

## **Primi steps verso la trasformazione genetica dei portinnesti di vite tramite le nuove tecnologie di miglioramento genetico**

Leila Caramanico, Valentina Ricciardi, Gabriella De Lorenzis, Osvaldo Failla, Lucio Brancadoro, Attilio Scienza

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio e Agroenergia (DISAA), via Celoria 2, 20133, Milano, Italia

### **Introduzione**

Durante gli ultimi due decenni le condizioni climatiche a livello globale hanno subito forti modifiche, determinando condizioni ambientali ed habitat completamente nuovi. Molteplici studi hanno riportato e quantificato le conseguenze che questi cambiamenti stanno portando al settore agroalimentare. In particolare, il cambiamento climatico influenza negativamente il settore vitivinicolo. E' stato, infatti, dimostrato come il cambiamento climatico abbia già provocato modificazioni nel ciclo di sviluppo della vite e nella composizione del vino (Péros et al., 2018), con un cambiamento nella fenologia della pianta ed e un abbassamento dei livelli di acidità, insieme ad un aumento del contenuto di zuccheri e alcol, nel vino (Duchene, 2016). Per questi motivi è necessario un adattamento alle nuove condizioni climatiche nelle diverse aree di coltivazione, sia a livello di gestione del vigneto sia a livello di selezione di nuove combinazioni di genotipi di nesti e portainnesti (Duchene, 2016). Lo sviluppo programmi di miglioramento genetico atti alla selezione di portainnesti con una tolleranza maggiore nei confronti degli stress ambientali, quale lo stress idrico, potrebbe quindi essere una strategia di successo per superare le limitazioni imposte dal clima futuro, senza dover stravolgere la tradizione viticola per come è conosciuta (Corso & Bonghi, 2014).

Nell'ultimo decennio, accanto al miglioramento genetico tradizionale, basato sull'incrocio tra individui aventi caratteristiche di interesse, sono state sviluppate nuove tecnologie capaci di accelerare la selezione dei genotipi in grado di rispondere alle sfide che lo scenario agricolo futuro suggerisce. Queste tecniche si basano sull'identificazione delle regioni genomiche che portano il carattere di interesse e sulla sua modificazione. In questo modo, si ha un aumento della precisione delle modificazioni a livello genomico, riducendo tempi e sforzi necessari per produrre le varietà in



grado di soddisfare i nuovi requisiti (Schaart et al., 2016). Le tecnologie così descritte prendono il nome di NBT: New Breeding Technologies. Le NBT utilizzano un processo di modificazione genetica al fine di ottenere, con qualche eccezione (es: *trans*-genesi), un prodotto privo di geni esogeni all'organismo, che risulti migliorato nella sua performance nelle diverse condizioni ambientali. La tecnologia NBT che sta raccogliendo più consensi a livello sia scientifico sia agricolo è quella dell'*editing* genomico, che si basa sull'utilizzo di proteine programmabili in grado di legare il DNA a livello di una sequenza target ed indurre nel sito un taglio del filamento. Questo taglio può essere riparato dalla cellula attraverso l'introduzione di piccoli errori quali delezioni e inserzioni, o attraverso un meccanismo che prende il nome di ricombinazione omologa, che avviene in presenza di un template che funge da stampo. In entrambi i casi, se le modificazioni avvengono nelle regioni codificanti, si ottiene un'alterazione della sequenza proteica (Schaart et al., 2016).

Uno dei fattori limitanti la trasformazione genetica delle piante è la capacità di rigenerare un organismo dalle cellule editate. Non tutte le specie/varietà hanno la capacità di rigenerare un nuovo organismo e, all'interno dello stesso organismo, non tutte le tipologie di cellule hanno la stessa capacità rigenerativa. La mancanza, quindi, di protocolli efficienti di rigenerazione *in vitro* rappresenta un grosso ostacolo alla massiva diffusione del *genome editing* in ambito agrario (Yin et al., 2017).

La vite appartiene alla categoria delle specie recalcitranti alla rigenerazione *in vitro*. Tuttavia, alcuni risultati incoraggianti sono stati ottenuti dalla rigenerazione di un nuovo individuo da embrioni somatici, strutture simili all'embrione zigotico, ma ottenute da cellule somatiche (Martinelli & Gribaudo, 2001). A questo proposito, lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un protocollo per l'ottenimento, tramite l'utilizzo di tecniche di coltura *in vitro*, di calli pro-embriogenetici adatti alla rigenerazione, per l'applicazione in futuri esperimenti di genome editing.

## **Materiale e metodi**

### **Materiale vegetale**

Per la messa a punto di un protocollo di rigenerazione *in vitro* di portainnesti di vite, sono stati utilizzati il portainnesto M4 (1103-Paulsen x ?) ed il 1103-Paulsen (*V. berlandieri* cv. Ressayé n°2 and *Vitis rupestris* cv. Lot.).

### Composizione dei terreni per la micropropagazione dei portainnesti di vite

I terreni utilizzati per la micropropagazione a base di MS (Murashige and Skoog), M4 per la radicazione degli espianti ed M5 per la propagazione dei germogli, sono composti come riportato in Tabella 1.

M4		M5	
pH	8 con KOH	pH	8 con KOH
Agar	8 g/L	Agar	8 g/L
MS	4 g/L	MS	4 g/L
Saccarosio	30 g/L	Saccarosio	30 g/L
IBA	0.1 mg/L		
BAP	0.5 mg/L		

**Tabella 1** Composizione dei terreni di coltura M4 ed M5, utilizzati, rispettivamente, per radicazione e propagazione dei germogli. Sono riportati reagenti e quantità utilizzate per un volume finale di 1 L. M4, a differenza di M5, contiene gli ormoni necessari ad indurre il processo di radicazione.

Dopo la preparazione i terreni sono stati sterilizzati in autoclave, a 121°C per 20 minuti. Una volta sterili, i mezzi di coltura sono stati piastrati in contenitori vegbox adatti alla micropropagazione.

### Terreni di coltura per la caulogenesi e l'embriogenesi somatica

Nelle Tabelle 2 e 3 è riportata la composizione dei mezzi di coltura previsti dal protocollo di caulogenesi ed embriogenesi somatica per la rigenerazione di piante di vite.

BI		NB2	
pH	8 con KOH	pH	8 con KOH
Reagenti	1L	Reagenti	1L
MS	4 g	Mezzo Nitsch (con vitamine)	2.178 g
Vitamine B5	1 mL	Saccarosio	20 g
Fe/EDTA	5 mL	BAP (1mM)	1mL
BAP	5 mL	2,4 - D (5mM)	1 mL
2,4 - D	5 mL		
NAA	5 mL		
Saccarosio	15 g		
Mio-inositolo	1 g		

**Tabella 2** Composizione dei mezzi di coltura per la caulogenesi BI e NB2. Sono riportati reagenti e quantità utilizzate per un volume finale di 1 L. I terreni di coltura differiscono, soprattutto, per contenuto e quantità di ormoni.

