

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E
L'ENERGIA**

Corso di Dottorato di Ricerca in

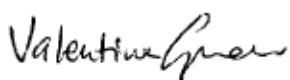
ORTOFLOROFRUTTICOLTURA - XXV Ciclo.

**"Applicazioni biotecnologiche per l'induzione di nuova variabilità
genetica nelle orchidee"**

(AGR/04)

Tesi di dottorato di:

Dott. Valentina Grosso

Firma 

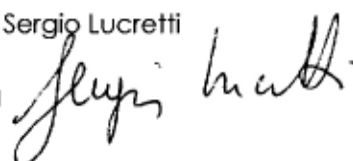
Coordinatore del corso

Prof. Giuseppe Colla

Firma 

Tutore

Dott. Sergio Lucretti

Firma 

07/06/2013

1.0	PARTE GENERALE	6
1.1	Cenni storici.....	6
1.2	Lo stato del commercio e dell'industria delle Orchidee.....	8
1.3	Il miglioramento genetico nelle Orchidee: dall'incrocio classico alle biotecnologie	9
1.3.1	Micropropagazione	11
1.3.2	Embriogenesi somatica	13
1.3.3	Variazione Somaclonale	15
1.3.4	Manipolazioni cellulari: Protoplasti ed Ibridazione somatica	17
1.3.4.1	I Protoplasti	17
1.3.4.2	L'ibridazione somatica.....	18
1.3.4.3	Manipolazioni cellulari nelle Orchidee.....	21
1.4	La citogenetica delle orchidee.....	22
1.4.1	Il Genoma delle Orchidaceae	22
1.4.2	Analisi citogenetiche	24
1.4.3	Ibridazione in situ fluorescente - FISH.....	26
1.5	La poliploidia ed il fenomeno della endopoliploidia nelle Orchidee.....	27
1.5.1	Poliploidizzazione in vitro.....	30
1.6	Nuovi metodi per l'analisi di cellule vegetali: la Citofluorimetria a flusso	32
1.6.1	Come funziona un citometro a flusso	33
1.6.2	La separazione cellulare (flow Sorting)	36
1.7	La citometria a flusso nelle piante	37
1.7.1	Fluorocromi specifici per il DNA.....	37
1.7.2	Analisi del contenuto di DNA in nuclei in sospensione	38
1.7.3	Analisi e sorting dei protoplasti.....	43
1.8	Caratterizzazione dei materiali vegetali tramite marcatori molecolari	44
1.8.1	Marcatori RAPD.....	45
1.8.2	Marcatori SSR.....	46

1.9 Obiettivi del Dottorato	47
2.0 MATERIALI E METODI	51
2.1 Materiale vegetale	51
2.1.1 Sterilizzazione degli espianti	52
2.2 Coltura in vitro.....	52
2.2.1 Coltura espianti	52
2.2.2 Induzione embriogenesi somatica	52
2.2.3 Coltura in sospensione di PLBs.....	53
2.3 Isolamento dei protoplasti	53
2.3.1 Soluzioni enzimatiche.....	54
2.3.2 Isolamento protoplasti da foglia	54
2.3.3 Isolamento protoplasti da PLBs.....	55
2.3.4 Purificazione dei protoplasti su gradiente	55
2.3.5 Analisi della vitalità.....	57
2.4 Ibridazione somatica	57
2.4.1 Fusione tramite PEG.....	57
2.4.2 Elettrofusione dei protoplasti	59
2.5 Coltura dei protoplasti	59
2.6 Poliploidizzazione	61
2.7 Citometria a flusso.....	61
2.7.1 Isolamento di nuclei in sospensione	62
2.7.2 Analisi del contenuto di DNA	62
2.7.3 Analisi della ploidia.....	63
2.7.4 Analisi e separazione citofluorimetrica degli ibridi	63
2.8 Analisi marcatori molecolari.....	64
2.8.1 Estrazione del DNA genomico	64
2.8.2 Analisi RAPD	65

2.8.3 Analisi SSR.....	66
2.8.4 Analisi dei profili elettroforetici	67
2.9 Analisi citologiche.....	67
2.9.1 Colorazione Feulgen	67
2.9.2 FISH su nuclei in sospensione.....	68
2.9.3 Analisi microscopiche	69
2.10 Analisi morfologiche.....	69
2.10.1 Analisi delle dimensioni e della densità stomatica	69
2.10.2 Analisi morfometriche.....	70
2.11 Analisi statistiche.....	70
3.0 RISULTATI	72
3.1 Micropropagazione degli espianti	72
3.2 Induzione di protocormi.....	75
3.3 Coltura in Sospensione dei PLBs.....	77
3.4 Isolamento protoplasti	80
3.4.1 Isolamento protoplasti da foglia	81
3.4.2 Isolamento protoplasti da PLBs.....	83
3.5 Fusione protoplasti.....	88
3.5.1 Fusione chimica	89
3.5.2 Elettrofusione.....	90
3.6 Separazione citofluorimetrica degli ibridi somatici.....	92
3.7 Coltura dei protoplasti	94
3.8 Poliploidizzazione dei PLBs.....	101
3.8.1 Rilevamento del peso fresco dei PLBs.....	101
3.8.2 Analisi citometrica dei PLBs poliploidizzati	104
3.9 Analisi della Ploidia.....	118
3.10 Analisi del contenuto di DNA	121

3.10.1 Poliploidi e duplicazione parziale	123
3.11 Analisi molecolari	126
3.11.1 Analisi RAPD	127
3.11.2 Analisi SSR	129
3.12 Analisi citogenetiche	129
3.12.1 Conteggio cromosomico.....	130
3.12.2 Caratterizzazione FISH.....	131
3.13 Analisi morfometriche.....	134
3.13.1 Tasso di differenziamento a plantula	134
3.13.2 Analisi morfometriche: dimensione e densità degli stomi	135
3.13.3 Valutazioni morfometriche	138
4.0 Discussione	141
Conclusioni	149
BIBLIOGRAFIA	151
APPENDICE	168

1.0 PARTE GENERALE

Le *Orchidaceae*, con le loro 25.000 specie, sono ad oggi la più grande famiglia di Angiosperme (Atwood, 1986). Le orchidee rappresentano, da sole, il 10% di tutte le piante mondiali a fiore, grazie alle loro molteplici forme (epifite, litofite, saprofite, terrestri) si sono adattate a vivere in tutti gli ecosistemi, ad eccezione di quello Antartico, con la massima espansione nelle regioni tropicali e subtropicali (Pridgeon *et al.* 1999). Le loro molteplici differenze morfologiche associate con i loro splendidi fiori hanno fatto diventare le specie di orchidee e i loro ibridi estremamente popolari sul mercato floricolo. Questa spettacolare diversificazione è stata correlata all'interazione specifica tra i fiori delle orchidee ed i loro impollinatori naturali (Cozzolino e Widmer 2005), all'interazione sequenziale e rapida tra deriva genetica e selezione naturale (Tremblay *et al.* 2005), al ruolo dell'interazione obbligata orchidea-fungo (Otero e Flanagan 2006), e al metabolismo Crassulaceo acido e all'epifitismo (Silvera *et al.* 2009). Inoltre le orchidee possiedono svariate ed uniche strategie riproduttive che contribuiscono al loro successo. Queste includono l'impacchettamento del polline in masse polliniche, l'impollinazione regolata durante lo sviluppo dell'ovario/ovulo, la sincronizzazione dei tempi di micro- e mega-gametogenesi per una fecondazione efficace ed il rilascio di migliaia o milioni di embrioni immaturi (semi privi di endosperma) in baccelli maturi (Yu e Goh, 2001).

1.1 Cenni storici

L'interesse commerciale su queste piante comincia intorno alla metà del XVIII secolo, quando arrivarono in Europa (in particolare inizialmente in Inghilterra) le prime orchidee introdotte a scopo ornamentale. Il loro costo era esorbitante anche perché fino ad allora nessuno era riuscito a coltivarle a regime controllato, e l'unico modo per procurarsele era quello di comprare i pochi individui che sopravvivevano ai lunghi viaggi dai loro lontani paesi di origine (America, Asia o Africa).

Il primo a sfruttare commercialmente le orchidee fu Conrad Loddiges nel 1812, seguito da molti altri importatori, tra cui J. Veitch & Sons e Frederick Sander, che finanziarono spedizioni nei più remoti angoli della terra per scoprire ed accaparrarsi le specie più belle, che ancora oggi portano i loro nomi.

Il primo ibrido artificiale a fiorire è stato la *Calanthe Dominyi* (*furcata* x *masuca*) nel 1856, realizzato da John Dominy, capo giardiniere della Veitch & Sons, seguito dalla *Cattleya Hybrida* (*guttata* x *loddigesii*). La scoperta che diverse specie e generi di orchidea potevano essere incrociati tra loro, diede il via al miglioramento genetico della specie e nei successivi 50 anni si realizzarono circa 200 nuovi ibridi (Yam *et al.* 2002).

Il fattore limitante rimase per lungo tempo la capacità germinativa dei semi, un meccanismo rimasto incompreso fino agli inizi del '900, quando sia Noel Bernard in Francia che German Hans Burgeff in Germania, intuirono la fondamentale relazione che esisteva tra la germinazione delle orchidee e la presenza obbligatoria di un fungo appartenente al genere *Rhizoctonia*. In quel momento non era ancora chiara la relazione simbiotica che esisteva tra i due organismi, ma la scoperta che i semi inoculati con il fungo erano capaci di germinare, diede un nuovo impulso alla coltura delle orchidee.

Un ulteriore passo avanti si fece nel 1922, quando alla Cornell University il fisiologo vegetale americano Lewis Knudson pubblicò il suo lavoro sulla germinazione asimbiotica delle orchidee (Knudson, 1922). Knudson appurò che il ruolo del fungo era quello di fornire all'embrione gli zuccheri ed i sali minerali di cui necessitava per svilupparsi, e formulò un mezzo di coltura artificiale che conteneva tutte le sostanze necessarie per permettere la germinazione e la crescita delle piantine in vitro in assenza del fungo. Molti substrati di coltura ancora oggi largamente utilizzati per la micropropagazione di moltissime specie vegetali derivano proprio da quei primi studi pionieristici (Vacin e Went, 1949). Da quel momento in poi è stato possibile produrre su larga scala nuove specie ed ibridi di orchidea.

Subito dopo la seconda guerra mondiale il mercato delle orchidee crebbe in importanza e molte aziende produttrici sorsero in Gran Bretagna, Francia, negli Stati Uniti e alle Hawaii.

Negli anni sessanta fu poi sviluppata la tecnologia della micropropagazione meristematica delle piante. Milioni di nuovi individui (cloni) poterono essere prodotti a partire da un unico apice vegetativo. Questa tecnologia si è rivelata particolarmente utile per piante come le *Vuylstekeara*, che derivano dall'ibridazione di ben tre generi diversi (*Cochlioda* x *Miltonia* x *Odontoglossum*). Non a caso la *Vuylstekeara Cambria* 'Plush' (Griesbach, 2002) è stata la prima pianta ad essere prodotta su larga scala in questo modo. Ogni clone infatti ha lo stesso identico patrimonio genetico della pianta madre (*True-to-Type*), mentre le piante che derivano da seme sono soggette alla segregazione degli alleli dei genitori e spesso danno origine a

individui difforni tra loro. Questo fenomeno non è desiderabile per una produzione industriale di tipo vivaistico, il cui prodotto deve aderire a precisi standard fenotipici che ne determinano il valore commerciale.

Dagli anni ottanta la tecnologia della micropropagazione è stata acquisita anche nei paesi del Sud-Est asiatico che, grazie a costi di manodopera irrisori, ed un clima decisamente più adatto di quello europeo, riescono a produrre quantità elevatissime di piante a costi decisamente competitivi. La riduzione del prezzo/pianta si è accompagnata in maniera direttamente proporzionale alla vasta diffusione delle orchidee nel mercato florovivaistico mondiale.

1.2 Lo stato del commercio e dell'industria delle Orchidee

Già nel 1957, James Shoemaker disse che: “ La coltivazione delle Orchidee non ha ancora pienamente raggiunto la transizione da un semplice hobby ad un'industria vera e propria”. Oggi la coltivazione delle orchidee è molto più di una semplice industria è diventato un vero e proprio *buisness* internazionale (Griesbach, 2002). Attualmente l'*import/export* mondiale delle orchidee si aggira su un valore di mercato di circa 150 milioni di dollari (U.S. Department of Agriculture 2010-2011; Fig. 1).

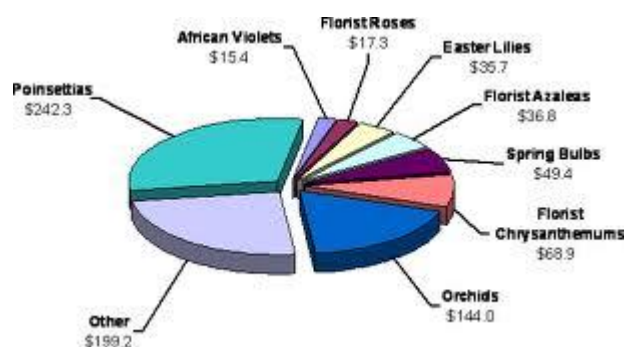


Figura 1. Grafico a torta dove sono presi in considerazione i valori sul mercato mondiale delle diverse specie ornamentali, commerciate per il valore dei loro fiori. I valori si riferiscono al biennio 2010-2011.

Di queste circa l'80% sono commercializzate come fiore reciso e il restante 20% come piante in vaso. Le Orchidee, da sole, rappresentano il 3% dei fiori recisi totali importati nell'Unione Europea, per un valore totale di mercato di 21 milioni di euro. Se da un lato il Giappone è il più grande importatore di orchidee recise, dall'altro l'Asia domina il mercato mondiale per quanto riguarda la produzione (Fig. 2). I maggiori produttori/fornitori mondiali sono la Thailandia, Singapore e Malaysia; seguite da Olanda, Italia, Francia e Nuova Zelanda.

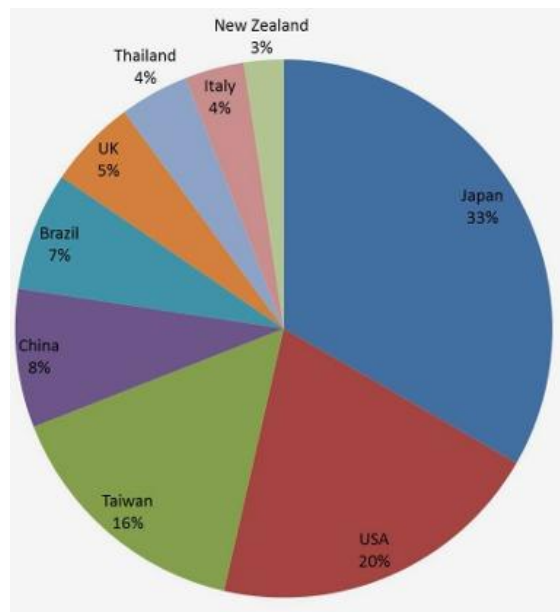


Figura 2. Nel grafico sono rappresentate le percentuali di importazione delle Orchidee nei diversi paesi mondiali.

Le maggiori specie coltivate appartengono ai generi *Dendrobium*, *Vanda*, *Paphiopedilum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* e *Cymbidium*.

1.3 Il miglioramento genetico nelle Orchidee: dall'incrocio classico alle biotecnologie

Le orchidee possiedono un alto valore ornamentale e i consumatori sono sempre desiderosi di nuove *cultivar* ad elevato valore ornamentale, come fiori con nuove combinazioni di forma e colore. Per questa ragione la vita di una nuova varietà è sempre molto breve, per quanto questa possa essere eccellente alla fine comunque perde valore sul mercato proprio perchè il consumatore perde interesse appena la novità diventa familiare. Questo destino spinge perciò i *breeders* e le industrie a sviluppare e a rilasciare sul mercato sempre nuove varietà.

Per poter soddisfare le continue richieste ed esigenze dei consumatori con sempre nuove e migliorate varietà di orchidee, le industrie del settore utilizzano i metodi classici di ibridazione tramite impollinazione e selezione per creare nuovi ibridi di orchidea. La Royal Horticulture Society, attualmente una fra le più grandi e famose organizzazioni mondiali dedite all'orticoltura, ha registrato, alla fine del 2011, 250.000 *cultivar* e più di 106.000 ibridi commerciali, sia naturali che artificiali (Fig. 3), con migliaia di nuovi ibridi che vengono aggiunti ogni anno (International Registration Authority for Orchid Hybrids, Royal

Horticultural Society, UK; <http://www.rhs.org.uk/Plants/RHS-Publications/Orchid-hybrid-lists>).



Figura 3. Quattro comuni ibridi commerciali di Orchidea derivati da incrocio intergenerico.

Questo è il più alto numero di ibridi mai registrato all'interno del regno vegetale. Alcuni ibridi di orchidea sono addirittura multigenerici. Ad esempio uno dei più popolari ibridi di *Phalaenopsis* "*Phalaenopsis Taisuco*" rilasciato a Taiwan nel 1998 deriva da *P. amabilis*, *P. rimestadiana*, *P. aphrodite*, *P. schilleriana*, *P. stuartiana* e *P. sanderiana* ed è stata sviluppata utilizzando materiale proveniente da diversi stock genetici presenti nelle industrie locali e altri provenienti da paesi stranieri, quali Giappone, Olanda e Stati Uniti (Chen *et al.* 1999). Tuttavia, il *breeding* classico, il quale richiede l'ibridazione tradizionale per trasmettere tratti utili all'interno di varietà commerciali, e la seguente caratterizzazione delle nuove varietà, è un processo laborioso che richiede molto tempo dato che nelle orchidee dalla germinazione

del seme alla fioritura passano di media dai 3 ai 6 anni fino ad arrivare a specie che impiegano sino a 13 anni per ottenere il primo fiore (Arditti, 1992; Kostenyuk *et al.* 1999; Kishor *et al.* 2006; Tang e Chen 2007). Proprio questo dover posticipare la selezione l'ostacolo più importante per la produzione rapida di nuove varietà di orchidee. A causa di queste limitazioni naturali, la produzione di ibridi e la loro successiva selezione richiedono tempi lunghi e alti costi di produzione che hanno spostato lo sviluppo di questi nuovi ibridi dall'Europa al Sud-Est Asiatico dove il clima e la manodopera a basso costo hanno favorito la "fioritura" di industrie oramai tra le più importanti a livello mondiale. A questi limiti si aggiungono anche i problemi dovuti alla disponibilità di germoplasma che può essere utilizzato nei programmi di incrocio e all'incompatibilità di incrocio per impollinazione tra i diversi generi e specie della famiglia che fanno sì che molte desiderabili combinazioni rimangano fuori dai classici programmi di incrocio.

In questo scenario l'utilizzo delle biotecnologie per lo sviluppo di nuove varietà nelle orchidee diventa interessante per i ricercatori, i *breeders* e le industrie. Due sono sicuramente le metodologie a più alto potenziale in questo campo: a) l'uso della coltura *in vitro* per la propagazione e l'allevamento delle orchidee; b) la manipolazione cellulare e genomica per la creazione di nuove combinazioni e varietà. L'utilizzo di queste biotecnologie ha come scopo, da un lato, quello di ridurre i tempi e i costi della produzione velocizzando la germinazione e la propagazione e aiutando a selezionare rapidamente il materiale di interesse, eliminando sin da subito quello non avente valore commerciale; dall'altro lato le biotecnologie attraverso le manipolazioni cellulari e del genoma possono portare alla formazione di ibridi e mutanti totalmente nuovi e che non sarebbe possibile, per motivi di incompatibilità, ottenere con i metodi classici.

1.3.1 Micropropagazione

La micropropagazione, analogamente ai tradizionali sistemi di propagazione vegetativa, consente la produzione di cloni e consiste nella moltiplicazione vegetativa *in vitro*, cioè in maniera asettica ed in condizioni controllate di nutrimento, umidità, luce e temperatura, di piante attraverso la coltura di loro espianti. Questa tecnica sfrutta la totipotenza delle cellule vegetali permettendo di ottenere un elevato numero di piante geneticamente identiche tra loro ed alla pianta madre, anche disponendo di limitate quantità di materiale iniziale. L'attitudine alla micropropagazione è fortemente condizionata dal genotipo e può essere incrementata ottimizzando la composizione del substrato e delle condizioni di coltura.

La propagazione in vitro può avvenire secondo tre principali modelli: per germogli ascellari, per organogenesi e per embriogenesi (Fig. 4).

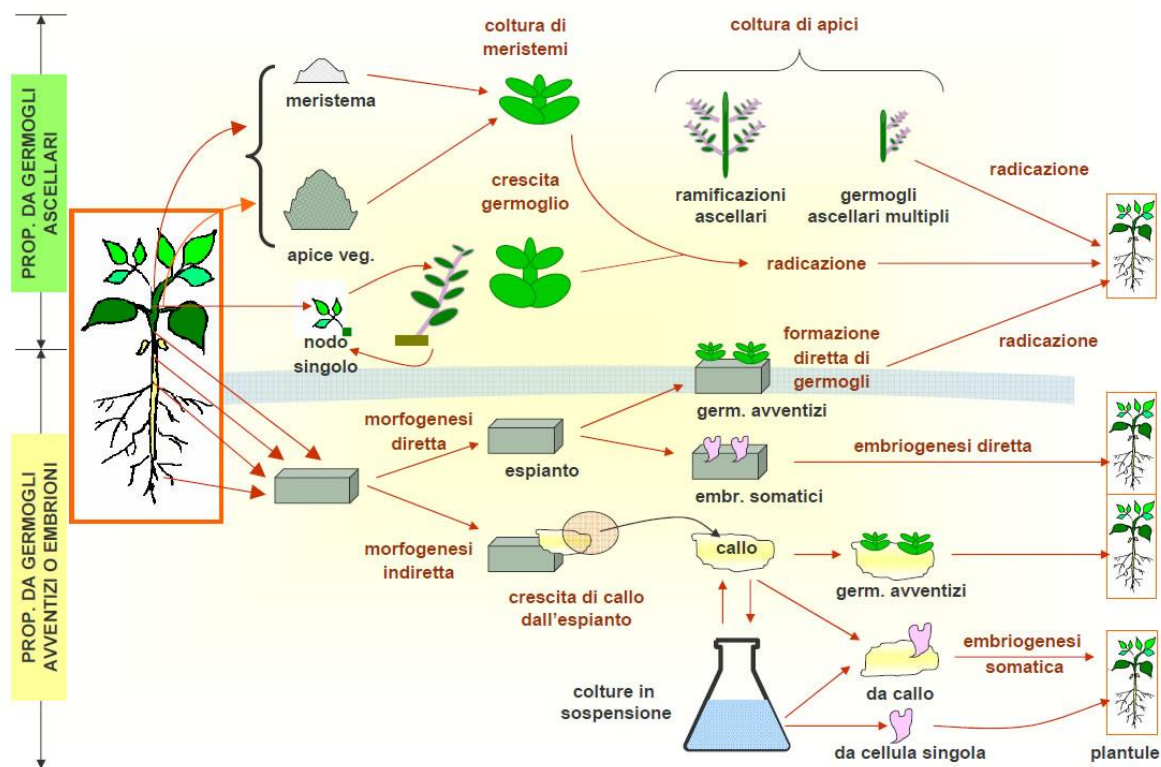


Figura 4. Schema generale dei vari modelli attraverso i quali propagando *in vitro* diverse parti della pianta si possono ottenere delle plantule intere.

Dato che le orchidee si riproducono per impollinazione, la loro propagazione per seme porta alla produzione di piante eterozigote. Perciò ottenere dei protocolli di rigenerazione da varie parti vegetative della pianta matura è essenziale. Morel nel 1960 utilizzò per primo i meristemi apicali di *Cymbidium* per ottenere dei cloni della pianta madre passando per la prima volta attraverso l'uso di *Protocorm-Like Bodies* (PLBs), che descrisse come strutture che assomigliavano a dei cormi ma che erano formate da cellule di tipo meristematico o calloso (Fig. 5).

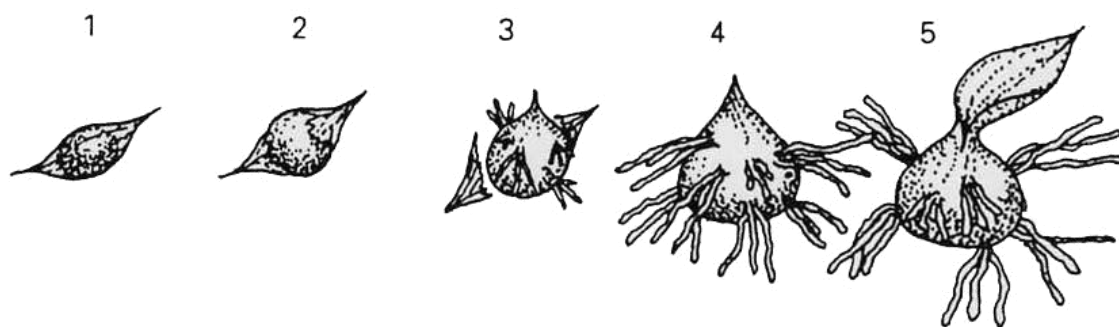


Figura 5. Schema dello sviluppo di un PLBs. 1) stadio iniziale di formazione, il PLB ha un orientamento polare; 2) dopo un paio di mesi il PLB cresce mantenendo la sua struttura polare; 3) dopo 3 mesi il PLB comincia a formare le prime radici; 4) Il PLB oramai si è ingrossato e la radicazione è molto pronunciata, si vede anche molto bene il meristema apicale; 5) Dopo 6 mesi oramai dal PLB si è sviluppata una vera e propria plantula con radici ben sviluppate e la prima fogliolina originata dall'apice apicale (da Yam e Arditti, 2009).

In seguito, nel 1963, Wimber pubblicò il primo dettagliato protocollo per la produzione *in vitro* di *Cymbidium* partendo dalla coltura di meristemi. Da qui in poi le tecniche di coltura *in vitro* dei tessuti sono state ampiamente studiate e sviluppate, non solo per la loro propagazione rapida e su larga scala ma anche per la conservazione *ex situ* delle orchidee. La micropropagazione è stata implementata utilizzando diversi tipi di espianti: germogli radicali, gemme fiorali, germogli ascellari, meristemi radicali e rizomi (Chugh *et al.* 2009). Le più importanti orchidee commerciali come *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Miltonia* e *Phalaenopsis* sono state propagate attraverso l'induzione alla formazione di PLBs da diversi tipi di espianti.

1.3.2 Embriogenesi somatica

L'embriogenesi somatica è sicuramente una delle grandi possibilità offerte dalle tecnologie *in vitro* ed è un metodo potente per la propagazione in massa di piante *True-to-Type*. Un embrione somatico è generalmente considerato possedere un'origine da singola cellula ed è estremamente vantaggioso negli studi sulle variazioni spontanee che si originano durante le colture *in vitro* o che possono essere indotte sperimentalmente attraverso mutagenesi o trasformazione genetica (Chen e Chang, 2006). Tuttavia, gli embrioni somatici non sembrano essere stati ben documentati nelle orchidee, sebbene studi citologici ed istologici confermino che i PLBs sono simili, o equivalenti, ad un embrione somatico (Steward e Mapes, 1971; Begum *et al.* 1994; Chen *et al.* 1999; Teixeira da Silva e Tanaka, 2006). Quegli organi che sembrano protocormi e che si formano spontaneamente nelle orchidee hanno uno sviluppo che è considerato unico nel suo genere. Esso può avvenire in due modi: i) per embriogenesi

diretta (Fig. 6), ossia i PLBs si sviluppano senza passare per la fase del callo, ovvero una proliferazione cellulare avventizia, e per ii) embriogenesi indiretta, dove i PLBs si sviluppano attraverso il passaggio per una fase intermedia a sviluppo proliferativo cellulare multiplo, o callo (Steward e Mapes, 1971; Chen *et al.* 1999; Begum *et al.* 1994; Huan *et al.* 2004; Teixeira da Silva e Tanaka 2006; Liao *et al.* 2011).

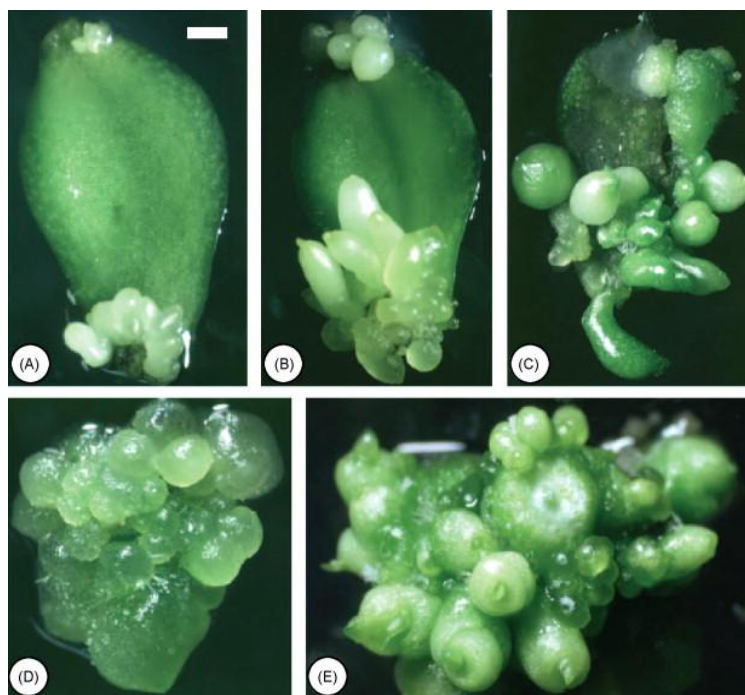


Figura 6. Embriogenesi somatica diretta in *Phalaenopsis*. a-b Dagli apici fogliari di una foglia posta su un opportuno substrato cominciano a svilupparsi i primi abbozzi proembrionali; **c** i proembrioni cominciano a svilupparsi in PLBs fino a che non compare una vera e propria masserella **(e)**, infine dai PLBs cominciano ad avere origine i primi abbozzi di giovani plantule. Scala della barra: 7,2mm. (da Chen e Chang, 2006).

La risposta morfogenetica nelle orchidee varia sia in base al tipo di espianto che al livello di ormoni endogeni (Chugh *et al.* 2009; Lu *et al.* 2001). Tuttavia le combinazioni, le concentrazioni e i rapporti tra i diversi ormoni della crescita sono fondamentali (Gow *et al.* 2008), infatti le citochinine, ed in particolare il Tidiazuron (TDZ), è l'unica classe di ormoni che ha dato una risposta embriogenetica significativa. Molti studi sono stati pubblicati sull'organogenesi e sull'embriogenesi somatica nelle orchidee, in *Cymbidium* e i suoi ibridi (Bhadra e Hossain, 2003; Teixeira de Silva *et al.* 2005, 2006), *Phalaenopsis* (Ishii *et al.* 1998; Chen e Chang, 2006; Gow *et al.* 2008), *Dendrobium* (Chung *et al.* 2007; Asghar *et al.* 2011). Tokuhara e Mii (2001, 2003) hanno riportato un altro efficiente sistema che sfrutta l'embriogenesi somatica ottenuta partendo da colture cellulari in sospensione originate da apici radicali. Zhao *et al.* (2008) hanno indotto embriogenesi somatica in *Dendrobium*

candidum con un alta frequenza di embrioni rigenerati a partire da segmenti di protocormo. Questi sistemi possono facilitare notevolmente la micropropagazione commerciale delle orchidee perchè possiedono un alto potenziale di rigenerazione comparati con gli altri metodi. Inoltre, il callo con capacità rigenerative è considerato essere un appropriato materiale “target” per le trasformazioni (Belarmino e Mii, 2000; Teixeira da Silva *et al.* 2011). Questa prospettiva apre ulteriormente la strada per l'utilizzo di un approccio biotecnologico nel miglioramento delle orchidee, tramite il trasferimento di informazioni genetiche in cellule in grado poi di generare un embrione ed una pianta che possiede quelle nuove caratteristiche inserite in maniera omogenea e stabile.

I sistemi di coltura che sfruttano le sezioni sottili (*Thin Cell Section*, TCS) sono anche loro molto promettenti per lo sviluppo di metodologie efficienti nella rapida rigenerazione delle orchidee. Tuttavia questo sistema di coltura non è ancora stato del tutto esplorato per la propagazione di orchidee di importanza commerciale eccetto per alcune specie di *Cymbidium*, *Phalaenopsis* e *Dendrobium* (Begum *et al.* 1994; Texeira de Silva e Tanaka 2006).

Nonostante lo spettacolare sviluppo della propagazione *in vitro* delle orchidee ci sono ancora grandi impedimenti da risolvere per poterla estendere a tutte le specie di orchidea di interesse. Uno dei maggiori problemi è causato dal fatto che i tessuti di orchidea una volta messi in coltura rilasciano una grande quantità di composti fenolici che una volta ossidati diventano tossici per le cellule (Compton e Preece, 1986). Uno dei metodi per evitare questa situazione è quello di aggiungere carbone attivo al terreno di coltura, il quale assorbe e trattiene i composti fenolici (Seeni e Latha, 2000, Dennis 2008), anche se però è stato dimostrato interferire con altri fattori importanti del metabolismo in quanto il carbone attivo trattiene anche gli elementi essenziali per la crescita e acidifica il terreno di coltura (Eymar *et al.* 2000). Inoltre, la presenza di alte concentrazioni di ormoni assieme ad una lunga permanenza in coltura sono tra i maggiori responsabili delle variazioni genetiche che si osservano nelle piante propagate *in vitro*, e chiamate comunemente variazioni somaclonali.

1.3.3 Variazione Somaclonale

Le colture *in vitro* possono consentire l'estrinsecazione della variabilità fenotipica già presente nella pianta madre, ma non espressa *in vivo*, così come quella indotta dalla coltura *in vitro* stessa ed osservabile nelle piante rigenerate. Ambedue queste possibilità di induzione di variabilità sono potenzialmente utilizzabile per la selezione di varianti con caratteristiche utili.

Questo tipo di variabilità “*in vitro*” fu definita per la prima volta con il termine “somaclonale” da Larkin e Scowcroft nel 1981. La variabilità somaclonale si riferisce pertanto alla comparsa casuale, nelle piante prodotte *in vitro*, di mutazioni genetiche solitamente irreversibili ed ereditabili a cui vanno aggiunte però anche le cosiddette variazioni epigenetiche, ovvero modificazioni non genetiche e quindi non ereditabili (Hirochika *et al.* 1996). La possibilità di rigenerare piante complete e di indurre variazione somaclonale attraverso le colture *in vitro* ha fatto sì che si sfruttasse questa caratteristica aggiungendo al terreno di coltura, sia solido che liquido, opportune sostanze mutagene allo scopo di promuovere ulteriormente la comparsa di varianti utili.

Generalmente nelle orchidee la variazione somaclonale avviene durante la proliferazione dei germogli e dei PLBs che porta a variazioni morfologiche e fisiologiche nei rigeneranti (Teixeira de Silva, 2005). Possono avvenire anche alcuni cambiamenti nella quantità di DNA presente nelle cellule che inducono quindi variazioni del livello di ploidia, ma questi possono anche non esprimersi in variazioni fenotipiche (Fukai *et al.* 2002; Teixeira da Silva e Tanaka, 2006). I meccanismi di queste variazioni preesistenti, e che vengono espresse durante la coltura *in vitro* nelle orchidee sono ancora largamente sconosciuti soprattutto a causa dell’elevato tempo che intercorre tra una generazione e l’altra e che quindi rende difficile lo studio dell’ereditarietà. Sono stati ottenuti numerosi mutanti vegetativi tra i quali mutanti con: numero di foglie sovrabbondante, germogli ascellari multipli, foglie a forma di falce distorta e poliploidi (Chen *et al.* 1998). Nei mutanti riproduttivi invece spesso si osservano più petali modificati anche loro in veri e propri labelli (Fig. 7), molti fiori di *Phalaenopsis* e *Doritaenopsis* sono diventati famosi proprio per questa caratteristica. Sempre in *Phalaenopsis* è stata riscontrata una mutazione a carico della lunghezza degli internodi.



Figura 7. Variazioni somaclonali nelle orchidee. In a e b sono mostrati due esempi di mutanti riproduttivi in *Phalaenopsis*, sono mutanti pelorici in cui i sepal laterali si sono modificati in labelli.

L'ampio spettro di variazione somaclonale può contribuire a spiegare parte dei cambiamenti epigenetici evidenziati nei materiali riprodotti *in vitro*.

