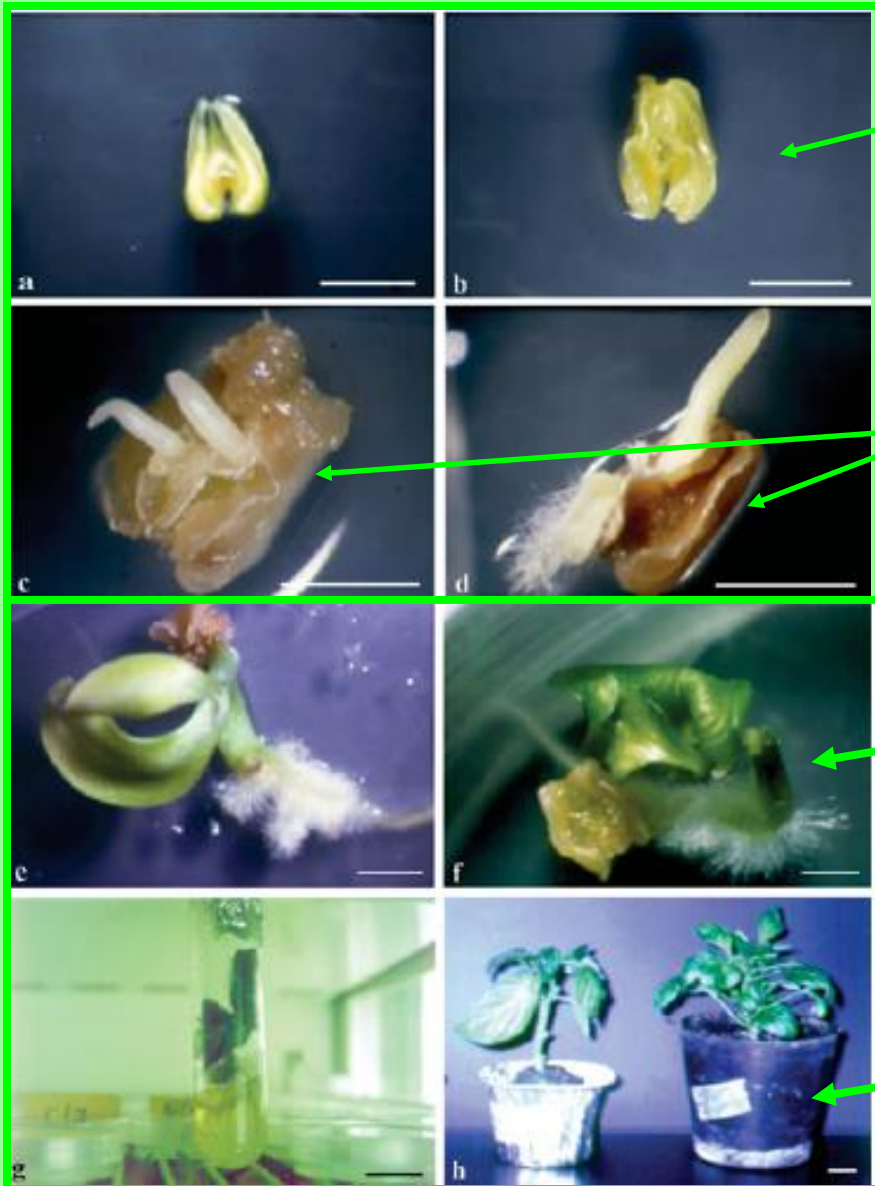
Dopo il trattamento induttivo alcune microspore si dividono formando due cellule uguali in taglia e struttura, bassa densità citoplasmatica e vacuoli. Molte microspore vanno incontro a morte o si bloccano nello sviluppo

In molte specie la potenzialità androgenica si manifesta con un aumento delle dimensioni della microspora, al suo interno è presente un grosso vacuolo centrale e il citoplasma risulta notevolmente ridotto. È importante precisare che non solo cambiamenti dimensionali sono coinvolti nel processo, ma anche riarrangiamenti citoplasmatici come riduzione dei granuli di amido e lipidi, riduzione del numero dei ribosomi. Il granulo bicellulare prolifera dando una struttura multicellulare formata da piccole cellule con denso citoplasma, confinate entro l'esina. Poi l'esina si rompe ed una massa embriogenica sferica o proembrioni vengono rilasciati.