GISCA		X6	
pH	8	pH	8
Reagenti	1L	Soluzione MX	1L
NN macro (10x)	10 mL	Calcio Cloruro MX	20 mL
MS micro (1000x)	1000 µL	Ferro MX	20 mL
Vitamine B5 (1000x)	1000 µL	Microelementi MX	20 mL
Fe/EDTA (200x)	5 mL	Nitrato MX	20 mL
NOA (1000µM)	10 mL	Fosfato MX	20 mL
BAP (1000µM)	1 mL	Potassio MX	20 mL
Saccarosio	60 g	Solfato MX	20 mL
Bacto Agar	8 g	Vitamine MX	1 ml
Carbone attivo	2.5 g	Mio-inositolo	1 g
IAA (dopo autoclave)	20 mL	Saccarosio	60 g

**Tabella 3** Composizione dei mezzi di coltura GISCA e X6 per l'embriogenesi somatica. Sono riportati reagenti e quantità utilizzate per un volume finale di 1 L. Nel terreno di coltura BI è presente carbone attivo per l'assorbimento dei composti polifenolici, il cui accumulo provocherebbe tossicità.

### **Micropropagazione dei portainnesti di vite**

Le piante di vite sono state ottenute per micropropagazione in ambiente sterile di internodi ottenuti da talee legnose provenienti dal campo sperimentale dove sono presenti le piante madri.

Le talee sono state poste a germogliare in acqua. I germogli così ottenuti sono stati privati di tutte le foglie, eccetto quella apicale, e sterilizzati effettuando la seguente procedura:

- 20 minuti, in acqua corrente
- 15 minuti in vasetti sterili contenenti una soluzione 1:4 di ipoclorito di sodio e acqua bi-distillata, sotto agitazione magnetica.
- Tre cicli di 7 minuti ciascuno, in vasetti sterili contenenti acqua bi-distillata, sotto agitazione magnetica.

I germogli sterili sono stati micropropagati, sotto forma di singoli nodi, in coulter contenenti mezzo ormonale per la radicazione (M4), in condizioni di sterilità. I coulter sono stati posti in camera di crescita alla temperatura di 25°C±1°C, con fotoperiodo 16h ore luce, 8h di buio. La luce è stata fornita mediante lampade a led, Valoya, di tipo AP67 e NS1/NS12, con spettro di illuminazione presente nella Tabella 4. Le luci utilizzate sono state selezionate per favorire la crescita vegetativa delle piante.



Spettro	AP67	NS1/NS12
<b>Ultravioletto</b> <400 nm	0%	1%/0.5%
<b>Blu</b> 400-500 nm	14%	20%/21%
<b>Verde</b> 500-600 nm	16%	39%/38%
<b>Rosso</b> 600-700 nm	53%	35%/35%
<b>Rosso-lontano</b>	17%	5%/6%
<b>PAR</b> 700-800 nm	83%	94%/94%
<b>CCT</b> Kelvin	2500	4800/5000
<b>CRI</b>	70	80/91
<b>B:G ratio</b>	1.2	0.7/0.6
<b>R:FR ratio</b>	3.3	10.4/6

**Tabella 4** Dati dello spettro standard nelle lampade Valoya utilizzate nella camera di crescita. AP67 sono le lampade utilizzate per crescita vegetativa e generativa forte. NS1/NS12 sono le lampade spettro simile a quello solare, indicate per la ricerca. Sono riportate le componenti dello spettro, le lunghezze d'onda corrispondenti, PAR (Photosynthetically Active Radiation), CCT (Correlated Color Temperature), CRI (Color Rendering Index), B:G ratio (Blue to Green ratio) e R:FR ratio (Red to Far-Red ratio).

Dopo una permanenza in questi contenitori di circa 10 giorni, le piantine sono state trasferite in vegboxes contenenti un mezzo privo di ormoni (M5), necessario allo sviluppo del germoglio. Le piantine di vite così ottenute sono state propagate per cicli successivi di micropropagazione.

### **Acclimatamento dei portainnesti di vite ottenuti dalla coltura *in vitro***

Le piantine ottenute tramite coltura *in vitro* sono state acclimate, allo scopo di essere utilizzate per trasformazioni transienti o per prelevare espianti per un nuovo ciclo di coltura *in vitro*.

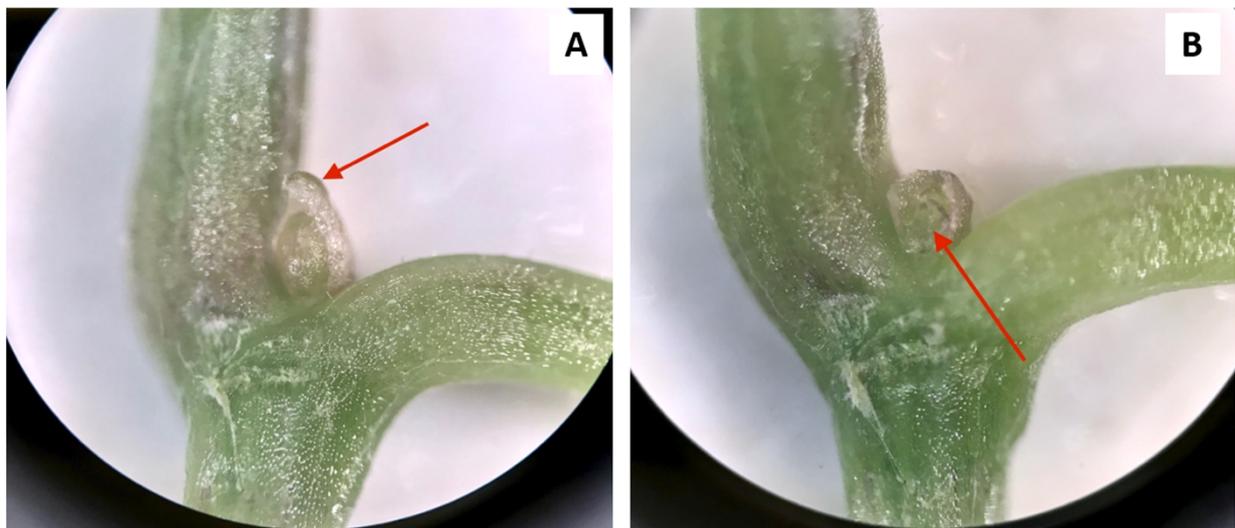
La procedura ha previsto l'accurato lavaggio delle radici in acqua corrente e il trasferimento della piantina in vasetti contenenti un substrato a base di torba (Vigor Plant, Irish and baltic peats based), precedentemente sterilizzato mediante autoclave. I vasetti con le piantine sono stati sistemati in serre portatili, isolate dall'ambiente esterno e con umidità a saturazione. Le serrette sono quindi state sistemate in camera di crescita. Dopo un paio di giorni, sono stati gradualmente permessi gli scambi gassosi con l'ambiente esterno per mezzo dell'apertura delle finestrelle presenti sulle celle