1.3.4 Manipolazioni cellulari: Protoplasti ed Ibridazione somatica

1.3.4.1 I Protoplasti

Quando l'incrocio sessuale non è attuabile, poichè non è possibile superare le barriere di incompatibilità riproduttiva pre-zigotica e post-zigotica, una valida alternativa per il trasferimento genico interspecifico è rappresentato dall'ibridazione somatica. Questa tecnica consente di produrre ibridi attraverso la fusione di protoplasti (ibridazione somatica). I protoplasti sono cellule vegetali private delle pareti cellulari tramite l'azione di una soluzione enzimatica (Sato, 1968) costituita in prevalenza da cellulasi, pectinasi ed, in alcuni casi, emicellulasi. Questi enzimi sono in grado di disgregare la cellulosa, la pectina (lamella mediana) e la emicellulosa, rispettivamente. La cellula privata del sostegno dato dalla parete cellulare, prende la conformazione a minore dispendio energetico, tipicamente a sfera. Nel 1960 E.C. Cocking individuò la possibilità di isolare protoplasti da tessuti differenziati (foglie, radici, steli) in seguito estesa anche ad aggregati cellulari indifferenziati (calli e sospensioni cellulari). Gli espianti utilizzati come materiale di partenza per gli isolamenti sono scelti possibilmente in fase di crescita, quando le cellule sono dotate di parete cellulare più sottile, questo perchè lo stato fisiologico del tessuto influenza la resa e la vitalità (Sinha *et al.* 2003, Davey *et al.* 2005a). L'utilizzo di tessuti *in vitro* inoltre favorisce il superamento della stagionalità dell'espianto anche se è stato dimostrato che, in alcune specie, le piante *in vitro* comunque mantengono un "orologio" stagionale (Keskitalo, 2001).

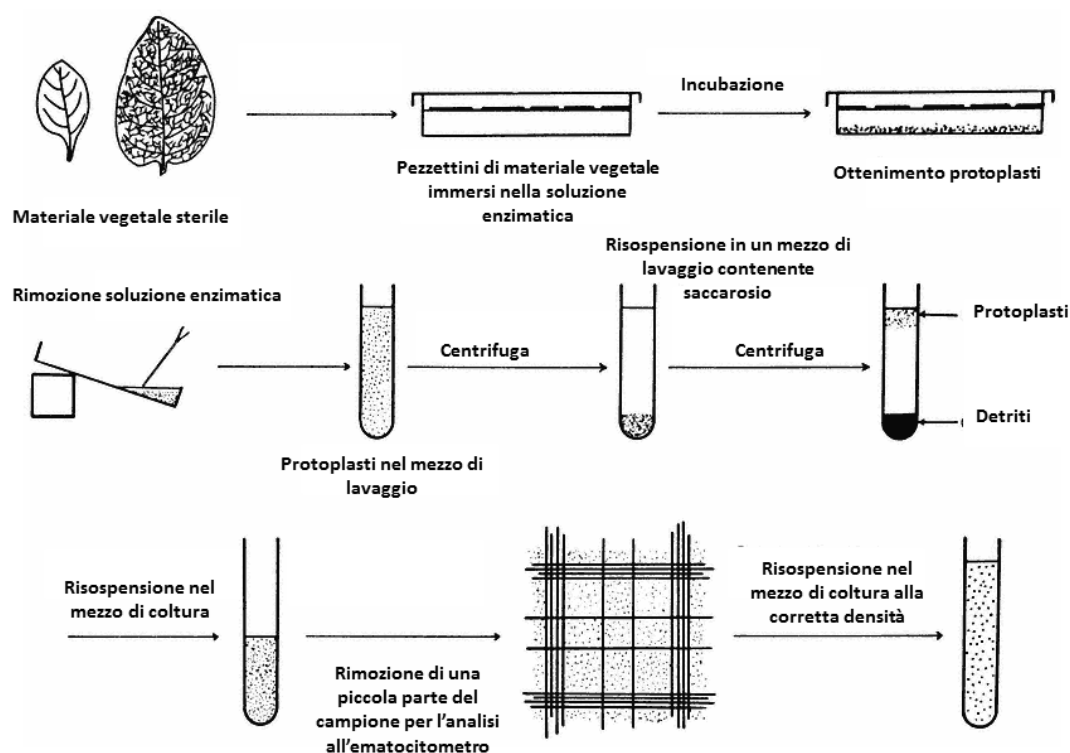


Figura 8. Schema generale che rappresenta le varie fasi del processo di isolamento dei protoplasti a partire da tessuto vegetale (foglia) sterile.

In funzione della specie, i protoplasti hanno il potenziale di rigenerare la parete cellulare, dedifferenziarsi, dividersi mitoticamente e proliferare a formare cloni cellulari e differenziarsi nuovamente sino a formare plantule (Davey *et al.* 2005a). L'efficienza di isolamento, la coltura e il potenziale rigenerativo delle piante dipende da numerosi fattori e parametri comprendenti la specie, il genotipo, il tipo di espanto, il trattamento enzimatico, le fasi di purificazione del campione e le condizioni di coltura (Davey *et al.* 2005a; Davey *et al.* 2005b; Fig. 8).

1.3.4.2 L'ibridazione somatica

In generale, l'ibridazione somatica prevede le seguenti fasi sperimentali principali: i) isolamento e purificazione dei protoplasti; ii) fusione dei protoplasti attraverso procedimenti chimici o fisici; iii) selezione degli eterocarionti; iv) coltura delle cellule ibride e rigenerazione delle piante; v) caratterizzazione genetico-molecolare delle plantule.

L'ibridazione delle cellule somatiche richiede la rimozione della parete cellulare per formare i protoplasti e l'induzione di un contatto tra le membrane citoplasmatiche per poi favorirne la micro-rottura reversibile in modo da realizzare la fusione tra i due protoplasti indipendenti.

In generale, la fusione dei protoplasti vegetali può avvenire spontaneamente durante la digestione della parete cellulare (omofusione). Questo tipo spontaneo di fusione è stata la prima osservata ed è stata attribuita all'espansione dei plasmodesmi tra i protoplasti derivati da cellule adiacenti (Cocking, 1972). Le fusioni controllate dei protoplasti possono essere ottenute con due classi di metodologie, una basata sull'utilizzazione di sostanze chimiche in grado di favorire la costituzione di ponti di collegamento tra le cellule, mentre l'altra sfrutta proprietà fisiche dei protoplasti stessi, quali la carica elettrica superficiale e la possibilità di indurre una polarizzazione della struttura cellulare.

Nel 1974 Kao e Michayluk riportarono la prima fusione di tipo chimico causata dall'aggregazione e fusione di protoplasti indotta da soluzioni di Polietilenglicole, PEG, in presenza di ioni calcio. Il PEG ($\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$) è altamente idrosolubile ed ha una carica leggermente negativa, conferita dalla presenza del legame etere, che gli consente di unirsi con i gruppi carichi positivamente delle membrane cellulari; il PEG, in presenza di ioni Ca^{++} , agisce come ponte molecolare tra i due protoplasti ed ha quindi una funzione aggregante. La fusione vera e propria avviene durante il lavaggio per l'allontanamento del PEG poiché tale operazione determina una redistribuzione delle cariche elettriche superficiali di membrana (Wojcieszyn *et al.* 1983), con la creazione di micropori di membrana che tendono a riunire le due cellule adiacenti in un'unica entità ibrida.

Molti fattori hanno effetto sulla fusione quali: le condizioni fisiologiche dell'espianto di partenza ed il grado di purezza dei protoplasti, la fase di preincubazione dei protoplasti in miscele di sali, la densità dei protoplasti alla fusione, e la concentrazione del PEG ed il suo grado di purezza per i suoi effetti citotossici. Uno degli inconvenienti maggiori nella fusione chimica risiede nel fatto che l'aggregazione dei protoplasti non può essere controllata completamente, per cui spesso si va incontro a fusioni multiple piuttosto che a fusioni singole tra due protoplasti.

Un metodo alternativo per l'ottenimento di fusioni è stato sviluppato da Senda e collaboratori i quali nel 1979 dimostrarono che la produzione di protoplasti ibridi poteva essere ottenuta mediante elettrofusione. Sviluppando questa ultima scoperta, Zimmerman nel 1981 mise a

punto un sistema molto efficiente per ottenere la fusione simultanea di un grande numero di protoplasti, che non presenta marcati problemi di vitalità per i prodotti di fusione e che consente un'elevata riproducibilità dei risultati. Questo metodo prevede che i protoplasti vengano posti a contatto sfruttando un campo elettrico in corrente alternata con voltaggio e frequenza appropriati. Gli elettrodi che generano questo campo, cambiando polarità molto velocemente, fino a migliaia di volte al secondo, inducono la formazione di un dipolo transiente sulla superficie esterna dei protoplasti. In questo modo i protoplasti possono avvicinarsi tra loro disponendosi a catena (*pearl chain*), lungo le linee di forza del campo elettrico compreso tra i due elettrodi, grazie al fenomeno chiamato dielettroforesi. A questo punto attraverso i protoplasti allineati uno accanto all'altro vengono fatti passare uno o più brevi impulsi di corrente continua ad alto voltaggio. Tali impulsi si trasmettono da un protoplasto all'altro nei punti di contatto delle membrane, poichè in corrispondenza di questi punti il potenziale elettrico è maggiore rispetto a quello dell'ambiente circostante che funge praticamente da isolante. Come conseguenza del passaggio della corrente continua si ottiene la rottura della membrana dei protoplasti adiacenti tra loro nella regione di contatto e si formano così dei ponti citoplasmatici tra i due protoplasti che allargandosi provocano la fusione delle loro membrane. L'elettrofusione è rapida, controllabile e può fornire rese di fusione fino al 50-80%.

L'ibridazione somatica può generare, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, ibridi simmetrici oppure asimmetrici, a seconda che il contributo molecolare e citoplasmatico delle due specie coinvolte sia uguale (fusione binaria) o sbilanciato verso uno delle due linee parentali (Ibridi asimmetrici con perdita di cromosomi di uno dei parentali, ibridi citoplasmatici o ci-ibridi nei quali il parentale donatore contribuisce all'ibrido solamente con il proprio citoplasma).

Nella Fig. 9 vengono mostrati esempi di possibili modalità di fusione.

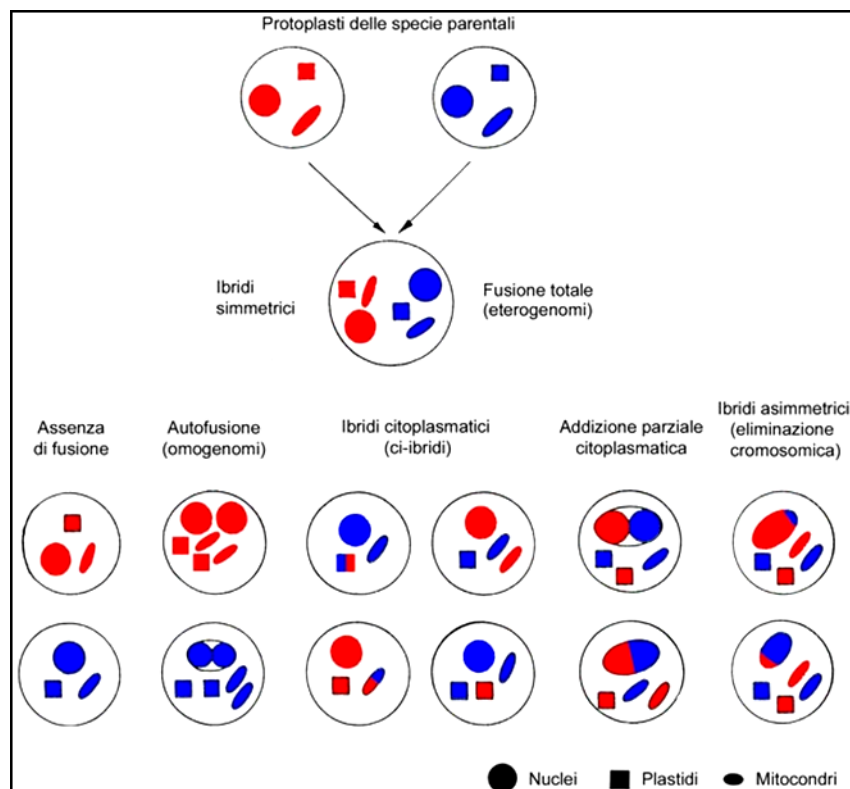


Figura 9. Schema generale di fusione tra protoplasti provenienti da due specie differenti. Sono mostrati i diversi casi che si possono ottenere durante la fusione; protoplasti non fusi, omofusioni, eterofusioni, ibridi citoplasmatici, ibridi asimmetrici caratterizzati da una eliminazione cromosomica a carico di uno dei due genomi di partenza.

1.3.4.3 Manipolazioni cellulari nelle Orchidee

Nella famiglia delle *Orchidaceae*, i primi studi sull'isolamento dei protoplasti risalgono al 1978 nel quale è stato riportato l'isolamento dei protoplasti dai protocormi di *Renantanda* (Teo and Neumann, 1978a). Successivamente sono stati riportati isolamenti di protoplasti da foglie di *Cattleya* e *Phalaenopsis*, da semi di *Dendrobium* e *Phaphiopetalum* (Teo and Neumann, 1978b), e da tessuto foliare di *Vanilla plantifolia* (Price e Earle, 1984). Ad oggi, tuttavia, la formazione di colonie in rigenerazione è stata riportata solo in *Dendrobium* (Kuehnle e Nan, 1990; Khentry *et al.* 2006) e *Phalaenopsis* (Sajise *et al.* 1990; Kobayashi *et al.* 1993; Ichihashi e Shigemura, 2002). Nel 2007 Shrestha *et al.* riportano per primi un metodo efficiente per rigenerare plantule da protoplasti di *Phalaenopsis* partendo da colture cellulari embriogenetiche in sospensione.

La limitata capacità rigenerativa mostrata da questa famiglia ha sicuramente scoraggiato sino ad oggi l'utilizzo delle fusioni dei protoplasti per lo sviluppo di ibridi. Tra i limitati tentativi riportati in letteratura, si possono citare quelli effettuati in *Dendrobium* (Kanchanapoom *et al.*

2001) e quello in *Vanilla* (Divakaran *et al.* 2008). In entrambi i casi per la fusione è stato utilizzato il PEG ma non è stata riportata rigenerazione in nessuno dei due casi. Nonostante la rilevanza economica che avrebbe l'ottenimento di fusioni tra protoplasti nelle Orchidee, per questa famiglia non ci sono ancora dei protocolli riproducibili ed efficaci di rigenerazione da protoplasti (Davey *et al.* 2005; Davey *et al.* 2007).

1.4 La citogenetica delle orchidee

La variazione intraspecifica nella dimensione del genoma, che comunemente si osserva nelle orchidee (Bennett e Leitch, 2005), è dovuta ad influenze ambientali che inducono alterazioni del ciclo cellulare con aberrazioni cromosomiche di vario tipo. Da ciò consegue che il contenuto di DNA non sia mai costante nè tra individui della stessa specie, nè tra cellule dello stesso individuo (Greilhuber 1998; Greilhuber e Obermayer, 1997). Un'informazione accurata sulla dimensione del genoma, intesa come quantità di DNA, sarebbe di grande importanza per i breeders ed i genetisti molecolari (Chen e Chen, 2007).

Nelle orchidee la poliploidia gioca un ruolo importante nello sviluppo di nuove e differenti varietà di Orchidee (Chen e Chen, 2007). Le basi genetiche degli ibridi commerciali brevettati sono solitamente poco conosciute e la sterilità della progenie, che deriva da ibridazione tra specie a contenuto di DNA e numero cromosomico differente, è uno dei problemi maggiori che incontrano i *breeders*. Per questo motivo avere a disposizione un' ampia conoscenza della genomica e della citogenetica delle specie è di fondamentale importanza, come pure è utile avere una metodologia per l'induzione di poliploidi artificiali da introdurre nei programmi di incrocio o per la poliploidizzazione degli ibridi già presenti sul mercato (Nakasome e Kamemoto, 1961; Griesbach 1985).

1.4.1 Il Genoma delle Orchidaceae

Le *Orchidaceae* sono attualmente la famiglia più variabile all'interno delle Angiosperme, con valori 1C che variano da un minimo di 0.33pg in *Trichocentrum maduroi*, a un massimo di 55.4pg in *Pogonia ophioglossoides*. Nonostante questo ampio *range*, la maggior parte delle specie sono caratterizzate da genomi piccoli con un valore medio 1C di 4,0pg ca (Chase *et al.* 2003). Esistono anche specie con genomi con quantità di DNA superiori ai 20pg come nel caso di 48 delle 59 specie delle *Cypripedioideae* e una specie di *Vanilloideae*. La sottofamiglia più variabile è quella delle *Epidendroideae* dove i valori vanno oltre le 60 volte ($1C=0.3\div 19.8pg$), per contro invece le *Orchidoideae* sono caratterizzate da una differenza

molto meno marcata, che varia solo di 6 volte (1C=2.9-16.4pg), anche se il valore medio è maggiore nelle *Orchidoideae*, (1C=8.4pg, rispetto alle *Epidendroideae*, 1C=3.6pg). Per le *Vanilloideae* si hanno dati sul contenuto di DNA solo per quattro specie, appartenenti a due tribù, e per tre di queste specie di *Vanilla* la differenza è minima (1C = 7.3-8.0pg) in contrasto con il contenuto di *Pogonia ophioglossoides* (1C = 55.4pg) della tribù delle *Pogonieae*. Ad oggi, sono riportate misurazioni del contenuto di DNA per 327 specie di orchidea (Leitch *et al.* 2009) (Tab. 1).

Genere	Sottofamiglia	Tribù	Min(pg)	Max(pg)	Media(pg)
<i>Bletia</i>	Epidendroideae	Epidendreae	9.2	9.2	9.15
<i>Calanthe</i>	Epidendroideae	Sconosciuta	9.3	13.2	11.23
<i>Cattleya</i>	Epidendroideae	Epidendreae	1.3	4.3	2.82
<i>Cephalanthera</i>	Epidendroideae	Epidendreae	16.4	16.8	16.6
<i>Cymbidium</i>	Epidendroideae	Cymbidieae	3.2	4.7	4.1
<i>Dactylorhiza</i>	Orchidoideae	Orchideae	2.9	7.5	5.87
<i>Dendrobium</i>	Epidendroideae	Sconosciuta	0.8	5.9	1.64
<i>Disa</i>	Orchidoideae	Orchideae	6.0	6.0	5.95
<i>Epidendrum</i>	Epidendroideae	Epidendreae	1.5	1.5	1.5
<i>Epipactis</i>	Epidendroideae	Neottieae	19.8	19.8	19.8
<i>Laelia</i>	Epidendroideae	Epidendreae	1.3	1.8	1.55
<i>Miltonia</i>	Epidendroideae	Cymbidieae	3.6	5.7	4.45
<i>Oncidium</i>	Epidendroideae	Cymbidieae	0.3	4.6	3.39
<i>Ophrys</i>	Orchidoideae	Orchideae	9.5	10.8	10.2
<i>Orchis</i>	Orchidoideae	Orchideae	5.4	14.3	8.83

<i>Otoglossum</i>	Epidendroideae	Cymbidieae	3.2	3.6	3.41
<i>Paphiopedilum</i>	Cypripedioideae	Sconosciuta	16.5	35.9	25.35
<i>Phalaenopsis</i>	Epidendroideae	Vandaeae	1.2	8.3	3.82
<i>Pogonia</i>	Epidendroideae	Arethuseae	3.1	3.1	3.1
<i>Vanda</i>	Epidendroideae	Vandaeae	2.1	4.4	3.25

Tabella 1. Contenuto di DNA dei principali generi di Orchidea, sono messi in evidenza i valori massimi e minimi di contenuto di DNA all'interno del genere, a conferma della loro grande variabilità.

1.4.2 Analisi citogenetiche

La citogenetica studia al microscopio ottico la morfologia dei singoli cromosomi e il loro cariotipo, ossia l'insieme dei cromosomi di una cellula, valutando la presenza di anomalie sia nella struttura dei cromosomi (anomalie cromosomiche), che nel loro numero (anomalie genomiche) (Bass e Birchler, 2012).

Gli studi citogenetici nelle orchidee sono pochi e spesso incompleti; è stato stimato che appena il 10% delle specie appartenenti a questa famiglia sia stato citogeneticamente valutato (Davina *et al.* 2009). Il numero cromosomico varia da $2n=10$ a $2n=240$ con numero cromosomico base più frequente pari a $n=19$ o 20 (Jones, 1974). Una caratteristica interessante è che all'interno dei suoi generi, sebbene il contenuto di DNA vari in maniera rilevante, il numero cromosomico rimane costante. Ad esempio, il genere *Phalaenopsis* comprende 45 specie (Sweet, 1980), e tutte le specie hanno lo stesso numero cromosomico ($2n=2x=38$), ma il loro contenuto $2C$ di DNA varia da 2.74 pg in *P. sanderiana* a 16.61pg in *P. parischii* (Lin *et al.* 2001), ed i loro cariotipi differiscono in maniera significativa nella taglia cromosomica assoluta e relativa e nella posizione del centromero. Varia sia la grandezza del genoma che la quantità di cromatina costitutiva (CH) e c'è una correlazione positiva tra i due parametri (Kao *et al.* 2001). Per il genere *Dendrobium* il numero base è $2n=2x=38$ (Jones *et al.* 1998), anche se in questo caso c'è una certa variabilità, infatti delle 257 specie analizzate sulle circa 1000 finora conosciute 38 presentano un numero cromosomico $2n=2x=40$, alcune presentano entrambe le situazioni, altre sono dei triploidi con numero cromosomico $2n=2x=57$, altre ancora sono andate incontro a fenomeni di poliploidizzazione e presentano numero cromosomico $2n=2x=76$ (Tab. 2).

Specie	Numero cromosomico 2n
<i>Cattleya aurantiaca</i>	40
<i>Cattleya bicolor</i>	40
	40,80
<i>Cattleya bicolor</i> var. <i>Measuresiana</i>	80
<i>Cattleya bowringiana</i>	41
	40
	40-42
<i>Cattleya guttata</i>	40
<i>Cattleya intermedia</i>	40
<i>Cattleya labiate</i>	40-42
<i>Cattleya trianaei</i>	40
<i>Cymbidium aloifolium</i>	40
	32
<i>Cymbidium bicolor</i>	40
<i>Cymbidium giganteum</i>	40
<i>Cymbidium insigne</i>	40
<i>Cymbidium schroederi</i>	40
<i>Dendrobium acuminatum</i>	40
<i>Dendrobium aggregatum</i>	38
<i>Dendrobium candidum</i>	38
<i>Dendrobium crumenatum</i>	40,38
<i>Dendrobium formosum</i>	38
<i>Dendrobium kingianum</i>	57
<i>Dendrobium loddigesii</i>	38
<i>Dendrobium nobile</i>	38
<i>Dendrobium phalaenopsis</i>	38,76
<i>Dendrobium scabrilingue</i>	38
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	38
<i>Phalaenopsis aphrodite</i>	38
<i>Phalaenopsis equestris</i>	38
<i>Phalaenopsis mannii</i>	38
<i>Phalaenopsis parischii</i>	38
<i>Phalaenopsis sanderiana</i>	38
<i>Pogonia ophioglossoides</i>	18
<i>Thrichocentrum maduroi</i>	24
<i>Vanilla aromatica</i>	32
<i>Vanilla planifolia</i>	32

Tabella 2. Numero cromosomico di alcune delle principali specie di Orchidea; si evidenzia come anche a fronte di un contenuto di DNA molto differente all'interno del genere, il numero cromosomico si mantenga pressochè costante.

Per quanto riguarda le dimensioni, i cromosomi sono piuttosto piccoli, con una predominanza di cariotipi bimodali (Cameron *et al.* 1999); la loro dimensione molto piccola è uno dei motivi principali per la presenza di scarsi studi cariologici nelle Orchidee (Than *et al.* 2011).

L'ibridazione genomica e quella Southern hanno indicato una corrispondenza diretta tra le dimensioni del genoma e la quantità di sequenze ripetute (microsatelliti) presenti, verificata anche nel caso delle orchidee. La presenza di microsatelliti contribuisce a facilitare l'analisi cromosomica ed a definire il grado di somiglianza tra le specie, sia tramite studi molecolari che citogenetici, con l'uso dell'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH: Fluorescent In Situ Hybridization) con sonde molecolari specifiche.

1.4.3 Ibridazione in situ fluorescente - FISH

L'ibridazione *in situ* di campioni su vetrino microscopico si basa sul principio che sequenze nucleotidiche complementari sono in grado di appaiarsi tra loro in condizioni di accessibilità del DNA cromosomico. La marcatura, con enzimi substrato specifici o molecole fluorescenti, della sequenza di DNA impiegata come sonda permette di localizzare *in situ* la sequenza bersaglio. Le sonde utilizzate sono in genere specifiche per una determinata regione cromosomica e quindi in grado di evidenziare l'intero cromosoma se combinate con altre sonde parimenti specifiche per altre sequenze di DNA e marcate con fluorocromi di diverso colore (painting cromosomico).

La tecnica FISH consente l'utilizzo di un'ampia gamma di fluorocromi abbinati a nucleotidi precursori del DNA, i quali vengono incorporati nella sequenza di ibridazione, rendendo quindi possibile una precisa e chiara localizzazione del segnale, con il vantaggio di poter utilizzare un maggior numero di sonde contemporaneamente, rispetto a quanto consentito dall'osservazione in luce trasmessa in campo chiaro. In base alla quantità di sequenze da marcare, il sistema di ibridazione può essere rilevato direttamente (marcatura diretta della sonda con incorporazione di nucleotidi coniugati con un fluorocromo), oppure amplificato tramite una marcatura secondaria della sonda ibridata con un anticorpo specifico per una componente della sonda a DNA, ed a sua volta fluorescente. Il risultato della FISH è anche dipendente dalle caratteristiche della sonda a DNA, la quale deve essere lunga a sufficienza per formare una molecola ibrida stabile, ma allo stesso tempo deve riuscire a penetrare

all'interno della struttura del cromosoma; la lunghezza tipica per una sonda efficace è di circa 100-300 bp (Schwarzacher e Heslopp-Harrison, 2000).

Nostri studi recenti studi hanno dimostrato che la FISH può essere effettuata anche utilizzando cromosomi e nuclei in sospensione (metodologia FISHIS; Giorgi *et al.* 2013).

Studi FISH hanno dimostrato che le *Orchidaceae* contengono un elevato numero di sequenze ripetute (Chen e Chen, 2007). Ad es., il microsatellite (GA)₁₁ è stato mappato fisicamente su sette specie di *Phalaenopsis*, generando uno spettro di ibridazione variabile, disperso su i cromosomi di *P. amboinensis* e *P. violacea*, ma raggruppato alle regioni centromeriche in *P. stuartiana*, *P. equestris*, *P. afrodite*, *P. manni* e *P. lueddemanniana*. Inoltre, i segnali si sono mostrati più intensi in *P. stuartiana* e *P. aphrodite* rispetto a tutte le altre specie (Li, 2000).

Queste osservazioni sperimentali tramite FISH sono in grado di portare all'individuazione di alterazioni cromosomiche, altrimenti difficilmente osservabili viste le difficoltà citologiche dovute alla minima dimensione dei cromosomi. Potranno anche contribuire alla caratterizzazione dei nuovi genotipi con variazioni nel numero, nella dimensione dei cromosomi e di eventuali riarrangiamenti a carico delle sequenze ripetute avvenuti durante i processi di manipolazione cellulare.

1.5 La poliploidia ed il fenomeno della endopoliploidia nelle Orchidee

La poliploidia è la condizione nella quale un organismo possiede più set cromosomici rispetto all'individuo base diploide (Ramsey e Schemske, 1998). I poliploidi possono essere classificati in autopoliploidi o in allopoliploidi a seconda della loro origine (Stebbins, 1950). Gli autopoliploidi sono originati dal raddoppiamento cromosomico di una specie diploide. Gli allopoliploidi sono ottenuti a seguito dell'ibridazione tra due specie divergenti; l'ibrido ottenuto subisce normalmente un processo di poliploidizzazione che lo rende fertile e stabile geneticamente. I poliploidi possono essere ottenuti con due differenti meccanismi: la poliploidizzazione mitotica, la quale si basa sul raddoppiamento del contenuto di DNA dei tessuti somatici dai quali si possono originare dei mutanti a contenuto di DNA multiplo, e la poliploidizzazione meiotica, la quale genera gameti 2n non ridotti (Ramsey e Schemske, 1998).

I poliploidi possono presentare una serie di caratteristiche agronomiche interessanti per la produzione, grazie alla presenza di tessuti più spessi, frutti più carnosi e/o di maggiore

pezzatura, statura e portamento più compatto, periodo di fioritura variato rispetto alla varietà di partenza e fiori di maggiori dimensioni (Comai 2005). In base a queste osservazioni, la poliploidizzazione è stata tentata anche in condizioni controllate. La prima applicazione della poliploidizzazione in agricoltura risale agli anni '30 (Blakeslee e Avery, 1937) tramite l'uso della colchicina. Nel 1966, Murashige e Nakano, hanno riportato il primo esperimento di poliploidizzazione *in vitro* su tessuti di tabacco. In Orchidea è stato riportato uno spontaneo raddoppiamento del numero cromosomico dovuto alla moltiplicazione *in vitro* (Chen *et al.* 2009).

Con il termine endopoliploidia si definisce la presenza di cellule con diverso livello di ploidia all'interno dello stesso organismo, in seguito duplicazione del DNA non seguita da mitosi (Larkins *et al.* 2001). Quando questo fenomeno si stabilizza in specifici tessuti della pianta, si ha il fenomeno della polisomatia, ossia la formazione di una pianta con tessuti a vario contenuto di DNA. L'endopoliploidia è stata osservata ripetutamente nelle Angiosperme ed in tutto il regno vegetale (Barow e Meister, 2003; Barow 2006), risultando essere una situazione organo-tessuto specifica e dipendente dallo sviluppo della pianta (Barow 2006; Inze e De Veylder, 2006).

L'endopoliploidia è stata trovata in diverse specie e ibridi di Orchidea, come *Dendrobium* spp. (Jones e Kuehnle, 1998), *Phalaenopsis* spp., *Oncidium varicosum* (Lin *et al.* 2001; Lee *et al.* 2004), *Vanda* (Lim e Loh, 2008) e *Spathoglottis plicata* (Yang e Loh, 2004). Anche nelle Orchidee l'endopoliploidia è risultata essere un fenomeno organo-specifico legato allo sviluppo e all'età della pianta (Lin *et al.* 2001). Durante lo sviluppo del fiore, l'endoreduplicazione contribuisce alla crescita cellulare in quanto il peso fresco è correlato positivamente con il livello di ploidia (Lee *et al.* 2004).

L'endopoliploidia è stata osservata durante lo sviluppo dei protocormi già a quattro giorni dalla loro formazione (Jean, 2008). I nuclei più grandi e a ploidia più elevata sono stati ritrovati nella porzione basale del protocormo (Fig.10).

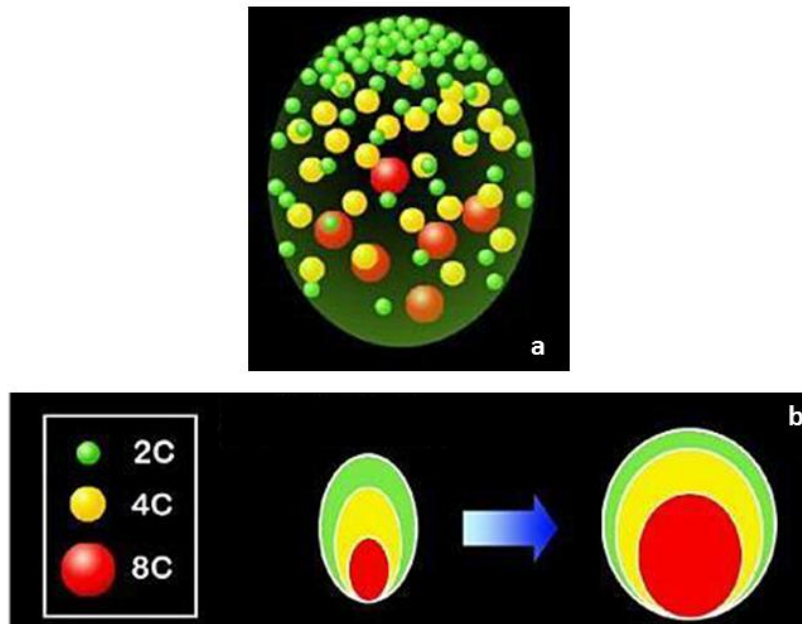


Figura 10. Schema della disposizione dei nuclei con diverso livello di ploidia all'interno dei PLBs. a-b con i diversi colori sono evidenziate le diverse ploidie, i nuclei a ploidia più elevata si dispongono nella parte basale (colore rosso).

Nei protocormi sono stati osservati diversi livelli di ploidia con nuclei 2C, 4C, 8C e 16C aventi, una percentuale media del 47.5, 35.7, 15.6 e 1.2%, rispettivamente (Chen *et al.* 2009). La parte sommitale del protocormo ha un basso livello di endopoliploidia mentre la parte basale, la quale contiene più cellule mature e differenziate, possiede un livello di endopoliploidia più elevato.

Le foglie giovani di *Phalaenopsis aphrodite*, che si trovano in attiva crescita, hanno un livello di endopoliploidia più elevato se comparate con le foglie più mature. La struttura endopoliploide varia e decresce progressivamente nelle varie parti del fiore (pedicello, sepali, petali e labello) ma non nell'ovario e nel polline che si presentano stabili, di norma (Chen *et al.* 2011).

Questa endopoliploidia naturale è stata sfruttata per generare poliploidi sezionando orizzontalmente, per più cicli di coltura, i PLBs, in maniera tale da ottenere poliploidi senza l'utilizzo di agenti antimittotici (Chen *et al.* 2009).

1.5.1 Poliploidizzazione in vitro

La poliploidizzazione *in vitro* è generalmente ottenuta interferendo con agenti chimici sul ciclo cellulare. Gli agenti chimici devono agire alla fine della fase S e prima che cominci la mitosi. Il più numeroso ed utilizzato gruppo di agenti antimitotici sono gli inibitori della metafase, quando i cromosomi pronti a migrare ai poli della cellula vengono inibiti nella migrazione dal blocco della polimerizzazione delle fibre del fuso mitotico, lasciandoli quindi stazionari nella zona centrale della cellula. L'inibizione della separazione dei cromosomi porta le cellule ad avere un numero cromosomico raddoppiato. I più noti ed utilizzati per l'inibizione della metafase sono i composti colchicina, orizalina, amiprofosmetil (APM) e la trifluralina.

Per verificare il grado di ploidia esistono una serie di metodologie di rapida attuazione, più o meno accurate nella determinazione della poliploidizzazione: il conteggio cromosomico mediante microscopia ottica, la citometria a flusso e la valutazione di parametri morfometrici. Le osservazioni anatomiche e morfologiche che vengono utilizzate sono semplici, come la misura della grandezza degli stomi, ma possono risultare inaccurate, ed infatti solitamente vengono applicate in combinazione con la citometria a flusso, o con il conteggio cromosomico per microscopia. I diploidi tendono ad avere un'apertura stomatica più piccola rispetto a quella dei tetraploidi, o poliploidi in genere; anche la densità stomatica per unità di superficie varia, avendo solitamente i poliploidi una densità stomatica più bassa rispetto ai diploidi. Un'altra utile caratteristica riguarda il numero di cloroplasti nelle cellule di guardia degli stomi, che risulta essere più alto nei poliploidi (Fig. 11).

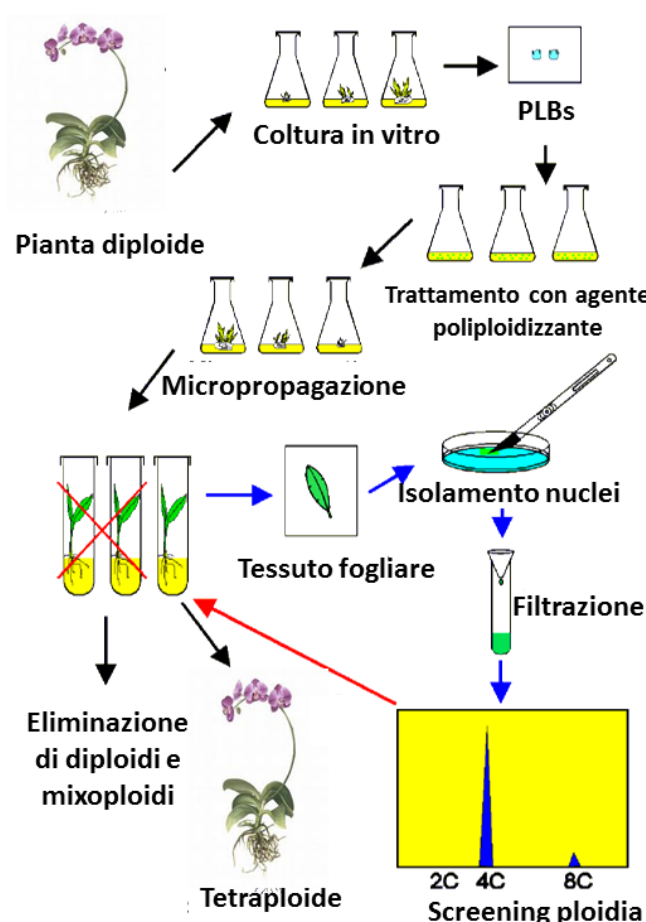


Figura 11. Schema generale del processo di poliploidizzazione *in vitro* delle orchidee. Una volta messo a punto il sistema di coltura *in vitro* i PLBs vengono trattati con l'agente poliploidizzante e tramite micropropagazione vengono originate le nuove plantule. Le giovani foglie vengono utilizzate per l'estrazione dei nuclei, dai quali, tramite citometria a flusso, si effettua uno screening del materiale che permette di eliminare tutto ciò che non è effettivamente tetraploide.

