

Variabilità somaclonale e selezione di somacloni



Le piante possono essere moltiplicate dall'uomo mediante:

• RIPRODUZIONE SESSUALE

Semi

Piante figlie geneticamente diverse tra loro e rispetto alla pianta madre

• RIPRODUZIONE ASESSUALE (propagazione vegetativa)

- Metodi tradizionali (talea)
- Moltiplicazione *in vitro*

Clone: piante figlie geneticamente identiche tra loro e alla pianta madre

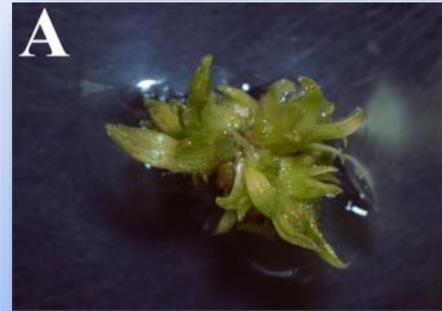
Le piante di interesse commerciale vengono spesso moltiplicate mediante riproduzione asexuale ...



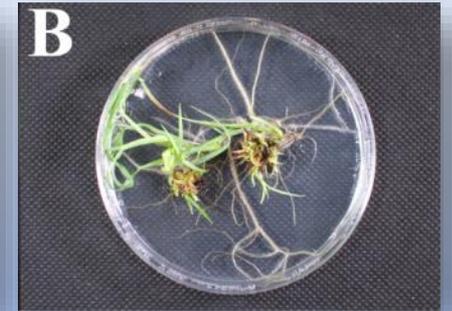
... per far si che le piante figlie conservino i caratteri della pianta madre e che non emergano nuovi caratteri indesiderati

La propagazione *in vitro* delle piante viene effettuata principalmente attraverso:

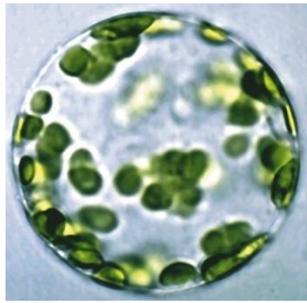
- **ORGANOGENESI DIRETTA**
Moltiplicazione di germogli e loro radicazione (micropropagazione)



Germogli multipli



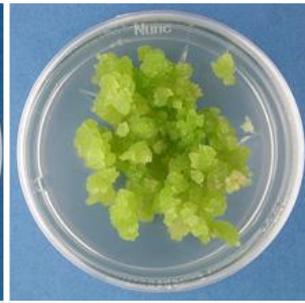
Germogli radicati



Protoplasto



Callo buio



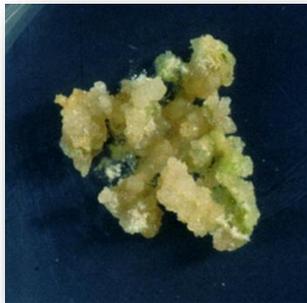
Callo luce

- **ORGANOGENESI INDIRETTA**
Rigenerazione da cellule indifferenziate

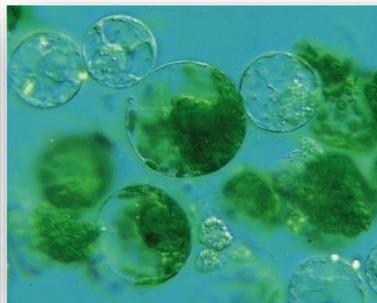
ORGANOGENESI INDIRETTA

Rigenerazione da callo o da protoplasti

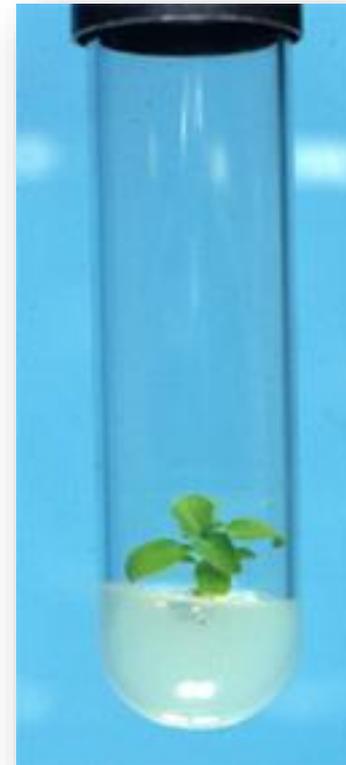
Callo



Protoplasti



Plantula



La plantula rigenerata può essere messa a dimora se il sistema vascolare delle radici è connesso con quello del germoglio