Formazione di embrioni aploidi a partire da una coltura di polline di tabacco.



Se dalla prima divisione della microspora uninucleata si forma la cellula generativa questa viene eliminata per morte cellulare programmata non partecipando al processo androgenico. La cellula vegetativa migra al centro, grazie ad una nuova distribuzione del citoscheletro (microtubuli e filamenti di actina). Contemporaneamente il grosso vacuolo si divide in frammenti orientati radialmente nel citoplasma. Così otteniamo una struttura a stella definita star-like structure, che segna proprio il raggiungimento definitivo della potenzialità androgenica. A questo punto la cellula vegetativa si moltiplica, attraverso divisioni simmetriche successive, fino a originare una struttura multicellulare



6° giorno di coltura

30° giorno

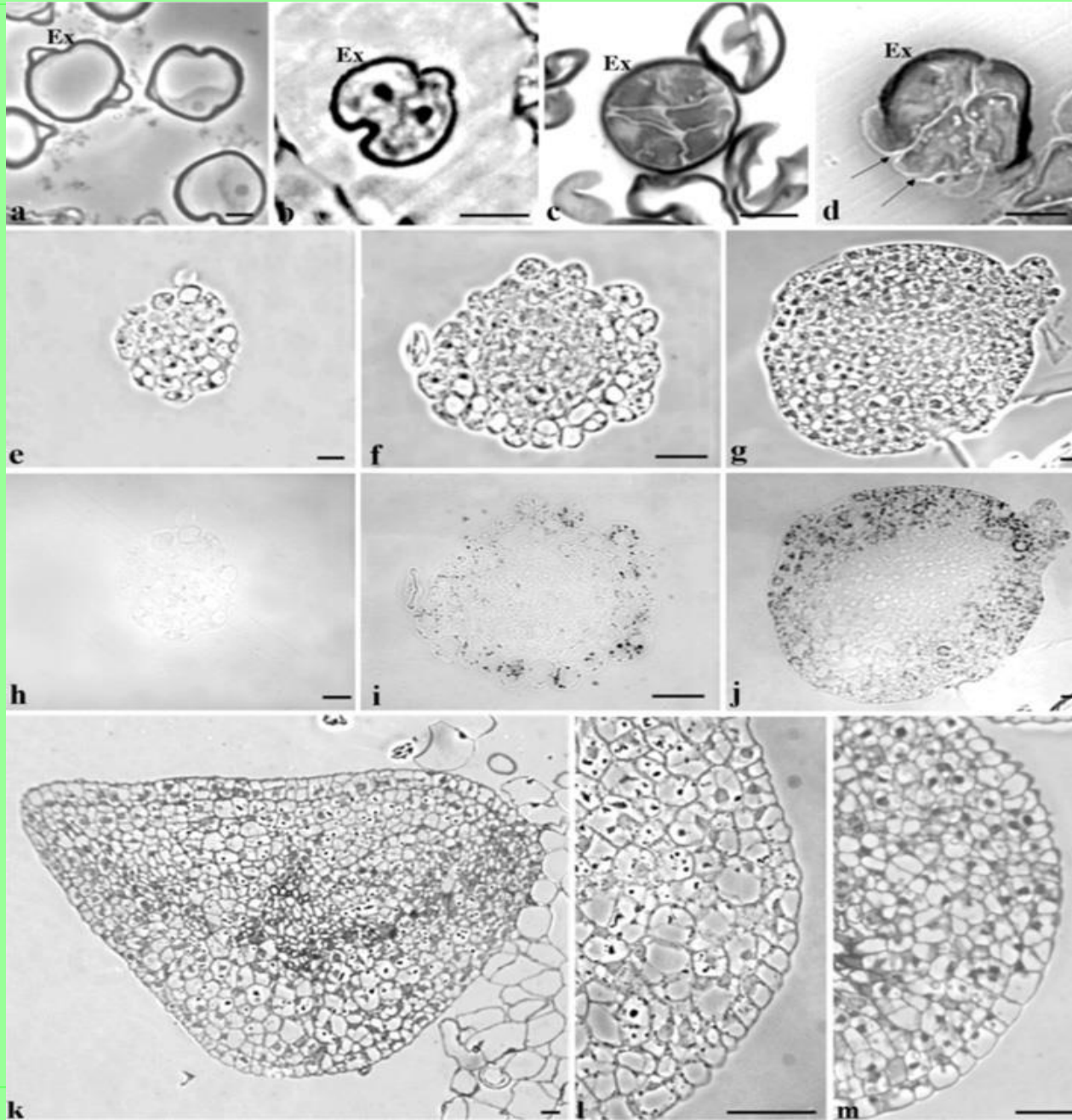
Le piantine germinate sono trasferite in un terreno HF