Sebbene il raddoppiamento del numero cromosomico non introduca nuovo materiale genetico, producendo solo copie aggiuntive di cromosomi e geni già presenti, alcune alterazioni genomiche avvengono in seguito a poliploidizzazione mitotica (Ranney, 2006). Nelle piante poliploidi sono state riscontrate situazioni come perdita di geni duplicati, alterazioni nell'espressione genica e presenza di cambiamenti epigenetici, come descritto da più autori (Osborn *et al.* 2003, Otto 2007 e Parisod *et al.* 2010). Questi cambiamenti genetici spesso hanno dato luogo a piante poliploidi con caratteristiche superiori ai diploidi per quanto riguarda le caratteristiche morfologiche, l'adattabilità genetica e la tolleranza agli stress ambientali (Dhooghe *et al.* 2011). La ragione esatta per cui queste differenze si presentano è ancora sconosciuta, ma potrebbe essere dovuta al vantaggio dell'ereditarietà polisomatica (Comai 2005), che potrebbe portare ad un aumento della flessibilità genomica e quindi ad una migliore risposta ai cambiamenti ambientali (Parisod *et al.* 2010; Riddle *et al.* 2006; Xiong *et*

al. 2006). Per le piante che contengono composti di interesse in campo medico, i poliploidi mostrando possono avere anche un aumento nel contenuto del composto di interesse (Gao *et al.* 1996). Oltre ad indurre cambiamenti morfologici, anatomici e fisiologici, l'alterazione del livello di ploidia può superare i problemi dovuti all'incrocio tra piante con ploidie diverse (Chapman e Abbott, 2010), ad esempio le barriere di ibridazione in un incrocio tra una pianta diploide ed una tetraploide possono essere superate poliploidizzando la specie diploide prima dell'incrocio. La poliploidizzazione può anche ripristinare la fertilità negli ibridi interspecifici (Dunn e Lindstrom 2007), dato che la duplicazione di ogni cromosoma favorisce la corretta meiosi. L'induzione di tetraploidi può essere un passo avanti nell'ottenimento di cultivar triploidi, come risultato dell'incrocio tra un diploide e il suo tetraploide (Chen e Chen, 2007).

La poliploidizzazione gioca un ruolo significativo nell'ibridazione e nel miglioramento delle orchidee. I consumatori richiedono costantemente la produzione di nuove varietà attraverso l'incrocio interspecifico ed intergenerico. Inoltre l'induzione di mutanti poliploidi offre un modo per ottenere piante con fiori più grandi, con un periodo di fioritura più lungo e con la possibilità di avere piante che hanno più fioriture nello stesso anno come è stato riportato per *Dendrobium* (Kamemoto *et al.* 1972), *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981) e *Paphiopedilum* (Watrous e Wimber, 1988). Diversi autori hanno ottenuto poliploidi in orchidea attraverso l'utilizzo della colchicina in *Dendrobium* (Sarathum *et al.* 2010), su PLBs, espianti facili da manipolare sui quali, anche con una bassa dose di agente mitotico si possono ottenere risultati di poliploidizzazione (Miguel e Kenneth, 2011). Inoltre, Chen *et al.* 2009 hanno dimostrato come successivi cicli di taglio con bisturi dei tessuti dei PLBs di *Phalaenopsis* portino all'induzione spontanea di poliploidi con delle rese del 33% dopo tre-quattro cicli successivi di taglio. Lo sviluppo di un protocollo di facile applicazione nell'induzione di poliploidi, e che dia alte rese, in termini di poliploidi prodotti, è sicuramente auspicabile nel campo del miglioramento genetico per la creazione di nuove varietà di orchidea da immettere in commercio.

1.6 Nuovi metodi per l'analisi di cellule vegetali: la Citofluorimetria a flusso

La citometria a flusso (FCM) è uno strumento unico per l'analisi di cellule ed elementi cellulari in sospensione liquida sulla base di una serie di parametri ottici, fisici e cromatici, consentendone la caratterizzazione e l'isolamento fisico in frazioni specifiche adatte a successive manipolazioni.

Le cellule sono analizzate in un periodo di tempo veramente breve (pochi microsecondi) durante i quali sono registrati una serie di segnali (parametri) come, ad esempio, la luce diffratta e le emissioni fluorescenti originate dalla particella stessa, che caratterizzano singolarmente gli elementi analizzati, uno alla volta. Le capacità dell'elettronica e la digitalizzazione del segnale rendono possibile una alta "processività" di questo tipo di analisi, con ratei che si possono spingere sino ad analizzare effettivamente 10^4 elementi per secondo. Le particelle/cellule vengono quindi categorizzate sulla base di una matrice di valori, o parametri, e utilizzando queste analisi "multiparametriche", è possibile individuare eventuali sottoinsiemi di "popolazioni" presenti nel campione in analisi e, basandosi su queste differenze, separare fisicamente (*flow sorting*) queste popolazioni e caratterizzarle poi utilizzando tecniche analitiche sia cellulari che molecolari.

1.6.1 Come funziona un citometro a flusso

I citometri a flusso sono strumenti complessi costituiti da tre parti principali: quella fluidica, quella ottica e quella elettronica. Quest'ultima è responsabile sia dell'acquisizione dei segnali che della loro elaborazione ed interfacciamento con l'operatore, e costituisce quindi la parte fondamentale che consente la gestione e l'uso della gran messe di dati prodotti dall'analisi multiparametrica.

La fluidica: Il sistema fluidico è responsabile del trasferimento ordinato del campione sperimentale dalla "provetta" al punto di analisi dove vengono generati "cellula per cellula" i segnali luminosi che forniscono le informazioni. Un fluido di convogliamento (*sheath fluid*) è responsabile del movimento del campione all'interno dello strumento, sino al suo allineamento ed incontro al punto di analisi dove viene intercettato. Mentre le particelle corrono nel flusso individualmente, esse vengono intercettate da una fonte luminosa (solitamente fornita di uno o più laser) in grado di generare segnali sia di fluorescenza che di luce diffratta (*scatter*). Fondamentale all'interno del sistema fluidico è la camera di flusso e l'orifizio tarato di uscita (*nozzle*), nella quale lo "*sheath fluid*" (di norma una soluzione salina) pressurizzato, incontra il campione e lo comprime lateralmente allungando il flusso di liquido contenente le cellule stesse, grazie alla forza idrodinamica esercitata sul campione in sospensione; il risultato è la separazione e l'allineamento delle particelle in un flusso di singoli elementi, focalizzati, o confinati, al centro del flusso (Fig. 12). Questo fenomeno prende il nome di focalizzazione idrodinamica. Per ottenere ciò, lo scorrere dello *sheath fluid*

all'interno della camera non deve essere perturbato e le linee di forza devono scorrere parallele senza turbolenze formando un "flusso laminare".

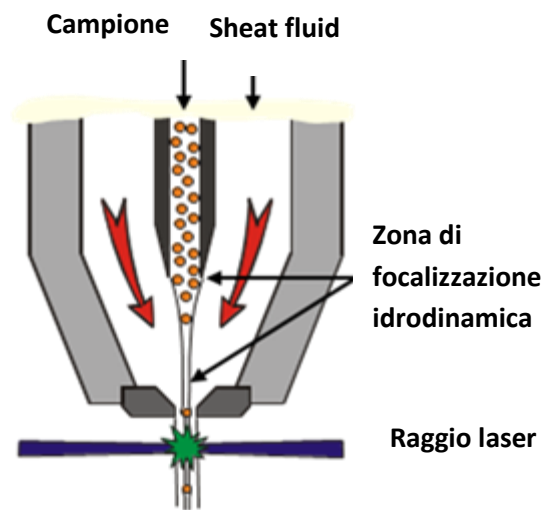


Figura 12. Schema esemplificativo di una camera di flusso.

L'ottica: I moderni citometri possiedono come sorgente di eccitazione uno o più laser, usualmente a stato solido, essenzialmente LED (*light emitting diode*) a specifiche emissioni. Altri laser con maggiori potenze e gestibili per la lunghezza d'onda della luce emessa, tipicamente laser a gas tipo argon, sono impiegati per applicazioni particolari e sono in grado di emettere fasci luminosi di potenza adeguata per tutte le applicazioni citofluorimetriche.

Il fascio di luce emesso dal laser deve essere focalizzato in un punto specifico sul flusso di campione. Questo punto, detto "*interrogation point*", è il luogo dove le particelle che corrono all'interno del flusso vengono analizzate ad una ad una. Come le particelle passano attraverso l'*interrogation point*, esse vengono eccitate dalla luce incidente, assorbono ed in parte diffrangono la luce di eccitazione ed emettono fluorescenza in ragione della loro struttura e della qualità del colorante associato. La luce diffratta in avanti (*foward scatter*) è raccolta da un sensore e convertita in impulsi di corrente. La luce diffusa ad angolo retto (*side scatter*) e la fluorescenza emessa dalle particelle sono raccolte da una lente posta a 90° rispetto al raggio di eccitazione (Fig. 13).

Il posizionamento di lenti di focalizzazione, specchi e filtri per la luce di lunghezza d'onda specifica, permette il rilevamento selettivo di questi segnali ottici (diffrazione e fluorescenza).

Il percorso ottico seguito dalla luce emessa dalle particelle analizzate deve essere accuratamente controllato, poiché ogni ambito di variabilità indipendente da quella biologica propria del campione stesso, deve essere ridotto al minimo possibile per consentire un'analisi accurata. La valutazione del corretto allineamento viene effettuata cercando di ottenere il minor coefficiente di variazione (CV) sul picco del segnale rappresentante le singole particelle. Il CV è un parametro adimensionale che rappresenta la deviazione standard come una percentuale della media ($CV = SD / Media \times 100$), ed è una misura della deviazione dei valori del campione dal valore medio.

L' elettronica: Grazie ai filtri presenti nello strumento i fotoni emessi da ogni particella analizzata sono separati in base al loro livello di energia (lunghezza d'onda) e diretti verso un appropriato “*detector*”. Questi sensori assorbono fotoni ed emettono elettroni, producendo quindi una corrente elettrica. La corrente prodotta è poi convertita in un segnale digitale riportato su un computer (Fig. 13). Nella maggior parte dei citometri abbiamo due principali tipi di sensori: fotodiodi e tubi fotomoltiplicatori.

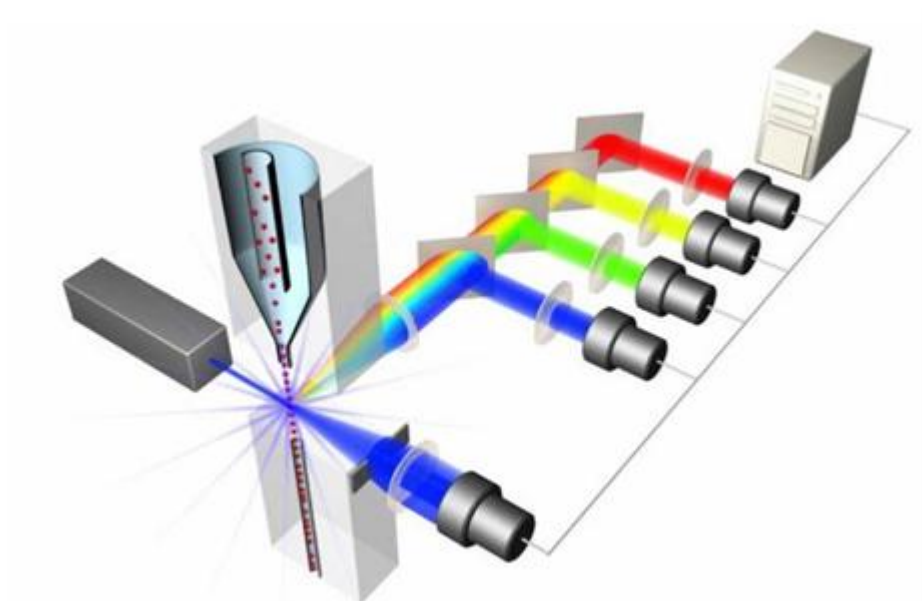


Figura 13. Visione complessiva di un citometro a flusso. La luce di eccitazione del Laser (blu) viene raccolta dai sensori di diffrazione, mentre contemporaneamente le diverse emissioni fluorescenti vengono separate da filtri ottici specifici e convogliate ai sensori di fotoni (fotomoltiplicatori) che generano segnali elettrici proporzionali alla quantità di fluorocromo presente.

Interfaccia informatica: Una volta digitalizzati i segnali sono mostrati o tramite istogrammi che indicano la frequenza di distribuzione del parametro selezionato, o con *dot plots* che mostrano la correlazione fra due parametri, dove ogni punto corrisponde ad un singolo evento analizzato dal citometro a flusso. Lo sviluppo dell'elettronica e dei programmi di gestione permettono così di collezionare un enorme numero di dati in un tempo brevissimo e renderli visibili in una forma grafica facilmente comprensibile.

1.6.2 La separazione cellulare (*flow Sorting*)

Il *flow Sorting* è la capacità che hanno alcuni citometri (*flow sorter*) di analizzare e separare fisicamente (*sorting*) le particelle di interesse in base alle loro proprietà ottiche. I *flow sorter* più diffusi utilizzano il principio del *sorting* elettrostatico, il quale si basa sulla capacità di discriminare la particella, determinare la sua posizione fisica nel flusso con un alto grado di accuratezza, rompere il flusso in goccioline con un cristallo piezoelettrico, mandare un impulso di carica sul flusso esattamente al momento giusto, cioè immediatamente prima che la goccia si distacchi dal flusso continuo (quando la cellula raggiunge l'ultima "goccia" attaccata), separarla fisicamente tramite attrazione elettrostatica, e convogliare solo la goccia che contiene la particella di interesse dentro un contenitore predisposto (Fig. 14).

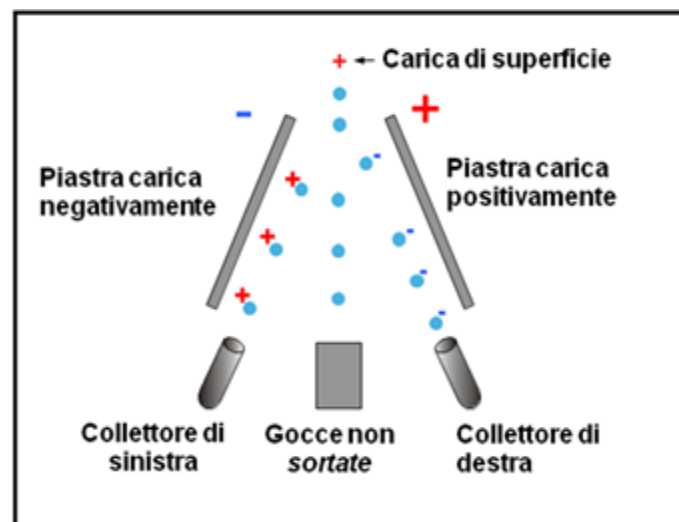


Figura 14. Principio base del processo di *sorting*. Le microgocce generate da un cristallo piezoelettrico che vibra a frequenza controllata, vengono caricate elettrostaticamente in base alla presenza o meno delle particelle di interesse. Un campo elettromagnetico stazionario induce la separazione delle gocce in base alla loro carica superficiale, separando così le cellule di interesse.

Per selezionare la nostra particella da separare basta semplicemente creare una finestra di *sorting*, ossia scegliere un intervallo di intensità di segnale su un istogramma di frequenza, come ad esempio un istogramma di intensità di fluorescenza o su un *dot plot*.

Il tasso di isolamento dipende da vari fattori, quali la velocità dell'analisi, la frequenza del tipo di particella da separare, il suo grado di risoluzione e la purezza richiesta. La purezza del sorting può essere valutata al microscopio a fluorescenza e tramite l'analisi del materiale separato ancora al citometro a flusso.

1.7 La citometria a flusso nelle piante

La fluorescenza è il più comune parametro ottico analizzato per quanto riguarda la citometria a flusso nelle piante. È un fenomeno fisico nel quale una sostanza assorbe luce ad una determinata lunghezza d'onda e la riemette ad un'altra lunghezza d'onda e di valore maggiore. La fluorescenza viene generata da due classi principali di molecole: i) pigmenti endogeni alla cellula (clorofille, aminoacidi aromatici, alcaloidi ed altre molecole presenti sia nel nucleo che nel citoplasma); ii) fluorocromi in grado di legarsi a specifiche componenti della cellula (proteine, acidi nucleici) o di evidenziare stati fisiologici (pH, contenuto di ioni).

Di particolare interesse, perchè di maggiore applicabilità, sono i coloranti degli acidi nucleici, tramite i quali si può valutare, ad es., il contenuto di DNA in cellule ed organuli cellulari.

1.7.1 Fluorocromi specifici per il DNA

La valutazione del contenuto di DNA di sospensioni di nuclei e cromosomi viene effettuata tramite colorazione con fluorocromi specifici; questi coloranti presentano due diverse modalità di legame al DNA:

1. Per intercalazione e legame covalente;
2. Per legame ionico in presenza di particolari coppie di basi azotate.

I fluorocromi più comunemente utilizzati sono il DAPI (4,6-diammino-2-fenilindolo), lo ioduro di propidio (PI) e la mitramicina (MIT)(Dolezel *et al.* 1992) (Tab. 3).

Il PI appartiene agli intercalanti fenantrenici, come il bromuro di etidio, e non mostra specificità per coppie di basi; è in grado però di legarsi sia al DNA che all'RNA a doppio filamento e ciò rende necessario un trattamento con RNasi, per evitare una elevata componente aspecifica nel segnale stesso. Per la colorazione il PI viene utilizzato in quantità saturanti. Il PI viene eccitato da lunghezze d'onda appartenenti alla zona del verde e dell'UV

(massimi di eccitazione a 540 e 342 nm) ed emette nell'arancione-rosso (massimo di emissione 615 nm).

Il DAPI appartiene alla classe degli antibiotici sulfamidici ed è un derivato dell'indolo (come l'Hoechst 33258 e 33342) e mostra una preferenza per le coppie AT. Il suo legame al DNA avviene in due modi: quello ad alta affinità, tramite legame alle regioni ricche di sequenze di almeno 3-4 paia di basi AT, nel solco minore dell'elica, con un marcato aumento della resa quantica di fluorescenza, e quello a bassa affinità che non presenta specificità di sequenza, caratterizzato da una costante di legame più bassa e da un minor aumento nella resa quantica di fluorescenza. Alle concentrazioni più alte di colorante è prevalente il legame a bassa affinità, ragion per cui il colorante si usa in dosi sottosaturanti. Il DAPI, caratterizzato da una più alta specificità per il DNA rispetto al PI, viene eccitato da lunghezze d'onda appartenenti alla regione dell'UV (365 nm) ed emette estesamente nel blu (con un massimo a 450 nm).

Tipo di legame e proprietà dello spettro di alcuni fluorocromi del DNA*

Colorante	Tipo di legame	Lunghezza d'onda(nm)**	
		Eccitazione	Emissione
Bromuro di etidio	Intercalante	530	605
Ioduro di propidio	Intercalante	540	615
Hoechst 33258	coppie AT	365	465
Hoechst 33342	coppie AT	360	460
DAPI	coppie AT	365	450
Cromomicina A3	coppie CG	445	570
Mitramicina	coppie CG	440	560

*Il reale tipo di legame e le proprietà dello spettro dipendono da molti fattori tra cui il rapporto DNA/colorante, la forza ionica e il pH della soluzione

**del complesso DNA-colorante

Tabella 3. Proprietà di alcuni fluorocromi specifici per il DNA.

1.7.2 Analisi del contenuto di DNA in nuclei in sospensione

I nuclei ed il loro DNA sono il target più frequente negli studi di FCM. Le sospensioni nucleari sono preparate lisando i protoplasti o tramite l'omogenizzazione dei tessuti seguendo il metodo descritto da Galbraith *et al.* (1983).

La stima del contenuto di DNA nei nuclei è una delle più importanti applicazioni della citometria a flusso nelle piante. Il primo esperimento di successo è stato effettuato nei primi anni settanta (Heller, 1973), ma il vero passo avanti nella metodica è stato prodotto con

l'introduzione della metodologia del *chopping* per l'isolamento dei nuclei vegetali (Galbraith *et al.* 1983), che ha lanciato la citometria a flusso come il miglior approccio per la misura del contenuto di DNA in specie vegetali. Infatti la citometria a flusso presenta numerosi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali (e.g. densitometria feulgen): velocità di preparazione ed elevata precisione dovuta al grande numero di nuclei che è possibile misurare in pochi minuti e la possibilità inoltre di colorare tutti i nuclei in maniera omogenea.

In linea di principio, qualsiasi tessuto vegetale può essere utilizzato per misurare il contenuto di DNA tramite citometria a flusso, poiché sono sufficienti pochi milligrammi (20-100mg) di tessuto foliare fresco per ottenere buoni risultati. La metodica prevede tre fasi operative: i) sminuzzamento (*chopping*) del materiale vegetale con un bisturi in un apposito tampone di estrazione; ii) filtrazione dell'isolato per rimuovere i residui del tessuto; iii) colorazione con fluorocromo specifico della sospensione.

Un buon tampone di estrazione, oltre a rilasciare i nuclei dalle cellule in quantità sufficiente per permettere l'analisi, deve anche riuscire a mantenere l'integrità nucleare per tutto il processo, proteggere il DNA dalla degradazione delle endonucleasi e permettere la colorazione stechiometrica del DNA. Sono stati descritti circa 26 buffer di estrazione e 4 di questi sono comunemente usati in ambito vegetale (Loureiro *et al.* 2006, Tab. 4).

Buffer	Composizione	Referenze
LB01	15mM TRIS; 2 mM Na ₂ EDTA; 0.5 mM spermine; 80 mM KCl; 20mM NaCl; 15mM β-mercaptoetanolo; 0.1% Triton X-100; pH 7.5	Dolezel <i>et al.</i> (1989)
Otto buffers	Otto I buffer: 100mM acido citrico; 0.5% Tween 20 (pH 2.3) Otto II buffer: 400 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (pH 8.9)	Otto (1990)
Tris-MgCl ₂	200 mM TRIS; 4 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O; 0.5% Triton X-100; pH 7.5	Pfossen <i>et al.</i> (1995)
Tris-MgCl ₂ mod.	200 mM TRIS; 4 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O; 10 mM CHAPS; pH 7.5	

Tabella 4. Elenco dei principali buffer di estrazione utilizzati nella citometria vegetale.

In un istogramma di intensità relativa di emissione fluorescente, tutti i nuclei che hanno lo stesso contenuto di DNA formeranno un gruppo ben isolato con la quantità di fluorescenza, ossia l'istogramma mostrerà un picco nella distribuzione. In un tipico istogramma di una specie euploide, l'analisi del contenuto di DNA tramite FCM viene indicato come analisi del ciclo cellulare poiché la variazione ciclica del DNA dovuta al processo coordinato di sintesi viene presentata con una distribuzione di fluorescenza tipicamente bimodale, ossia con due picchi. Il primo picco, più numeroso perché le cellule normalmente vi stazionano quando sono in fase di riposo, rappresenta la fase G1 e l'altro (che si forma esattamente al valore doppio dei

canali del primo), che rappresenta la fase G2 del ciclo cellulare (Ochatt 2008; Greilhuber e Dolezel, 2009; Fig. 15). In alcuni casi si possono avere anche altri picchi a valore 8C, 16C etc. e ciò si verifica quando trattiamo tessuti endopoliploidi o endoreduplicati (Fig. 16). L'utilizzo dei *dot plot* è importante per la separazione dei doppietti dai nuclei endopoliploidi, e i nuclei in fase S dai nuclei rotti con contenuto 4C o dai frammenti cellulari (Dolezel e Greilhuber, 2010).

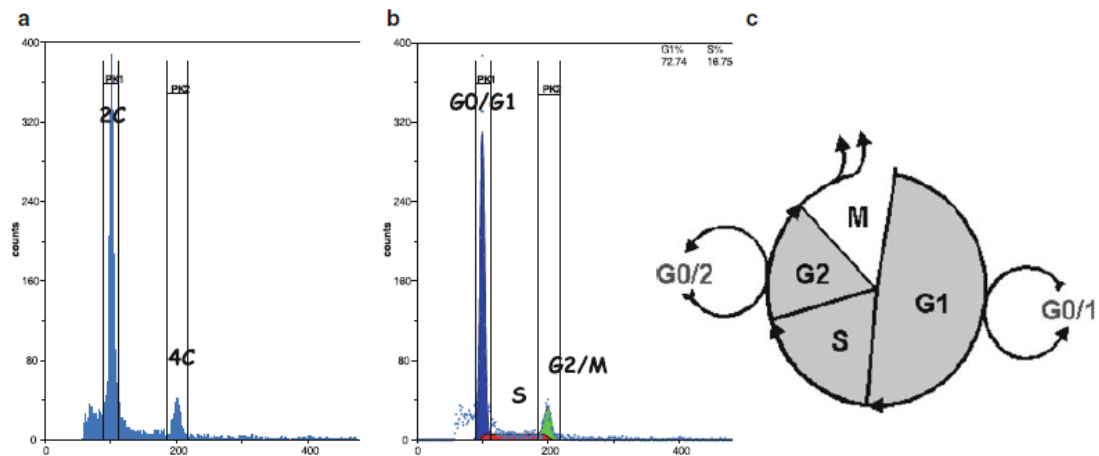


Figura 15. Tipico analisi citometrica di un genotipo normale ($2x = 2n$). a) Nell'istogramma del contenuto relativo di DNA si possono vedere due picchi, il primo corrispondente ai nuclei con contenuto 2C di DNA e il secondo a nuclei 4C; b) Lo stesso profilo che vediamo in a) ma in questo caso la distribuzione dei nuclei è stata analizzata statisticamente e con i diversi colori sono evidenziate le fasi del ciclo cellulare; c) rappresentazione grafica tipica del ciclo cellulare.

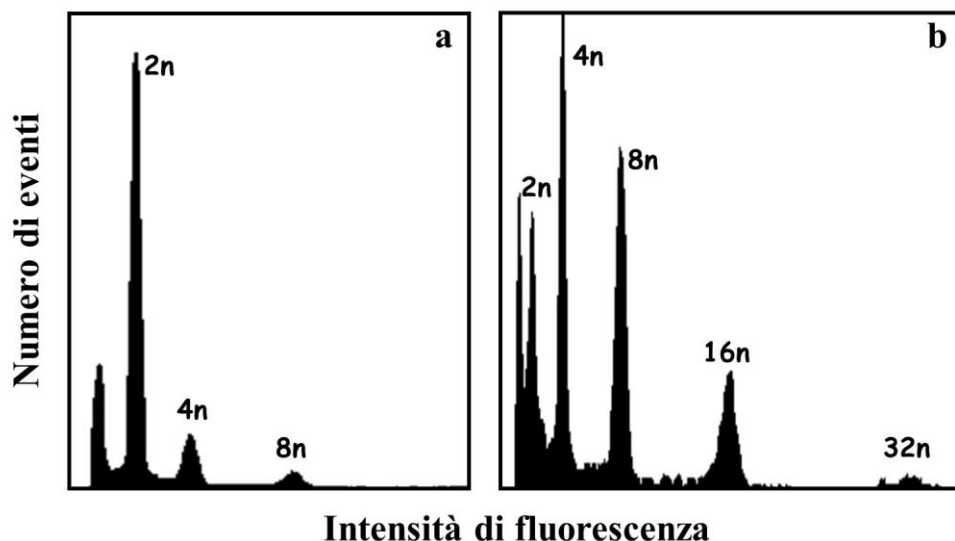


Figura 16. Iistogrammi del contenuto relativo di DNA. In a) abbiamo una situazione di un genotipo normale, dove sono presenti i picchi standard. In b) abbiamo un tessuto endopoliploide in cui sono presenti diversi livelli di ploidia rappresentati dai diversi picchi (da 2n a 32n).

In questi istogrammi, l'analisi citometrica a flusso mostra l'intensità di fluorescenza relativa del contenuto di DNA; per avere una misura assoluta del contenuto di DNA dobbiamo confrontare il nostro campione sconosciuto con uno standard di riferimento a contenuto di DNA noto. Lo standard può essere esterno (campione noto analizzato separatamente da quello biologico in studio) o interno (standard inserito nella stessa soluzione del campione biologico); quest'ultimo è da preferirsi poiché elimina la variabilità associata alle procedure di colorazione e trattamento separate, che invece affliggono l'uso di uno standard esterno (Dolezel, 1991). Lo standard viene scelto per affinità con la specie in esame e in maniera tale che il contenuto di DNA non sia troppo diverso dal nostro campione, per evitare errori dovuti all'analisi del segnale; bisogna anche evitare che esso sia troppo simile e che si vada a sovrapporre al nostro campione rendendo impossibile la comparazione (Fig. 17). La misura assoluta del contenuto di DNA di un campione è calcolata sulla base del valore medio della fluorescenza del picco in G₁ rispetto a quello dello standard di riferimento:

$$\text{Contenuto 2C DNA del campione} = [(G_1 \text{ campione})/I(G_1 \text{ standard})] \times \text{contenuto 2C DNA standard (pg DNA)}$$

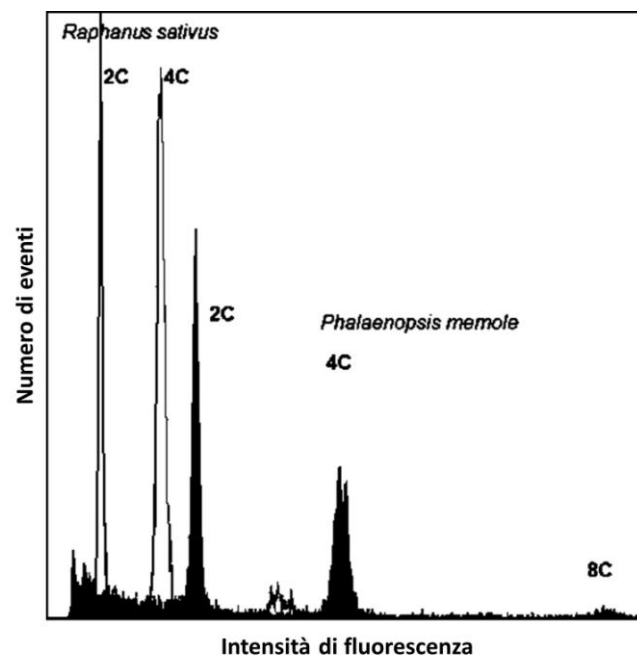


Figura 17. Istogramma del contenuto assoluto di DNA. Con i picchi vuoti è rappresentato il nostro standard interno a contenuto di DNA noto, *Raphanus sativus*, mentre con i picchi pieni è rappresentato il genotipo di chi si vuole sapere il contenuto di DNA, in questo caso *Phalaenopsis memole*. L'analisi dei rapporti tra i due ci dà il contenuto di DNA in termini assoluti del nostro campione.

Per stimare con precisione il genoma di una specie, devono essere analizzate diverse piante ed ognuna di esse deve essere analizzata più volte al fine di mediare la variabilità sperimentale strumentale e ridurre l'apporto nel corso della misura del contenuto di DNA effettivo.

Dalla prima pubblicazione di de Laat *et al.* (1987) sull'uso della citometria a flusso per la determinazione del livello di ploidia, numerosi studi sono stati riportati per analizzare individui ottenuti in seguito ad esperimenti di aplo-diploidizzazione o di poliploidizzazione (Dolezel *et al.* 2007; Ochatt, 2008; Ochatt *et al.* 2005, 2011; Sharma *et al.* 1983), rendendola ad oggi la tecnica più utilizzata a questo scopo (Fig. 18).

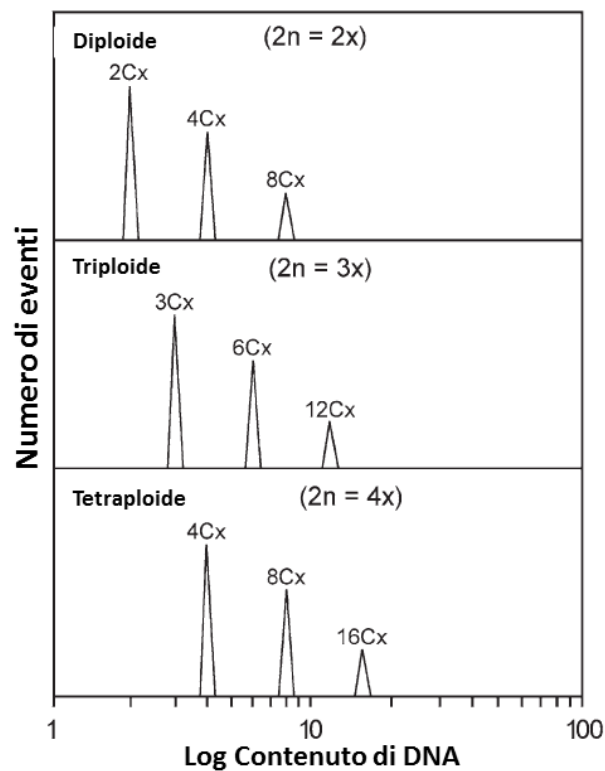


Figura 18. Schema del contenuto relativo di DNA che mostra come si presentino i picchi degli istogrammi in tre diverse situazioni: diploide, triploide e tetraploide.

L'analisi del livello di ploidia, in termini di contenuto relativo di DNA, ha un buon impatto quando applicato ai mutanti (derivati da mutagenesi chimica o fisica o da trasferimento genico), ed è particolarmente efficiente per l'analisi del materiale dove siano stati inseriti

retrotrasposoni, i quali riescono a duplicare le loro inserzioni nel genoma, aumentando così il contenuto relativo di DNA per nucleo dell'individuo (Grandbastien *et al.* 2005).

1.7.3 Analisi e sorting dei protoplasti

Il citometro a flusso può analizzare anche cellule intatte di elevate dimensioni, rispetto a quelle umane, come i protoplasti vegetali che hanno dimensioni molto variabili, dell'ordine dei 20-100µm rispetto a quelle umane comprese tra 10-20µm. La sospensione da analizzare deve contenere protoplasti che siano il più intatti possibile, proprio perchè i residui provenienti dalla rottura dei protoplasti possono dare vita ad un gran numero di segnali di scattering e a volte anche di fluorescenza, oltre che intasare la fluidica dello strumento, sino a rendere impossibile l'analisi stessa. La purificazione dei protoplasti su gradiente è un semplice metodo per eliminare i detriti cellulari e sub-cellulari e consentire così l'analisi citometrica.

Con la citometria a flusso si possono analizzare i protoplasti per diversi parametri e/o caratteristiche: si possono misurare le dimensioni, il contenuto proteico, la loro vitalità e stato fisiologico, il numero di organelli cellulari, ed anche l'effettiva produzione di ibridi somatici. In quest'ultimo caso, è molto importante evitare l'aggregazione sia perchè gli aggregati potrebbero bloccare il nozzle, sia perchè un'associazione non dovuta a fusione tende ad aumentare la proporzione di eventi falsamente positivi ed identificati come ibridi somatici. Differenti combinazioni di marcatori fluorescenti sono usate per discriminare durante l'analisi i protoplasti parentali da quelli ibridi (Fig. 19). Il sistema più utilizzato prevede l'impiego dell'autofluorescenza della clorofilla da protoplasti di foglia, abbinati alla fusione con protoplasti derivati da calli embriogenetici o sospensione cellulare e colorati con un fluorocromo sopravvitali come il diacetato di fluoresceina (FDA) o l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) (Lucretti *et al.* 1992). La principale ragione per la scelta di questo approccio è la buona separazione spettrale tra l'emissione massima della fluoresceina (520 nm) e quella della clorofilla (680 nm), e la bassa tossicità del FDA. L'analisi a flusso e la separazione degli ibridi formati tra protoplasti derivati da tessuti di origine simili, e perciò non caratterizzati da specifici pigmenti, richiede l'uso di due differenti fluorocromi esogeni. Le combinazioni basate sull'emissione di fluorescenza della fluoresceina (FITC) e della rodamina (TRITC) (Haugland 1992) è stata utilizzata con successo per la selezione di ibridi prodotti tra protoplasti da callo.