Caulogenesi (*Citochinine*)



Germogli multipli

Rizogenesi (*Auxine*)



ORGANOGENESI DIRETTA

Moltiplicazione di germogli



Germoglio

Citochinine
inibizione
dominanza
apicale



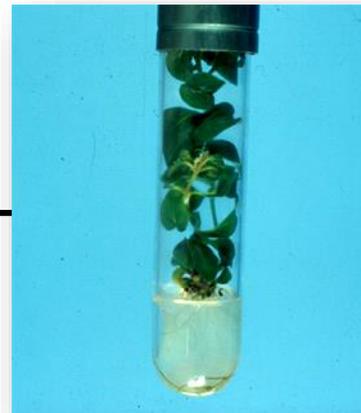
Germogli multipli

- Separazione dei germogli
- Radicazione



Pianta

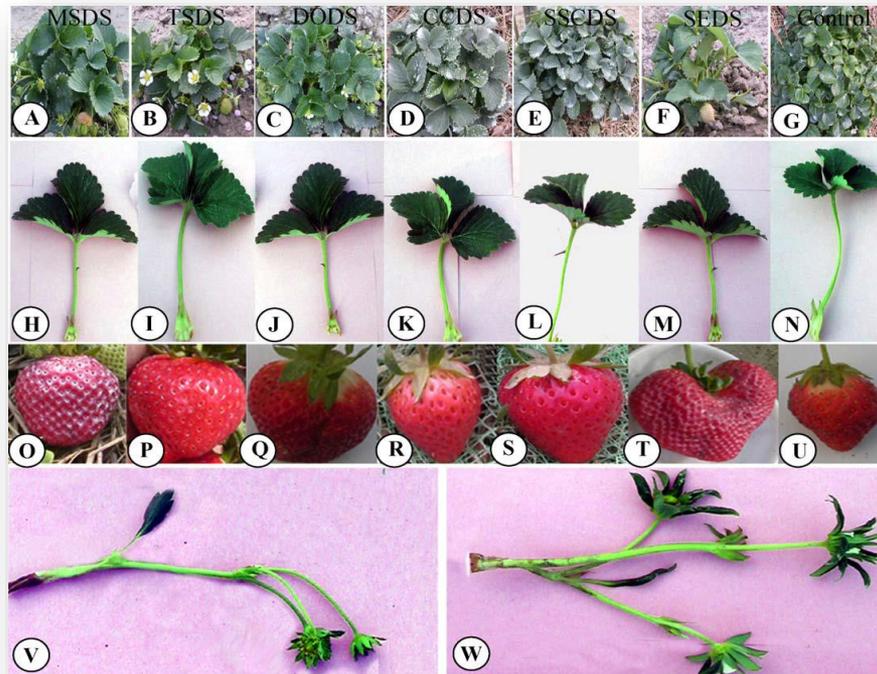
Messa a dimora
Previa
acclimatazione



Plantula

Spesso le piante propagate *in vitro* presentano eterogeneità fenotipica

(seppure originate da espianti della medesima pianta madre!)