80° giorno

aploide

diploide

SVILUPPO DI EMBRIONI DA MICROSPORO



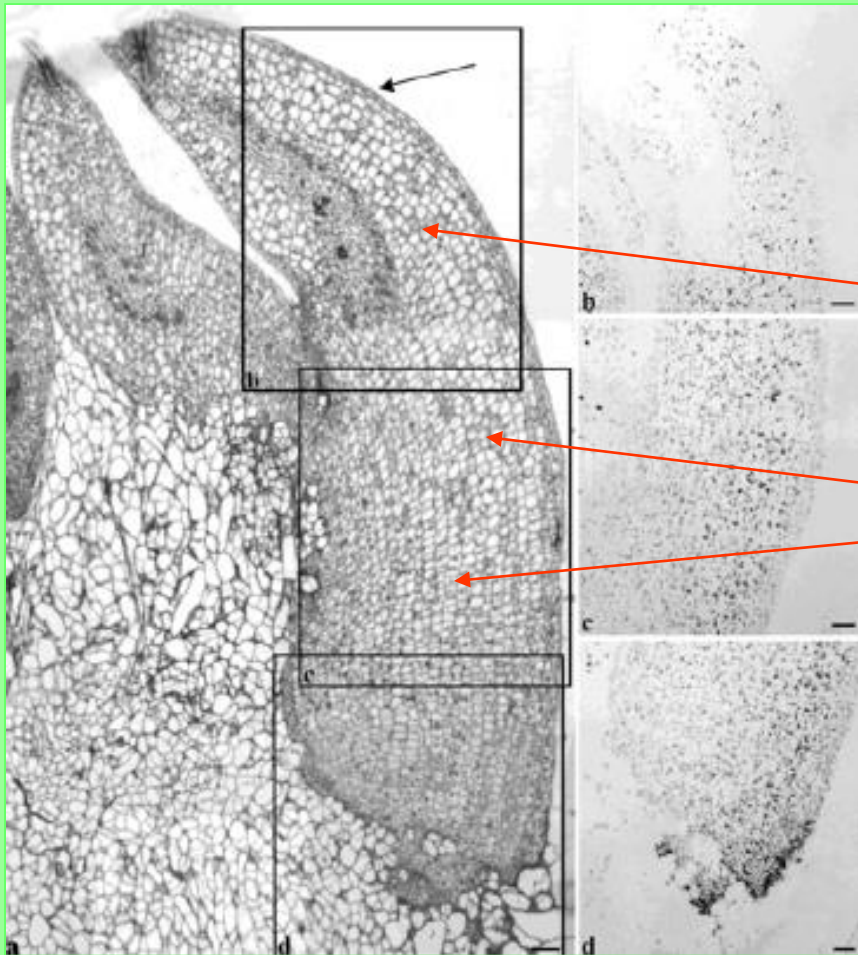
le cellule sono
altamente vacuolate,
nucleo centrale,
forma poligonale

Non si osserva
accumulo di amido,
ma si distinguono 2
strati cellulari

Negli stadi successivi si
osserva amido nello
strato più esterno e le
differenze cellulari
sono più evidenti

Come l'embriogenesi procede le strutture diventano più grandi e più sferiche, simili ad embrioni globulari, il sospensore è assente. Si definisce un pattern ben evidente di strati cellulari più esterni e più profondi. Si osserva una maggiore deposizione di amido negli strati esterni. Gli embrioni poi si allungano dando luogo allo stadio a cuore. Allo stadio globulare e successivi, si osservano strati di cellule piccole e isodiametriche nella parte esterna. Gli strati più periferici mostrano una morfologia simile al protoderma dell'embrione zigotico. Allo stadio di torpedo è possibile riconoscere i diversi tessuti: l'epidermide, i primordi dei cotiledoni ed il parenchima. Si osserva una differente distribuzione dell'amido nelle cellule. Le cellule parenchimatiche mostrano accumulo di amido, non visibile nell'epidermide e nei primordi dei cotiledoni. Si osserva presenza di amido nelle cellule della cuffia radicale.