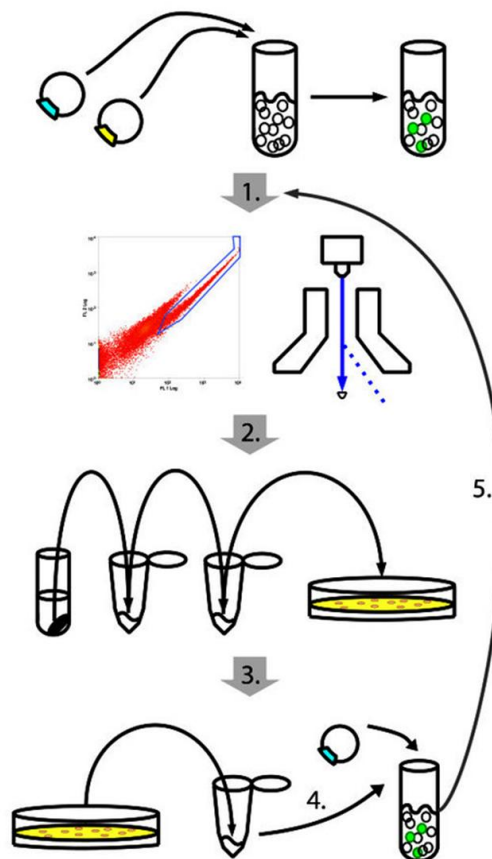


Figura 19. Figura schematica dell'isolamento e la messa in coltura di protoplasti fusi. Una volta marcati in maniera diversa, i protoplasti provenienti da due specie vanno incontro al processo di fusione e in seguito vengono analizzati al citometro (1). In base alla loro emissione fluorescente i protoplasti realmente eterofusi vengono isolati e messi in coltura (2). I prodotti eterofusi possono essere riutilizzati in nuovi programmi di miglioramento genetico e i loro prodotti controllati nuovamente tramite citometria a flusso (3, 4, 5).

Nel 1992 Lucretti *et al.* hanno messo a punto una procedura che permette di separare singoli protoplasti o ibridi e di incapsularli singolarmente in delle *beads* di sodio alginato. In questa maniera ogni protoplasto è messo in coltura singolarmente ed è fisicamente individuabile in coltura; da ogni singola capsula gelificata si origineranno dei calli di ben definita origine. In questa maniera si possono portare in coltura solo gli elementi realmente eterofusi, con evidenti benefici in termini di costi e tempi di coltura.

1.8 Caratterizzazione dei materiali vegetali tramite marcatori molecolari

L'analisi del genoma mediante marcatori molecolari (*fingerprinting*) è in grado di rilevare la diversità dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse. Le differenze tra individui a carico della sequenza

nucleotidica del DNA sono in grado di far discriminare i diversi individui a livello genetico e costituiscono un sistema di analisi genomica di grande precisione (Philips e Vasil, 2001).

Un marcatore molecolare è definito come quel locus genico, rilevabile con sonde e primer specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico e inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e rileva eventuali differenze alleliche presenti nel tratto di DNA in analisi evidenziando polimorfismi nella sequenza nucleotidica dovuti ad alterazione della stessa, come inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi (Varneshey *et al.* 2005).

I marcatori molecolari sono uno strumento estremamente versatile per la caratterizzazione del genoma vegetale con diverse finalità. Le loro applicazioni più rilevanti sono: la costruzione di mappe genetiche, il mappaggio genico e la selezione assistita, la caratterizzazione e dissezione della variabilità genetica, la tipizzazione ed identificazione varietale, l'individuazione di OGM (Organismi Geneticamente Modificati), l'analisi dell'espressione genica e il clonaggio genico (Agarwal *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2009). Esistono una varietà di metodologie che consentono di sviluppare pannelli di marcatori molecolari con caratteristiche diverse a seconda della maniera con la quale vengono prodotti (Agarwal *et al.* 2008). Alcuni tra i marcatori molecolari più utilizzati nella caratterizzazione genetica sono: RAPD, PCR-RFLP, AFLP, SNP e SSR. Nel corso del progetto di ricerca è stato scelto di utilizzare i RAPD e gli SSR, in un caso per la praticità d'uso per l'ottenimento rapido di informazioni preliminari, e successivamente per la riproducibilità del quadro di caratterizzazione.

1.8.1 Marcatori RAPD

I RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sono marcatori PCR, prevedono l'impiego di un solo oligomero, generalmente un 8-12-mer, scelto in maniera casuale e tra quelli presenti in letteratura. La numerosità dei polimorfismi RAPD ottenibili per singolo primer varia mediamente da 6 a 12, fino ad un massimo di 20, in funzione della complessità genomica dell'organismo analizzato. I prodotti di amplificazione sono generalmente separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e colorati con il bromuro di etidio (o altro colorante specifico fluorescente). Le dimensioni dei frammenti di amplificazione generati dipende dalla frequenza dei siti di ibridazione dei primer e dalla massima lunghezza di sequenza nucleotidica efficientemente sintetizzata dall'enzima. I polimorfismi sono in questo caso da

attribuire a differenze nelle sequenze nucleotidiche riconosciute da primer oppure nella dimensione del frammento compreso fra i siti di attacco degli stessi.

I RAPD sono stati ampiamente applicati per il *fingerprinting* e ciò è dovuto al fatto che gli stessi presentano numerosi vantaggi rispetto alle altre metodologie: hanno elevato potere discriminante, rapidità operativa, non necessitano di alte quantità di DNA, costi abbastanza bassi e facilità di automazione. Quest'analisi ha come limite principale la bassa riproducibilità, inoltre essendo marcatori dominanti non sono in grado di distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti, fornendo di fatto un più basso livello di informazione (Micheli *et al.* 1994).

Nelle orchidee i RAPD sono stati utilizzati per studi filogenetici e di popolazione (Li *et al.* 2002; Goh *et al.* 2005), per individuare polimorfismi intra- e inter-specifici nel genere *Cattleya* (Benner *et al.* 1995), per individuare caratteristiche di interesse nella progenie e selezionare perciò i cloni più interessanti (Chen e Chen, 2007), per individuare alterazioni dovute a variazioni somaclonali (Ferreira *et al.* 2006), per individuare gli ibridi ottenuti nei programmi d'incrocio. Recentemente i RAPD si sono dimostrati essere degli ottimi marcatori anche per individuare variazioni tra cloni dello stesso genotipo sottoposti a trattamento poliploidizzante con colchicina (Khosravi *et al.* 2008), dimostrando variazioni genetiche nei poliploidi non evidenziabili con i metodi classici.

1.8.2 Marcatori SSR

I marcatori SSR (*Simple Sequence Repeat*) sono noti più comunemente con il nome di microsatelliti e consentono di mettere in evidenza i polimorfismi a livello delle sequenze di DNA ripetute. I microsatelliti sono regioni di DNA caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 2-6 basi azotate, ad es. (AG)_n. Si tratta di una classe di marcatori molecolari capaci di mettere in evidenza una elevata diversità genetica poichè i polimorfismi sono dovuti a varianti alleliche allo stesso locus (Varnshey *et al.* 2005, Powell *et al.* 1996). Tale caratteristica rende i microsatelliti particolarmente adatti alla tipizzazione genotipica e all'identificazione varietale, oltre che alla conduzione di studi evolutivisti. Un'altra caratteristica vantaggiosa è la loro natura codominante che permette di distinguere tra individui omozigoti ed eterozigoti.

Nelle Orchidee ci sono ancora poche informazioni, gli studi principali si sono focalizzati principalmente su *Dendrobium* (Cai *et al.* 2012; Lu *et al.* 2012; Yue *et al.* 2006) e *Phalaenopsis* (Hsu *et al.* 2011) e hanno un carattere soprattutto evolutivo.

1.9 Obiettivi del Dottorato

Il dottorato ha avuto come obiettivo principale quello di introdurre nuova variabilità genetica nelle orchidee. Tale obiettivo è stato perseguito tramite lo sviluppo di metodologie di manipolazione cellulare abbinate a tecniche di analisi genetiche e citogenetiche avanzate al fine di generare un sistema integrato ad alta efficienza e rapidità per l'ottenimento di nuove combinazioni genetiche nelle orchidee (Fig.20).

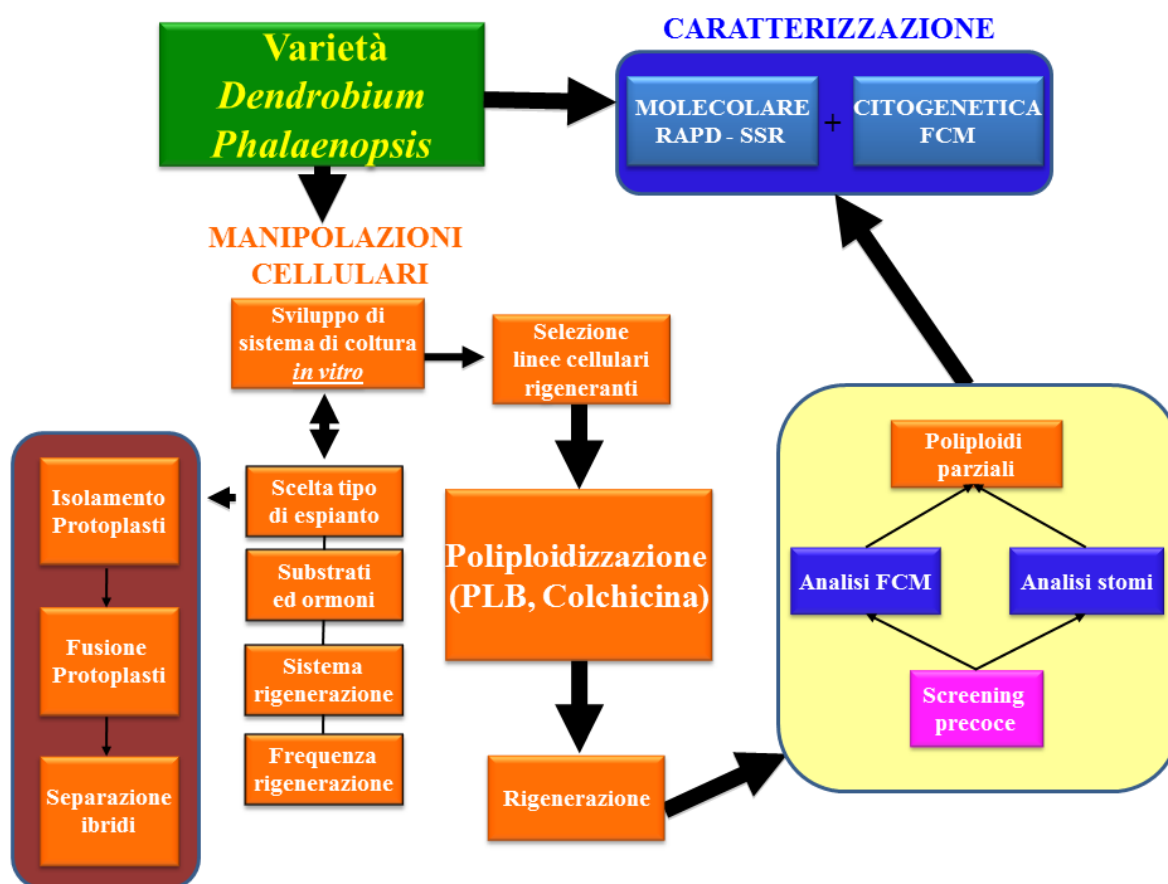


Figura 20. Schema generale del progetto. Con il colore arancione sono indicati tutti i passaggi che prevedono manipolazioni cellulari, mentre con il colore blu quelli che riguardano la caratterizzazione del materiale.

Il materiale sperimentale sul quale sono state sviluppate le attività del dottorato sono stati una serie di ibridi tra *Phalaenopsis* e *Dendrobium*, sui quali si è operato per la creazione di piante con livello di ploidia multiplo.

A tal fine, il piano sperimentale triennale è stato sviluppato come:

- Caratterizzazione citofluorimetrica e molecolare del germoplasma di partenza, sviluppo di un sistema efficiente di coltura *in vitro* e selezione delle linee cellulari altamente rigeneranti; (I anno)
- Isolamento protoplasti, loro fusione chimica e fisica e separazione ibridi; (I e II anno)
- Poliploidizzazione PLBs attraverso inibitori del fuso mitotico, *screening* precoce del materiale, caratterizzazione citofluorimetrica, molecolare e citogenetica dei poliploidi. (II e III anno)

Il progetto di dottorato è stato articolato in più fasi, durante le quali:

i) sono stati generati *in vitro* espianti competenti alla rigenerazione ad alta frequenza, o pseudo protocormi (PLB: *protocorm like bodies*); ii) sono stati selezionati gli espianti con maggiore capacità rigenerante e selezionati i substrati ed i cicli di coltura più efficienti; iii) sono stati provati più agenti poliploidizzanti *in vitro* e definite le condizioni di trattamento compatibili con la rigenerazione di plantule; iv) sono state sviluppate metodologie di riconoscimento molecolare delle varietà di partenza e degli espianti *in vitro* tramite marcatori RAPD e SSR; v) sono state sviluppate tecniche di isolamento nuclei in sospensione per l'analisi citofluorimetrica a flusso e la valutazione del contenuto di DNA su vari tipi di espianti *in vivo* ed *in vitro*; vi) sono stati condotti esperimenti di trattamento con agenti poliploidizzanti per più cicli di coltura *in vitro* e valutata precocemente la risposta degli espianti tramite microcampionamento ed analisi citofluorimetrica non distruttiva; vii) tramite elaborazione statistica dei dati sperimentali, sono state individuate le metodiche più efficaci per la poliploidizzazione e prodotti ibridi poliploidi caratterizzati; viii) sono state sviluppate le metodologie di isolamento di protoplasti da vari tipi di espianti e verificate le possibili vie per indurre differenziamento da essi; ix) sono stati indotti ibridi somatici tramite le due metodologie di fusione note, quella chimica con PEG e quella con elettrofusione; x) sono state messe a punto le procedure di analisi e *flow sorting* dei protoplasti tramite colorazione sopravvitalità ed incorporazione in microgocce di alginato; xi) sviluppo di metodologie di analisi

citogenetiche molecolari per il riconoscimento qualitativo e quantitativo dei riarrangiamenti genomici intercorsi dopo i trattamenti poliploidizzanti. I materiali ibridi poliploidi di orchidea prodotti saranno potenzialmente capaci di mostrare caratteristiche fenotipiche differenti dall'ibrido di partenza. Le tecniche di biologia cellulare, citogenetica e biologia molecolare sviluppate nel corso del dottorato hanno consentito di caratterizzare ed isolare le nuove combinazioni genetiche sin dalle prime fasi di manipolazione, riducendo i passaggi ed i tempi di coltura *in vitro*. In questo modo le successive colture sono state principalmente focalizzate sulle linee potenzialmente innovative, riducendo in maniera sostanziale il materiale biologico da processare ed analizzare. Grazie a queste metodologie, la caratterizzazione genetica delle nuove linee è effettuata precocemente, ed in maniera non distruttiva, utilizzando solo pochi milligrammi di tessuto fogliare delle nuove plantule, consentendo di concentrare le risorse sperimentali sui materiali significativi ed in grado di produrre il risultato voluto di ottenimento di nuove combinazioni genetiche nelle orchidee.

MATERIALI E METODI

2.0 MATERIALI E METODI

2.1 Materiale vegetale

I materiali vegetali di partenza utilizzati poi per tutto il lavoro sperimentale sono stati forniti dalla Floramiata S.p.A. (Pian del Castagnaio, Siena), in particolare dal dott. Dimitri Paskulov e dal dott. Benedetto Aracri. Le specie di orchidee fornite rappresentano una selezione, comprendente specie botaniche e ibridi, con caratteristiche fenotipiche di interesse commerciale (Tab. 5).

GENOTIPO	ORIGINE	NOTE
<i>Phalaenopsis</i> “Memole” x “B. grosso”	Da seme	Incrocio interspecifico
<i>Phalaenopsis</i> “Lady” x “Violet Light”	Da seme	Incrocio varietà commerciale
<i>Phalaenopsis</i> “Violet Light” x self	Da seme per autoimpollinazione	Varietà commercial
<i>Miltonia spectabilis</i>	Da seme	Specie botanica
<i>Miltonia schroederiae</i>	Da seme	Specie botanica
<i>Cattleya maxima</i>	Clonale	Specie botanica
<i>Cattleya intermedia</i>	Clonale	Specie botanica
<i>Laelio Cattleya Angel Heart</i>	Da seme	Incrocio interspecifico
<i>Dendrobium phalaenopsis</i> (viola) x <i>Dendrobium loddigesii</i>	Da seme	Incrocio interspecifico
<i>Dendrobium phalaenopsis</i> (bianco) x <i>Dendrobium virgineum</i>	Da seme	Incrocio interspecifico
<i>Dendrobium B. grosso</i> x <i>Dendrobium viola</i>	Da seme	Incrocio interspecifico
<i>Phalaenopsis</i> Memole x self	Da seme per autoimpollinazione	Varietà commercial
<i>Every spring prince</i> x <i>Ph. Memole</i>	Da seme	Incrocio interspecifico

Tabella 5. Elenco del germoplasma fornito da Floramiata S.p.A.

Gli espianti sono stati forniti, a seconda della specie, o sotto forma di giovani plantule o sotto forma di PLBs originati da seme.

2.1.1 Sterilizzazione degli espianti

I semi sono stati lavati in acqua distillata con alcune gocce di un detergente (Tween 20) per circa 10 minuti. Successivamente sono stati fatti 4 lavaggi di 5 minuti ciascuno in acqua distillata sterile in cappa a flusso laminare. Gli espianti sono stati trasferiti in etanolo al 70% per 2 minuti in agitazione e risciacquati nuovamente in acqua sterile, infine lasciati asciugare e trasferiti sul terreno di coltura appropriato.

2.2 Coltura in vitro

2.2.1 Coltura espianti

Dopo la sterilizzazione i semi sono stati disposti in capsule Petri (diametro 4 cm) su un terreno di coltura base MS (Murashige e Skoog, 1962) supplementato con 6-Benzilaminopurina (BAP) a 3mg/L per l'ottenimento dei PLBs (A3, Appendice Tab. 1). I PLBs ottenuti sono stati trasferiti in capsule petri di dimensioni maggiori (diametro 6cm) o in barattoli da coltura in vitro con capacità di 250ml. I terreni utilizzati sono stati: un MS base supplementato con saccarosio al 2% per il mantenimento a PLBs (MSO, Appendice Tab. 1), un MS supplementato con tre diversi tipi di auxine per lo sviluppo delle giovani plantule, acido indol-3-acetico (IAA), Acido α -naftalen acetico (α -NAA), acido indol-3-butyrico (IBA), tutti e tre a concentrazione 1-2-4 μ M. Invece nel caso dei genotipi appartenenti al genere *Phalaenopsis* dopo il primo stadio di acclimatamento dei PLBs una volta raggiunto lo stadio di giovani plantule, data l'eccessiva produzione di polifenoli dovuta all'espianto, sono stati trasferiti su un terreno contenente carbone attivo (ORCHIMAX, Duchefa O0257), per il loro mantenimento (Appendice Tab. 1).

2.2.2 Induzione embriogenesi somatica

Tre specie di *Phalaenopsis* (*Phalaenopsis memole*, *Phalaenopsis V. Light*, *Phalaenopsis lady x Phalaenopsis V. light*) sono state utilizzate per indurre embriogenesi somatica a partire da espianti fogliari seguendo il protocollo di Chen e Chang 2006. Giovani plantule di circa 2 mesi sono state utilizzate come materiale di partenza. Circa 1cm della parte apicale di una giovane foglia è stato tagliato, rimuovendo la nervatura centrale. La porzione di foglia recisa è

stata sottocolturata su un MS mezza forza modificato supplementato con Thidiazuron (TDZ) 0.1-1-3mg/L. Gli espianti sono stati posti sul terreno di coltura, con la pagina superiore a contatto con il terreno, in piastre Petri 90 × 15mm² ed incubate o al buio o alla luce, con un fotoperiodo di 16h, per 3 tempi di incubazione diversi, 15-30-45 giorni ad una temperatura di 25±2°C, trasferiti su terreno fresco ogni 30 giorni e a 3 mesi valutati per la produzione di embrioni.

2.2.3 Coltura in sospensione di PLBs

I PLBs di 4 specie e ibridi di orchidee (*Dendrobium phalaenopsis* × *Dendrobium loddigesii*, *Dendrobium phalaenopsis* × *Dendrobium virgineum*, *Every spring prince* × *Phalaenopsis memole*, *Cattleya maxima*) di origine clonale sono stati utilizzati per lo sviluppo e la moltiplicazione su terreno liquido dei PLBs. A questo scopo sono stati utilizzati due diversi terreni: MSO e NDM (Tokuara e Mii, 1993; Appendice Tab. 1 e 2), circa 1gr di inoculo iniziale e stato posto in 40ml di terreno liquido in una beuta da 250ml in agitazione a 120rpm/min, in camera climatica ad una temperatura di 25±2°C e con fotoperiodo di 16h, o posti totalmente al buio. Per ogni condizione sono state testate anche tre diverse concentrazioni di Pluronic F-68 0.01-0.5%. Per ogni diverso trattamento sono state effettuate 3 repliche, il terreno è stato cambiato ogni 2 settimane e ad ogni cambio è stato valutato il peso fresco per stimare il tasso di accrescimento.

2.3 Isolamento dei protoplasti

Per l'isolamento dei protoplasti sono stati utilizzati diversi genotipi (Tab. 6) e due tipi diversi di espianto: PLBs e foglia.

GENOTIPO	TIPO DI ESPIANTO
<i>Cattleya maxima</i>	Foglia e PLBs
<i>Phalaenopsis</i> “Lady” × “Violet Light”	Foglia
<i>Phalaenopsis</i> “Violet Light” × self	Foglia
<i>Laelio Cattleya Angel Heart</i>	Foglia
<i>Dendrobium phalaenopsis</i> (viola) × <i>Dendrobium loddigesii</i>	Foglia e PLBs

<i>Dendrobium phalaenopsis (bianco) x Dendrobium virgineum</i>	Foglia e PLBs
<i>Phalaenopsis Memole x self</i>	Foglia
<i>Every spring prince x Ph. Memole</i>	Foglia e PLBs

Tabella 6. Elenco dei genotipi utilizzati per l'isolamento dei protoplasti

2.3.1 Soluzioni enzimatiche

Per ottimizzare il rilascio dei protoplasti dai tessuti sono state utilizzate quattro diverse soluzioni enzimatiche con alcune modificazioni a seconda del genotipo e del tipo di espianto. Le soluzioni utilizzate sono state: SEG (Grosser e Gmitter, 1990), SEF (Grosser e Gmitter, 1990), SED1 (Kanchanapoom *et al.* 2001) e SED2 (Khentry *et al.* 2006) (Tab. 7).

Componenti	SEG	SEF	SED1	SED2
Cellulase Onozuka R10	1%	1%	1%	1%
Macerozyme R10	1%	1%	1%	0.2%
Pectolyase Y23	0.2%	0.2%	-	0.01%
Driselase	-	-	0.5%	-
Mannitolo	0.7M	0.5M	0.4M	0.5M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	12.0mM	10.1mM	-	10.0mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.4mM	-	-	-
MES	6.0mM	3.0mM	-	5.0mM
pH	5.6	5.6	5.7	5.8

Tabella 7. Elenco delle soluzioni enzimatiche e della loro relativa concentrazione e combinazione di enzimi

Tutte le soluzioni sono state filtrosterilizzate a 0.22µm e conservate a -20°C e scongelate prima dell'utilizzo.

2.3.2 Isolamento protoplasti da foglia

Due-Tre settimane dopo l'ultima sottocoltura giovani foglie di circa 3-4cm di lunghezza sono state recise e circa 100mg di tessuto fogliare sono stati sminuzzati con una lama bisturi in 4ml di soluzione enzimatica. Nel caso delle soluzioni SEG e SEF il rapporto soluzione enzimatica terreno di coltura è stato 1ml a 4ml. Una volta preparato il campione è stato incubato a 24°C per 18h al buio, la qualità della resa è stata controllata tramite microscopia in luce trasmessa. Il materiale è stato filtrato tramite una rete nylon con maglie del diametro di 50µm per trattenere i residui più grossolani.

2.3.3 Isolamento protoplasti da PLBs

Dopo 10 giorni dall'ultima sottocoltura una masserella di PLBs di dimensione uniforme è stata prelevata e circa 200-300mg di tessuto sono stati sminuzzati con una lama bisturi in 4ml delle soluzioni enzimatiche preparate come descritto nel paragrafo precedente. Il campione così preparato è stato messo ad incubare a 28°C per 3h al buio, la qualità della resa è stata controllata tramite microscopia in luce trasmessa. Il materiale è stato filtrato tramite una rete nylon con maglie del diametro di 100µm per trattenere i residui più grossolani.

2.3.4 Purificazione dei protoplasti su gradiente

Una volta isolati i protoplasti immersi ancora nella soluzione enzimatica sono stati centrifugati tramite rotore basculante a 100g per 5min a 10°C. Il sopranatante è stato rimosso e il pellet è stato risospeso in 4ml di CPW25S e sulla sospensione sono stati stratificati delicatamente 2ml di CPW13M (Tab. 8).

Componenti (mg/L)	CPW25S	CPW13M
KH_2PO_4	27.2	27.2
KNO_3	101	101
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1480	1480
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246	246
KI	0.16	0.16
$\text{CuSO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
Saccarosio	250g	-
Mannitolo	-	130g

Tabella 8. Composizione componenti per la purificazione dei protoplasti

Il campione è stato nuovamente centrifugato a 100g per 10min a 10°C, i protoplasti integri sono stati individuati all'interfaccia tra CPW25S e CPW13M, mentre sul fondo adavano a sedimentare i detriti di piccole dimensioni ed i protoplasti danneggiati. I protoplasti concentrati su gradiente in un “anello” all'interfaccia tra saccarosio e mannitolo sono stati prelevati con una pipetta Pasteur e risospesi in 5ml del terreno di coltura (Fig. 21).

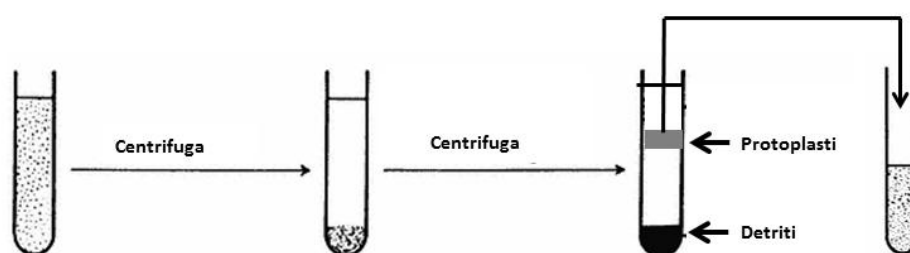


Figura 21. Schema purificazione protoplasti su gradiente di saccarosio. I protoplasto si dispongono all'interfaccia tra il saccarosio e il mannitolo, formando un anello, mentre i detriti, più leggeri depositano sul fondo, i protoplasti vengono così purificati e disposti nell'apposito terreno di coltura

I protoplasti sono stati ulteriormente centrifugati per 10mi a 100g a 10°C. Il pellet è stato risospeso in 1ml di terreno per la determinazione della concentrazione con l'ematocitometro (Camera Bürker) e per portare la concentrazione finale della sospensione dei protoplasti a 1×10^5 protoplasti/ml (per l'ibridazione somatica la concentrazione finale dei protoplasti è stata portata a 2×10^5 protoplasti/ml).

2.3.5 Analisi della vitalità

L'analisi della vitalità dei protoplasti, definita come integrità della membrana cellulare ed attività metabolica, è stata valutata utilizzando il fluorocromo sopravvitalo fluoresceina diacetato (FDA; Molecular Probes cod F1303) alla concentrazione di 0,5µg/ml (Haugland 1992; Nadel 1989).

2.4 Ibridazione somatica

L'ibridazione somatica è stata condotta mediante l'uso di due metodologie, una chimica, che si avvale delle capacità fusogene del polietilenglicole (PEG) seguendo la procedura descritta da Tusa *et al.* 1990, e l'altra fisica, basata sull'elettrofusione, seguendo la procedura descritta da Lucretti *et al.* 1992, apportando lievi modifiche ed aggiustamenti.

I genotipi utilizzati nello schema di ibridazione sono stati *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii*, *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium virgineum*, *Phalaenopsis Lady*, *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole*. Con protoplasti ottenuti sia da foglia che da PLBs.

2.4.1 Fusione tramite PEG

I protoplasti dei due campioni, portati alla concentrazione di 2×10^5 protoplasti/ml, sono stati mescolati in rapporto 1:1; con una pipetta Pasteur sono state disposte 2-3 gocce (100µl circa) della miscela al centro di una Petri (diametro 3,5cm), una volta lasciati sedimentare sul fondo della piastra i protoplasti nella goccia, sono state aggiunte, lateralmente alla goccia centrale, 2 gocce (100µl circa) della soluzione PEG. Il PEG è stato lasciato agire per 8-10min. Successivamente sono state aggiunte 3-4 gocce (100-130µl) della soluzione A+B (in rapporto 9:1) (Tab. 9), sempre lateralmente alla goccia centrale lasciando agire per 10-12min.

Componenti (g/L)	PEG	Soluzione A	Soluzione B
PEG (M.W. 1500; 4000; 8000)	40%	-	-
Glucosio	54,1	72,1	-
CaCl ₂	9,7	9,7	-
DMSO	-	10%	-
Glicina	-	-	22,5
pH	6	6	10,5

Tabella 9. Composizione componenti per ibridazione somatica di tipo chimico

L'azione aggregante del PEG è stata arrestata successivamente aggiungendo tutt'intorno 10 gocce del terreno di coltura (300µl). Dopo 5-10 minuti il terreno è stato rimosso con cura con una pipetta pasteur, cercando il più possibile di non toccare la goccia centrale contenente i protoplasti; questa operazione è stata ripetuta per altre due volte aumentando il volume del terreno a 15 gocce (450µl) e lasciando agire per 2-5min ogni volta (Fig. 22).

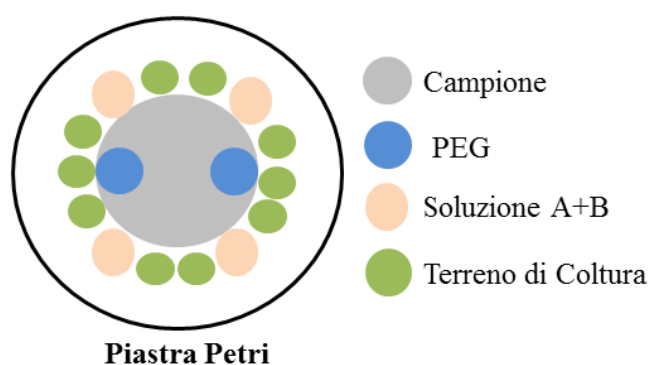


Figura 22. Schema ibridazione somatica tramite PEG. Con i vari colori sono indicati i vari componenti nel processo. La loro disposizione rispecchia quella reale che avviene durante il processo di fusione.

Dopo aver rimosso definitivamente il terreno per i lavaggi, i protoplasti sono stati risospesi in 3ml finali di terreno di coltura. Le piastre sono state sigillate con parafilm e poste ad incubare a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ al buio.

2.4.2 Elettrofusione dei protoplasti

Le elettrofusioni sono state condotte con elettrofusore “Zellfusion CFA-400A” (Kruss, Germania), seguendo la procedura descritta da Lucretti *et al.* 1992. I protoplasti sono stati purificati secondo la procedura già descritta e la loro concentrazione portata a 2×10^5 diluendoli con un substrato di appropriata osmolarità e privo di sali, una soluzione acquosa al 12% di mannitolo e 3% di saccarosio ($\text{H}_2\text{O}12\text{M}3\text{S}$). Il campione è stato centrifugato a 100g per 5min per diluire ulteriormente le tracce del precedente substrato ed i protoplasti risospesi in un appropriato volume della stessa soluzione.

I parametri elettrici di fusione sono stati verificati con l’ausilio di un microscopio invertito e di una camera a vetrino con elettrodi a vista, dove è stato possibile osservare direttamente il comportamento dei protoplasti a seconda dei valori impostati. Successivamente, la popolazione mista di protoplasti è stata posta in una camera chiusa a siringa del volume di 500 μl ed è stata condotta la fusione secondo i parametri definiti precedentemente. La camera a siringa è stata sterilizzata con EtOH al 70% per 30min e successivi risciacqui con H_2O sterile e con la soluzione di fusione ($\text{H}_2\text{O}12\text{M}3\text{S}$). Il campione è stato osservato al microscopio invertito per controllare la presenza delle fusioni ed effettuare eventuali ulteriori aggiustamenti.

I parametri ricorrenti impostati per la fusione dei protoplasti di Orchidea sono stati: campo elettrico generato da corrente alternata (AC) 150-500 Vp/cm con frequenza 1000-1100KHz; 2-3 impulsi di fusione di durata 30 μs /impulso di 1,5KV/cm con corrente continua (DC). Il campo elettrico è stato ricondotto a zero gradualmente (60-120sec) ed i protoplasti sono stati portati per diluizione alla concentrazione di coltura finale ($1\cdot 10^5/\text{ml}$) e posti ad incubare al buio a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.5 Coltura dei protoplasti

Per la coltura dei protoplasti e dei loro prodotti di fusione sono stati utilizzati diversi tipi di terreno, con substrati e supplementi ormonali diversi, per massimizzare la rigenerazione dei

protoplasti da genotipi ed espianti molto diversi tra loro. Fondamentalmente sono stati seguiti due metodi:

1) Nel metodo “standard” i protoplasti, una volta, purificati sono stati posti in terreno liquido, e ogni 2 settimane il terreno è stato diluito con uno dello stesso tipo ma in maniera tale da abbassare la pressione osmotica. I terreni utilizzati sono stati: BH_3 , EME, $\frac{1}{2}$ NDM, K3 (Tab. 2-3, Appendice).

2) Nel secondo metodo, i protoplasti purificati sono stati risospesi in $\frac{1}{2}$ NDM privo di ioni calcio e supplementato con sodio alginato (0.1-0.5%). 1ml di questa sospensione è stata fatta cadere, tramite una pipetta Pasteur, in un terreno contenente 8ml CPW e 1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, in maniera tale da formare circa una trentina di gocce. Dopo 1h la soluzione di CPW è stata sostituita da 4ml di mezzo di coltura. I protoplasti, così incapsulati nelle “beads” di sodio alginato, sono stati sottocolturali ogni mese sostituendo il mezzo di coltura circostante con un mezzo di coltura fresco con una concentrazione di sorbitolo ogni volta decrescente di 0.1M (Fig. 23).



Figura 23. Schema del processo di sottocoltura dei protoplasti una volta incapsulati nelle beads di sodio alginato. La rimozione del mezzo di coltura avviene tramite una pipetta pasteur e il fatto che i protoplasti siano imprigionati in dei supporti rigide rende il processo molto facile e rapido evitando problemi di manipolazione.

In entrambi i casi i terreni sono stati implementati con diverse concentrazioni e combinazioni di ormoni, NAA e Acido-2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D); integrando inoltre surfactanti, come il Pluronic F-68, a diverse concentrazioni (0,01-0,1-1%).

2.6 Poliploidizzazione

I PLBs stabilizzati in coltura *in vitro* sono stati utilizzati per il trattamento poliploidizzante, i genotipi utilizzati sono stati: *Dendrobium phalaenopsis*, *Cattleya maxima*, *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole*. I PLBs sono stati sottocolturali su mezzo liquido 1/2NDM per *Dendrobium* e 1/2MS+BAP per *Cattleya* e *Phalaenopsis*. Circa 1g di PLBs, tagliati trasversalmente, sono stati posti in beute da 200ml con 40ml di terreno di coltura, in agitazione a 120rpm/min, alla luce con un fotoperiodo di 16h e a 25±1°C.

Come agenti poliploidizzanti sono stati utilizzati: colchicina a diverse concentrazioni (0.00, 0.025, 0.050, 0.075% (wt/vol)); e APM a diverse concentrazioni (1.25 e 2.5µM). Dopo un periodo di incubazione di 3, 10 e 21 giorni gli espianti sono stati trasferiti su un terreno privo di colchicina e sottocolturali ogni 2 settimane.

2.7 Citometria a flusso

Le analisi citofluorimetriche sono state effettuate con un citofluorimetro FACSVantage SE della Becton Dickinson (La Jolla, California, USA) equipaggiato con un laser ad Argon Innova 90/5 UV con emissione a 353+361nm e 200mW per il DAPI ed a 514nm e 200 mW per il PI (Fig. 24). La fluorescenza è stata raccolta attraverso filtri passa banda specifici per il DAPI (BP 450/20 per i nuclei e LP400 per i cromosomi) e per il PI (BP 620/30). E' stato utilizzato un nozze in ceramica da 70 µm e come "sheath fluid" una soluzione KCl 25 mM in H₂O filtro sterilizzato a 0.22 µm. L' allineamento dello strumento è stato effettuato utilizzando nuclei fissati estratti da eritrociti di pollo, conservati a – 20°C in etanolo 70% e colorati come i campioni. Lo strumento è stato considerato ben calibrato per le analisi quando per i CRBC il coefficiente di variazione (CV) dell'intensità di fluorescenza del picco era calcolata tra 2.5% e 3%. I segnali ottenuti dai campioni sono stati acquisiti, conservati ed analizzati tramite il software di gestione del FACSVantage CellQUEST Pro ver. 4.1 (Becton Dickinson, USA) per computer Macintosh.