di acclimatazione. Queste ultime sono state quindi spostate dalla camera di crescita e poste in una serra con un range di temperatura che varia dai 21°C ai 28°C e un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Constatata la capacità delle piantine di far fronte alle nuove condizioni ambientali, dopo circa una settimana dal posizionamento nelle serre portatili, sono state rimosse da queste ultime. In base al loro sviluppo, le piantine sono poi state trasferite in vasi di dimensioni adatte ai vari stadi di crescita.

## **Coltura di gemme ascellari di portainnesti di vite: open/unopen buds**

Le piantine nei vegboxes di propagazione sono state utilizzate per prelevare le gemme ascellari, necessarie per il processo di caulogenesi. Le gemme sono state sistemate su piastre petri contenenti due mezzi pre-embriogenici differenti, BI e NB2, che costituiscono il primo step di due protocolli sperimentali di caulogenesi e successiva embriogenesi somatica. In ogni piastra sono state depositate circa 25 gemme, prelevate in condizioni open (denudate dei tessuti di protezione) o unopen (Figura 1). Per ogni genotipo sono state realizzate almeno due repliche, per ogni mezzo colturale e per tipologia di gemma. Le piastre sono state posizionate al buio, ed incubate a 25°C.



**Figura 1.** Esempio di gemma chiusa (A) e gemma aperta (B), come appaiono allo stereomicroscopio.

### **Embriogenesi somatica**

Una volta formati i calli, all'incirca dopo un mese, essi sono stati trasferiti su mezzo embriogenico. A tal fine, il mezzo BI è stato sostituito con GISCA e il mezzo NB2 con X6. La composizione dei mezzi è riportata nella Tabella 3.

### **Valutazione delle PEM (Masse Pro-Embriogeniche)**

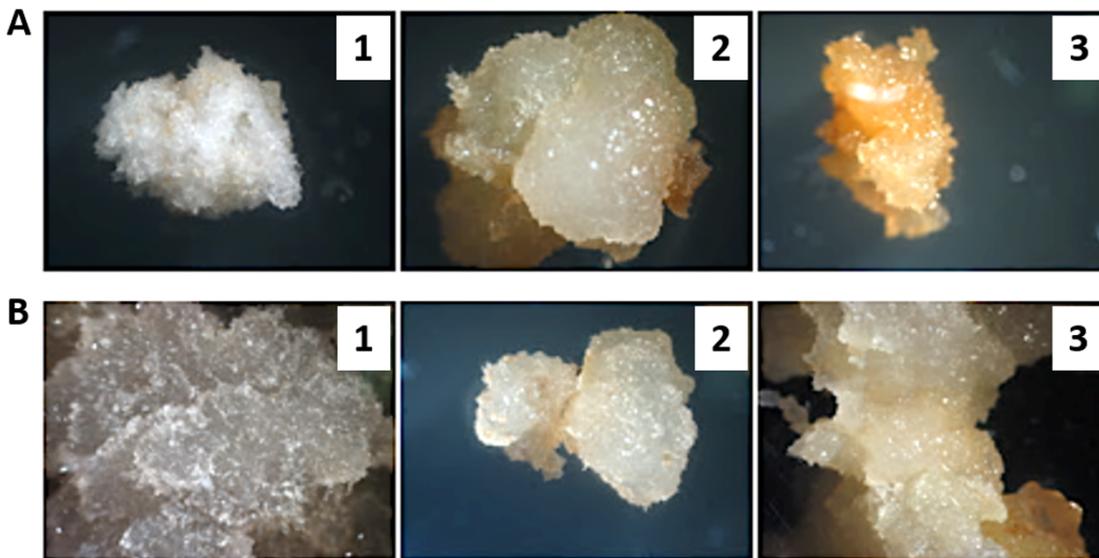
I calli dei genotipi M4 e 1103-P sono stati valutati per la loro qualità, confrontando il loro sviluppo sui due differenti mezzi pre-embriogenici BI e NB2. La valutazione è avvenuta per mezzo di uno stereoscopio (Wild Heerbrugg M420, 1,25x), da cui sono state raccolte anche le immagini dei calli.

La fotocamera utilizzata a tal proposito è stata una Canon Power Shot S 30, 3.2 mega pixels.

I parametri qualitativi comparati sono stati: i) % callo, ovvero la percentuale di superficie della gemma ascellare che sviluppa la massa del callo; ii) consistenza, valutata su una scala estesa tra friabile e acquosa; iii) colore, con un range spaziente da bianco a necrotico (marrone), in cui la tonalità crema è stata considerata il valore ottimale (Tabella 5 e Figura 2).

% CALLO		COLORE		CONSISTENZA	
1	0	1	Bianco	1	Friabile
2	25%	2	Crema	2	Ottimale
3	50%	3	Marrone	3	Watery
4	75%				
5	100%				

**Tabella 5** Criteri di valutazione utilizzati durante la raccolta dei dati per l'analisi qualitativa dei calli prodotti sui due mezzi colturali testati, BI e NB2. La % callo indica la percentuale di superficie della gemma ascellare che sviluppa il callo. Il colore è valutato su un intervallo da bianco a marrone, in cui il colore crema è ritenuto il valore ottimale e il marrone indica la necrosi. La consistenza è valutata invece su un intervallo tra friabile e acquosa (watery), in cui un valore intermedio tra le due è considerato come ottimale dal punto di vista qualitativo.



**Figura 2** Criteri di valutazione (Tabella 5) utilizzati durante la raccolta dei dati per l'analisi qualitativa dei calli prodotti sui due mezzi culturali testati, BI e NB2. A: Colore; B: Consistenza.