SVILUPPO DI EMBRIONI DA MICROSPORE

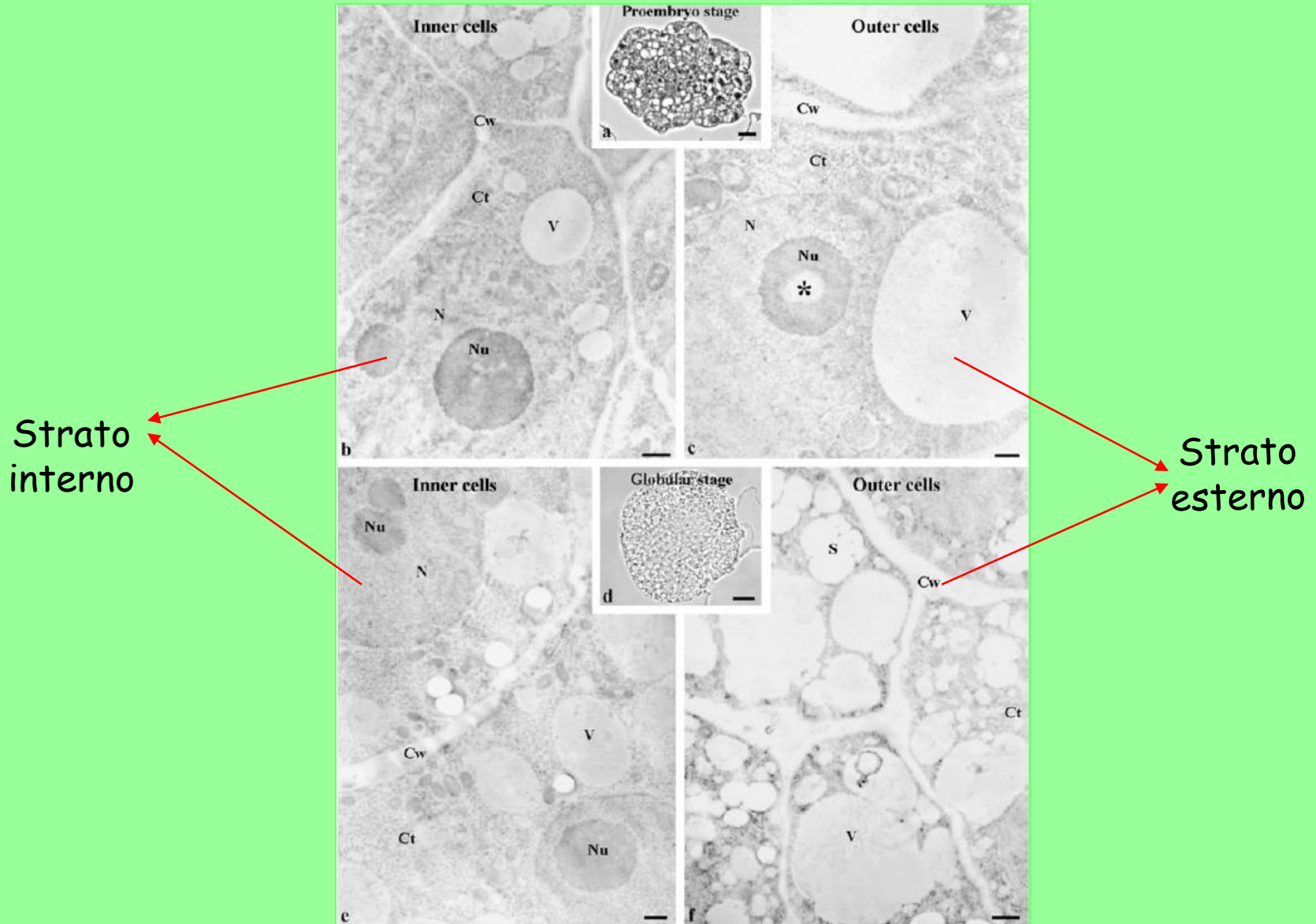


Allo stadio a torpedo si evidenziano già i diversi tessuti

Primordio cotiledonare: non è evidente accumulo di amido

Parenchima con accumulo di amido

ULTRASTRUTTURA DI PRO-EMBRIONI ED EMBRIONI GLOBULARI



CONCLUSIONE : INDIVIDUAZIONE DEI MARKER CELLULARI

- *DIVISIONE SIMMETRICA*
- *ASSENZA DI AMIDO (associato con fenomeni differenziativi)*
- *NUCLEO CON CROMATINA DECONDENSATA (nella normale microsporogenesi, la cellula vegetativa mostra cromatina dispersa e nucleolo attivo, mentre il nucleo generativo mostra bassa attività trascrizionale dimostrata da cromatina condensata e nucleolo compatto)*
- *DOPO LA DIVISIONE SIMMETRICA i nucleoli sono compatti, indicando una ripresa dell'attività trascrizionale che avviene in fase G1)*

STADI DI SVILUPPO EMBRIONALE SIMILI A QUELLI DI EMBRIONI ZIGOTICI una volta che i proembrioni sono stati rilasciati dall'esina

INDUZIONE DI DIPLOIDIZZAZIONE

COLCHICINA. - È un alcaloide contenuto nei semi (3%), nei bulbi (0,40%), e del resto in tutta la pianta del colchico.

Nei tessuti animali che questa azione consiste nell'arresto delle divisioni nucleari e che essa pertanto si può considerare un veleno mitotico

Nelle cellule vegetali è capace di indurre mutazioni e poliploidia

Effetto fondamentale della colchicina sulla mitosi è la distruzione dell'apparato del fuso con conseguente superspiralizzazione (o contrazione dei cromosomi), e un ritardo della divisione del centromero; i cromosomi si dividono, sia pure con ritardo, ma le loro metà figlie (cromatidi) non sono distribuite ai poli.

La mitosi influenzata dalla colchicina prende il nome di "c-mitosi" (A. Levan), o meglio di "c-mitosi restituzionale" (E. Battaglia).

INDUZIONE DI DIPLOIDIZZAZIONE