Figura 24. Citometro a flusso presente nel nostro laboratorio.

2.7.1 Isolamento di nuclei in sospensione

I nuclei in sospensione sono stati isolati tramite sminuzzamento di tessuto fogliare e PLBs in tampone di estrazione seguendo la procedura di Galbraith *et al.* (1983). Diversi tamponi di isolamento sono stati provati, come LB01, Otto buffer, Tris-MgCl₂ e un Tris buffer modificato dove al posto del tensioattivo non ionico Triton-X100 abbiamo inserito un tensioattivo anfotero il 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 10mM. In breve, 50-80mg di tessuto fogliare espanso o di masserelle uniformi di PLBs sono stati posti in una capsula Petri in vetro e sminuzzati con una lama da bisturi a bordo arrotondato. Il tessuto è stato frammentato sino al rilascio di una sospensione verde contenente sia i nuclei che cloroplasti e residui tissutali aspecifici. La sospensione a questo punto è stata filtrata con un filtro a 36µm e colorata con un colorante specifico, a seconda dell'uso.

2.7.2 Analisi del contenuto di DNA

Per la misurazione del contenuto di DNA, la sospensione nucleare è stata colorata con 74,8 µM PI (50 µl stock PI per ml di sospensione) assieme ad un trattamento con RNasi (50 µg/ml sospensione). Come standard interno di riferimento è stato utilizzato *Raphanus sativus* avente contenuto di DNA noto (2C=1.06pg). I campioni così trattati sono stati analizzati al citometro per determinarne la concentrazione in nuclei ed ottimizzare la quantità di standard interno da aggiungere nel rapporto migliore tale da consentire una comparazione dei valori di fluorescenza nell'istogramma del DNA prodotto. La sospensione nucleare finale contenente ambedue le specie, Orchidea e *Rhapanus* nei rapporti definiti sperimentalmente, è stata

colorata con PI e trattata con RNasi per 10 min, a temperatura ambiente, prima dell'analisi citofluorimetrica.

2.7.3 Analisi della ploidia

Per la valutazione della ploidia, la sospensione è stata filtrata a 36 µm per rimuovere la gran parte dei residui tissutali ed il volume ottenuto è stato colorato con 5,8 µM DAPI (20 µl stock DAPI per ml di sospensione). Nel caso del materiale poliploidizzato le analisi sono state condotte inizialmente sui nuclei estratti da PLBs, a diversi tempi durante e dopo il trattamento (3-10-28 giorni) e dopo sei mesi dal trattamento sulle giovani foglie delle prime plantule originate dai PLBs trattati. Per la comparazione dei risultati, sono state utilizzate come standard interno le *beads* di allineamento (Flow Check Fluorophores, Beckman Coulter), che sono state aggiunte alla sospensione dei nuclei vegetali prima della colorazione (Lucretti *et al.* 1992).

2.7.4 Analisi e separazione citofluorimetrica degli ibridi

Per l'analisi e il "sorting" degli ibridi è stata seguita la metodica descritta da Lucretti *et al.* 1992 con alcune modifiche minori. I protoplasti colorati con FDA (emissione 510-560nm), FITC (emissione 510-560nm), TRITC (emissione 530-580nm) (Haugland 1992), o contenenti clorofilla (emissione 670-680nm), sono stati analizzati per la loro emissione fluorescente in seguito ad eccitazione con luce blu alla riga a 488nm dell'argon e 100mW di potenza. I segnali di fluorescenza sono stati raccolti dai fotomoltiplicatori dello strumento tramite appropriati filtri discriminatori (BP) posti davanti ai sensori (BP535/15 per FDA e FITC; BP 580/20 per TRITC; BP670/10 per clorofilla). Nel caso di emissioni contemporanee dovute alla presenza coincidente di più fluorocromi, come nel caso degli ibridi somatici contenenti FITC e TRITC o FDA e clorofilla, i segnali sono stati suddivisi tramite uno specchio dicroico con lunghezza d'onda di taglio a 560nm.

L'analisi e la separazione dei protoplasti è stata effettuata con un *nozzle* di 100µm di diametro ed una frequenza di 200 protoplasti/sec. È stato utilizzato uno *sheat fluid* modificato, contenente NaCl 50mM e sodio alginato allo 0.5%, i protoplasti sono stati risospesi in un terreno privo di calcio utilizzato per l'analisi citometrica. Per la separazione, i protoplasti sono stati raccolti in capsule Petri (diametro 3,5cm) contenenti CPW+1%CaCl₂, in questo modo una volta che la goccia contenente un singolo protoplasto ibrido è entrata a contatto con i CPW si è formato una micro *beads* di sodio alginato contenente un singolo protoplasto di

interesse. Alla fine della separazione i CPW sono stati sostituiti con il terreno di coltura, la piastra Petri sigillata con parafilm e posta ad incubare al buio a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.8 Analisi marcatori molecolari

Le analisi molecolari sono state condotte su giovani foglie di circa 6 mesi di tutti i materiali di partenza (tab..) e successivamente di tutti i materiali andati poliploidizzati.

2.8.1 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione è stata effettuata partendo da tessuto fogliare verde, omogeneizzato con mortaio e pestello in presenza di azoto liquido seguendo il protocollo di Tai e Tanksley (1990) con alcune modifiche minori. Ad ogni campione contenente circa 150mg di tessuto fogliare sono stati aggiunti 700 μl di tampone di estrazione (100 mM TrisHCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 1,25% SDS, 8,3 mM NaOH, 0,38% sodio bisolfito) pre-riscaldato a 65°C ed il campione è stato incubato in un bagnetto caldo a 65°C per 10 minuti, agitando di tanto in tanto. Sono stati aggiunti 0,22 ml di potassio acetato 5 M ed il campione è stato posto in ghiaccio per almeno 40 minuti, poi è stato centrifugato a 4°C per 3 minuti e il sopranatante è stato filtrato con carta miracloth. Sono stati aggiunti 600 μl di isopropanolo e si è centrifugato di nuovo a 4°C per 3 minuti, eliminando poi il sopranatante e sciacquando il pellet due volte con 800 μl di etanolo al 70%. Il pellet è stato risospeso in 300 μl di T5E (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8), "vortexato" e posto a 65°C per 5 minuti. Il campione è stato poi nuovamente "vortexato" per risospendere il pellet e sono stati aggiunti 150 μl di ammonio acetato 7,4 M, poi è stato centrifugato 3 minuti e al sopranatante sono stati aggiunti 330 μl di isopropanolo. Il campione è stato centrifugato 3 minuti e, dopo aver eliminato il sopranatante, il pellet è stato sciacquato due volte con etanolo al 70%. Sono stati aggiunti 100 μl di T5E ed è stato incubato a 65°C per 5 minuti. Sono stati aggiunti 10 μl di sodio acetato 3 M e 75 μl di isopropanolo, poi il campione è stato centrifugato 3 minuti, è stato eliminato il sopranatante ed è stato sciacquato due volte con etanolo al 70%. Il pellet è stato asciugato sottovuoto per 15 minuti, poi è stato risospeso per tutta la notte a 4°C in 25 μl di TE. Il campione il giorno successivo è stato poi scaldato a 65°C per 5 minuti e conservato a -20°C .

La concentrazione del DNA genomico estratto è stata determinata tramite lettura della densità ottica (Q-bit) a 260nm (1 OD unit = 50ng/ μl); la sua purezza è stata invece valutata dal rapporto OD260/OD280 (Sambrook *et al.* 1989). I campioni sono stati infine diluiti ad una concentrazione finale di DNA di 10ng/ μl .

2.8.2 Analisi RAPD

L'analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) è stata condotta utilizzando 21 primer oligonucleotidici costituiti da 10 basi della Operon Technologies (Alameda, California; Tab. 10).

Primer ID	sequenza 5'-3'	PM	%GC	Tm	%GC Tm	Palindromi
OPF-01	ACGGATCCTG	3090.0	60.0	12.3	17.0	GGATCC
OPF-02	GAGGATCCCT	3090.0	60.0	9.4	17.0	GGATCC
OPF-03	CCTGATCACC	3010.0	60.0	5.5	17.0	TGATCA
OPF-04	GGTGATCAGG	3170.1	60.0	5.5	17.0	TGATCA
OPF-05	CCGAATTCCC	3010.0	60.0	19.3	17.0	GAATTC
OPF-06	GGGAATTCGG	3170.1	60.0	19.3	17.0	GAATTC
OPF-07	CCGATATCCC	3010.0	60.0	14.1	17.0	GATATC
OPF-08	GGGATATCGG	3170.1	60.0	14.1	17.0	GATATC
OPF-09	CCAAGCTTCC	3010.0	60.0	14.3	17.0	AAGCTT
OPF-10	GGAAGCTTGG	3170.1	60.0	14.3	17.0	AAGCTT
OPF-11	TTGGTACCCC	3041.0	60.0	14.0	17.0	GGTACC
OPF-12	ACGGTACCAG	3099.0	60.0	8.2	17.0	GGTACC
OPF-13	GGCTGCAGAA	3139.1	60.0	15.1	17.0	CTGCAG
OPF-14	TGCTGCAGGT	3121.0	60.0	14.5	17.0	CTGCAG
OPF-15	CCAGTACTCC	3010.0	60.0	0.7	17.0	AGTACT
OPF-16	GGAGTACTGG	3170.1	60.0	0.7	17.0	AGTACT
OPF-17	AACCCGGGAA	3108.0	60.0	23.9	17.0	CCCGGG
OPF-18	TTCCCGGGTT	3072.0	60.0	23.9	17.0	CCCGGG
OPF-19	CCTCTAGACC	3010.0	60.0	0.2	17.0	TCTAGA
OPF-20	GGTCTAGAGG	3170.1	60.0	0.2	17.0	TCTAGA
OPQ-10	TGTGCCCCGAA	3090	60.0	21.8	17.0	-

Tabella 10. Elenco dei primer utilizzati per l'analisi RAPD dei nostri espianti, parentali e mutanti.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in provette da 250μ in un thermal cycler “Eppendorff”, seguendo il protocollo di Chen e Chen (2007) con le seguenti modifiche: 5min a 94°C per la denaturazione iniziale dei filamenti, 55 cicli 94°C per 6sec, 60°C per 7sec e 72°C per 70sec, seguito da 10min finali a 72°C per l'allungamento dei filamenti.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è stata effettuata in un volume finale di 25µl contenente: Tris-HCl pH 9.0 10mM, KCl 50mM e MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 500µM, primer 1µM, 1 unità di Taq DNA Polimerasi (Invitrogen) e 10ng di DNA genomico.

I prodotti generati dall'amplificazione PCR sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio 1.5% (p/v) in tampone TBE (0.045M Tris-Borato, 0.001M EDTA, pH 8), a 80V per 50min. I gel colorati con bromuro d'etidio sono stati fotografati mediante transilluminatore ad illuminazione ultravioletta.

2.8.3 Analisi SSR

L'analisi SSR è stata condotta utilizzando 11 primer oligonucleotidici che amplificano microsatelliti già mappati in Orchidea (Yue *et al.* 2006; Tab11).

Repetitive motif	Primer (5'-3')	nome	Gene bank accession	Size range
(GT) ₄ CT(GA) ₁₀ GT(GA) ₈	CCTATCCGAGGAGAACCATAA AAGCTTTGAGATTCTTTGTGACT	SSR01-A SSR01-B	DQ205391	160-174bp
(TC) ₅ (GT) ₁₈	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT AATCAAGCCATTTATCTCCTCT	SSR02-A SSR02-B	DQ205392	166-180 bp
(AG) ₁₇ (TG) ₆	GCATTCTTTTGCCTAATTCAGGAA TCCACCCTTTCATCCAAATACTTC	SSR03-A SSR03-B	DQ205393	163-287
(AG) ₂₀	ACAGCGTTAACATAAACCATTAAGC CTGCCCCGAGATTTCAGC	SSR04-A SSR04-B	DQ205394	221-277
(GA) ₂₉	GGAACGGAGAAGATTAAGACAACC TGCCCTCACATGCCGTATT	SSR06-A SSR06-B	DQ205395	179-217
(GA) ₃₁	TAAGGCAAACCTTGAGTGCTTTATT CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	SSR07-A SSR07-B	DQ205396	89-147
(CT) ₈ AC(CT) ₅	CATATATTAGCCACTTCACTCTC ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	SSR08-A SSR08-B	DQ205397	222-266
(GA) ₄ TG(GA) ₆	AAATGGGGAAAAAGGAAAGGAC ATCCCTCCCCTCGCTCTCTC	SSR09-A SSR09-B	DQ205398	314-336
(TC) ₆ CC(TC) ₂₁	CATCCCAGCCCTTTTTCAC GAGAGCAAGAGGAGGATGGAA	SSR10-A SSR10-B	DQ205399	134-160
(AG) ₃₂	GGAAGGGCCTAAGTGGATG GCGTACCATGCTTAACATTCA	SSR11-A SSR11-B	DQ205401	139-181
(TC) ₉ (AC) ₄ AT(AC) ₈	GTGACTCGAGCCTTGAATACG ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG	SSR12-A SSR12-B	DQ205402	187-205

Tabella 11. Elenco dei primer utilizzati nell'analisi SSR dei genotipi parentali e non.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in provette da 250µl in un thermal cycler Invitrogen, seguendo il protocollo di Yue *et al.* 2006 con le seguenti modifiche: 2min a 94°C

per la denaturazione iniziale dei filamenti, 34 cicli 94°C per 30sec, 50°C per 30sec e 72°C per 30sec, seguito da 5min finali a 72°C per l'allungamento dei filamenti.

La PCR è stata effettuata in un volume finale di 25µl contenente: Tris-HCl pH 9.0 10mM, KCl 50mM e MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 200µM, primer 200mM, una unità di Taq DNA polimerasi e 10ng di DNA genomico.

I prodotti generati dall'amplificazione PCR sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio 3% (p/v) in tampone TBE, per un'ora a 100V. I gel colorati con bromuro d'etidio sono stati fotografati tramite transilluminatore ad illuminazione ultravioletta.

2.8.4 Analisi dei profili elettroforetici

I profili elettroforetici RAPD e SSR sono stati valutati mediante un apposito software di analisi di immagini gel TotalLab 120 (Nonlineardynamics) ed analizzati per la presenza/assenza di ogni singolo prodotto di amplificazione, nel caso dei RAPD, e per la posizione della banda di amplificazione nel caso degli SSR. I dati sono stati utilizzati per un'analisi gerarchica dei cluster di tipo agglomerativo condotta tramite il software statistico SPSS.

2.9 Analisi citologiche

Le analisi citologiche sono state condotte sui genotipi di *Dendrobium* e *Phalaenopsis* sottoposti a poliploidizzazione per effettuare il conteggio cromosomico ed evidenziare eventuali riarrangiamenti avvenuti a carico del cariotipo.

2.9.1 Colorazione Feulgen

I Cromosomi sono stati preparati partendo da apici radicali in attiva crescita seguendo il protocollo di Kao *et al.* 2001. Una volta recisi gli apici radicali sono stati tagliati longitudinalmente ed è stata rimossa, con una lama bisturi, la cuffia radicale e il velamen (uno strato di cellule morte con una parete molto spessa). L'apice radicale è stato pretrattato con 8-idrossichinolina 2mM in agitazione (100 cicli/min) per 4 ore a 20°C, in seguito è stato fissato in Carnoy (etanolo-acido acetico 3:1) per 18 ore a 4°C, idrolizzato in 1N HCl per 7min a 60°C, colorato con fucsina per 1 ora e digerito in 1% pectinasi per 1 ora. L'apice è stato poi schiacciato in 45% acido acetico su un vetrino portaoggetto.

2.9.2 FISH su nuclei in sospensione

I nuclei sono stati estratti da giovani foglie seguendo il protocollo di Sgorbati *et al.* 1986 con alcune modifiche. In breve, circa 100mg di tessuto fogliare sono stati prelevati e fissati in una soluzione di formaldeide al 4% (CH₂O in soluzione al 36,5%, Sigma F8775) in tampone TRIS (TRIS 10mM, Na₂EDTA 10mM, NaCl 100mM, pH 7.5), in un bagnetto termostatico mantenuto a 4±0.5°C. La formaldeide è poi stata rimossa tramite tre lavaggi da 5min con 30ml di tampone TRIS a 4°C. La soluzione contenente formaldeide va sempre preparata fresca prima dell'uso e sono state effettuate diverse prove per diversi tempi di fissazione: 5-10-20-40min. Una volta fissati i nuclei sono stati estratti seguendo la procedura di Galbraith *et al.* 1983, il tessuto fogliare è stato sminuzzato con lama bisturi in 1ml di buffer di estrazione TRIS-MgCl₂, i nuclei così rilasciati sono stati filtrati con una rete nylon con pori di diametro di 36µm e sono andati incontro al processo di ibridazione fluorescente.

La FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) è stata condotta seguendo il protocollo di Giorgi *et al.* 2013. Per consentire l'ibridazione in situ è stata effettuata una denaturazione alcalina del DNA, è stato aggiunto NaOH al nostro campione fino al raggiungimento del pH 13 per 20min, in seguito è stato aggiunto Tris-HCl 1M a pH 7.4 per 1min fino al ritorno del pH 8 e il tutto è stato trasferito in ghiaccio. A questo punto sono state aggiunte le nostre sonde degli oligonucleotidi sintetizzati da Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) con delle molecole fluorescenti in posizione 3' e/o 5' (Tab. 12).

Nome della Sonda	Oligonucleotide
GAA	5' -FITC-(GAA) ₇ -3'-FITC 5' -CY3-(GAA) ₇ -3'
(GA) ₁₀	5' -FITC-(GA) ₁₀ -3'-FITC 5' -CY3-(GA) ₁₀ -3'
Telomerica	5' -FITC-(TTAGGG) ₅ -3'-FITC 5' -CY3-(TTAGGG) ₅ -3'
pTa71 (ribosomale)	Misto di oligonucleotidi disegnati sulla base delle sequenze ripetute presenti all'interno della sonda

Tabella 12. Sonde utilizzate per la marcatura FISH dei nuclei in sospensione.

Gli oligonucleotidi sono stati dissolti in 2XSSC alla concentrazione finale di 1ng/μl ed aggiunti al campione, la sonda è stata lasciata in incubazione per un'ora a temperatura ambiente. Infine il campione è stato colorato con DAPI alla concentrazione finale di 7μM e risospeso in Tris-MgCl₂ fino ad arrivare al doppio del volume di partenza.

Per l'analisi microscopica circa 30μ della sospensione con i nuclei marcati è stata montata con Vectashield (v/v) (Vector Labs, Burlingame, CA) per amplificare il segnale di fluorescenza, e coperta con vetrino coprioggetto 24 × 24mm.

2.9.3 Analisi microscopiche

Per le analisi al microscopio è stato utilizzato un microscopio invertito Nikon Eclipse TE2000-S, equipaggiato con una lampada HB0 100W e un obiettivo PlanApo 100X ad olio e un set appropriato di filtri modulo per r DAPI, fluoresceina e CY3. Le immagini separate acquisite tramite ciascun filtro sono state catturate e digitalizzate utilizzando una camera DXM1200F e il software NIS AR 3.1 (Nikon Instruments S.p.A., Firenze, Italia). Le immagini sono state sovrapposte una sull'altra, dopo le opportune ottimizzazioni digitali, utilizzando il software gratuito ImageJ v1.46 (rsbweb.nih.gov/ij/index.html).

2.10 Analisi morfologiche

Le analisi morfologiche sono state condotte sui genotipi utilizzati per il processo di poliploidizzazione, poliploidi e non, in questo caso *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* e *Every spring prince* x *Phalaenopsis Memole*.

2.10.1 Analisi delle dimensioni e della densità stomatica

L'analisi degli stomi è stata effettuata misurando le dimensioni e il numero degli stomi della pagina fogliare inferiore di giovani plantule di circa 6 mesi. Brevemente, le foglie sono state recise dalla plantula tutte intorno alle 10 del mattino, in maniera tale che in tutte le foglie ci fosse lo stesso grado di apertura stomatica, una volta tagliate sulla pagina inferiore della foglia è stata spalmata una miscela di colla vinavil ed acqua (in rapporto 1:10), il tutto è stato lasciato ad asciugare per circa 8 ore. Una volta essiccato la colla è stata rimossa facendo un'operazione simile a quella di *peeling* fogliare in questo modo sullo strato di collo asportato è stata impressa l'immagine della pagina fogliare inferiore, il tutto è stato montato su un vetrino portaoggetto e valutato al microscopio in luce trasmessa.

Gli stomi sono stati valutati per dimensione (lunghezza e larghezza) e per densità (numero di stomi medio per cm²), gli individui sono stati catalogati come poliploidi e non, a conferma dei dati ottenuti tramite citometria a flusso.

2.10.2 Analisi morfometriche

I poliploidi sono stati valutati anche per le loro caratteristiche fenotipiche, proprio per individuare le differenze ed eventuali caratteristiche di interesse. Le giovani plantule poliploidi sono state valutate per il loro tasso di accrescimento, ossia quante plantule per ogni inoculo iniziale sono state rigenerate.

2.11 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software statistico SPSS (IBM, www.ibm.com). Sono state condotte sui dati morfologici e citometrici analisi della varianza (ANOVA) e Duncan MRTs per individuare i trattamenti migliori. Sui dati molecolari sono state invece effettuate delle Cluster Analysis.

RISULTATI

3.0 RISULTATI

3.1 Micropropagazione degli espianti

Sugli espianti di *Cattleya*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis* in nostro possesso sono stati utilizzati i terreni base per il mantenimento e la moltiplicazione dei PLBs (Fig. 25).

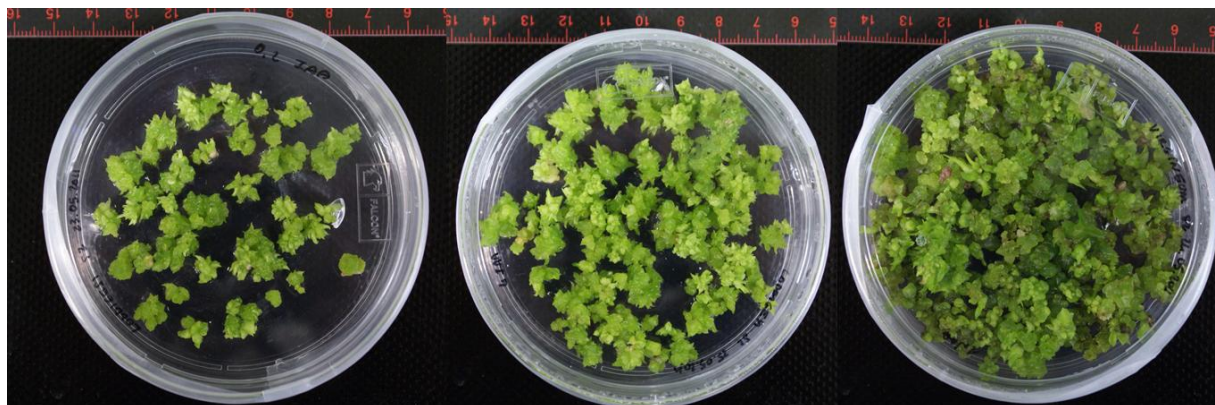


Figura 25. PLBs piastrati su MSO. Si possono vedere in sequenza, da sinistra verso destra, come i PLBs si moltiplichino durante le fasi di sottocultura da 0 a 4 mesi.

I PLBs sono stati piastrati su MSO e sottoculturati ogni due mesi; nella prima fase di coltura i PLBs sono triplicati sia in numero che in peso (Fig. 26), dimostrando come il terreno utilizzato sia risultato efficace a questo scopo.

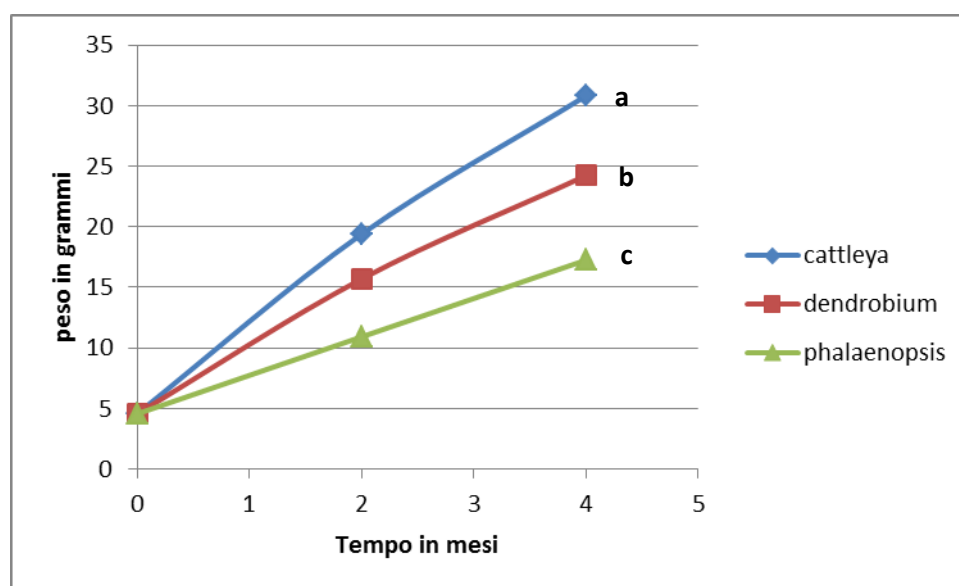


Figura 26. Andamento del peso fresco dei PLBs di *Cattleya*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis*. I diversi colori delle curve indicano i genotipi ed i punti sul grafico indicano i pesi medi rilevati su tre repliche..

Le differenze nel peso fresco che si possono rilevare tra i diversi genotipi sono risultate statisticamente significative (Duncan MRTs $p \leq 0.05$), l'incremento maggiore di peso è stato riscontrato per *Cattleya*, seguita da *Dendrobium* e *Phalenopsis*. Per quanto riguarda lo sviluppo dei PLBs a plantula, quelli di *Cattleya* non hanno mostrato necessità di ulteriori supplementi ormonali e dopo pochi mesi hanno sviluppato rapidamente una plantula; i PLBs di *Dendrobium* invece, non avendo mostrato questa capacità, sono stati piastrati su un terreno contenente MSO supplementato con diverse auxine (NAA, IAA e IBA) a diverse concentrazioni (1-2-4 μ M). In ogni contenitore sono stati piastrati circa 10-15 PLBs e l'efficacia nell'induzione di giovani plantule è stata valutata come percentuale sul totale a 4 mesi dal trattamento, per ogni singola combinazione concentrazione ormone sono state valutate 5 repliche (Fig. 27).

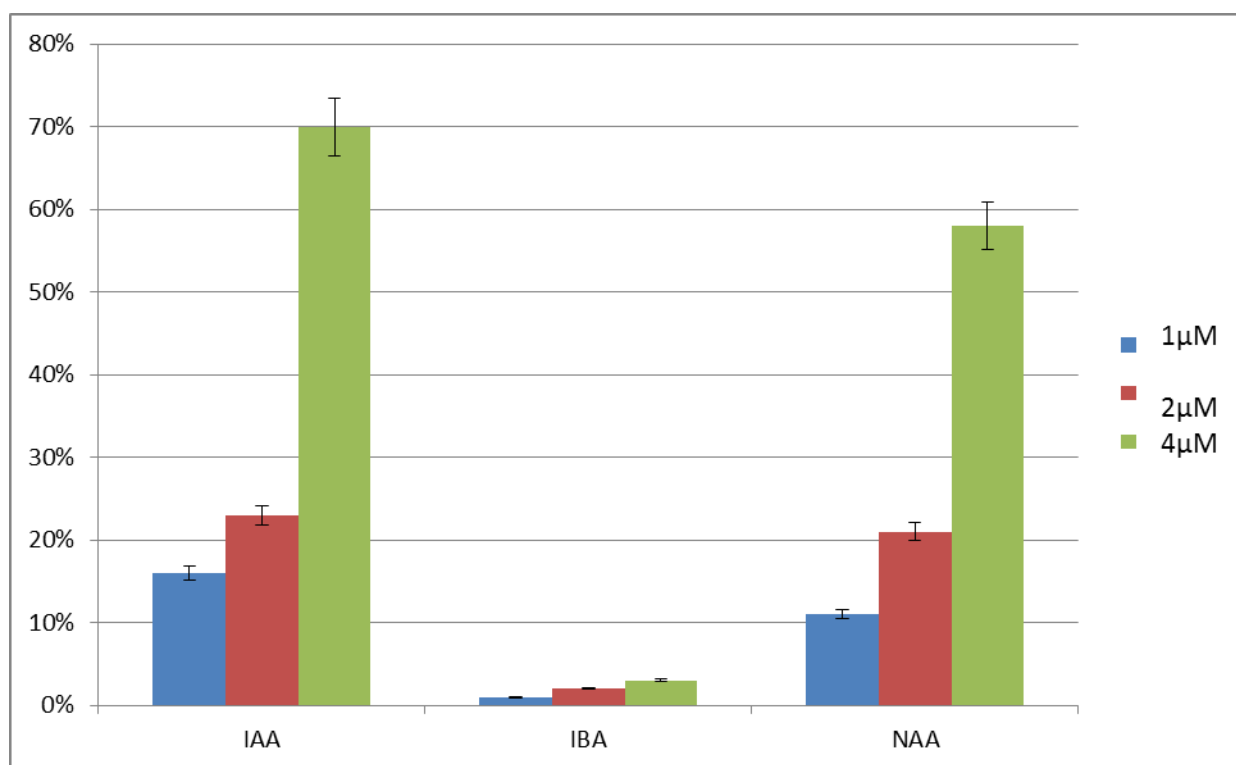


Figura 27. Grafico a barre relativo alla percentuale delle piante rigenerate dai PLBs di *Dendrobium* in funzione degli ormoni utilizzati e della loro concentrazione. Nel grafico sono mostrate per ogni trattamento le 5 repliche prese in considerazione a 4 mesi dall'inizio del trattamento; le barre indicano l'errore standard.

L'analisi della varianza (ANOVA) ha mostrato come le differenze riscontrate siano statisticamente significative e l'effetto dovuto sia alla concentrazione che al tipo di ormone utilizzato; in questo caso il trattamento migliore è stato quello con 4 μ M IAA che ha prodotto

plantule nel 70% di PLBs, anche se anche il trattamento 4 μ M NAA è risultato statisticamente comparabile con il primo (Duncan MRTs $p \leq 0.05$; Tab. 13).

μ M	IAA	IBA	NAA
1	16% bc	1% c	11% bc
2	23% b	2% c	21% b
4	70% a	3% c	58% a

Tabella 13. Valori medi percentuali della rigenerazione a plantula dei PLBs a seconda delle varie aggiunte ormonali. Le lettere indicano i raggruppamenti secondo Duncan MRTs, $p \leq 0.05$.

Non hanno portato a risultati soddisfacenti invece le concentrazioni 1-2 μ M per nessuno degli ormoni testati e per quanto riguarda l'IBA nessuna concentrazione è stata efficace nella produzione di piante da PLBs (Fig. 27).

Le plantule trattate con 4 μ M IAA o NAA in 4 mesi hanno raggiunto un'altezza di circa 4-5cm a differenza dei PLBs piastrati su MSO, che invece hanno mostrato solo eccezionalmente lo sviluppo di qualche plantula, ma mai superiore ad 1cm di altezza (Fig. 28).

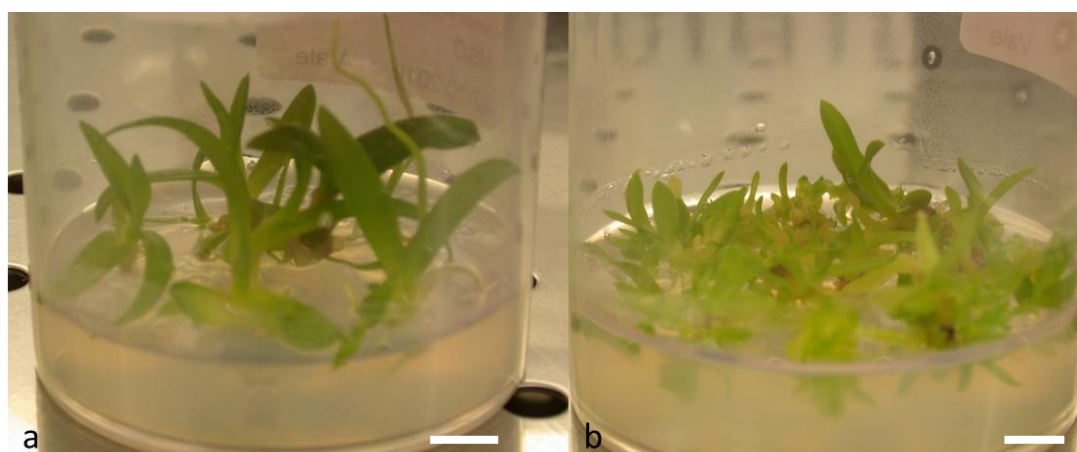


Figura 28. Giovani plantule di *Dendrobium* a confronto. In a abbiamo plantule originate su PLBs piastrati su MSO supplementato con 4 μ M IAA a 4 mesi dal trattamento, mentre in b ci sono alcune plantule originate da PLBs piastrati su MSO privo di ormoni. Barra di misurazione 1cm.

In *Phalenopsis* invece a causa dell'eccessiva produzione di polifenoli nel terreno (Fig. 29c-d) dopo una prima fase di acclimatamento dei PLBs e delle giovani plantule su un MSO semplice (Fig 29a-b), le plantule sono state trasferite su un terreno ricco di carbone attivo (ORCHIMAX, Fig. 29e). In quest'ultimo caso non è stato più possibile valutare la produzione di polifenoli perchè il carbone attivo maschera la presenza dei fenoli a causa del suo colore

nero, ma il veloce tasso di accrescimento delle plantule ha confermato che il carbone attivo presente nel terreno ha comunque favorito il loro sviluppo.

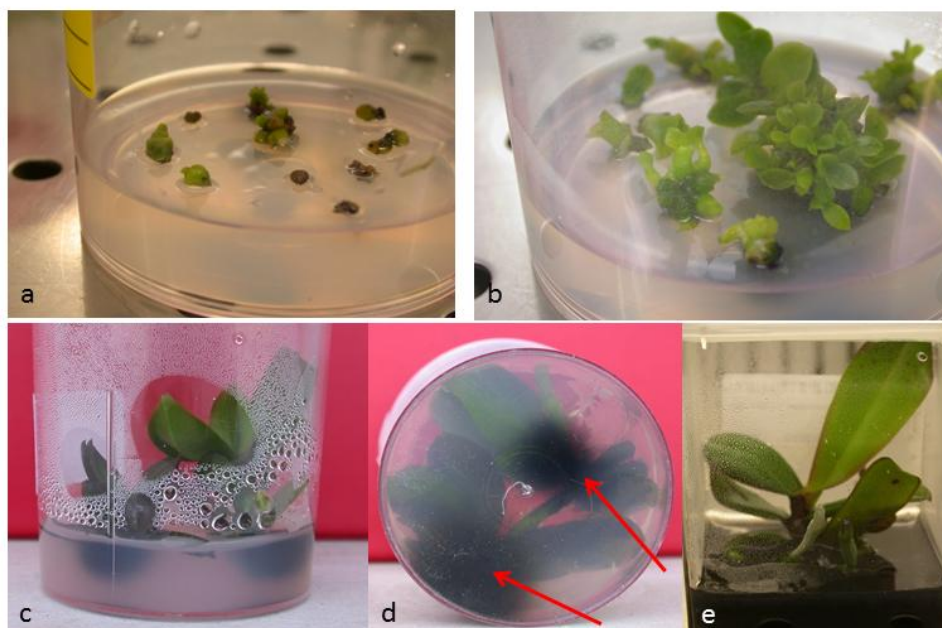


Figura 29. Diversi stadi su diversi terreni di espianti di *Phalaenopsis*. In a) e b) il terreno è un MS 1/2, in a) abbiamo i PLBs e in b) delle plantule originate da PLBs; in c) e d) le plantule mostrano la produzione di polifenoli (freccie rosse); in e) una pianta di *Phalaenopsis* sottocolturata su ORCHIMAX, il terreno appare nero a causa del carbone attivo.

3.2 Induzione di protocormi

Giovani foglie di *Phalaenopsis* sono state tagliate e sottocolturate su terreno solido in maniera tale da indurre la formazione di protocormi (Fig. 30). Gli espianti sono stati sottocolturati a 3 diverse concentrazioni di TDZ (0.1-1-3mg/L), sia in condizioni di luce che in condizioni di buio. Dopo 20 giorni di coltura, le cellule embriogenetiche (molte delle quali con un diametro di 20-30µM) si sono originate dalle cellule dello strato epidermico. Dopo circa altri 20 giorni sono stati ottenuti proembrioni globulari. L'esposizione delle colture alla luce ha indotto l'ossidazione dei fenoli e il blocco dello sviluppo delle colture. La superficie di taglio si è dimostrata l'unica in grado di produrre cellule con capacità embriogenetiche.