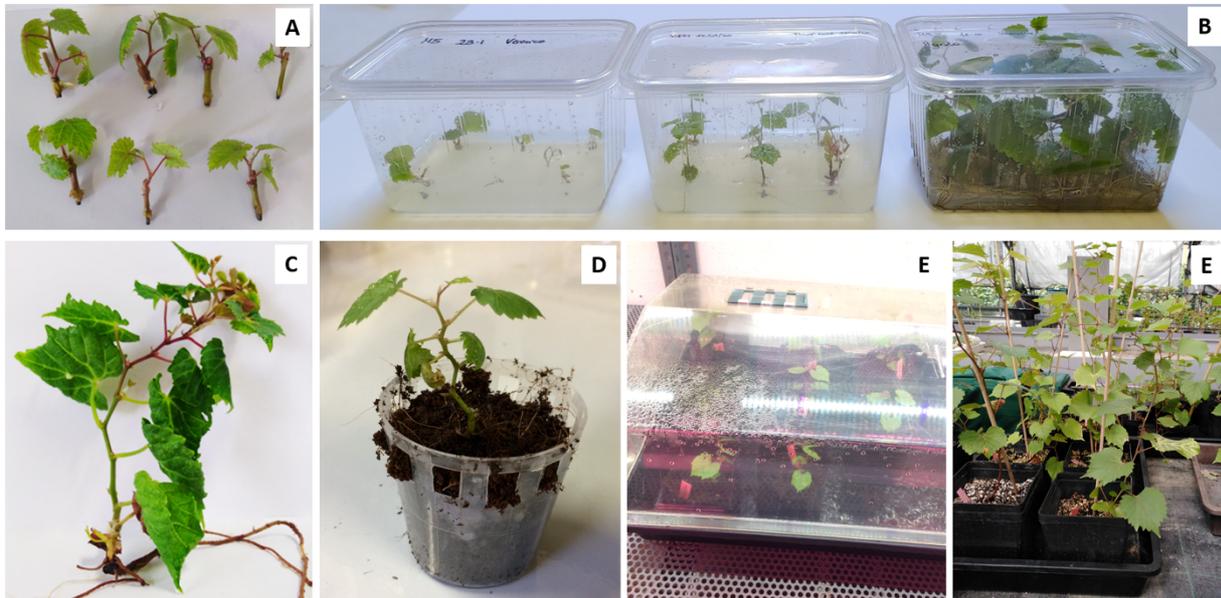
### **Analisi statistiche**

I dati raccolti con le osservazioni allo stereoscopio sono stati analizzati statisticamente tramite R. L'analisi svolta ha riguardato una distribuzione di tipo non parametrico, per cui sono state valutate diverse interazioni: i) il comportamento dei singoli genotipi, M4 e 1103-P, nei due diversi mezzi; ii) l'effetto dei due mezzi di coltura, BI e NB2, sul pool totale dei genotipi; iii) l'interazione tra tipologia di gemma messa in coltura, open ed unopen (closed), e mezzi di coltura. La significatività delle medie è stata valutata sulla base del Chi Quadrato e p-value, ottenuti applicando il test di Kruskal-Wallis. I dati sono stati visualizzati in grafici di tipo boxplots.

### **Risultati**

#### **Propagazione in vitro dei portainnesti di vite**

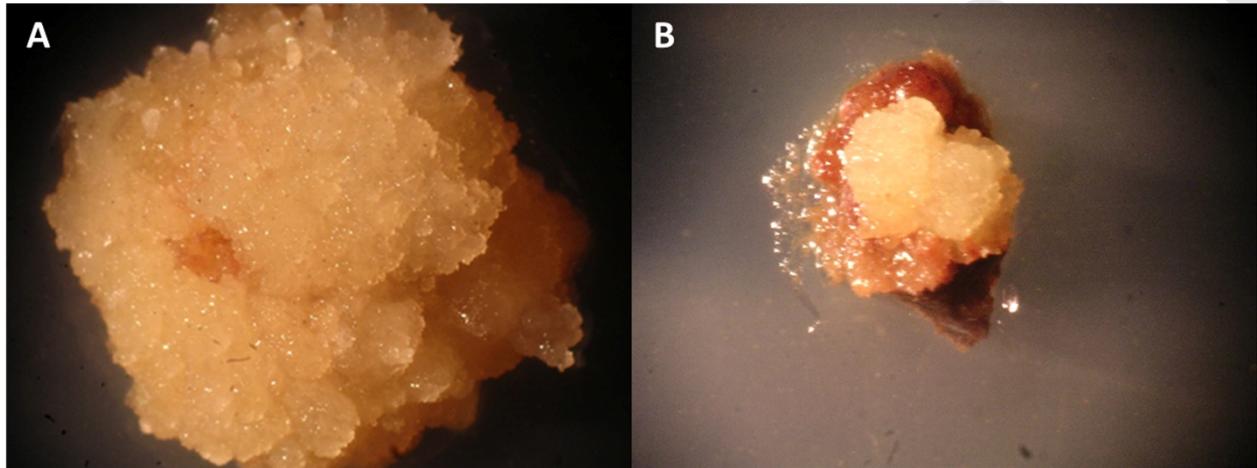
Nella Figura 3 sono riportate le fasi salienti della propagazione *in vitro* dei portainnesti di vite, a partire dalla messa in coltura dell'espianto fino all'acclimatazione delle piantine micropropagate. La micropropagazione ci permette di avere a disposizione, in qualsiasi momento dell'anno, piante giovani che possono essere utilizzate sia per il prelievo delle gemme (aperte e chiuse) per la produzione di callo embriogenetico, sia per un nuovo ciclo di propagazione *in vitro*.



**Figura 3** Fasi della propagazione in vitro dei portainnesti di vite. A: scelta dell'espianto. B: messa in coltura dell'espianto dopo sterilizzazione su mezzo che induce la radicazione (M4) e trasferimento su mezzo di moltiplicazione privo di ormoni (M5). C-E: trapianto delle piantine sviluppate in vasi contenente terriccio e trasferimento in celle di acclimatazione. H: trasferimento in cella e mantenimento.

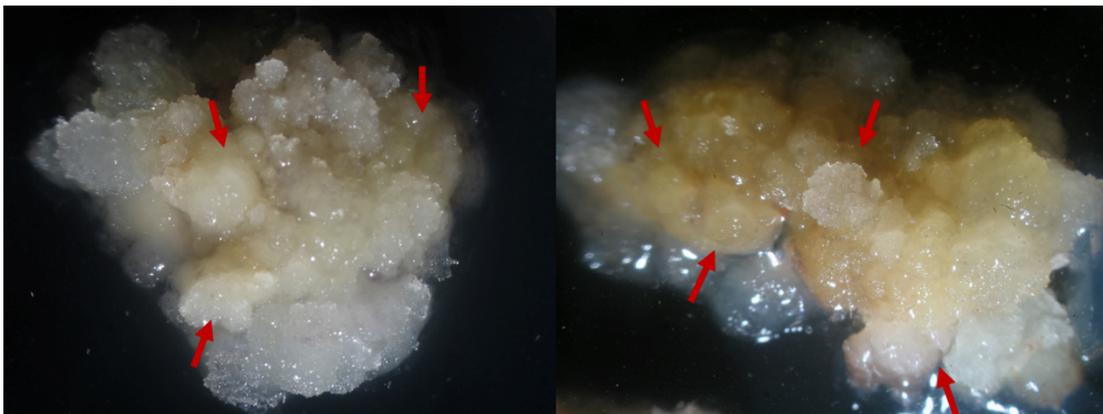
### **Risultati dell'analisi qualitativa dei call**