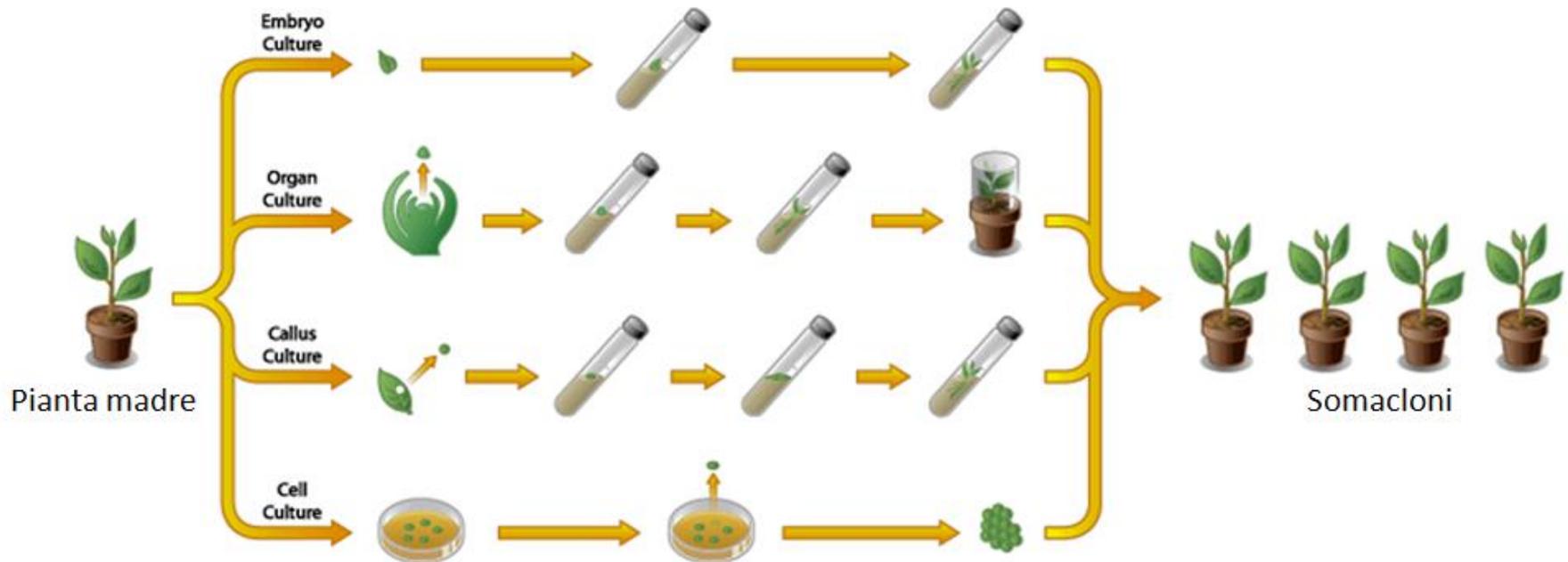
M.K. Biswas, M. Dutt, U.K. Roy, R. Islam, M. Hossain - Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits - *Scientia Horticulturae* 122 (2009) 409–416

Tale fenomeno è molto più frequente (ma non esclusivo) in piante rigenerate da cellule indifferenziate

Somacloni e variabilità somaclonale

definizione

The term 'somaclone' was coined to refer to plants derived from any form of cell culture, and the term 'somaclonal variation' was coined to refer to the genetic variation among such plants.



Variabilità somaclonale

Alterazioni geniche

Mutazioni puntiformi

Sostituzioni nucleotidiche

Mutazioni cromosomiche

Delezioni
Inversioni
Duplicazioni
Traslocazioni

Modificazioni genomiche

Poliploidia
Aneuploidia

Modificazioni epigenetiche

Metilazione del DNA

Variabilità somaclonale

Alterazioni geniche ereditabili/non ereditabili

Mutazioni puntiformi

Mutazioni cromosomiche

Modificazioni genomiche

Modificazioni epigenetiche

Stabili
Ereditabili

Instabili
Non ereditabili

Variabilità somaclonale

Alterazioni geniche ereditabili/non ereditabili

Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits

M.K. Biswas^{a,b,*}, M. Dutt^c, U.K. Roy^b, R. Islam^b, M. Hossain^{b,*}

^a National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, 430070, Wuhan, PR China

^b Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh

^c Citrus Research and Education Center, UF/IFAS, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, FL 33850, United States

EPIGENETIC VARIATION is often **unstable** and can disappear either **after plants are removed from culture** or within a few **clonal or sexual generations** (Kaeppler et al., 2000), while **GENETIC VARIATION** is **stable** and then **heritable** (Skirvin et al., 1994).

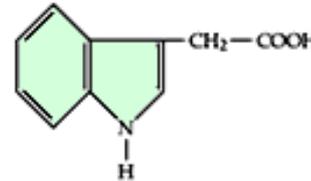
The **success in applying somaclonal variation** in plant breeding is therefore dependent on the **genetic stability of the selected somaclones**.