Se la droga inizia la sua azione al principio della metafase, i cromosomi con la scomparsa della membrana nucleare non vanno in piastra equatoriale e non si orientano ma si sparpagliano invece per la cellula in modo del tutto irregolare, perché non ancorati alle fibrille acromatiche del fuso. Si realizza così una figura pseudometafasica, durante la quale i cromatidi restano lungamente riuniti fra loro dal centromero: scompare gradualmente ogni rapporto di torsione fra ciascun paio di cromatidi i quali si respingono pur essendo ancora riuniti fra loro dal centromero indiviso, essi acquistano così un aspetto ad X. Le c-paia rimangono incluse in un unico nucleo che prende il nome di "c-nucleo di restituzione". Se la divisione centromerica è precoce, i cromatidi restano affiancati parallelamente a guisa di un "paio di sci" (Levan).

Nella "c-mitosi" è soppresso lo stadio caratteristico dell'anafase; questo è particolarmente vero quando la concentrazione della droga è tale da determinare una "c-mitosi completa" con totale inattivazione del fuso.

Se l'azione della droga continua, il processo della c-mitosi si ripete più volte portando alla formazione di nuclei altamente poliploidi: nei meristemi delle radici colchicinizzate di *Allium Cepa* sono stati osservati da Levan nuclei contenenti oltre un migliaio di cromosomi ($128n = 1024$).

INDUZIONE DI PIANTE DIPLOIDIZZATE

Piante diploidizzate si ottengono:

- Inducendo produzione di callo in espianti caulinari o fogliari di piante aploidi.
- Stimolando nel callo l'endocitosi attraverso l'uso di colchicina che determina il raddoppio dei cromosomi
- Induzione di caulogenesi da callo
- Ottenimento di piante diploidizzate fertili
- Tempi dimezzati rispetto alle normali tecniche di incrocio e selezione

Fecondazione *in vitro*

La prima fusione *in vitro* di singoli gameti maschili e femminili isolati da angiosperme fu messa a punto circa 20 anni fa attraverso lo sviluppo di tecniche di micromanipolazione. Alcune di queste tecniche vennero inizialmente sviluppate per i protoplasti da cellule somatiche. E' stato necessario mettere a punto un sistema di coltura per sostenere la crescita di un singolo o pochi zigoti e cellule dell'endosperma.