È stata effettuata la valutazione della produzione di callo a partire da gemme aperte (open) e chiuse (unopen, closed) di dei due portainnesti M4 e 1103-P. La valutazione è stata eseguita per due protocolli per la caulogenesi e l'embriogenesi somatica, il primo basato sul mezzo di coltura BI e il secondo su NB2. I risultati dell'analisi visiva, relativa alla qualità dei calli formati, hanno rivelato la superiorità del mezzo BI rispetto a NB2 (Figura 1) nel generare, a parità di tipologia di gemma, calli migliori in termini di massa sviluppata, colore e consistenza. A parità di età dalla semina, i calli su BI sono cresciuti più rapidamente, sviluppando la massa con un mese di anticipo rispetto a quelli cresciuti su NB2 e mantenendo caratteristiche ottimali (Figura 4 A) per i passaggi successivi del protocollo di rigenerazione. Al contrario, i calli seminati su mezzo di coltura NB2 hanno mostrato da subito segni evidenti di necrosi (Figura 4 B).



**Figura 4** Calli di genotipo M4 su terreno BI (A) e NB2 (B), a tre mesi dalla semina. Il callo su terreno BI è molto più sviluppato di quello in NB2, che risulta invece necrotico e di dimensioni inferiori.

Una volta raggiunto lo stadio ottimale di crescita, caratterizzato da calli con masse completamente sviluppate di circa 1 cm di diametro, color crema e di consistenza intermedia tra friabile e acquosa, i calli sono stati trasferiti su mezzo embriogenico, GISCA nel caso di BI e X6 nel caso di NB2. I calli provenienti da BI e trasferiti in GISCA hanno mostrato, dopo circa 2 mesi, la formazione di masse embriogeniche (Figura 5).



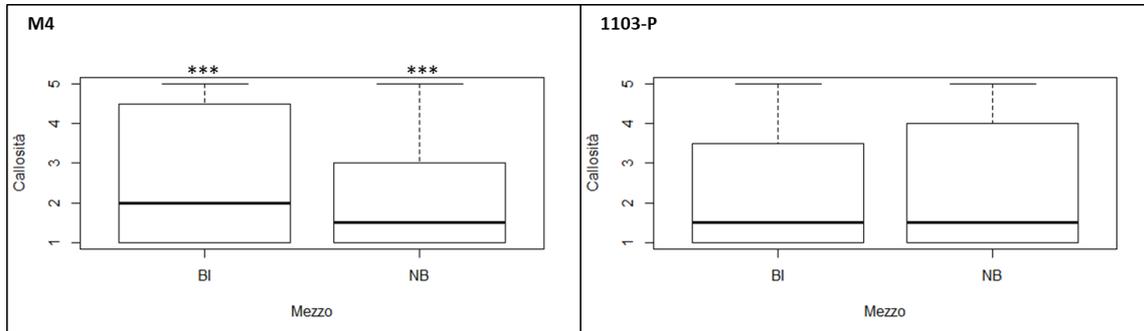
**Figura 5** Calli di M4 su mezzo embriogenico GISCA, a cinque mesi dalla semina. Le frecce rosse indicano le masse embriogeniche in formazione.

### **Risultati delle interazione “Genotipo x Mezzo di coltura”**

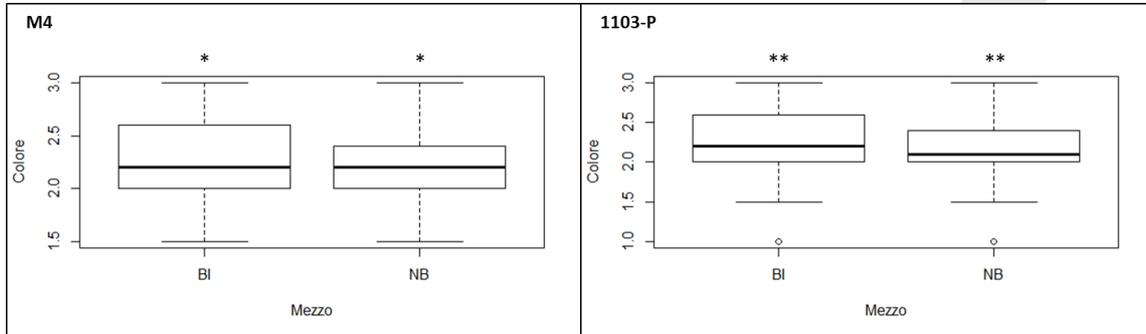
I valori dei tre parametri valutati, % callo, colore e consistenza, sono stati sottoposti ad analisi statistica con R, utilizzando il modello di distribuzione di tipo non parametrico e il test di Kruskal-Wallis. I risultati hanno confermato le ipotesi fatte in fase di valutazione visiva, infatti sono state

riscontrate differenze statisticamente significative tra i calli cresciuti su mezzo di coltura BI e quelli su NB2. I calli su mezzo colturale BI crescono di più (Figura 6), sviluppando masse di dimensioni maggiori, 1 cm nel caso di BI contro dimensioni inferiori a 0.5 cm nel caso di NB2. Per quanto riguarda la qualità, in termini di colore (Figura 7) e consistenza (Figura 8), la media generale tra i due mezzi risulta simile, con un valore vicino a 2.0 (considerato ottimale) per entrambi i parametri. Per quanto concerne il genotipo 1103-P, invece, le analisi statistiche non rilevano significatività di interazione tra genotipo e mezzo per quanto riguarda i parametri % di callo (Figura 6) e consistenza (Figura 8). La mancanza di significatività potrebbe però essere dovuta al mancato bilanciamento del numero di repliche dei diversi genotipi, per ciascuna condizione.