Variabilità somaclonale

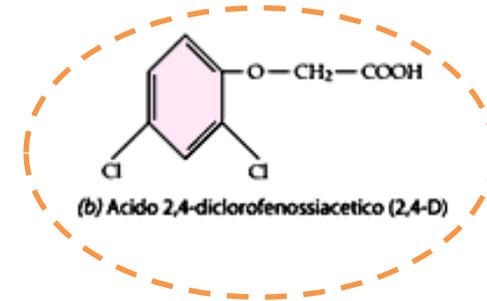
Fattori determinanti

Numerosi studi hanno evidenziato una correlazione tra variabilità somaclonale e:

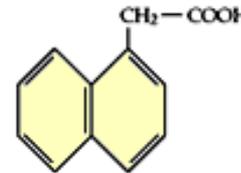
1) tipo e concentrazione di auxine nel mezzo colturale



(a) Acido indolacetico (IAA)

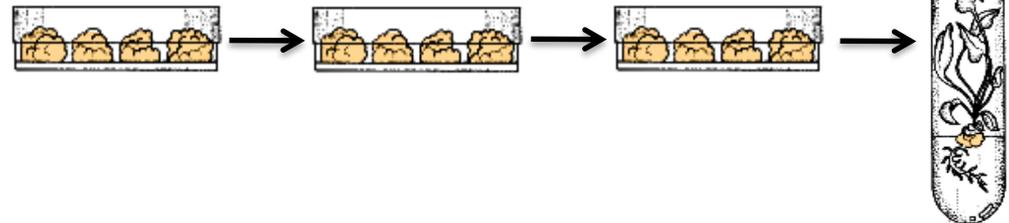


(b) Acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D)



(c) Acido 1-naftalenacetico (NAA)

2) numero di subculture

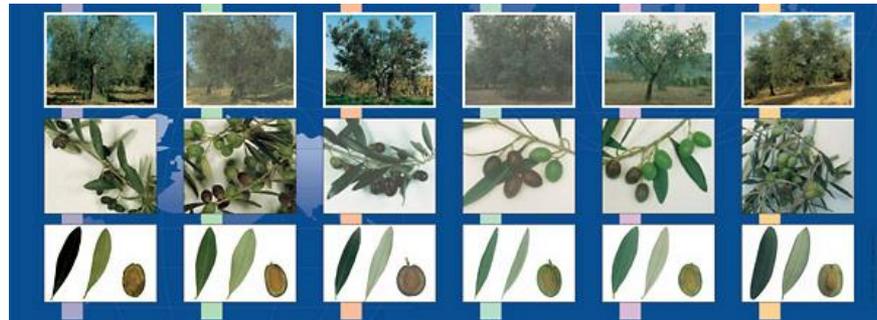


Variabilità somaclonale

Fattori determinanti

Oltre agli 1) ormoni e al 2) numero di subcolture, altri fattori possono influenzare la variabilità somaclonale:

3) Genotipo:



Le diverse varietà di una specie, sulla base del diverso genotipo, possono essere più o meno suscettibili ai fattori determinanti la variabilità somaclonale

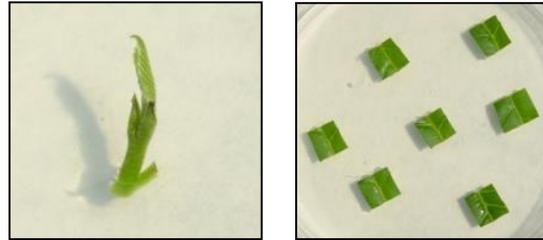
Ad es., alcune varietà possono avere sistemi di prevenzione delle mutazioni e riparazione del DNA più efficaci rispetto ad altri individui della stessa specie

Variabilità somaclonale

Fattori determinanti

Oltre agli 1) ormoni e al 2) numero di subcolture, altri fattori possono influenzare la variabilità somaclonale:

4) Tipo di espianto:



Diversi tipi di espianto, seppure ottenuti dal medesimo individuo, possono originare diversi gradi di variabilità somaclonale

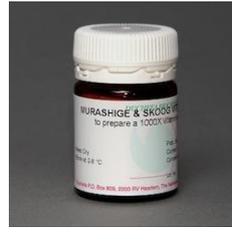
In genere, più giovani sono gli espianti e minore è l'incidenza della variabilità somaclonale (i tessuti più maturi sono mosaici di mutanti mitotici)

Variabilità somaclonale

Fattori determinanti

Oltre agli 1) ormoni e al 2) numero di subcolture, altri fattori possono influenzare la variabilità somaclonale:

5) Substrato



Per motivi ad oggi ignoti, la frequenza della variabilità somaclonale può essere diversa in colture mantenute su mezzi colturali di diversa composizione