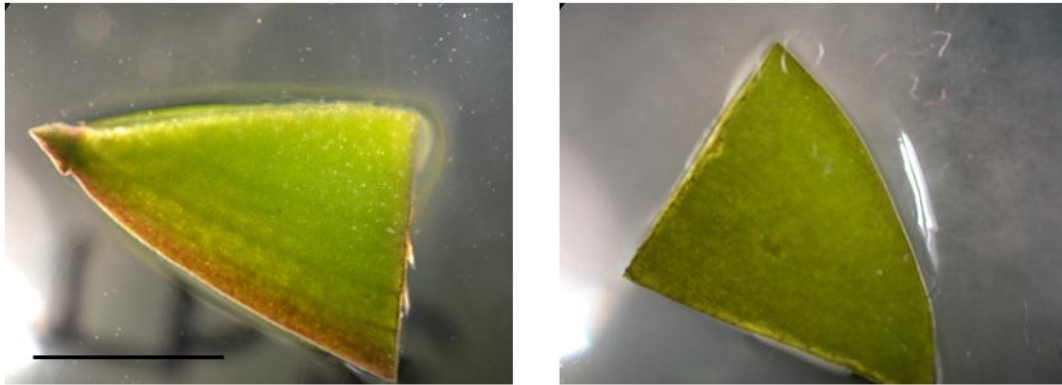


Figura 30. Sezioni fogliari di *Phalaenopsis memole* poste su substrato solido supplementato con TDZ. Barra=1cm.

Tra le concentrazioni di TDZ utilizzate (0.1-1-3mg/L), quella che si è dimostrata la migliore nell'induzione di proembrioni è stata 0.1mg/L TDZ (Fig. 31), con una media di circa 8 proembrioni su ogni superficie esposta a taglio del piccolo pezzo di foglia colturato, la concentrazione si è dimostrata statisticamente significativa; all'aumentare della concentrazione è diminuito drasticamente il numero di proembrioni che si sono formati.

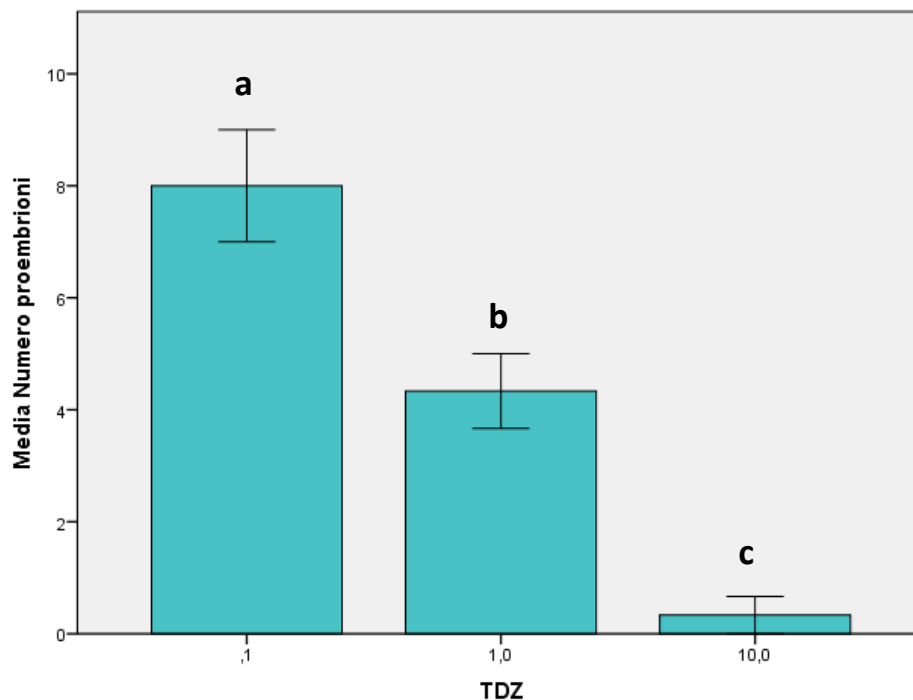


Figura 31. Effetti del trattamento sulla produzione di proembrioni da tessuto fogliare. In ascissa sono riportati i valori di concentrazione di TDZ (mg/L) utilizzati. Le barre rappresentano l'errore standard.

Sebbene il TDZ 0.1mg/L sia stato efficiente nella produzione iniziale di proembrioni, lo sviluppo ad embrioni completi ed in seguito a PLBs non è stato raggiunto, probabilmente a causa di una successiva carenza ormonale derivata dall'induzione di proembrioni in presenza di solo TDZ.

3.3 Coltura in Sospensione dei PLBs

I PLBs prima di essere utilizzati in sospensione sono stati sottocolturati singolarmente su mezzo solido e dopo due mesi la massa di PLBs, in questo caso di origine clonale, è stata utilizzata come inoculo iniziale per la sospensione.

I PLBs sono stati posti in coltura liquida testando due diverse condizioni (luce-buio), due diverse modalità (tagliati-non tagliati) e l'aggiunta di un surfattante, il Pluronic F-68, a diverse concentrazioni (0.01-0.5%).

In una prima analisi è stato utilizzato come terreno di coltura NDM su PLBs di *Dendrobium*, *Cattleya* e *Phalaenopsis*. Per quanto riguarda *Cattleya* e *Phalaenopsis* dopo un mese è stata osservata la necrosi dei tessuti, per tutte le situazioni di coltura, per cui è stato necessario in una seconda fase cambiare il terreno di coltura.

Per quanto riguarda *Dendrobium*, invece, ogni due settimane è stato valutato il peso fresco dei PLBs per verificare il trattamento migliore al fine dell'ottenimento di una sospensione di PLBs altamente proliferativa (Fig. 32).

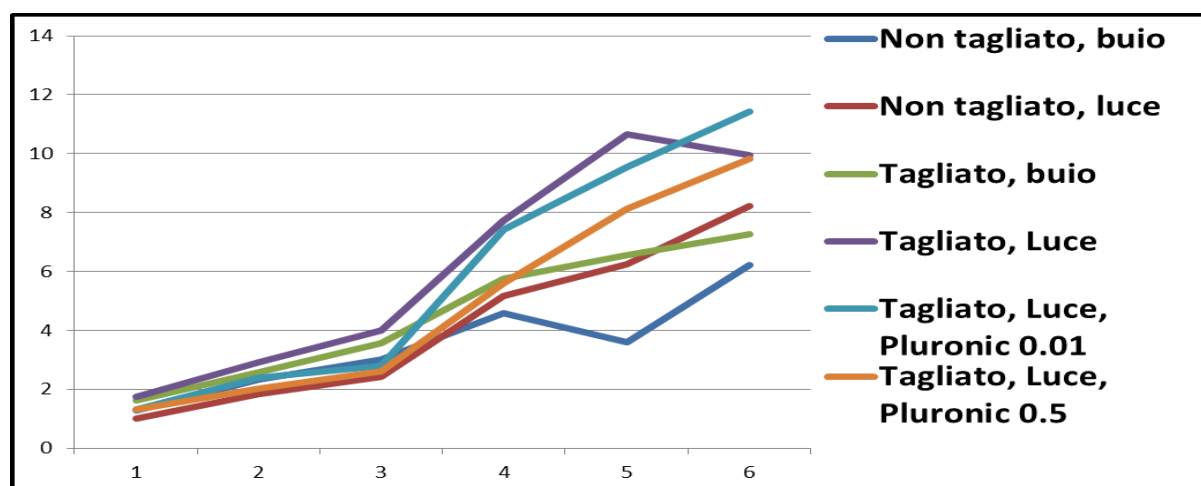


Figura 32. Curve di crescita dei PLBs posti in sospensione. In ascissa abbiamo la scala temporale, dove ogni unità di misura corrisponde a 2 settimane, in ordinata i valori del peso fresco espressi in grammi. Con i diversi colori sono rappresentati i trattamenti.

Come si può vedere dal grafico in figura 28, l'andamento si è dimostrato costante per le prime 6 settimane, per tutte le condizioni utilizzate; le differenze tra i vari trattamenti sono state messe in evidenza in termini di aumento del peso fresco degli espianti. A due mesi dal trattamento si evidenziano in maniera significativa le differenze tra i trattamenti, in particolar modo risulta statisticamente significativa la differenza nell'incremento di peso tra i PLBs tagliati e quelli non tagliati (Tab. 14-15).

Medie a due mesi	modalità	
condizione	Non tagliato	Tagliato
buio	4,1929	5,3231
luce	5,1055	7,1686

Tabella 14. Medie del peso fresco dei PLBs, espresse in grammi, a 2 mesi dalla messa in coltura liquida.

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	Sign.	C.V. (%)
Condizione	760711561	1	760711561	22,85355	0,000448	**	
Modalità	1019748422	1	1019748422	30,63562	0,000129	**	
condizione x modalità	87030241	1	87030241	2,614591	0,131853		
Residual	399436436	12	33286369,63				10,59085
Total	2266926660	15					

Tabella 15. Tabella dell'ANOVA. Sono evidenziati gli effetti statisticamente significativi sulla resa in peso fresco dei PLBs messi in sospensione a due mesi dall'inizio del trattamento.

L'analisi della varianza (Tab. 15) indica che il taglio dei tessuti del protocormo, a parità di condizione (luce-buio), influenza in maniera significativa lo sviluppo e la moltiplicazione dei nuovi PLBs, ottenendo i pesi freschi maggiori (7,16g tagliato-luce e 5,33g tagliato-buio), proprio perché molto probabilmente è proprio dalla superficie di taglio che si originano le nuove strutture. Per quanto riguarda le condizioni di incubazione degli espianti, la migliore resa totale si è avuta per gli espianti posti alla luce, che quindi risulta essere la condizione ideale e statisticamente significativa (Tab. 15); in una successiva analisi dei dati si vede come nel caso degli espianti tagliati e al buio la media del peso fresco sia maggiore di quella dei non tagliati posti alla luce (Tab. 14). Infatti non vi è, a 2 mesi dal trattamento, un'interazione statisticamente significativa tra la modalità del trattamento e la condizione (buio-luce) in cui vengono colturali gli espianti (Tab. 15).

Analizzando però il peso fresco a 3 mesi dalla messa in terreno liquido, si vede come l'interazione tra modalità e trattamento diventi statisticamente significativa (Tab. 16-17).

Medie a 3 mesi	modalità	
condizione	non tagliato	Tagliato
buio	5,5705	6,4836
luce	6,9672	9,8020

Tabella 16. Tabella delle Medie. Medie del peso fresco dei PLBs, espresse in mg, a 3 mesi dalla messa in coltura liquida.

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	Sign.	C.V. (%)
condizione	2223216801	1	2223216801	54,61527	8,38E-06	**	
modalità	1404637962	1	1404637962	34,50616	7,55E-05	**	
condizione x modalità	369254656	1	369254656	9,071065	0,010826	*	
Residual	488482439	12	40706869,88				8,854171
Total	4485591858	15					

Tabella 17. Tabella dell' ANOVA. Sono evidenziati gli effetti statisticamente significativi sulla resa in peso fresco dei PLBs messi in sospensione a tre mesi dall'inizio del trattamento.

A tre mesi il miglior trattamento in quanto a sviluppo e moltiplicazione risulta essere quello che prevede il taglio iniziale e la coltura alla luce dei PLBs in sospensione (Tab. 16) e risulta esserci un'interazione statisticamente positiva tra il taglio e la luce, effetto che a due mesi dall'inizio della coltura ancora non era evidenziabile.

Dato che il trattamento taglio-luce si è dimostrato più efficiente abbiamo provato ad aggiungere un surfattante, il Pluronic F-68, per provare ad aumentare la resa dei PLBs. In realtà, come si può vedere in Figura 28, la miglior resa si è avuta con l'aggiunta di Pluronic F-68 allo 0.01% (Tab. 18) anche se però dall'analisi della varianza non viene evidenziata nessuna differenza statisticamente significativa (Tab. 18).

Medie a 3 mesi	
Pluronic F-68	Medie pesi
0	9,8020
0,01	11,1660
0,5	9,6322

Tabella 18. Tabella delle medie del peso fresco dei PLBs tagliati e posti alla luce supplementati con Pluronic a due diverse concentrazioni.

Dato che in coltura liquida i PLBs si mostravano o singolarmente o aggregati in piccole masserelle è stata indagata se fosse evidenziabile una differenza nel tasso di crescita delle due forme, ossia se l'accrescimento dei PLBs in sospensione era a carico di una frazione piuttosto che dell'altra. Per fare questo abbiamo re-inoculato o con PLBs singoli (piccoli) o con aggregati di PLB (grandi), ed abbiamo esposto entrambi al trattamento luce-tagliato. Le analisi hanno mostrato come ci sia una differenza statisticamente significativa tra l'incremento di peso delle due frazioni (Tab. 19); la frazione più piccola cresce molto di più di quella più grande (Tab. 19), anche se, comunque, la frazione che conteneva sia PLBs piccoli che grandi ha dimostrato l'accrescimento maggiore (Tab. 19).

Means of resa		
modalità	Total	Duncun MRTs
grandi	43133,66667	c
misti	59658,66667	a
piccoli	51329,66667	b

Tabella 19. Duncan Multiple Range Test. Le medie si riferiscono al peso fresco dei PLBs dopo due mesi dall'inoculo, con le lettere sono indicate le categorie Duncun per $p \leq 0.05$.

Per quanto riguarda *Cattleya* e *Phalaenopsis*, ad un mese dalla messa in coltura liquida e per tutte le condizioni testate è stata osservata necrosi dei tessuti, il terreno di coltura è stato cambiato, utilizzando un MSO liquido. In questo caso, visti i dati ottenuti in *Dendrobium*, abbiamo utilizzato solo il trattamento tagliato-luce dimostratosi il più efficiente. Con il nuovo terreno non abbiamo rilevato necrosi dei tessuti, anche se il tasso di accrescimento è stato inferiore rispetto a *Dendrobium*.

3.4 Isolamento protoplasti

L'isolamento protoplasti è stato condotto sia su giovani foglie che su PLBs, in entrambi i casi gli espianti utilizzati sono stati prelevati da materiale al quale era stato rinnovato il terreno di coltura da circa 2 settimane. Per mettere a punto un protocollo efficace di rilascio dei protoplasti sono state provate diverse soluzioni enzimatiche e tempi diversi di incubazione, considerando come parametri di valutazione dell'efficacia del rilascio, la concentrazione dei protoplasti per ml di sospensione, e la loro vitalità.

3.4.1 Isolamento protoplasti da foglia

L'isolamento protoplasti da foglia è stato condotto su foglie di circa due centimetri provenienti da espianti di *Cattleya*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis*. Le foglie sono state sminuzzate nelle varie soluzioni enzimatiche ed incubate *overnight*, al buio a 24°C (Fig. 33a). I protoplasti così rilasciati (Fig. 33b) sono stati purificati ed è stato valutato il rilascio e la vitalità al microscopio a fluorescenza (Fig. 33c-d).

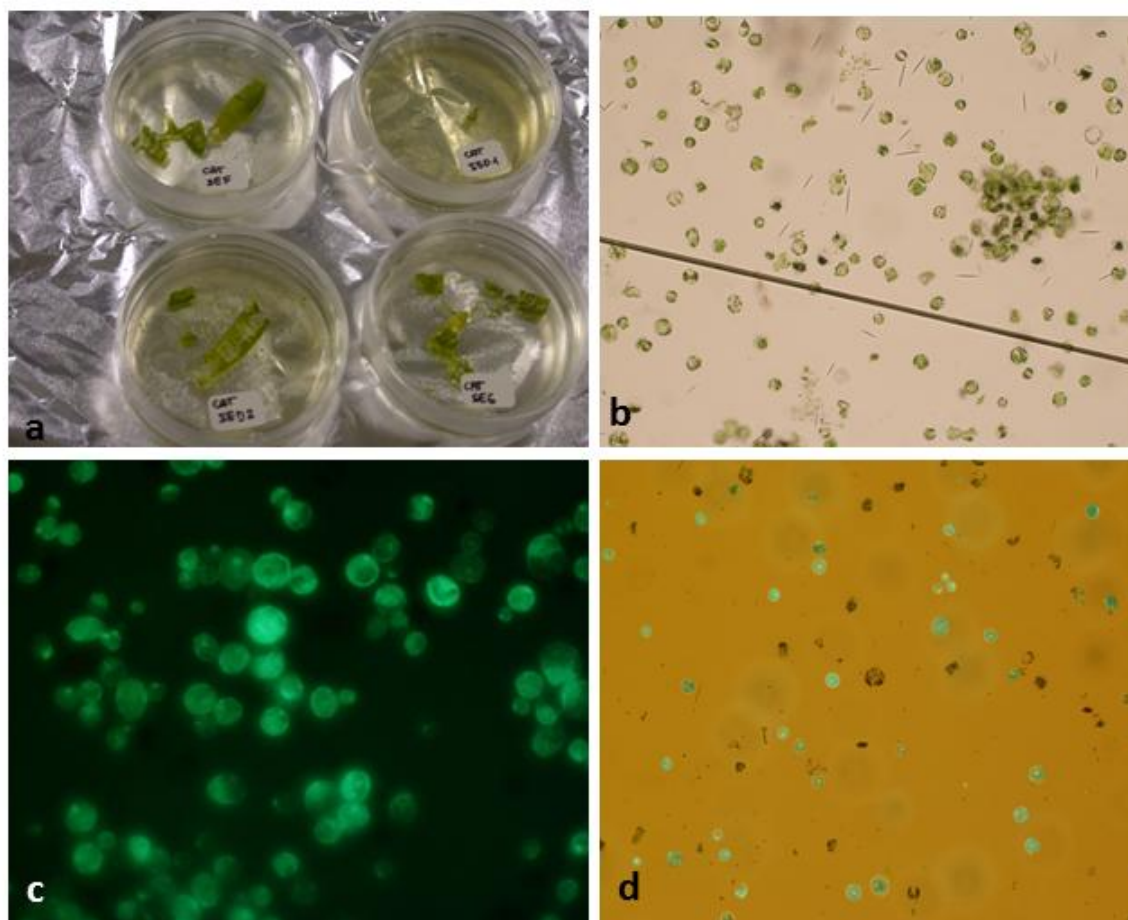


Figura 33. Immagini del processo di isolamento protoplasti. In a) possiamo vedere la digestione enzimatica delle giovani foglie dopo il processo di incubazione; b) protoplasti isolati prima della filtrazione; c) protoplasti vitali identificati con FDA; d) osservando sia in luce trasmessa che in fluorescenza si possono identificare i protoplasti vitali e quelli non fluorescenti.

Per le quattro diverse soluzioni enzimatiche testate sui diversi genotipi è stato valutato il rilascio dei protoplasti, a parità di quantità di tessuto, e la vitalità è stata verificata tramite marcatura fluorescente con FDA. Sia la concentrazione che la vitalità dei protoplasti sono

variate in relazione alla soluzione enzimatica impiegata; la soluzione enzimatica SED2 si è dimostrata la migliore con un ottimo rilascio di protoplasti (circa $2 \cdot 10^5$ proto/ml; Fig. 34) e una vitalità maggiore dell'80% (Fig. 35), mentre la soluzione SEF non ha dato rilascio di protoplasti (Fig. 34). Le differenze riscontrate tra le varie soluzioni si sono dimostrate statisticamente significative secondo l'analisi della varianza (Tab. 20-21).

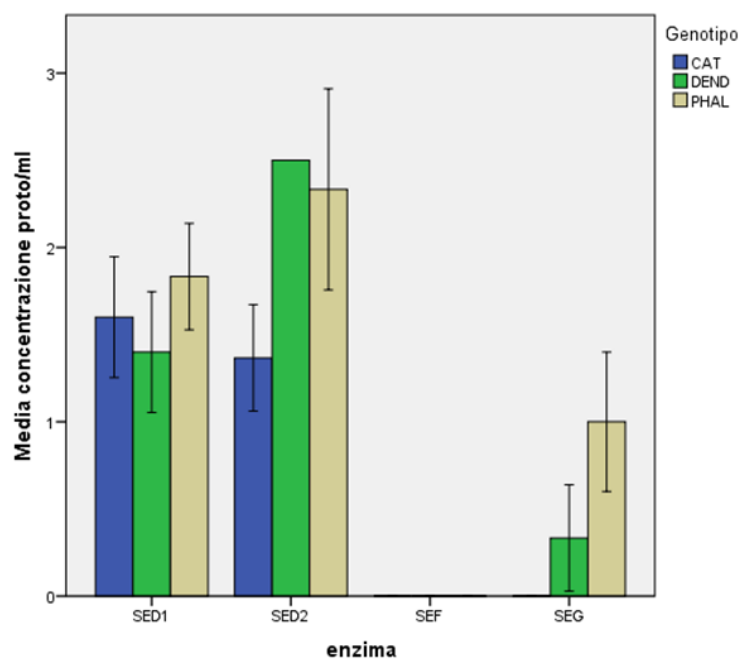


Figura 34. Istogramma delle medie della concentrazione dei protoplasti nel substrato, le barre indicano l'errore standard. Il rilascio dei protoplasti è espresso in 10^5 proto/ml; con i diversi colori sono indicati i diversi genotipi di orchidea utilizzati per l'isolamento dei protoplasti, CAT = *Cattleya*; DEND = *Dendrobium*; PHAL = *Phalaenopsis*.

Media concentrazione proto/ml	Genotipo		
Enzima **	CAT	DEND	PHAL
SED1	1,6 b	1,4 bc	1,8 b
SED2	1,3 bc	2,5 a	2,3 a
SEF	0 d	0 d	0 d
SEG	0 d	0,3 d	1 c

Tabella 20. Medie della concentrazione protoplasti/ml dopo il processo di isolamento da foglia. Sono messi a confronto le rese di rilascio per ogni genotipo a seconda della soluzione enzimatica impiegata. Le lettere indicano i raggruppamenti significativi secondo il Duncan MRTs per $p \leq 0.05$.

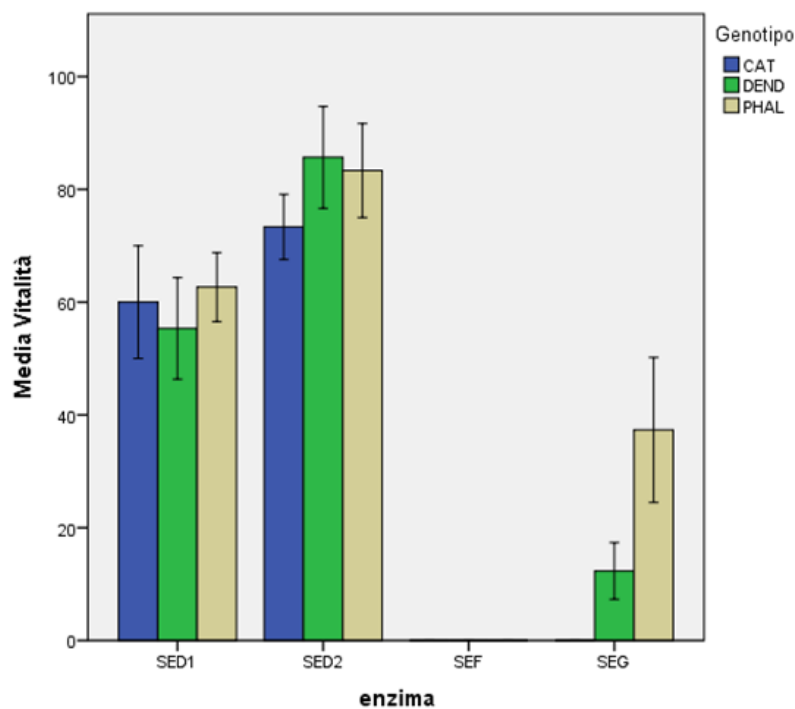


Figura 35. Istogramma delle medie della vitalità, le barre indicano l'errore standard. La vitalità per i protoplasti isolati è espressa in percentuale, con i diversi colori sono indicati i genotipi di Orchidea utilizzati per l'isolamento dei protoplasti, CAT = *Cattleya*; DEND = *Dendrobium*; PHAL = *Phalaenopsis*.

Media Vitalità	Genotipo		
Enzima **	CAT	DEND	PHAL
SED1	0,6 c	0,55 c	0,62 bc
SED2	0,73 ab	0,85 a	0,83 a
SEF	0 e	0 e	0 e
SEG	0 e	0,12 e	0,37 d

Tabella 21. Medie della vitalità dei protoplasti dopo il processo di isolamento da foglia. Sono messi a confronto i valori percentuali di vitalità dei protoplasti per ogni genotipo e per soluzione enzimatica usata. Le lettere indicano i raggruppamenti significativi secondo il Duncan MRTs per $p \leq 0.05$.

3.4.2 Isolamento protoplasti da PLBs.

Per quanto riguarda l'isolamento protoplasti da PLBs anche in questo caso sono state utilizzate le 4 soluzioni enzimatiche su genotipi di *Cattleya*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis*. La condizione di incubazione *overnight* a 24°C non ha conseguito nessun risultato, per tutti i genotipi e per tutte le soluzioni enzimatiche provate: i protoplasti risultavano completamente

danneggiati. Per questo motivo sono stati ridotti drasticamente i tempi di incubazione ed aumentate le temperature. Sono state effettuate prove a 2, 3, 4 e 6 ore di incubazione a 28°C (Fig. 36a-d).

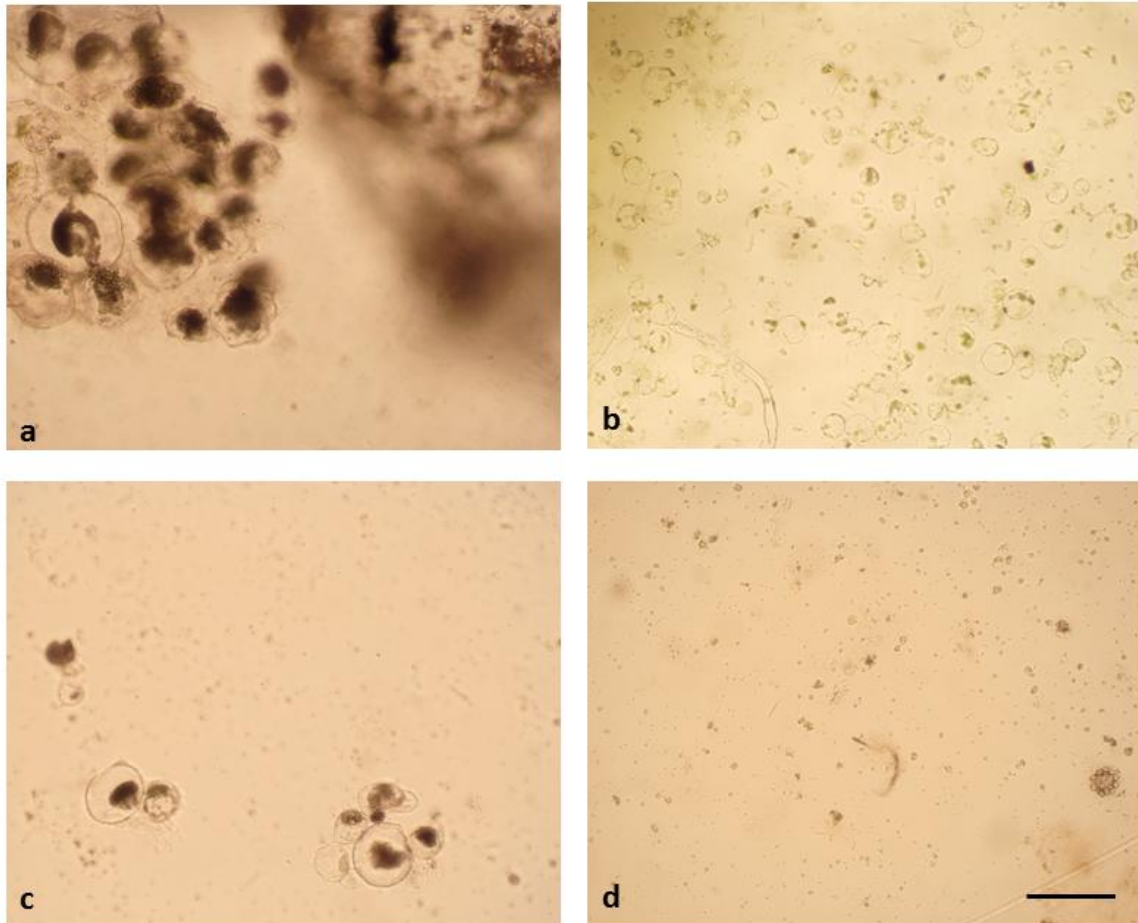


Figura 36. Protoplasti da PLBs. È mostrato il rilascio dei protoplasti da PLBs in *Dendrobium* con la soluzione enzimatica SED2. In a) isolamento a 2 ore; in b) isolamento a 3 ore; in c) isolamento a 4 ore; in d) isolamento a 6 ore. Tutte le immagini sono state acquisite ad ingrandimento 20X, Barra=20µm.

Essendo quello dei PLBs un tessuto non omogeneo, i protoplasti rilasciati si sono rivelati di dimensioni molto diverse tra loro e con rese variabili rispetto a quelli da foglia. Per quanto riguarda *Cattleya* nessuna delle soluzioni enzimatiche per nessuno dei periodi di incubazione provati ha portato ad un rilascio di protoplasti vitali. Per quanto riguarda *Dendrobium* e *Phalaenopsis* i trattamenti con SEG e SEF non hanno portato a rilascio di protoplasti vitali per nessuno dei periodi di incubazione, mentre il rilascio c'è stato per le soluzioni SED1 e SED2 (Fig. 37a-b). A due ore dall'inizio del trattamento non si è apprezzato nessun rilascio

significativo, ma i protoplasti erano in fase di formazione e visibili all'osservazione al microscopio. A 3 ore dal trattamento abbiamo avuto il rilascio maggiore, soprattutto con la soluzione enzimatica SED2 e per entrambi i genotipi; a 4 ore dal trattamento il rilascio è andato diminuendo perchè molti protoplasti sono stati danneggiati, a 6 ore dal trattamento quasi tutti i protoplasti sono andati incontro a morte e deterioramento (Fig. 37a-b).

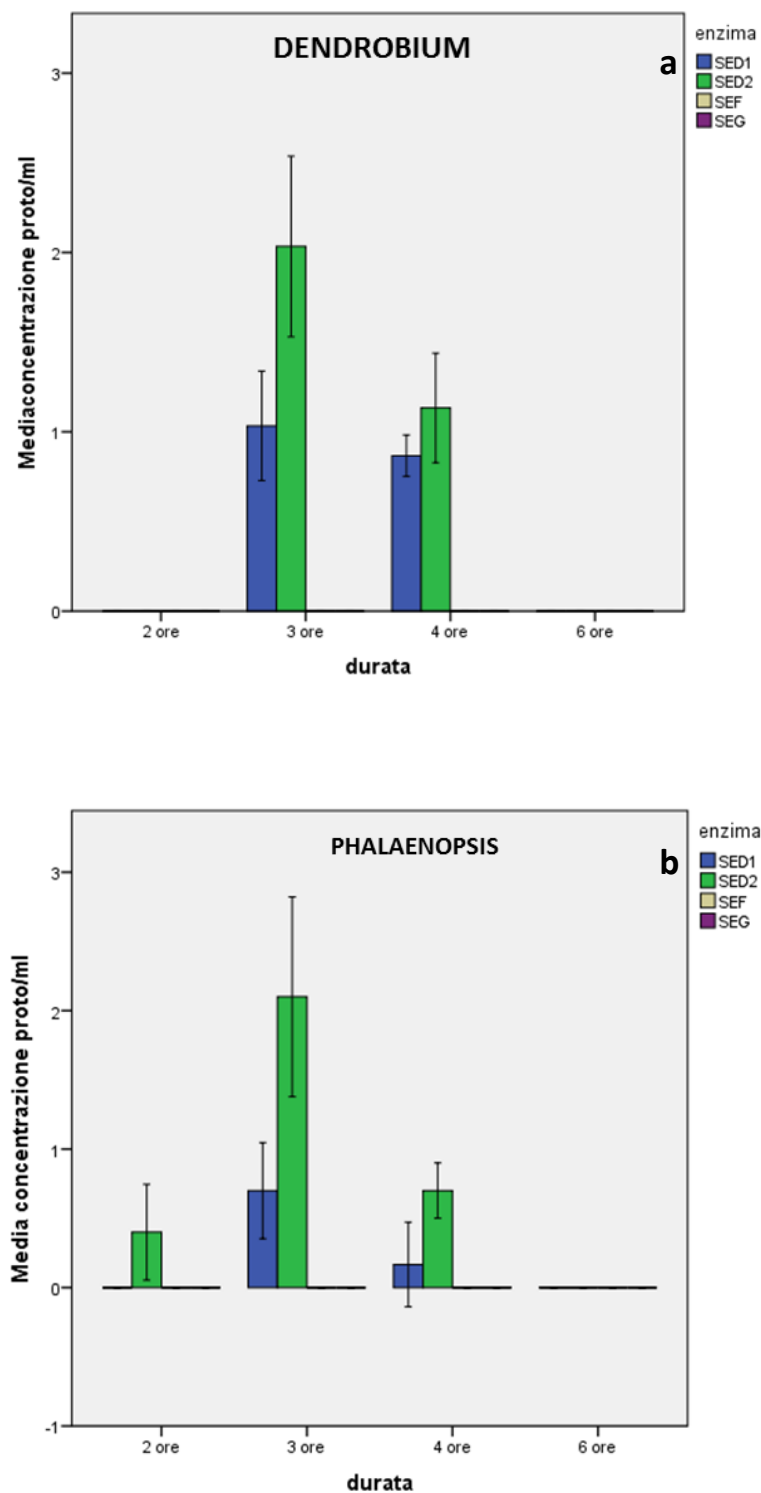


Figura 37. Istogramma della concentrazione media dei protoplasti/ml in base alla durata del trattamento e della soluzione enzimatica utilizzata; le barre indicano la deviazione standard. In a) abbiamo la variazione della concentrazione dei protoplasti per quanto riguarda *Dendrobium* ed in b) quella per *Phalaenopsis*. In entrambi i casi il rilascio migliore è stato ottenuto per 3 ore di trattamento con la soluzione enzimatica SED2.

Le differenze sono state statisticamente significative e la soluzione SED2 per tre ore è stata quella che ha consentito un maggior rilascio sia in Dendrobium che in Phalaenopsis (Tab. 22).

	DENDROBIUM				PHALAEOPSIS			
	durata							
enzima	2 ore	3 ore	4 ore	6 ore	2 ore	3 ore	4 ore	6 ore
SED1	0 d	0,7 b	0,16 d	0 d	0 d	1,0 b	0,86 c	0 d
SED2	0,4 c	2,1 a	0,7 b	0 d	0 d	2,0 a	1,13 b	0 d
SEF	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
SEG	0 d	0 d	0d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d

Tabella 22. Medie del rilascio protoplasti da PLBs a seconda del diverso genotipo, soluzione enzimatica utilizzata e durata del trattamento. I valori sono espressi in 10^5 protoplasti/ml. Le lettere indicano i raggruppamenti significativi secondo il Duncan MRTs per $p \leq 0.05$.

In questo caso la vitalità dei protoplasti è stata nettamente maggiore rispetto ai protoplasti estratti da foglia, per i protoplasti estratti da PLBs la vitalità si è attestata intorno al 90% per tutti i rilasci positivi (Fig. 38).

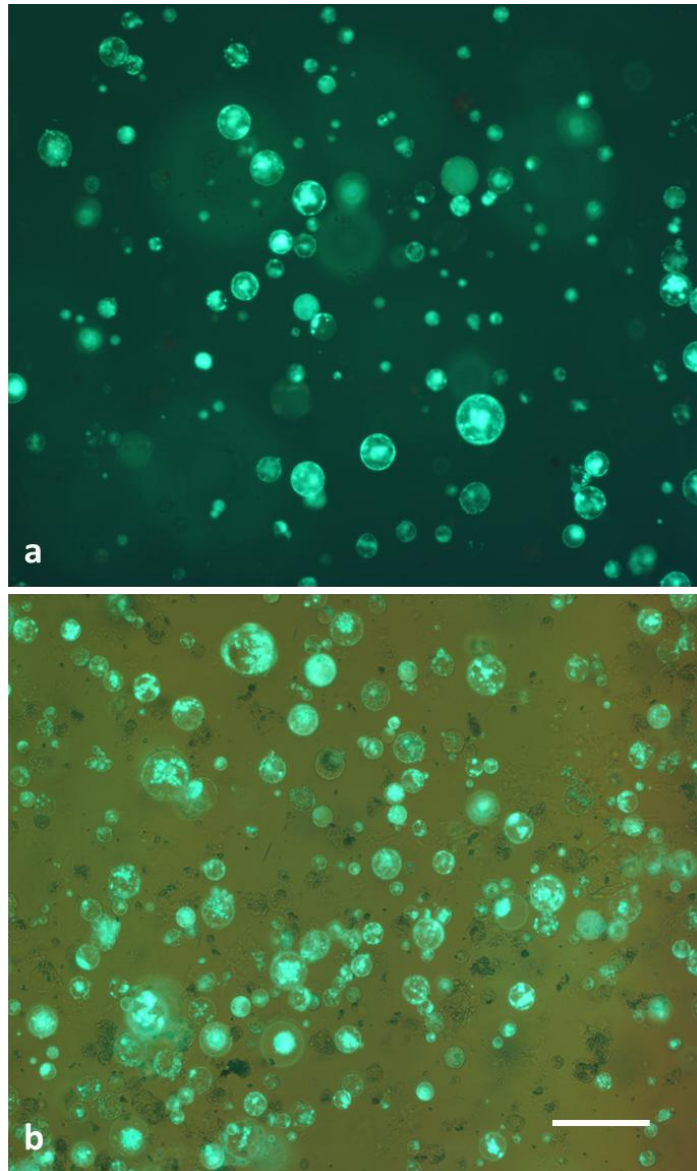


Figura 38. Vitalità protoplasti *Phalaenopsis* isolati da PLBs. In a) protoplasti vitali marcati con FDA, in b) tramite osservazione al microscopio in epifluorescenza e luce trasmessa, si possono distinguere i protoplasti vitali (fluorescenza verde) (marcati) da quelli non vitali. Barra = 50µM

3.5 Fusione protoplasti

La fusione dei protoplasti è stata condotta sia per via chimica, tramite PEG, che per via elettrica, o elettrofusione. Per le fusioni sono stati utilizzati due genotipi di *Dendrobium*, *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* e *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium virgineum*, e uno di *Phalaenopsis* (*Phalaenopsis memole*). I protoplasti sono stati isolati sia da PLBs che da foglia.