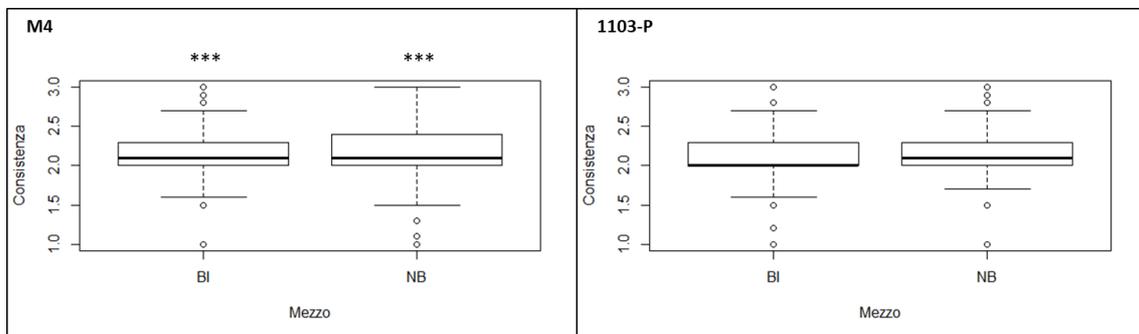
Per ciò che riguarda invece il parametro colore del callo, nel caso del genotipo 1103-P, i valori rilevati per il mezzo BI risultano lievemente inferiori in misura statisticamente significativa rispetto a quelli per il mezzo NB2. Per il mezzo BI, infatti, i valori medi si avvicinano maggiormente al valore medio 3.0, mentre per NB2 risultano più vicini a 2.0.



**Figura 6** Boxplots relativi al parametro % callo formato. Sull'asse delle ordinate è riportata la scala della percentuale di superficie callosa sviluppata: 1=0%, 2=25%, 3=50%, 4=75%, 5=100%. Per ogni genotipo (M4 e 1103-P), il parametro è confrontato per i due diversi terreni, BI e NB2 (asse delle ascisse), in 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.



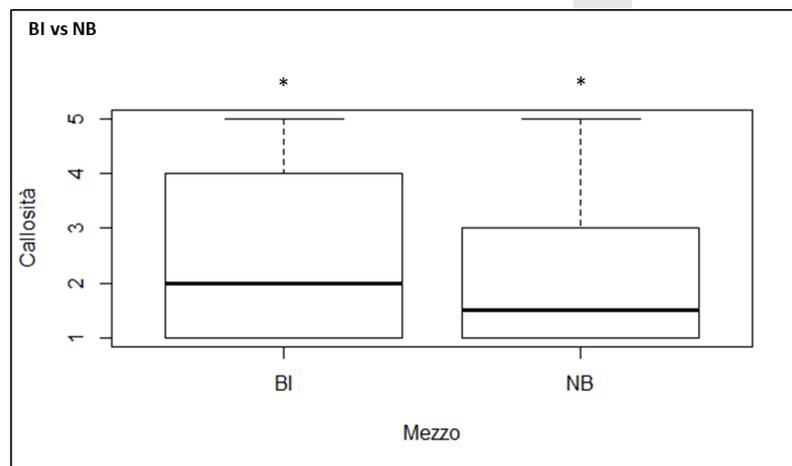
**Figura 7** Boxplots relativi al parametro colore del callo. Sull'asse delle ordinate è riportata la scala di valutazione utilizzata: 1.0=bianco, 2.0=crema (valore ottimale), 3=marrone (necrosi). Per ogni genotipo (M4 e 1103-P), il parametro è confrontato per i due diversi terreni, BI e NB2 (asse delle ascisse), in 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.



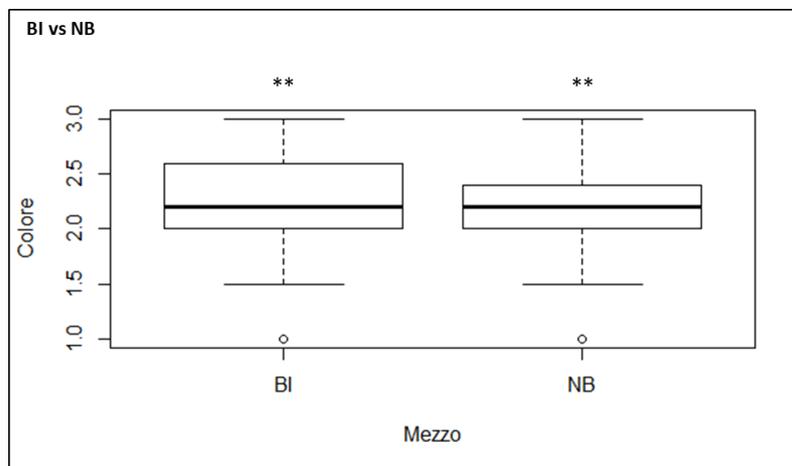
**Figura 8** Boxplots relativi al parametro consistenza del callo. Sull'asse delle ordinate è riportata la scala di valutazione utilizzata: 1.0=friabile, 2.0=ottimale, 3.0=acquosa. Per ogni genotipo (M4 e 1103-P), il parametro è confrontato per i due diversi terreni, BI e NB2 (asse delle ascisse), in 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.

Confermato il comportamento simile dei due genotipi, un'analisi sul pool totale di repliche ha confermato la superiorità nel determinare una qualità migliore dei calli da parte del mezzo BI rispetto a NB2, per quanto riguarda il parametro di sviluppo del callo (Figura 9). A parità di tempo dalla semina, i calli su terreno di crescita BI sviluppano masse in media più grandi, con una

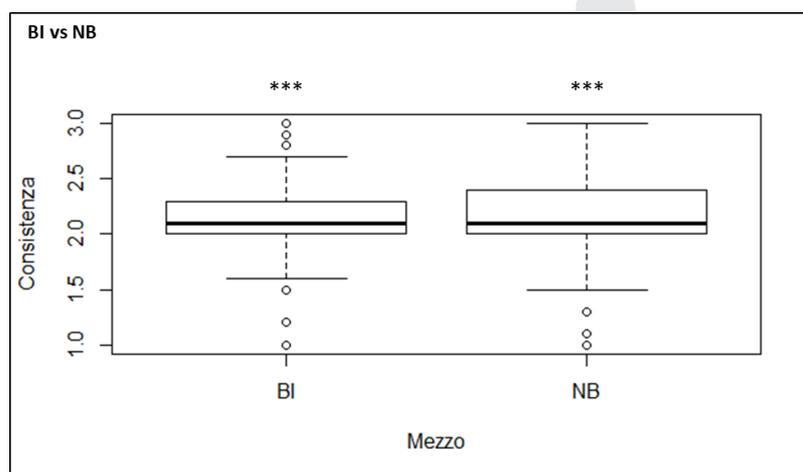
superficie di circa il 25% (2.0 nella scala utilizzata) contro valori di 10-15% (1.5 c.a. nella scala) nel caso di NB2 (Figura 9). Invece, per ciò che concerne i valori di colore (Figura 10) e consistenza (Figura 11) non sembrano esserci differenze statisticamente significative di BI rispetto a NB2 nel determinare un migliore aspetto, in termini di colore e consistenza, delle PEM.