Le tre principali microtecniche coinvolte nella fecondazione *in vitro* sono:

- Isolamento, manipolazione e selezione di gameti maschili e femminili
- Fusione di coppie di gameti
- Colture di singole cellule

Tutte queste procedure sono state usate per ottenere cellule uovo e cellule centrali isolate, non fecondate, da prendere come materiali di partenza per una serie di analisi su processi di sviluppo precoci. Le cellule spermatiche delle angiosperme richiedono l'isolamento dai granuli di polline o dai tubetti tramite shock osmotico o schiacciamento, mentre i gameti femminili devono essere separati dal sacco embrionale tramite mezzi meccanici o anche usando miscele di enzimi per la degradazione della parete cellulare in combinazione con una procedura di isolamento manuale. Nel mais, per esempio, il trattamento del tessuto nucellare con tali enzimi, per un breve periodo, prima dell'isolamento manuale è spesso utile per evitare danni ai protoplasti gametici. I protoplasti gametici possono essere fusi con i metodi utilizzati per la fusione di protoplasti somatici. La co-coltura con cellule nutrici o cellule uovo è generalmente necessaria per sostenere la crescita degli zigoti e dell'endosperma. Una fecondazione completa, che consiste in embriogenesi, rigenerazione della pianta e sviluppo dell'endosperma a partire da gameti maschili e femminili isolati e fusi *in vitro*, è stata raggiunta finora solo nel mais e nel riso usando l'elettrofusione dei gameti e la coltura assieme a cellule nutrici.

Tecniche di fusione in vitro

Singoli gameti isolati sono stati fusi elettricamente e con agenti chimici, come calcio o glicole polietilenico.

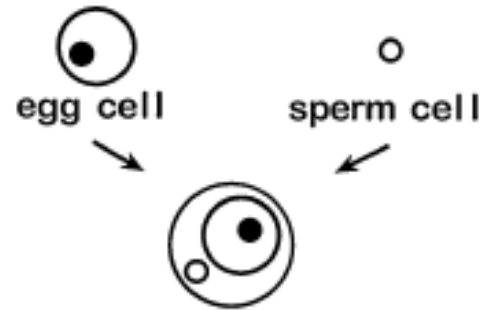
La fusione tramite impulsi elettrici è ben stabilizzata e produce efficientemente un numero sufficiente di zigoti per studi sulla crescita e analisi molecolari.

Per ottenere la fusione non elettrica, i gameti sono allineati manualmente tramite piccoli aghi.

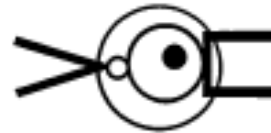
Il metodo della fusione mediata da calcio può essere usato per identificare i fattori che promuovono l'adesione, la fusione delle membrane e gli eventi di riconoscimento che hanno luogo durante la fecondazione. Tuttavia l'efficienza di questa procedura deve essere ancora ottimizzata. Sebbene dopo la fusione mediata dal calcio avvenga lo sviluppo iniziale dell'embrione, non ci sono stati casi di sviluppo continuo o generazione di piante. La ragione potrebbe essere il basso numero di zigoti ottenuti finora con questa metodica, che potrebbe essere insufficiente per gli esperimenti di crescita.

Così come per i protoplasti ottenuti da cellule somatiche, le condizioni osmotiche dei protoplasti ottenuti da cellule gametiche sono fattori importanti per la fusione. Il turgore dei gameti deve essere elevato. Lo sviluppo dopo la fusione è stato finora ottenuto nelle monocotiledoni, ma non nelle dicotiledoni sia perché la piccola taglia dei gameti non permette una loro facile manipolazione e distinzione morfologica, sia perché gli stadi del ciclo cellulare nei gameti maschili e femminili isolati non coincidono, e perciò non si attivano i processi di divisione nucleare e cellulare. In questi casi potrebbe essere utile l'isolamento di queste cellule tramite microdissettore laser.