Le combinazioni provate sono state:

- *Dendrobium phalaenopsis* x *D. loddigesii* x *Dendrobium phalaenopsis* x *D. virgineum*
- *Dendrobium phalaenopsis* x *D. loddigesii* x *Phalaenopsis memole*
- *Dendrobium phalaenopsis* x *D. virgineum* x *Phalaenopsis memole*

3.5.1 Fusione chimica

Una volta stimata la concentrazione dei protoplasti provenienti dai diversi espianti questi sono stati miscelati insieme in maniera tale da ottenere una sospensione che contenesse in egual misura i protoplasti di entrambi i genotipi, per cercare di facilitare in questa maniera le eterofusioni rispetto alle omofusioni.

Le fusioni sono state condotte con tre tipi di PEG, a diverso peso molecolare (4000, 6000 e 8000), seguendo la procedura descritta da Tusa *et al.* 1992. Il processo di fusione è stato controllato in ogni sua fase al microscopio, per riuscire a determinare il tempo d'azione addensante del PEG (Fig. 39a). Abbiamo potuto constatare come con il PEG 6000 e 8000 i protoplasti venissero danneggiati gravemente, mentre i danni minori venivano mostrati con il trattamento con il PEG 4000 (Fig. 39b).

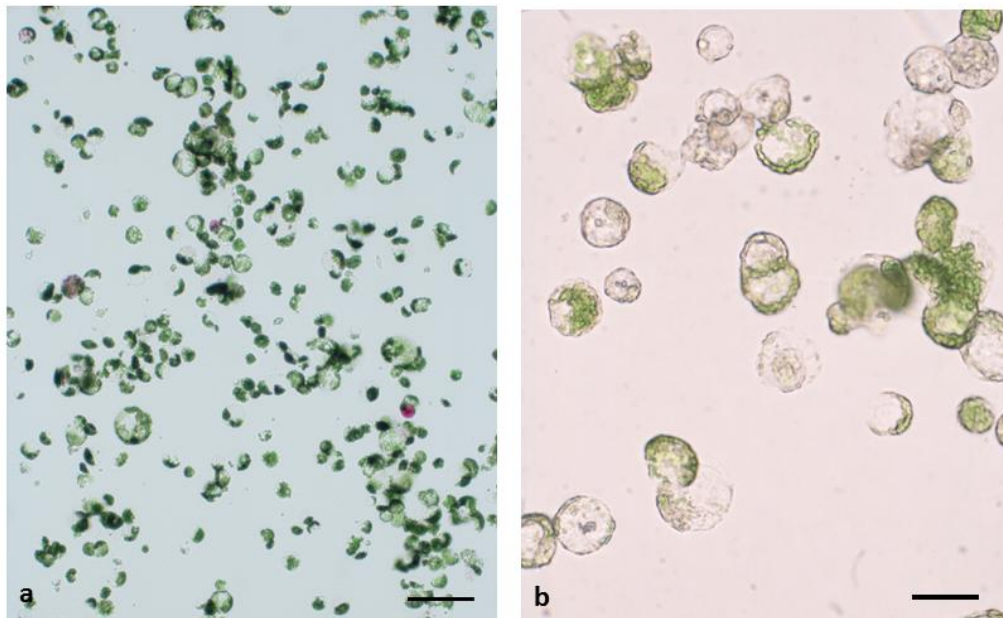


Figura 39. Fusioni tramite PEG. In a) una foto d'insieme dell'addensamento dei protoplasti operato dal PEG (10x); barra=50µm. In b) protoplasti dopo il processo di fusione (20x); Barra=20µm.

La maggiore efficacia è stata riscontrata per le fusioni effettuate con il PEG 4000, con un'efficienza di eterofusione del 9%. La percentuale degli ibridi è stata calcolata sulla base sia della loro morfologia, che in seguito a colorazione delle linee parentali con due fluorocromi a diversa emissione (FITC: verde; TRICT: rosso). La percentuale di ibridi somatici a doppia emissione fluorescente è stata valutata al microscopio come:

$$\% \text{ibridi} = (\text{N}^\circ \text{ ibridi totali} / \text{N}^\circ \text{ di protoplasti}) \times 100$$

Il problema principale, nel caso della fusione tramite PEG, è stata la creazione di prodotti di fusione tra più di due elementi cellulari, cosa che ha reso difficile individuare distintamente le fusioni binarie.

I protoplasti andati incontro a processo di fusione hanno seguito due vie: sono stati colturiati direttamente dopo fusione senza ulteriori trattamenti o sono stati analizzati al citometro a flusso, attraverso il quale abbiamo ottenuto la separazione degli ibridi.

3.5.2 Elettrofusione

I protoplasti per l'elettrofusione devono essere risospesi in un terreno iso-osmotico privo di sali, in maniera da facilitare la formazione dei dipoli elettrici e la conduzione della corrente di campo tramite i protoplasti stessi.

Sono state sperimentate diverse condizioni e valori dei parametri elettrici che controllano la fusione. I parametri principali analizzati per consentire un'elettrofusione efficace sono stati: l'intensità del campo elettrico in corrente alternata (AC), per permettere l'allineamento dei protoplasti; la sua frequenza (MHz) e l'intensità dell'impulso necessario per la fusione dei protoplasti in corrente continua (DC).

Circa il 70% dei protoplasti si sono allineati in catene di 2-7 cellule con l'applicazione di una corrente alternata di 150-Vcm per 30sec (Fig. 40a): una intensità di corrente maggiore e/o tempi più lunghi di applicazione hanno portato all'allungamento delle catene di protoplasti. Questa evenienza risulta negativa per la produzione di prodotti di fusione binari, poiché al momento dell'induzione dei micropori tramite impulso di corrente continua, sono favorite le fusioni multiple a causa dell'appressamento di più protoplasti nelle catene (Fig. 40b). L'intero processo dell'elettrofusione è stato sviluppato e verificato tramite una camera aperta per l'osservazione al microscopio, con la quale sono state effettuate le immagini a corredo del lavoro.

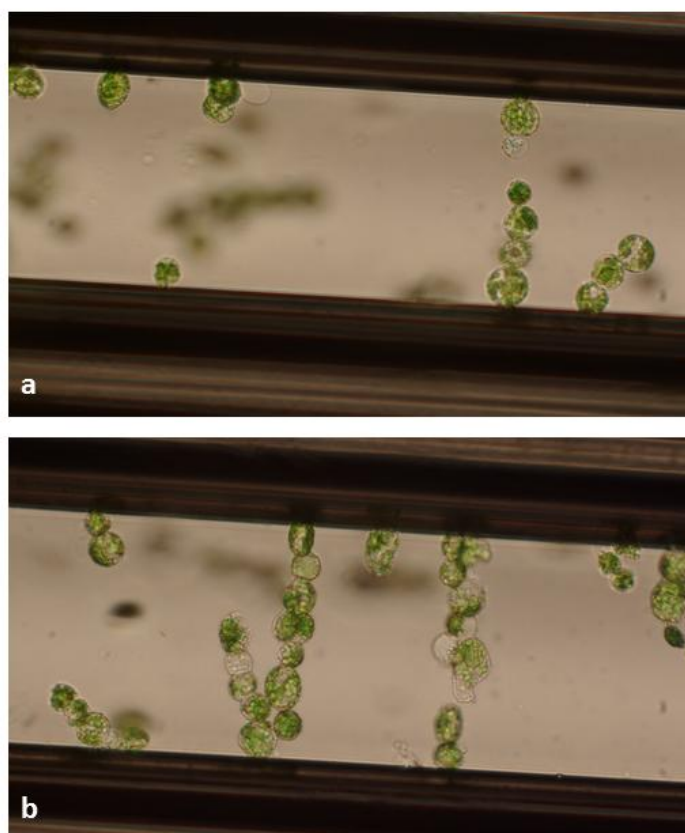


Figura 40. Formazione delle “pearl chain” nella camera a vetrino durante l’impulso in corrente alternata. In a) abbiamo la formazione di alcune catene con l’applicazione di una corrente alternata di 150 V/cm; in b) aumentando l’intensità della corrente alternata i protoplasti formano delle catene molto lunghe che portano alla formazione di prodotti di fusione multipli.

L’intensità dell’impulso di corrente continua (DC) è stato determinato sperimentalmente: con DC inferiore 0.5 kV/cm si sono cominciate ad osservare le prime fusioni fino ad un massimo del 20% per l’intensità DC 1.5 kV/cm.

Questi parametri sono stati quelli utilizzati per la fusione nella camera a siringa chiusa. La massima efficienza è stata ottenuta con sospensioni di protoplasti con una densità di $2,5 \times 10^5$ protoplasti/ml ed un campo elettrico in corrente alternata di 150 V/cm applicato per 30sec, seguito da 3 impulsi in corrente continua DC di 1.5 kV/cm (1MHz) della durata di 30 μ s ed applicati a distanza di 0.1 secondi l’uno dall’altro. In queste condizioni è stata ottenuta una frequenza massima di fusione del 22%, di cui circa il 50% erano fusioni realizzate tra due protoplasti. I prodotti di fusione sono stati analizzati in microscopia a fluorescenza, marcando

inizialmente con DAPI per individuare i protoplasti con doppio nucleo a dimostrazione di una fusione binaria (Fig. 41).

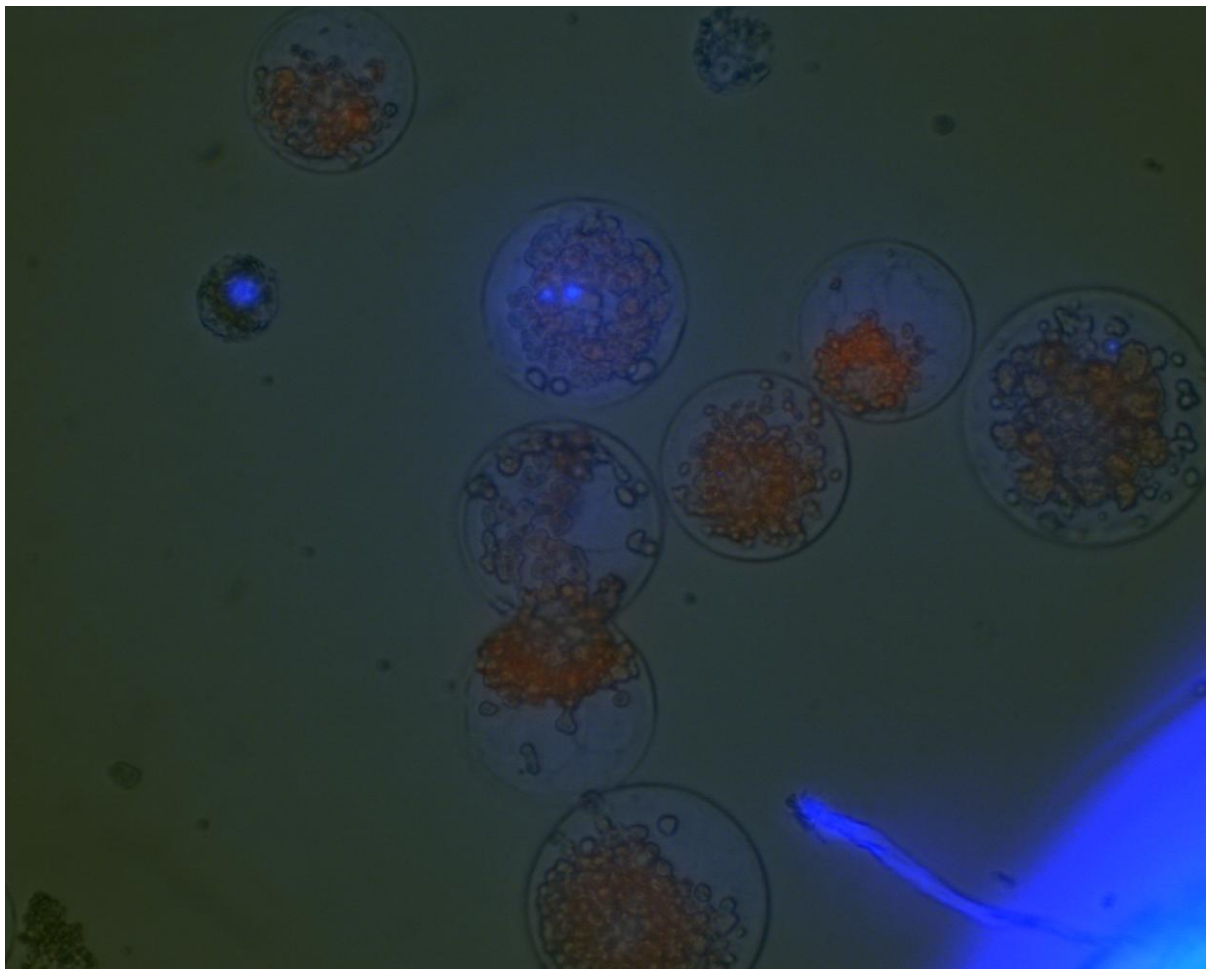


Figura 41. Protoplasti fusi. È possibile vedere due nuclei all'interno di un singolo protoplasto dopo il processo di elettrofusione.

Per l'elettrofusione, a differenza della fusione chimica, i protoplasti utilizzati provenivano per entrambi i genotipi da un solo tipo di espianto, o entrambi da PLBs o entrambi da foglia. Gli ibridi somatici sono stati sottoposti all'analisi ed alla separazione citofluorimetrica in base ai segnali di fluorescenza emessi.

3.6 Separazione citofluorimetrica degli ibridi somatici

Gli esperimenti di fusione effettuati sono stati analizzati citofluorimetricamente per isolare e separare gli ibridi da mettere in coltura. L'elettrofusione si è dimostrata la tecnica che più si adatta con l'analisi a flusso, grazie all'assenza di macro aggregati cellulari nei campioni. La fusione tramite PEG, per sua natura, non consente facilmente tali analisi, in quanto i protoplasti si presentano adesi al fondo della capsula dove è stata effettuata la fusione e solo

dopo alcuni giorni tornano, in piccola porzione, in sospensione. Inoltre i protoplasti completano il processo di fusione e riacquistano la loro forma sferica solo nel corso di alcune ore (Hahn-Hagerdal *et al.* 1986).

I prodotti di fusione sono resi riconoscibili dall'analisi al citometro a flusso dalla loro colorazione fluorescente, per cui è indispensabile utilizzare cellule o che contengono sostanze endogene autofluorescenti (esempio la clorofilla) o alle quali sono stati fatti incorporare fluorocromi.

I protoplasti ibridi sono stati perciò analizzati al citometro a flusso per l'identificazione e la separazione delle frazioni di interesse e il loro recupero in sodio alginato, attraverso un processo che prevede la separazione dei protoplasti di interesse utilizzando come parametri discriminanti la dimensione e la forma del protoplasto ("*forward scatter*") e l'intensità dei segnali di fluorescenza emessa (Fig. 42), legata alla contemporanea presenza dei fluorocromi specifici utilizzati. Una volta individuati i parametri ottimali sono stati isolati i protoplasti di dimensioni maggiori, che quindi molto probabilmente erano andati incontro a processo di fusione, e con l'intensità di fluorescenza maggiore (Fig. 42c).

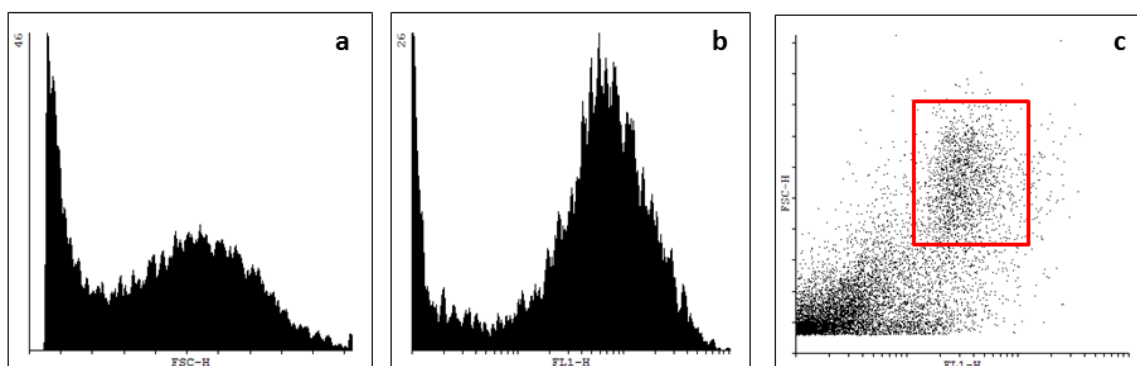


Figura 42. Analisi citometrica dei protoplasti andati incontro a processo di fusione. A) Istogramma del *forward scatter*, che mostra le informazioni sulle dimensioni dei protoplasti; b) istogramma che mostra l'intensità di fluorescenza dei protoplasti dovuta alla colorazione vitale con FDA; c) *dot plot*, mostra la relazione tra i segnali di *forward scatter* e di fluorescenza; il quadrato rosso indica la finestra di *sorting* con i potenziali ibridi somatici.

I protoplasti sono stati analizzati al citometro a flusso in un terreno privo di calcio e con uno *sheat fluid* contenente alginato di sodio. Poiché l'alginato polimerizza immediatamente in presenza di ioni Ca^{++} , quando la goccia contenente l'ibrido avvolto da una "camicia" di

alginato tocca il terreno di coltura si gelifica immediatamente formando una perla di terreno solido, che isola l'ibrido putativo dalle altre cellule in coltura (Fig. 43).

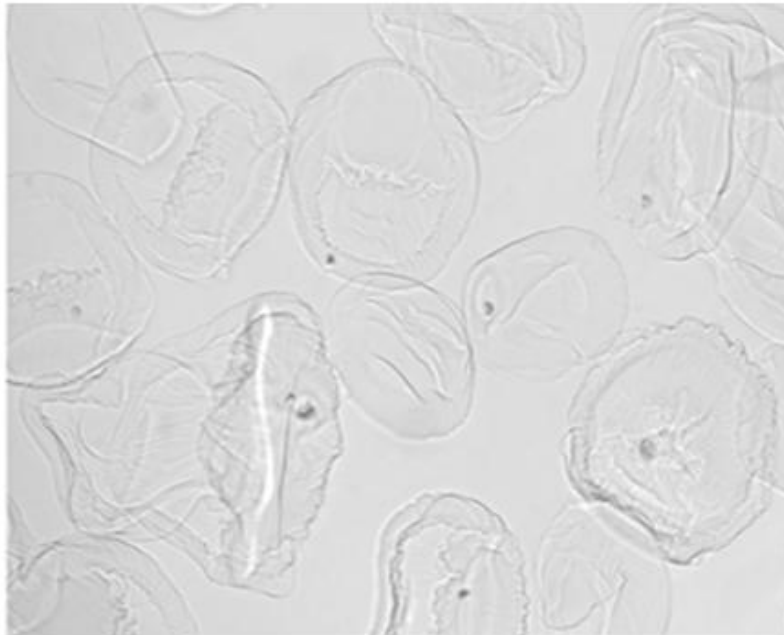


Figura 43. Perle di alginato di sodio. In ogni microcapsula è presente un singolo protoplasto andato incontro a processo di fusione e selezionato tramite *flow sorting*.

Questa tecnica permette un rapido *screening*, consentendo di porre in coltura con alta precisione solo i protoplasti realmente fusi, riducendo drasticamente i tempi dell'intero processo. Inoltre ogni singolo microcallo potrà essere facilmente isolato e manipolato per i trasferimenti necessari nel proseguo delle manipolazioni, e il materiale deriverà sicuramente da un'unica cellula.

3.7 Coltura dei protoplasti

Per la coltura dei protoplasti sono stati provati: i) vari tipi di terreni (BH₃, K3, EME, 1/2NDM); ii) diversi ormoni (2,4-D, NAA) a varie concentrazioni e in diversa combinazione tra loro; iii) surfattanti quali il Pluronic F-68; condizioni di coltura come la sospensione liquida o l'incapsulamento in capsule di alginato di sodio (Tab. 23).

2,4-D	Pluronic	Alginatodisodio	NAA			
0	0	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,01	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
0,1	0	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,01	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
1	0	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,01	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
10	0	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,01	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	0,1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10
	1	0,1	0	0,1	1	10
			0	0,1	1	10

Tabella 23. Matrice combinatoria dei terreni per protoplasti provati.

Le situazioni testate sono state circa 130 per ogni terreno, e per ognuna sono state fatte 3 repliche. Sono stati utilizzati sia protoplasti provenienti dall'isolamento fogliare che da PLBs, oltre che quelli andati incontro a processo di fusione.

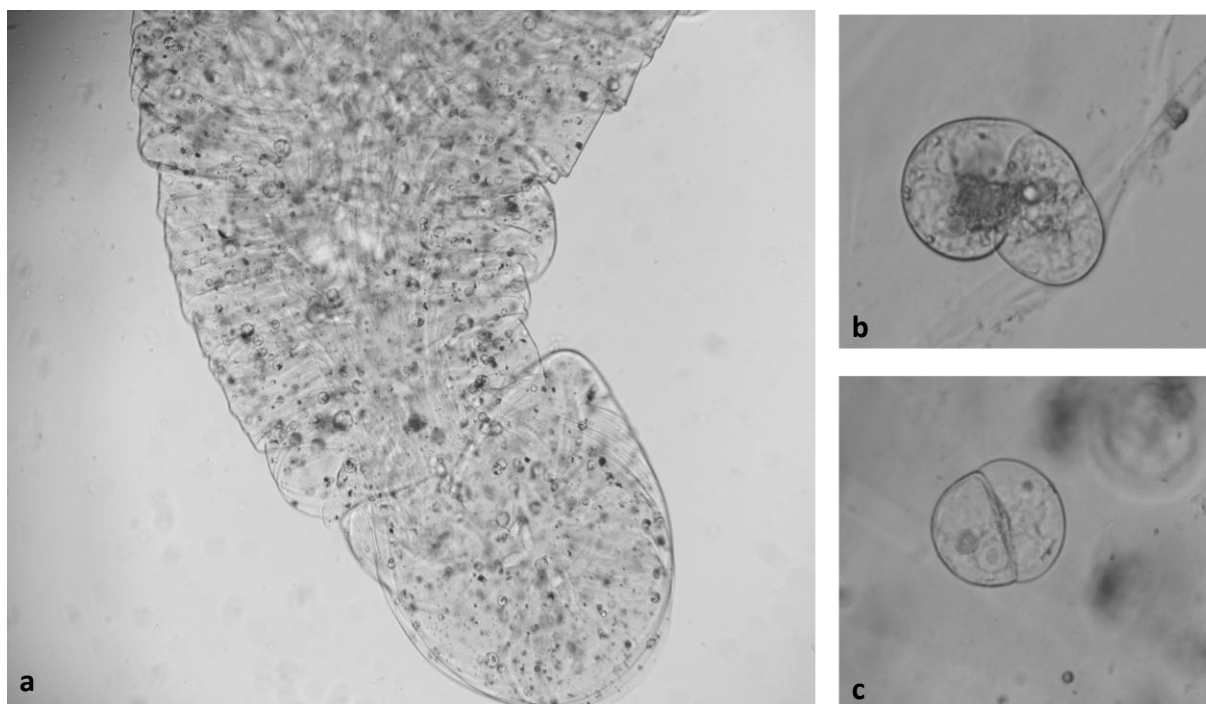


Figura 44. Protoplasti in divisione in *beads* di sodio alginato a due settimane dal processo di isolamento, purificazione e messa in coltura. a) *Beads* di alginato di sodio contenente protoplasti di *Phalaenopsis* (ingrandimento 10x); b) e c) protoplasti in divisione è possibile vedere il setto di separazione che sta portando alla divisione del protoplasto (ingrandimento 40x).

I protoplasti di orchidea si sono dimostrati particolarmente restii nell'induzione e proliferazione di microcalli. Di tutte le combinazioni provate poche sono state quelle che hanno portato a delle divisioni cellulari, e comunque tutte le poche positive derivate da protoplasti estratti da PLBs. Infatti i protoplasti estratti da foglia non hanno mostrato in nessun caso segni di divisione cellulare per nessuna delle diverse combinazioni utilizzate, confermando l'importanza del materiale di partenza per l'induzione e la proliferazione cellulare. Abbiamo analizzato ogni due settimane i nostri protoplasti, valutando lo stato delle divisioni e proliferazioni dall'inizio del processo di isolamento, purificazione e messa in coltura. Durante questo periodo, il terreno di coltura è stato cambiato, diminuendone progressivamente la pressione osmotica, come riportato per la rigenerazione in altre specie (Davey *et al.* 2005a). Le prime divisioni sono state rilevate dopo due settimane (Fig. 44) e hanno continuato fino a 4 settimane dall'inizio del processo, aumentando in numero, per poi degenerare dopo un mese con i protoplasti che hanno cominciato a perdere progressivamente

la loro vitalità fino al 50% in meno a 8 settimane dall'isolamento. I risultati migliori sono stati ottenuti con il terreno $\frac{1}{2}$ NDM, ed in alcune combinazioni con il terreno K; la differenza principale tra i due terreni risiede nello zucchero usato come osmotico: nel primo viene utilizzato il sorbitolo, mentre nel secondo il saccarosio. Poiché il saccarosio viene prontamente utilizzato dal metabolismo cellulare, è molto probabilmente questa la differenza principale che ha influenzato lo sviluppo dei protoplasti, sfavorendo il terreno K3. Inoltre tutte le combinazioni nutritive che hanno portato a divisioni cellulari sono state ritrovate nei terreni supplementati con alginato di sodio, a dimostrazione dell'importanza di un supporto solido per lo sviluppo dei protoplasti. Delle due concentrazioni provate, la migliore è stata sicuramente lo 0.5% che ha dato una media di divisioni significativamente più elevata rispetto allo 0.1% (Fig. 45a-b).

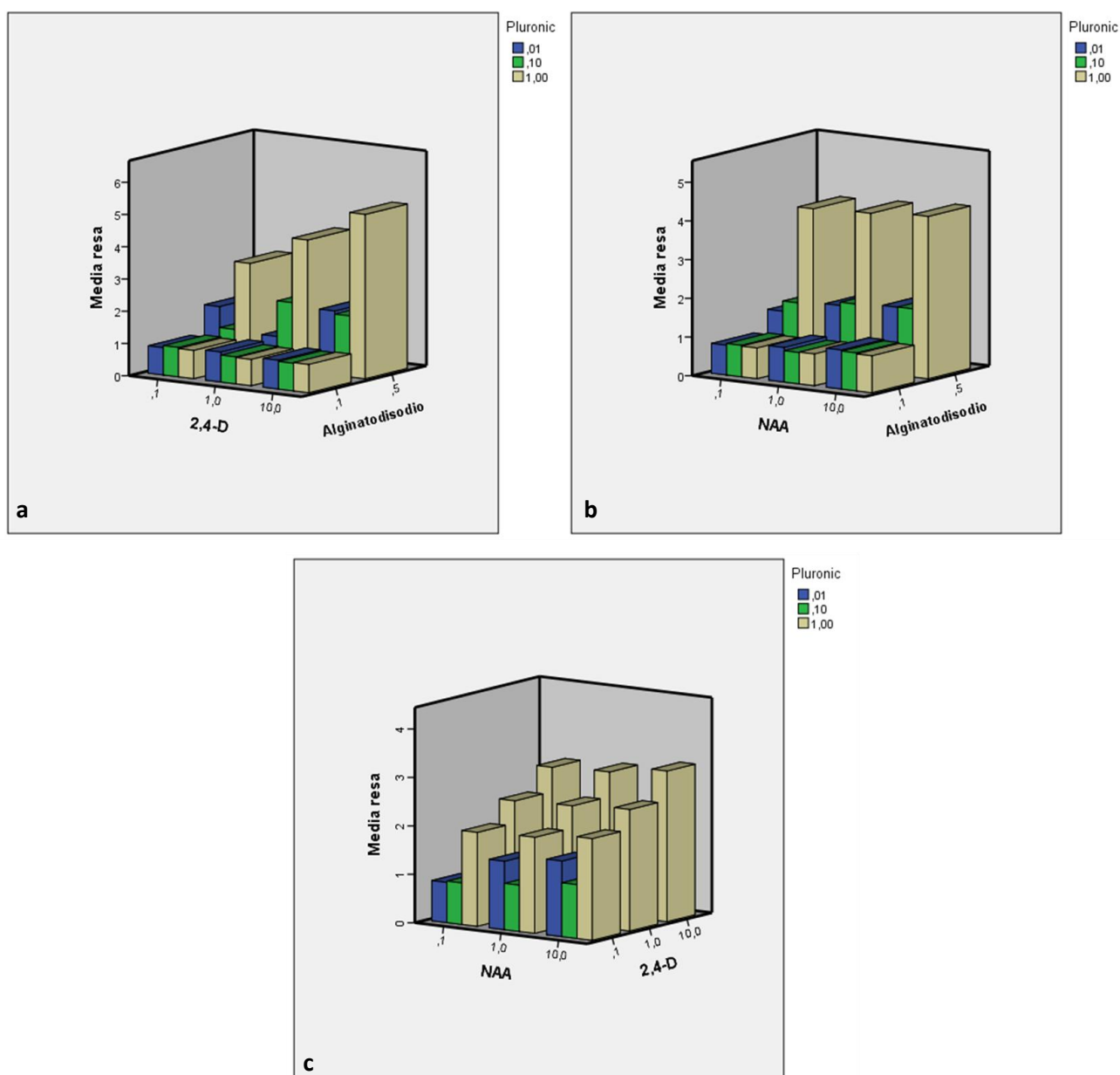


Figura 45. Istogrammi rappresentativi della medie delle divisioni osservate a seconda delle diverse combinazioni di ormoni, surfattanti e mezzi solidi supplementati al terreno di coltura NDM.

Il più alto numero di divisioni è stato ottenuto con la combinazione tra 2,4-D 10 μ M e Pluronic all'1%, in perle di sodio alginato allo 0.5%, a dimostrazione che il surfattante aumentando gli scambi gassosi all'interno del terreno favorisce il metabolismo e le divisioni cellulari (Kumar *et al.* 1992) (Fig. 45a-b-c; Tab. 24).

Medie divisioni			NAA			
2,4-D	Pluronic	Alginatodisodio	0	0,1	1	10
0	0	0,1	0	0	0	0
		0,5	2	0,56	0,61	0,61
	0,01	0,1	0	0	0	0
		0,5	1,36	2	2	3
	0,1	0,1	0	0	0	0
		0,5	1,42	2	2	3
	1	0,1	0	0	0	0
		0,5	2,52	2	3	3
0,1	0	0,1	0,25	0	0	0
		0,5	0	2	2	2
	0,01	0,1	1	0	0,21	0,25
		0,5	3	2,88	2,25	2,32
	0,1	0,1	1	0,55	0	0,25
		0,5	3	3,12	2,75	3,25
	1	0,1	2	0,85	1,15	1,25
		0,5	3	3,5	3,25	3
1	0	0,1	0	0	0	0
		0,5	0	2	2	2
	0,01	0,1	1	0,75	0	0
		0,5	3	2,7	2,66	2,1
	0,1	0,1	1	0	0,5	0
		0,5	5	4,15	3,75	3,7
	1	0,1	1	1,2	0,7	0,65
		0,5	5	4,5	4,5	3,75
10	0	0,1	0	1	1	1
		0,5	1,33	2	2	2
	0,01	0,1	2	1,5	1,5	0,52
		0,5	5	4,5	4	4
	0,1	0,1	2	1,5	1	1,75
		0,5	5	4	4,25	4,22
	1	0,1	2	1,75	1	2,15
		0,5	5	4,75	4	4

Tabella 24. Medie di divisione protoplasti a seconda dei diversi trattamenti effettuati. I valori rappresentano il numero di divisioni individuate in ogni perla di alginato e per 20 protoplasti analizzati.

L'analisi della varianza, condotta contando il numero di divisioni cellulari visualizzate all'interno di ogni microcapsula, ha messo in evidenza come in realtà tutti i componenti supplementati al normale terreno di coltura influiscano in maniera significativa nell'aumento del numero di divisioni cellulari osservate (Tab. 24-25)

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	Sign .
NAA	0,246775	2	0,123387654			
2,4-D	7,265979	2	3,632989506	70,30448348	3,67063E-20	**
NAA	1,474912	2	0,737456173	14,27102259	3,24889E-06	**
NAA x 2,4-D	0,369802	4	0,092450617	1,789075604	0,13643069	
Pluronic	55,11027	2	27,55513395	533,2383857	4,77184E-56	**
Pluronic x 2,4-D	5,949869	4	1,487467284	28,78500445	3,3895E-16	**
Pluronic x NAA	0,246891	4	0,06172284	1,194441201	0,31759314	
Pluronic x NAA x 2,4-D	0,49876	8	0,062345062	1,206482252	0,30227622	
Alginatodisodio	100,0327	1	100,0326543	1935,800828	6,45835E-70	**
Alginatodisodio x 2,4-D	7,365053	2	3,682526543	71,26310882	2,43491E-20	**
Alginatodisodio x NAA	0,122483	2	0,061241358	1,185123721	0,30972582	
Alginatodisodio x Pluronic	57,18028	2	28,59013765	553,2674556	8,04295E-57	**
Alginatodisodio x 2,4-D x NAA	0,166432	4	0,041608025	0,805185558	0,52452747	
Alginatodisodio x 2,4-D x Pluronic	7,126928	4	1,781732099	34,47952566	2,03323E-18	**
Alginatodisodio x NAA x Pluronic	0,078743	4	0,019685802	0,380953529	0,82182071	
Alginatodisodio x 2,4-D x NAA x Pluronic	0,507864	8	0,063483025	1,228503758	0,28964795	
Residual	5,477558	106	0,051675076			
Total	249,2212	161	1,547958071			
C.V. (%) : 13,7349272868716						

Tabella 25. Analisi della varianza sulla rigenerazione dei protoplasti a seconda dei diversi trattamenti. È mostrata la significatività dei fattori in maniera individuale e della loro interazione.

Ma soltanto alcune combinazioni sono statisticamente significative e possiedono perciò delle medie più elevate rispetto a trattamenti che contengono solo uno dei fattori, sono risultate statisticamente significative le combinazioni: Pluronic x 2,4-D, Alginato di sodio x 2,4-D, Alginato di sodio x Pluronic, Alginato di sodio x 2,4-D x Pluronic. Nessuna combinazione contenente NAA è risultata significativa (Tab. 25). L'analisi della varianza però nel suo complesso non ci permette di capire fino in fondo quale dei seguenti fattori influenzi in maniera determinante le divisioni cellulari, ma ci permette invece di stabilire il trattamento che dà una media di divisioni maggiori (combinazione correlata: sodio alginato 0.5%, Pluronic 1% e 2,4-D 10µM). Sicuramente il sodio alginato è il fattore che influenza in maniera inequivocabile le divisioni: senza di esso non avvengono divisioni, mentre supplementando le divisioni cellulari avvengono, ed in maniera significativa aggiungendolo allo 0.5%. Il pluronic è il secondo fattore fondamentale che ha permesso l'incremento significativo del numero di divisioni, infatti, come mostrato in tabella 24 i trattamenti che hanno presentato il massimo di divisioni cellulari sono stati solo quelli con il Pluronic alla massima concentrazione (1%). Anche l'azione del 2,4-D è risultata importante, in quanto i

terreni con NAA e Pluronic o solo con Pluronic non hanno avuto un numero di divisioni significativamente rilevante. Valutazione a parte per l’NAA, il quale da solo aumenta significativamente il numero di divisioni, ma in combinazione o con il Pluronic o con il 2,4-D ne inibisce l’effetto.