**Figura 9** Boxplots relativi al parametro % callo sviluppato. Il confronto è stato eseguito tra i due mezzi, BI e NB2 (asse delle ascisse), su tutto il pool di repliche di entrambi i genotipi disponibili, per 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Sull'asse delle ordinate è riportata la scala della percentuale di superficie callosa sviluppata: 1=0%, 2=25%, 3=50%, 4=75%, 5=100%. Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.



**Figura 10** Boxplots relativi al parametro colore del callo. Il confronto è stato eseguito tra i due mezzi, BI e NB2 (asse delle ascisse), su tutto il pool di repliche di entrambi i genotipi disponibili, per 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Sull'asse delle ordinate è riportata la scala di valutazione utilizzata: 1.0=bianco, 2.0=crema (valore ottimale), 3=marrone (necrosi). Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.

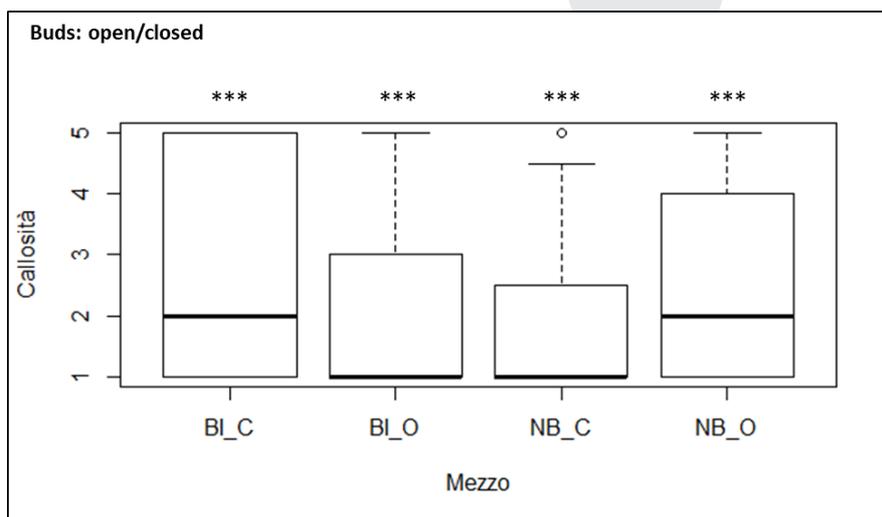


**Figura 11** Boxplots relativi al parametro consistenza del callo. Il confronto è stato eseguito tra i due mezzi, BI e NB2 (asse delle ascisse), su tutto il pool di repliche di entrambi i genotipi disponibili, per 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Sull'asse delle ordinate è riportata la scala di valutazione utilizzata: 1.0=friabile, 2.0=ottimale, 3.0=acquosa. Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.

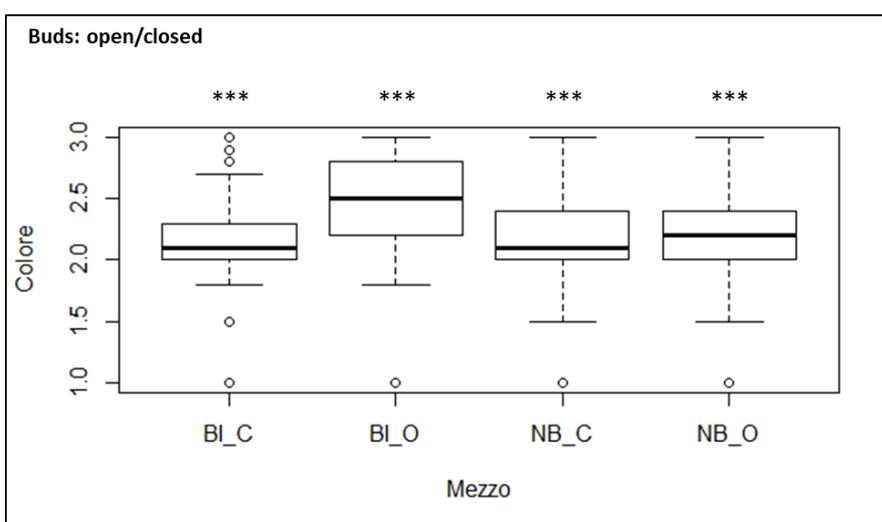
### **Risultati delle interazione “Tipologia di espianto x Mezzo di coltura”**

Per quanto riguarda l'interazione mezzo/tipologia di gemma messa in coltura (aperta o chiusa), l'analisi dei dati sullo sviluppo del callo (Figura 12) ha rivelato risultati statisticamente significativi: le gemme chiuse hanno mostrato un comportamento migliore in terreno BI e, al contrario, quelle aperte hanno evidenziato un risultato qualitativamente superiore in NB2. Le gemme chiuse su BI e aperte su NB2 hanno infatti sviluppato calli di superficie media intorno al 25% (valore equivalente a 2.0 nella scala utilizzata), al contrario delle controparti che nelle condizioni di crescita hanno avuto la tendenza a non svilupparsi affatto, con superficie callosa molto vicina allo 0% (valore pari a 1.0 nella scala utilizzata) (Figura 12). Le differenze si sono rivelate attenuate, invece, per i parametri qualitativi di colore (Figura 13) e consistenza (Figura 14), con valori più vicini a 2.0

(colore ottimale) nel caso delle gemme chiuse, e parametri più tendenti alla necrosi (valore 3.0 della scala utilizzata) nel caso delle gemme aperte.



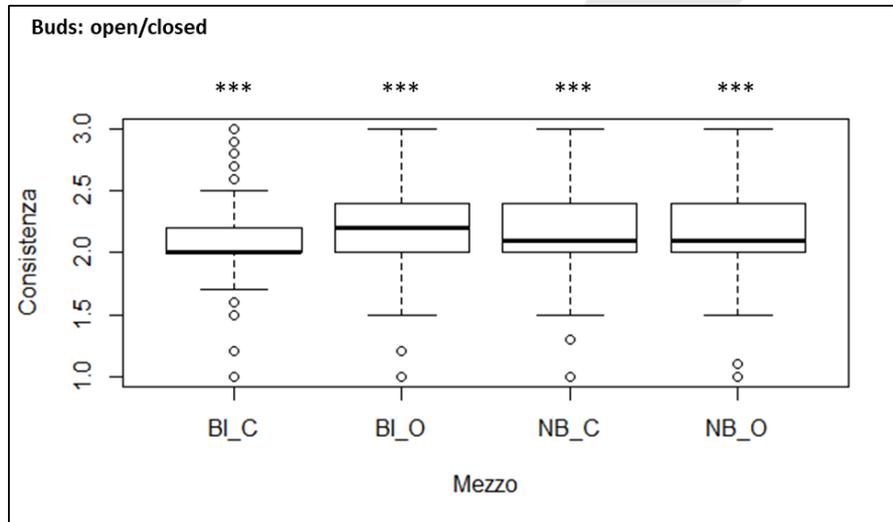
**Figura 12** Boxplots relativi al parametro % callo sviluppato. Sull'asse delle ascisse è riportato il confronto eseguito tra i due mezzi, BI e NB2, suddivisi nei sottogruppi relativi alla tipologia di gemma messa in coltura (O: Open , C: Closed), per 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Sull'asse delle ordinate è riportata la scala della percentuale di superficie callosa sviluppata: 1=0%, 2=25%, 3=50%, 4=75%, 5=100%. Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.