Isolation

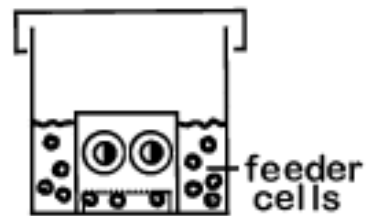


Electrofusion

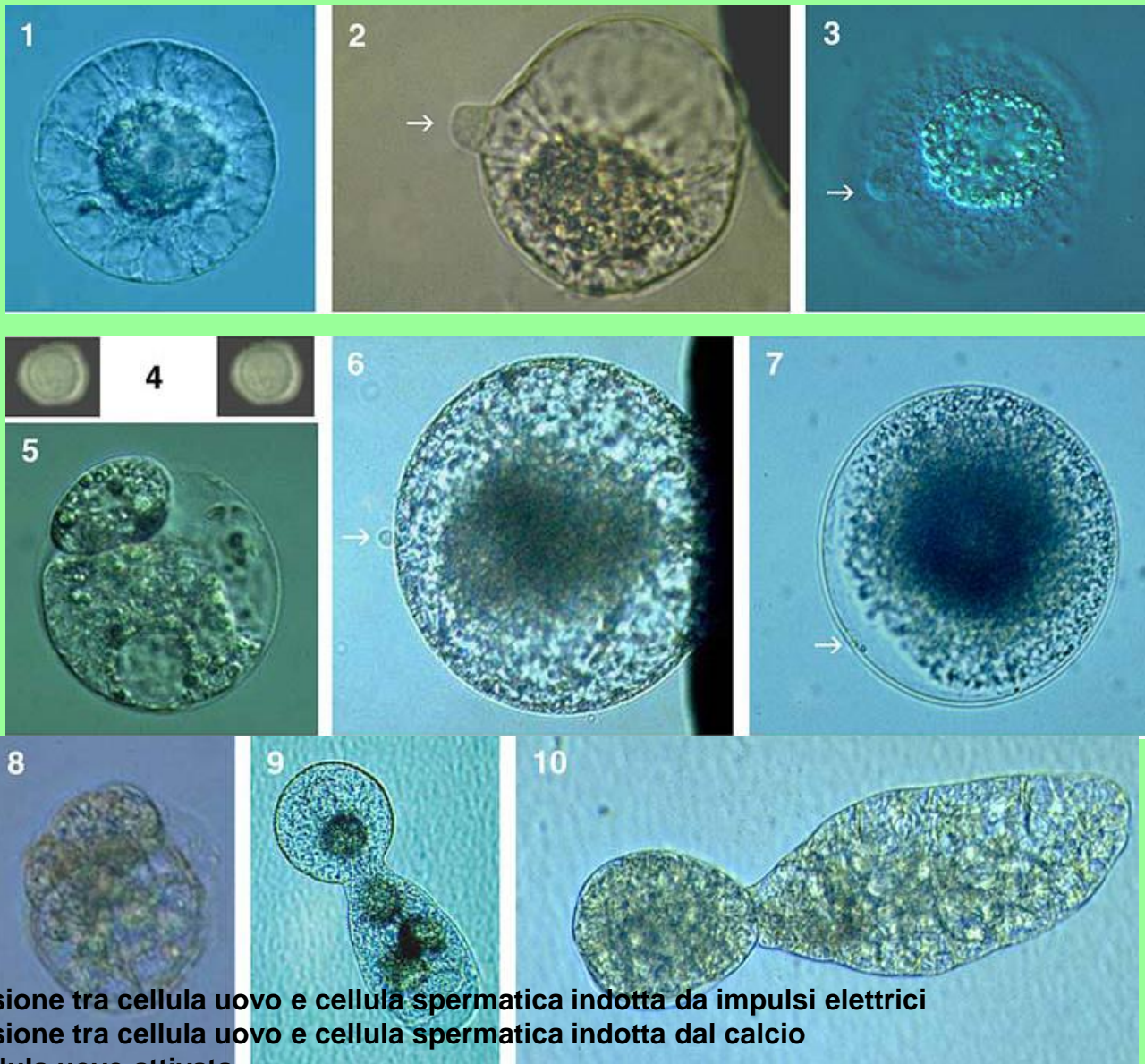


fertilized egg cell

Culture



millicell



- Fusione tra cellula uovo e cellula spermatica indotta da impulsi elettrici
- Fusione tra cellula uovo e cellula spermatica indotta dal calcio
- Cellula uovo attivata
- Prima divisione asimmetrica dello zigote prodotto *in vitro*
- Fusione tra cellula spermatica e cellula centrale indotta da impulsi elettrici
- Fusione tra cellula spermatica e cellula centrale indotta dal calcio
- Giovane embrione sviluppato da zigote prodotto *in vitro*
- Cellula dell'endosperma primario sviluppata dopo fusione *in vitro* della cellula centrale e spermatica