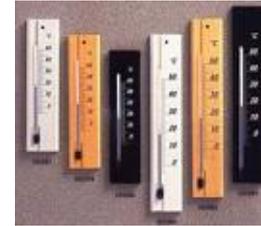
Le principali differenze tra mezzi colturali sono: micro-e macro-nutrienti, vitamine, chelanti del Fe e tamponi

Variabilità somaclonale

Fattori determinanti

Oltre agli 1) ormoni e al 2) numero di subcolture, altri fattori possono influenzare la variabilità somaclonale:

6) Condizioni colturali



Anche le condizioni colturali, principalmente illuminazione, temperatura e umidità, possono incidere sul grado di variabilità somaclonale

In generale, più sono stressanti le condizioni di crescita, maggiore è la probabilità di insorgenza di variazioni somaclonali

Variabilità somaclonale

Potenzialità

La variabilità somaclonale può rappresentare un problema per la propagazione di genotipi di elezione ...

... tuttavia, può anche rappresentare un vantaggio per alcune applicazioni:

- Selezione di somacloni iperproducenti composti di interesse industriale
- Selezione di somacloni resistenti a composti chimici (alluminio, NaCl)
- Selezione di somacloni resistenti a stress biotici o abiotici (funghi, siccità, insetti)

Variabilità somaclonale

Valutazione

Il grado di variazione somaclonale viene valutato sulla base di diversi parametri:

➤ **fenotipici** (altezza pianta, resistenza a stress)



SELEZIONE VISIVA
(*visual screening*)

➤ **biochimici** (analisi delle proteine, formazione di metaboliti secondari)



ANALISI CHIMICHE

➤ **genetici** (analisi del cariotipo, analisi con marcatori molecolari, grado di metilazione DNA)

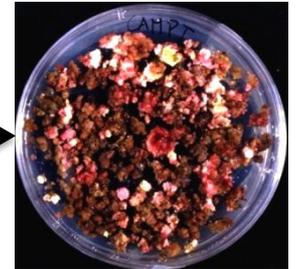
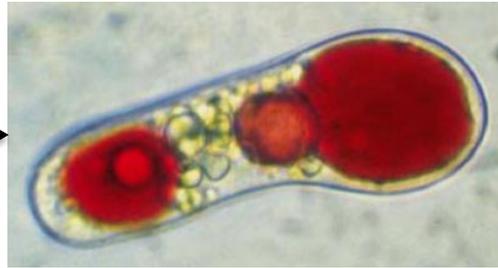


ANALISI
CITOGENETICHE E
BIOMOLECOLARI

Variabilità somaclonale

In vitro ed *ex vitro*

- **IN VITRO**: sulle masse cellulari indifferenziate (ad es. produzione di pigmenti)



- **EX VITRO**: sulle piante rigenerate (caratteri morfologici o fisiologici)



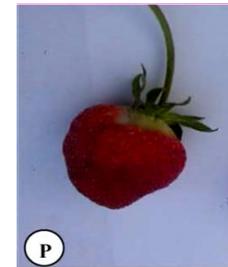
Control



Variant 1



Variant 2



Variant 3

Variabilità somaclonale

Valutazione con *markers* molecolari

Una delle tecniche più diffuse è:

RAPD

```
graph TD; RAPD --> Randomly; RAPD --> Amplified; RAPD --> Polymorphic; RAPD --> DNA;
```

Randomly

Amplified

Polymorphic

DNA

Variabilità somaclonale

RAPD test

Principale vantaggio: può essere effettuato su piante con genoma parzialmente o totalmente ignoto

È una PCR in cui, invece di primers disegnati appositamente sulle sequenze target, si usano primers casuali (*random primers*) di piccole dimensioni (8-12 bp)

Nel caso in cui i primer riescano ad associarsi al DNA, l'amplificazione produrrà una serie di frammenti che, interpretati, permetteranno di approssimare un profilo semi-individuale dell'organismo in analisi.