**Figura 13** Boxplots relativi al parametro colore del callo. Sull'asse delle ascisse è riportato il confronto eseguito tra i due mezzi, BI e NB2, suddivisi nei sottogruppi relativi alla tipologia di gemma messa in coltura (O: Open , C: Closed), per 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Sull'asse delle ordinate è riportata la scala di valutazione utilizzata:



1.0=bianco, 2.0=crema (valore ottimale), 3.0=marrone (necrosi). Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi, indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.



**Figura 14** Boxplots relativi al parametro consistenza del callo. Sull'asse delle ascisse è riportato il confronto eseguito tra i due mezzi, BI e NB2, suddivisi nei sottogruppi relativi alla tipologia di gemma messa in coltura (O: Open, C: Closed), per 4 tempi di controllo: un mese dalla semina (T1), un mese e 10 giorni dalla semina (T2), un mese e 20 giorni dalla semina (T3), due mesi dalla semina (T4). Sull'asse delle ordinate è riportata la scala di valutazione utilizzata: 1.0=friabile, 2.0=ottimale, 3.0=acquosa. Per ogni boxplot sono riportati gli asterischi, indicativi della significatività dei risultati dell'analisi. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001.

### Analisi dei parametri relativi alla crescita del callo nel tempo

L'andamento nel tempo della crescita dei calli, e della loro qualità, in termini di colore e consistenza sono stati valutati ad intervalli di 10 giorni per due mesi (da T1 a T4). I calli mostrano segni evidenti di crescita, con una differenza di sviluppo statisticamente significativa più ampia tra penultimo (T3) e ultimo tempo di controllo (T4), in cui la massa del callo è cresciuta da un valore di circa il 25% di superficie a circa 75% (i valori 2.0 e 4.0 della scala utilizzata, rispettivamente). Il colore e la consistenza tendono a rimanere stabili nel tempo, segno che le condizioni di coltura utilizzate (mezzi di coltura) sono favorevoli allo sviluppo delle masse callose. I calli tendono all'imbrunimento (valori più vicini a 3.0, indicativi di necrosi) e ad assumere una consistenza di tipo acquoso dopo un mese e mezzo circa dalla semina. L'imbrunimento è probabilmente dovuto all'accumulo di polifenoli nel terreno di crescita, un problema particolarmente severo nella coltura in vitro di tessuti vegetali: il fenomeno provoca infatti crescita stentata, abbassa i tassi di rigenerazione e può portare alla morte del tessuto o della pianta (Jones & Saxena, 2013). Il fatto che il terreno NB2 abbia avuto risultati qualitativamente inferiori rispetto a BI, nonostante sia un mezzo di coltura utilizzato frequentemente per la caulogenesi di diverse specie vegetali, potrebbe essere dovuto alla mancata aggiunta di componenti in grado di assorbire e quindi mantenere a livelli di bassa tossicità la concentrazione di polifenoli, o di inibitori di enzimi della sintesi dei polifenoli stessi. Sostanze quali il PVP (Polyvinylpyrrolidone) e il carbone attivo, o l'inibitore competitivo

della PAL (Fenilalanina ammonio liasi), l'AIP (aminoindane-2-phosphonic acid), vengono infatti frequentemente aggiunte alla composizione dei terreni e utilizzati a tale scopo (Agüero et al., 2006; Jones & Saxena, 2013; Oláh, 2017).

### **Conclusioni**

In futuro, il miglioramento genetico non tradizionale troverà sempre maggiore applicazione nei programmi di breeding aziendali. Tuttavia, l'applicazione di queste NBT richiede l'utilizzo di protocolli efficienti di rigenerazione di un organismo a partire dalle cellule modificate. A tal scopo, l'obiettivo di quest lavoro ha riguardato la valutazione di due protocolli per l'ottenimento di calli embriogenetici per la rigenerazione delle piante di portainnesti della vite. Il protocollo basato sui terreni BI e GISCA ha dato risultati statisticamente significativi migliori rispetto a quello basato sui mezzi di coltura NB2 e X6. Buoni risultati sono stati raccolti dai calli ottenuti sul mezzo BI. Infatti, i calli si sono sviluppati in modo ottimale, dal punto di vista della massa, del colore e della consistenza, e una volta trasferiti su terreno di coltura embriogenico (GISCA) sono andati incontro con successo all'induzione dell'embriogenesi.

### **Bibliografia**

- Agüero, C. B., Meredith, C. P., Dandekar, A. M. (2006). Genetic transformation of *Vitis vinifera* L. cvs Thompson Seedless and Chardonnay with the pear PGIP and GFP encoding genes. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 45(1):1–8.
- Corso, M., Bonghi, C. (2014). Grapevine rootstock effects on abiotic stress tolerance. *Plant Science Today*, 1(3):108–113.
- Duchene, E. (2016). How can grapevine genetics contribute to the adaptation to climate change? *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 50(3):113–124.
- Jones, A. M. P., Saxena, P. K. (2013). Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLoS ONE*, 8(10):1–13.
- Martinelli L., Gribaudo I. (2001) Somatic Embryogenesis in Grapevine. In: Roubelakis-Angelakis K.A. (eds) *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Springer, Dordrecht.
- Oláh, R. (2017). The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 56(4):161–171.

- Péros, J.-P., Ojeda, H., Sire, Y., Torregrosa, L., Boursiquot, J.-M., Berhe, D. T., et al. (2018). *Vitis vinifera* L. Fruit Diversity to Breed Varieties Anticipating Climate Changes. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1–16.
- Schaart, J. G., van de Wiel, C. C. M., Lotz, L. A. P., Smulders, M. J. M. (2016). Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. *Trends in Plant Science*, 21: 438-449.
- Yin, K., Gao, C., Qiu, J. (2017). Progress and prospects in plant genome editing. *Nature Plants* 3: 17107.