Variabilità somaclonale

RAPD test

1. Estrazione del DNA

2. Amplificazione del DNA mediante PCR con *random primers*

3. Separazione elettroforetica su gel di agarosio

4. Confronto tra gli ampliconi ottenuti da diversi somacloni

5. Analisi statistica dei dati ottenuti

Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive

A.R. Leva, R. Petruccelli and L.M.R. Rinaldi

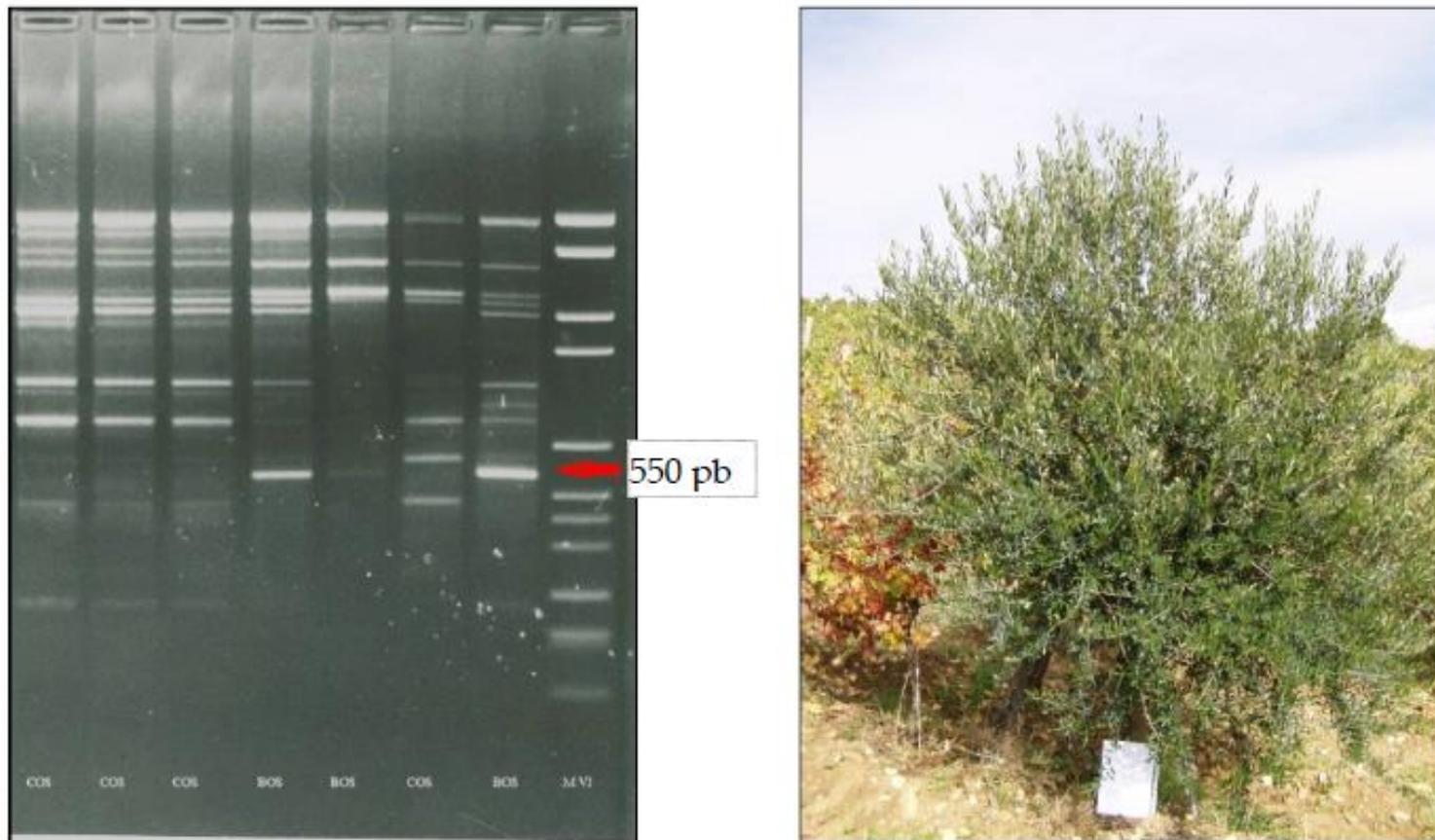


Figure 9. RAPD-PCR amplification patterns for somaclonal olive plants BOS using AG1 primer. Polymorphic DNA fragment is identified by an arrow

Variabilità somaclonale

Problemi

Non sempre la selezione dei somacloni è un metodo adeguato all'ottenimento di nuove varietà vegetali:

- Dipendenza dal genotipo
- Variazioni instabili e non ereditabili
- I caratteri di interesse possono non essere modificati
- Molti cambiamenti sono indesiderati
- Incontrollabile e non prevedibile