Per quanto riguarda i prodotti di fusione, ed anche per protoplasti non fusi, non si è avuta rigenerazione.

3.8 Poliploidizzazione dei PLBs

Le poliploidizzazioni sono state condotte su PLBs di *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii*, *Cattleya maxima* e *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole*, su terreno liquido (NDM), provando diverse concentrazioni di colchicina (0, 0.025, 0.050, 0.075%) e APM (0, 1.25, 2.5µM), a diversi tempi di incubazione dell’agente poliploidizzante (0, 3, 10 e 21 giorni). In tutti i casi, i PLBs sono stati tagliati trasversalmente prima del trattamento, in quanto il taglio si è dimostrato un fattore determinante nel loro accrescimento. Per ogni trattamento sono state eseguite 3 repliche contenenti circa 50 PLBs l’una (per un inoculo iniziale di circa 1g di peso fresco).

Durante il trattamento è stato monitorato il peso fresco degli espianti ogni 2 settimane, per verificare lo stato di accrescimento rispetto al controllo; tramite FCM è stato valutato l’andamento del processo di poliploidizzazione, analizzando l’andamento del processo di poliploidizzazione durante l’intero processo di coltura *in vitro*.

.

3.8.1 Rilevamento del peso fresco dei PLBs

Il peso fresco è stato rilevato ogni due settimane, per due mesi e per tutti i trattamenti poliploidizzanti effettuati. Per quanto riguarda i trattamenti a 21 giorni e per tutte le concentrazioni di agenti poliploidizzanti e per tutti i genotipi trattati sono state rilevate necrosi dei tessuti, portando alla conclusione che i lunghi tempi di esposizione non sono compatibili con la vitalità dei PLBs. I pesi freschi dei diversi espianti sono stati valutati tra di loro a due mesi dall’inizio del trattamento, per evitare che ci potesse essere un effetto dovuto alla permanenza con l’agente poliploidizzante.

Per quanto riguarda *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* abbiamo potuto constatare come a circa 2 mesi dall'inizio del trattamento, le prove effettuate con incubazioni di 3 giorni con colchicina o APM, per tutte le concentrazioni provate, hanno dato un tasso di crescita maggiore del trattamento a 10 giorni, ma anche superiore a quello del controllo (Fig. 46), come a dimostrare un qualche effetto benefico dell'agente poliploidizzante sul tasso di accrescimento dei PLBs. Infatti, mentre la media del peso fresco rilevata sul controllo si aggira sui 5g circa, la media del trattato per 3 giorni con colchicina, per tutte le concentrazioni, e quella del trattato con APM 2,5µM per 3 giorni, si trovano sui 7,5g e 11g, rispettivamente (Fig. 46). L'analisi della varianza ha inoltre dimostrato come questo andamento sia statisticamente significativo e non casuale. Il trattamento che in termini assoluti ha portato ad un incremento maggiore dei PLBs è stato quello con APM 2,5µM per 3 giorni (Fig. 46).

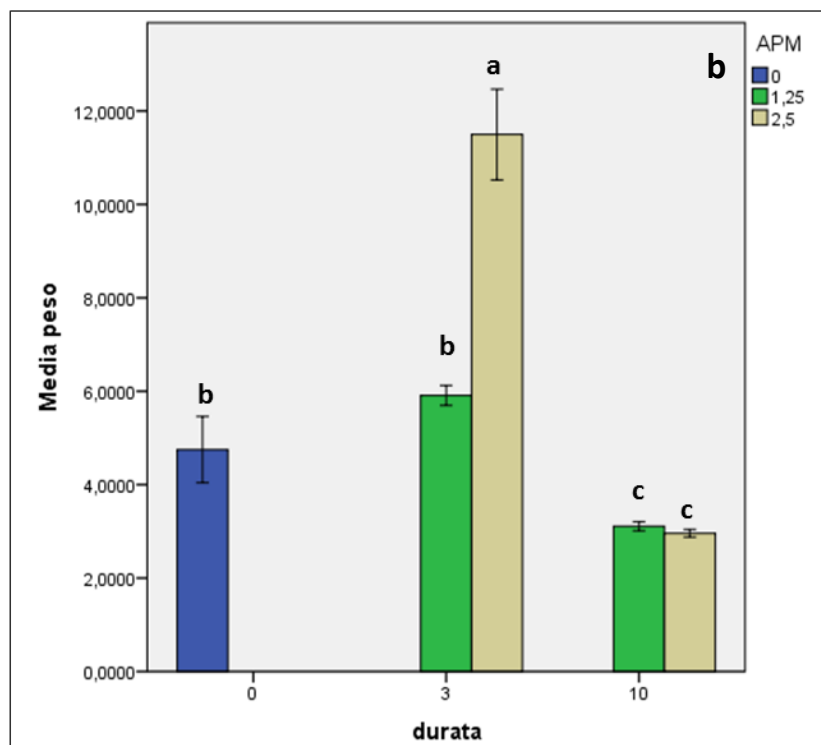
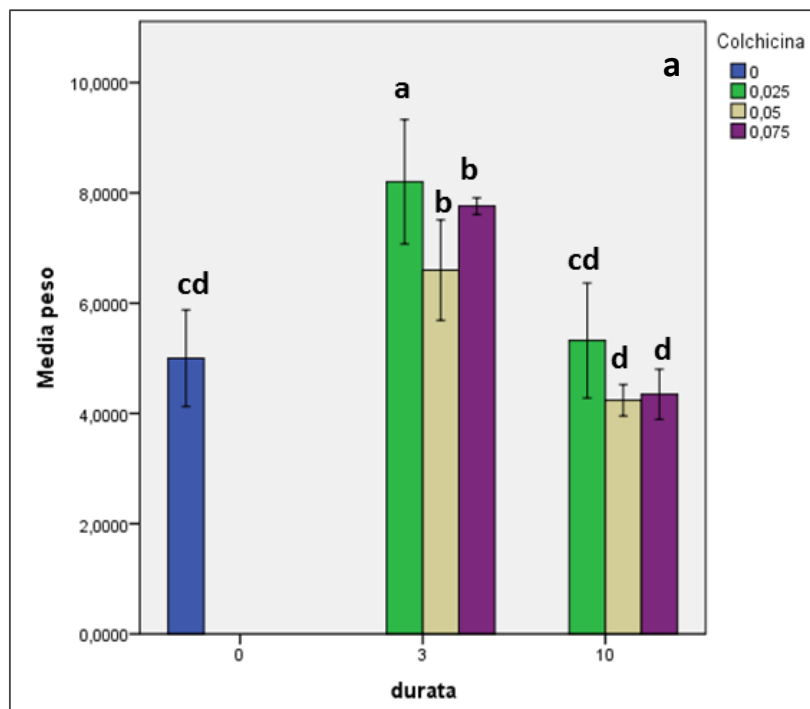


Figura 46. L'effetto della durata del trattamento e della concentrazione della colchicina (a) e dell'APM (b) sul peso fresco dei PLBs di *Dendrobium* a due mesi dall'inizio del trattamento. Il peso fresco dei PLBs è rappresentato in milligrammi, le barre rappresentano l'errore standard, sull'asse orizzontale sono rappresentati i diversi tempi del trattamento (0-3-10 giorni). Le lettere rappresentano i raggruppamenti significativi secondo il Duncan MRTs per $p \leq 0.05$.

Per quanto riguarda *Cattleya maxima*, per il trattamento a 10 giorni si è avuta necrosi del materiale, mentre per quello a 3 giorni, non ha mostrato differenze nell'accrescimento tra il trattato ed il controllo, a differenza del genotipo di *Dendrobium*.

Situazione simile è stata riscontrata per *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole*, dove anche qui il trattamento a 10 giorni ha portato a necrosi dei tessuti, e anche in questo caso tra i PLBs trattati ed il controllo non ci sono state differenze statisticamente significative (Fig. 47).

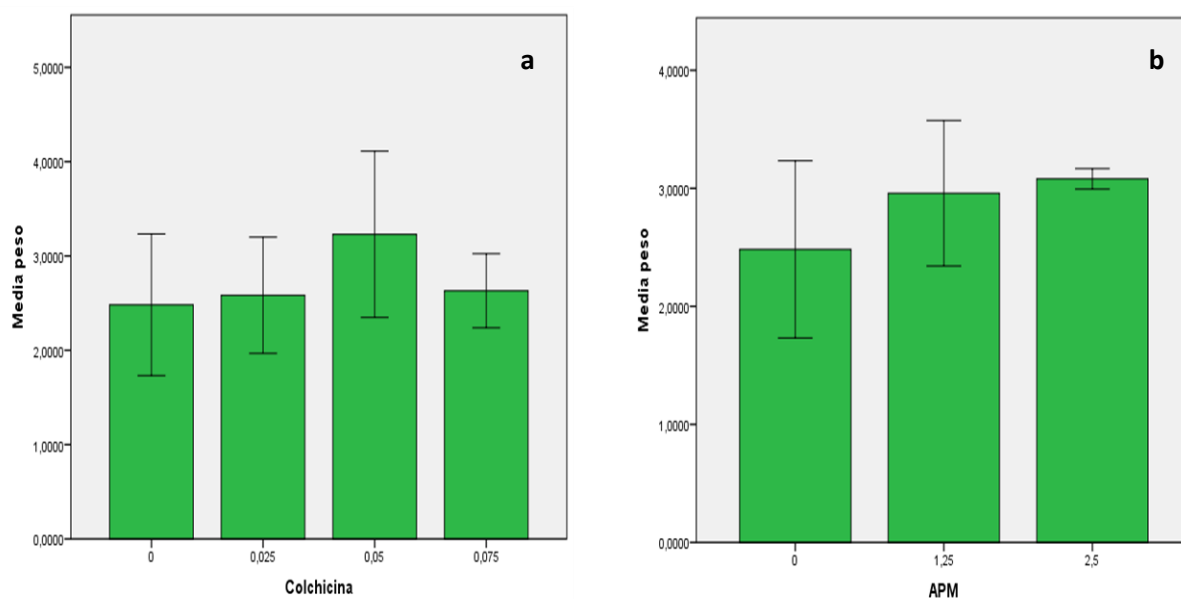


Figura 47. L'effetto della durata del trattamento e della concentrazione della colchicina (a) e dell'APM (b) sul peso fresco dei PLBs di *Phalaenopsis* a due mesi dall'inizio del trattamento. I pesi freschi dei PLBs sono rappresentati in mg come peso medio; le barre rappresentano l'errore standard. Sull'asse orizzontale sono rappresentate le diverse concentrazioni utilizzate per il trattamento a 3 giorni.

Dato interessante, però, è la messa a confronto tra i controlli delle tre specie poste a trattamento poliploidizzante con colchicina, poichè questi mostrano un tasso diverso nell'accrescimento anche a parità di inoculo iniziale: ciò puo' indicare una risposta al trattamento genotipo-specifica. Infatti, i controlli di *Cattleya* e *Phalaenopsis* mostrano un accrescimento del controllo in due mesi di circa 2.5g in totale, mentre in *Dendrobium* il controllo arriva ad una media di circa 5g totali, partendo in tutti e tre i casi da un inoculo iniziale di circa 1g.

3.8.2 Analisi citometrica dei PLBs poliploidizzati

Sui i PLBs è stato effettuato uno *screening* precoce durante tutto il trattamento poliploidizzante. Le analisi citometriche sono state condotte a 3, 10 e 28 giorni dall'inizio del

trattamento su un insieme di PLBs che fosse rappresentativo dell'andamento della popolazione posta a contatto con l'agente poliploidizzante.

Più che evidenziare differenze sostanziali tra le diverse concentrazioni provate si sono riscontrate differenze significative tra i diversi tempi del trattamento, in particolar modo per quanto riguarda *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii*, per il quale nessun trattamento ha portato a necrosi dei tessuti.

I nuclei estratti dai PLBs sottoposti a trattamento poliploidizzante, sono stati analizzati al citofluorimetro a flusso per valutarne la ploidia sia al tempo T0, che nelle fasi successive dell'esperimento, al fine di verificare l'andamento del processo di amplificazione del DNA controllando la variazione dei picchi di intensità di fluorescenza associati ai diversi livelli di ploidia. Abbiamo analizzato la percentuale di nuclei presenti nei diversi picchi col variare del tempo e del trattamento, ed abbiamo infine utilizzato un indice, il *cycle value* (Barow e Meister, 2003) che ci potesse dare un'informazione sintetica per ciascuna analisi e permetterci così di confrontare rapidamente i diversi trattamenti.

Controllando l'andamento durante il tempo del trattamento a 3 giorni rispetto a quello a 10 giorni risalta come dopo tre giorni dall'inizio della poliploidizzazione, la colchicina sposti considerevolmente i picchi sugli istogrammi verso livelli di ploidia più elevati (Fig. 48); ma a 10 giorni la situazione muta, ed i PLBs che sono restati più a lungo a contatto con l'agente poliploidizzante cominciano a ritornare verso la situazione di partenza. Infatti il picco 2n ritorna ad essere il picco con il numero di nuclei maggiore, mentre nel trattato a 3 giorni i picchi a livello di ploidia maggiore continuano a crescere a discapito di quello contenente i nuclei 2n. Ad un mese dal trattamento, l'analisi citometrica rivela come, sebbene la situazione in entrambi i casi sia variata rispetto a quella di partenza, il trattato a 3 giorni possieda una situazione di livello di ploidia totalmente differente dal controllo con i picchi 4n e 8n che raccolgono la percentuale maggiore dei nuclei e la nuova presenza di picchi con livello di ploidia 16n e 32n (Fig. 48).

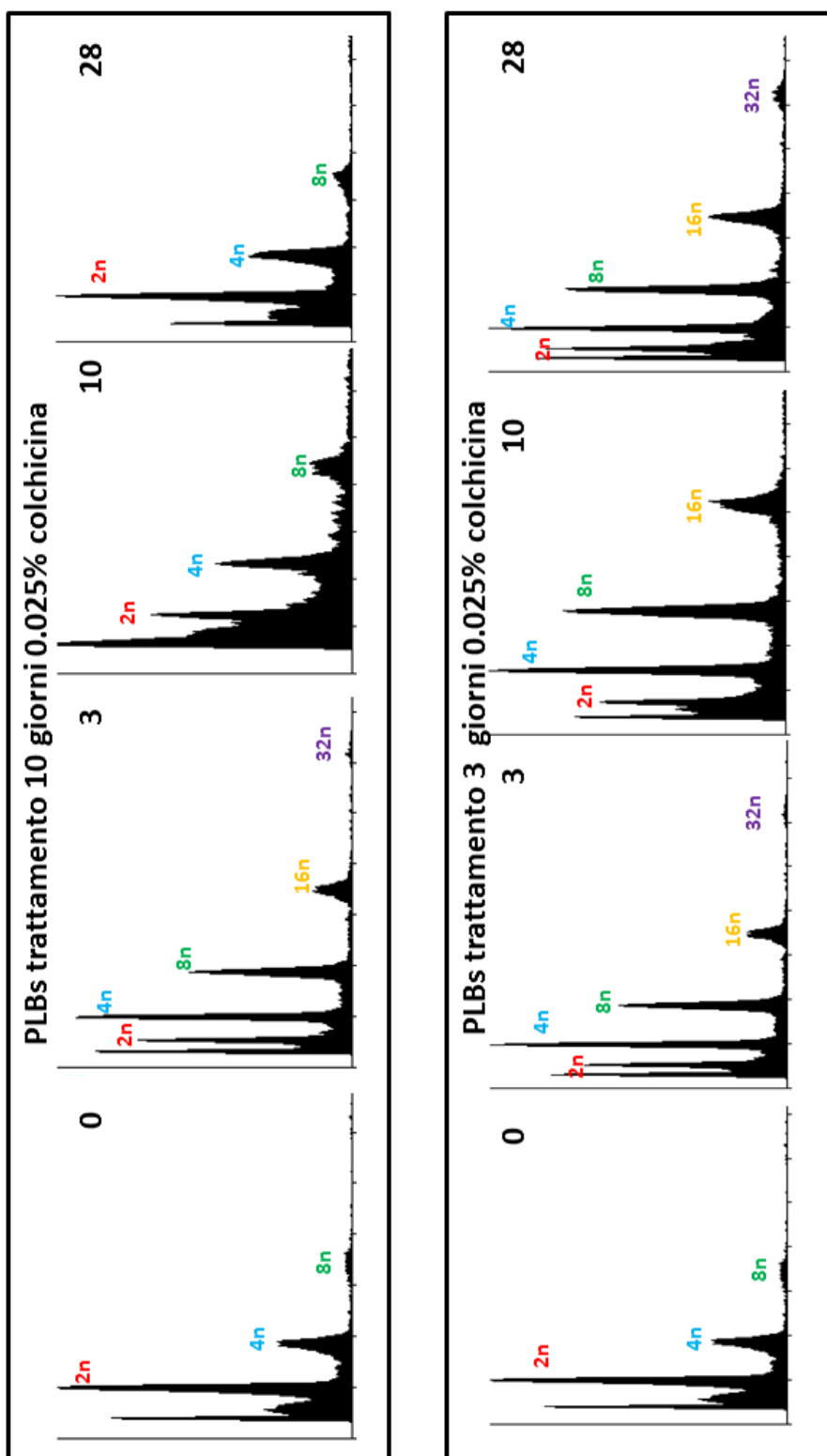


Figura 48. Istogrammi del contenuto relativo di DNA dei PLBs posti a trattamento poliploidizzante. Sono mostrati gli istogrammi per il trattamento 0.025% colchicina, mettendo a confronto i due diversi tempi di esposizione all'agente antimitotico. Ogni istogramma rappresenta un diverso tempo a cui è stata effettuata l'analisi (0, 3, 10 e 28 giorni); accanto ad ogni picco è stato riportato il livello di ploidia.

Medesima situazione senza differenze rilevanti si riscontra per tutte le concentrazioni di colchicine ed APM testate. Quello che sembra evidenziarsi, mettendo i due diversi tempi di trattamento a confronto, è che il differente tempo di esposizione alla colchicina fa variare l'andamento del ciclo cellulare dei PLBs, aumentando nel caso del trattamento a 3 giorni, il numero di cellule con grado di poliploidizzazione più elevato.

Abbiamo utilizzato a questo punto il *cycle value* per esprimere il grado di poliploidizzazione, in maniera sintetica, per ogni singolo trattamento ai diversi tempi di analisi. Il *cycle value* è stato calcolato come segue:

$$\text{cycle value} = \frac{0 \times n_{p1} + 1 \times n_{p2} + 2 \times n_{p3} + 3 \times n_{p4} \dots}{n_{p1} + n_{p2} + n_{p3} + n_{p4} \dots}$$

Dove n_{p1} , n_{p2} ... rappresentano il numero dei nuclei presenti nei diversi livelli di ploidia. Questo è un indice sintetico utilizzato per analizzare il grado di ploidia ed endopoliploidizzazione dei tessuti; in questo caso è stato adattato per stabilire il grado di poliploidizzazione di ogni singolo esperimento, utilizzando come tessuto una serie di PLBs assunti come rappresentativi della popolazione trattata (Fig. 49).

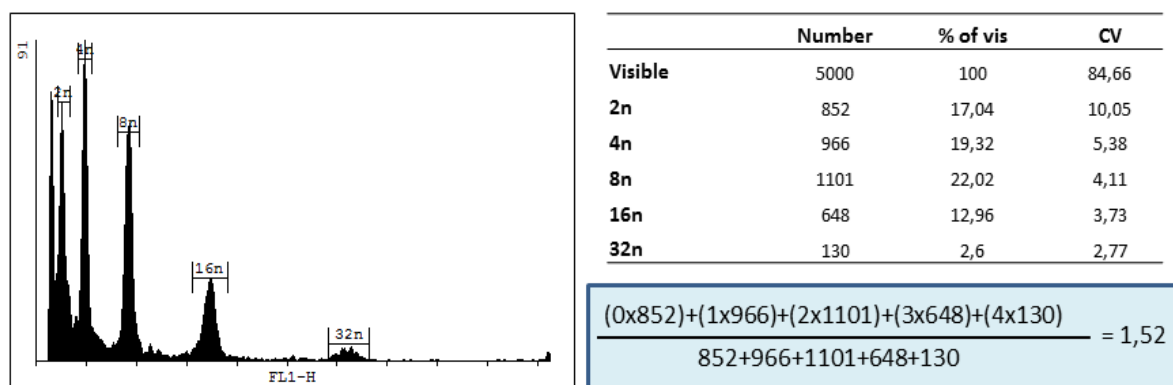


Figura 49. Istogramma del contenuto relativo di DNA dei PLBs posti a trattamento poliploidizzante e relativa misurazione del contenuto di ogni picco a differente ploidia per il calcolo del *cycle value*.

Utilizzando il *cycle value* abbiamo perciò visualizzando l'andamento nel tempo dei PLBs sottoposti a trattamento poliploidizzante. Mettendo a confronto i dati provenienti dai due diversi tempi di trattamento rispetto al controllo si può vedere come l'andamento del

trattamento a 10 giorni ed il controllo siano molto simili, mentre il trattamento a 3 giorni porta ad un diverso andamento del ciclo cellulare dei PLBs.

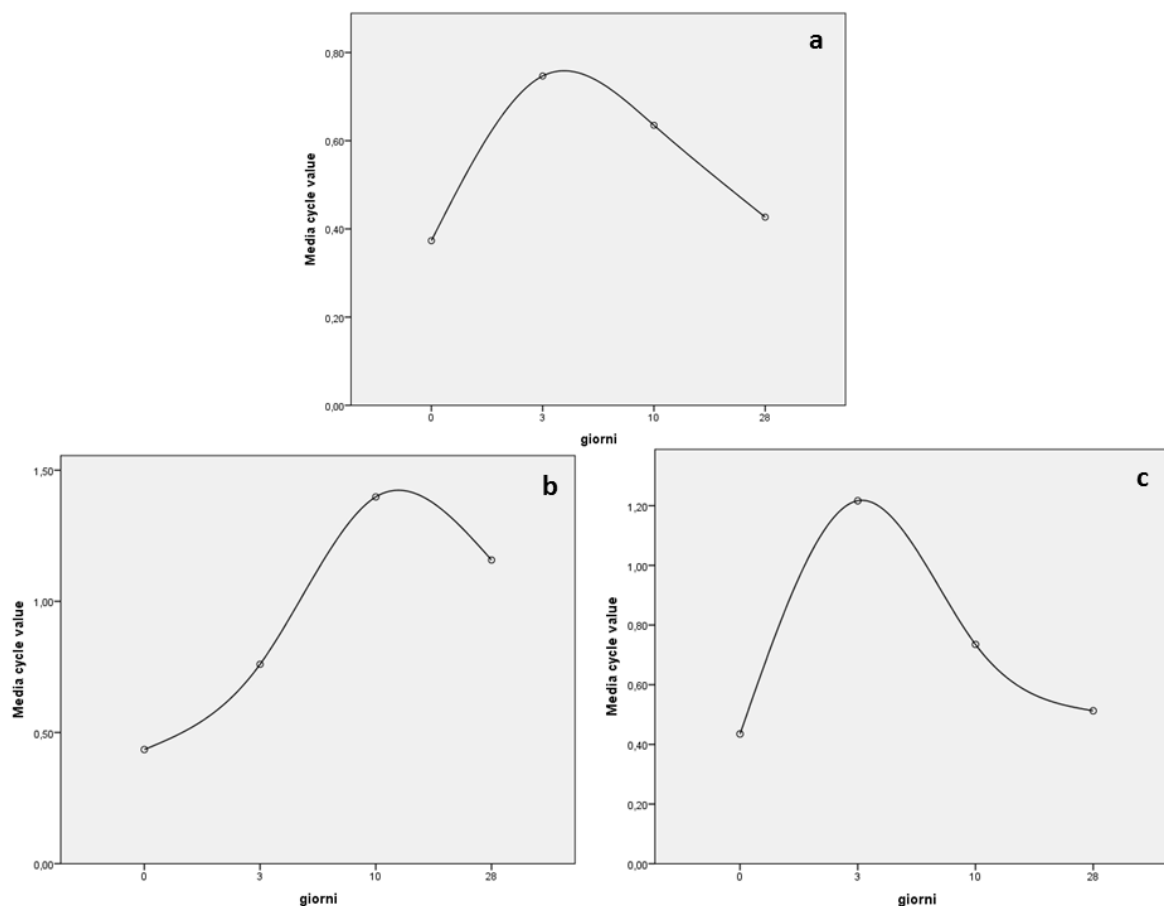


Figura 50. Curve del diverso andamento del *cycle value* nel tempo (da 0 a 28 giorni dall'inizio del trattamento) a seconda della durata del trattamento con colchicina. In a) andamento del *cycle value* nel controllo, in b) andamento del *cycle value* nel trattamento colchicina tre giorni ed in c) andamento *cycle value* per il trattamento colchicina 10 giorni. Le curve sono state ricavate prendendo il valore medio di *cycle value* per quel determinato tempo di analisi.

In un andamento normale di PLBs posti in sospensione, senza alcun agente poliploidizzante, il solo taglio contribuisce in una prima fase alla stimolazione della crescita, e perciò delle mitosi cellulari, facendo sì che il numero di nuclei in fase G2 aumenti, e aumentando così anche il valore del *cycle value*. Il picco massimo di cellule in massima divisione viene raggiunto tra i 3 ed i 5 giorni; dopo le cellule cominciano lentamente a ritornare alla situazione di partenza ed a 28 giorni la situazione ritorna quasi alla condizione di equilibrio iniziale (Fig. 50a). Questo tipo di andamento è rilevabile anche per quanto riguarda il trattamento a 10 giorni per tutte le concentrazioni provate (Fig. 50c). In questo caso quello che cambia sono i valori del *cycle value*, infatti l'andamento è molto simile a quello del

controllo ma la colchicina aumenta considerevolmente il numero di cellule che si trovano in G_2 , aumentando di conseguenza il valore del *cycle value*. Anche in questo caso il picco massimo si ha tra i 3 ed i 5 giorni per poi cominciare a decrescere (Fig. 50c); togliendo la colchicina dopo 10 giorni si vede come il decremento sia molto più repentino che nel caso del controllo. Caso totalmente a se è quello del trattamento a 3 giorni (Fig. 50b); togliendo la colchicina a 3 giorni, invece di assistere ad un decremento del numero di cellule in divisione, si assiste ad un repentino incremento con un culmine tra il quindicesimo e ventesimo giorno. A 28 giorni nonostante il decremento, il valore del *cycle value* è nettamente maggiore di quello riscontrato nel trattamento a 10 giorni.

Mettendo a confronto i diversi istogrammi tra i diversi trattamenti è chiaramente evidente come il trattamento a 3 giorni ha portato ad un aumento della poliploidia del tessuto e quindi, presumibilmente, ad un aumento del numero di PLBs con grado di ploidia maggiore.

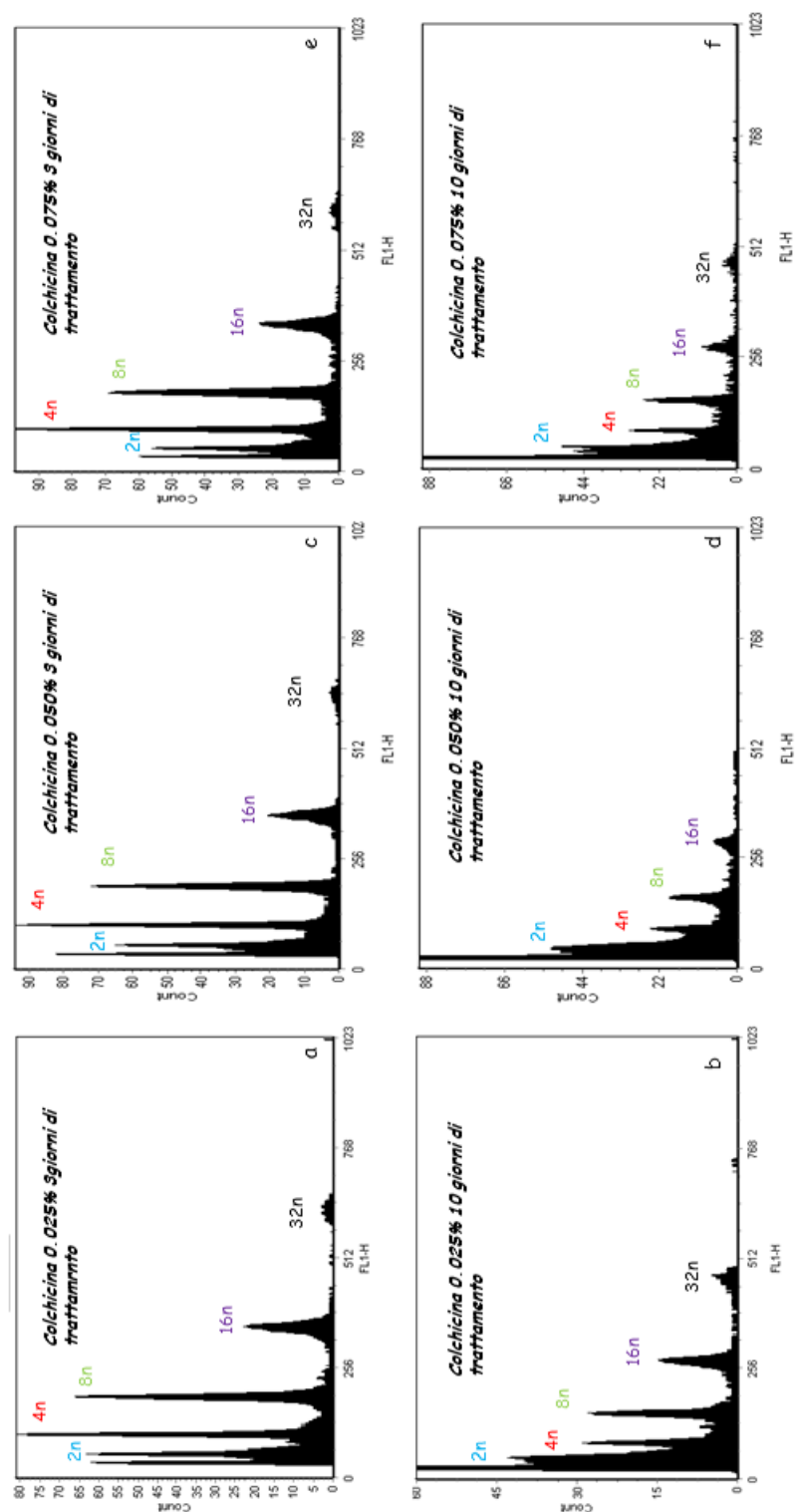


Figura 51. Istogramma del contenuto relativo di DNA dei PLBs per ogni diverso trattamento con colchicina a 28 giorni dall'inizio della poliploidizzazione. A) c) e) trattamento 3 giorni con, rispettivamente 0.025, 0.050 e 0.075% colchicina; b) d) f) trattamento 10 giorni con, rispettivamente, 0.025, 0.050 e 0.075% colchicina.

Analizzando gli istogrammi in figura 51 quello che si vede è come in entrambi i tempi di trattamento ci sia stato un aumento del numero dei picchi a ploidia più elevata rispetto al controllo, quello che varia è il numero di nuclei presenti in ciascun picco. A 28 giorni dall'inizio del processo, il trattamento a 3 giorni mostra un aumento rilevante dei picchi a ploidia 4n e 8n (31% e 32% rispettivamente), e una diminuzione considerevole dei picchi a ploidia 2n (20%, rispetto al 60% del controllo), mentre nel trattamento a 10 giorni, il picco 2n rimane ancora il picco maggiore (40%), come se in questo caso la colchicina avesse agito su un numero minore di cellule del tessuto, anche se rispetto al controllo è comunque minore.

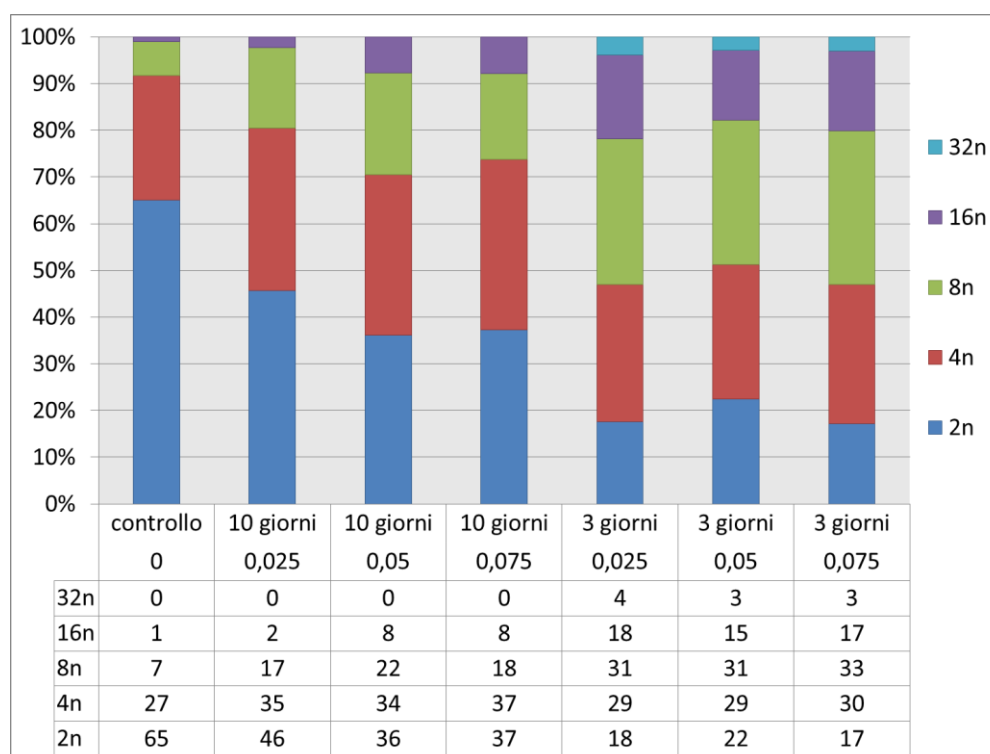


Figura 52. Istogramma cumulato del livello di ploidia dei nuclei dei PLBs di *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* dopo il trattamento con colchicina. L'istogramma mette a confronto la diversa composizione percentuale di ploidia dei nuclei di PLBs rispetto a diverse durate dei trattamenti effettuati (3 e 10 giorni), e diverse concentrazioni di colchicina utilizzata nel terreno di coltura (0, 0.25, 0.50 e 0.75%). In basso abbiamo la tabella con i dati percentuale dei vari livelli di ploidia.

L'analisi della varianza ha dimostrato come le differenze tra i due diversi tempi di trattamento siano statisticamente significative per tutte le concentrazioni testate, mentre non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative tra le diverse concentrazioni di colchicina. Per l'analisi della varianza abbiamo utilizzato il valore del *cycle value* calcolato sugli istogrammi delle analisi citometriche effettuate a 28 giorni dal trattamento, per evitare che l'analisi risentisse troppo della possibile presenza della colchicina, come avrebbe potuto

essere se fosse stata effettuata a 15 o a 20 giorni dal trattamento. Il valore del *cycle value* maggiore è stato quello per il trattamento a 3 giorni, le concentrazioni di colchicina 0.025-0.050-0.075% hanno dato, rispettivamente, valori di *cycle value* di 1,51-1,47-1,59. Per quanto riguarda il trattato a 10 giorni i valori di *cycle value* sono stati maggiori del controllo con una media intorno allo 0,80 ed anche in questo caso non ci sono differenze statisticamente significative tra le varie concentrazioni (Tab. 26).

concentrazione ^a	durata	P1 ^x	P2	P3	P4	P5	cycle value
0	10 giorni	59,97	30,38	9,65	0,00	0,00	0,49
0,025		45,69	34,77	17,24	2,30	0,00	0,76
0,05		36,12	34,33	21,89	7,66	0,00	1,01
0,075		37,21	36,59	18,30	7,90	0,00	0,96
0	3 giorni	57,57	33,56	7,94	0,94	0,00	0,52
0,025		17,57	29,33	31,20	18,08	3,81	1,51 **
0,05		22,47	28,74	30,91	14,95	2,93	1,47 **
0,075		17,17	29,81	32,87	17,19	2,96	1,59 **

Tabella 26. *Cycle value* e percentuale dei diversi livelli di plodia per i trattamenti con colchicina su *Dendrobium* a 28 giorni dalla poliploidizzazione. ^a I valori di concentrazione sono espressi in percentuale; ^x per P1, P2, P3, P4, P5 si intendono i diversi livelli di ploidia 2n, 4n, 8n, 16n, 32n; le lettere rappresentano i raggruppamenti significativi secondo il test di Duncan MRTs per p≤0.05.

In *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* abbiamo potuto anche analizzare le differenze per quanto riguarda i trattamenti con APM per i vari tempi di esposizione. Con APM il trattamento con 2.5µM a 3 giorni risulta essere il più efficace e la poliploidizzazione indotta è molto simile a quella prodotta con colchicina (Fig. 53).

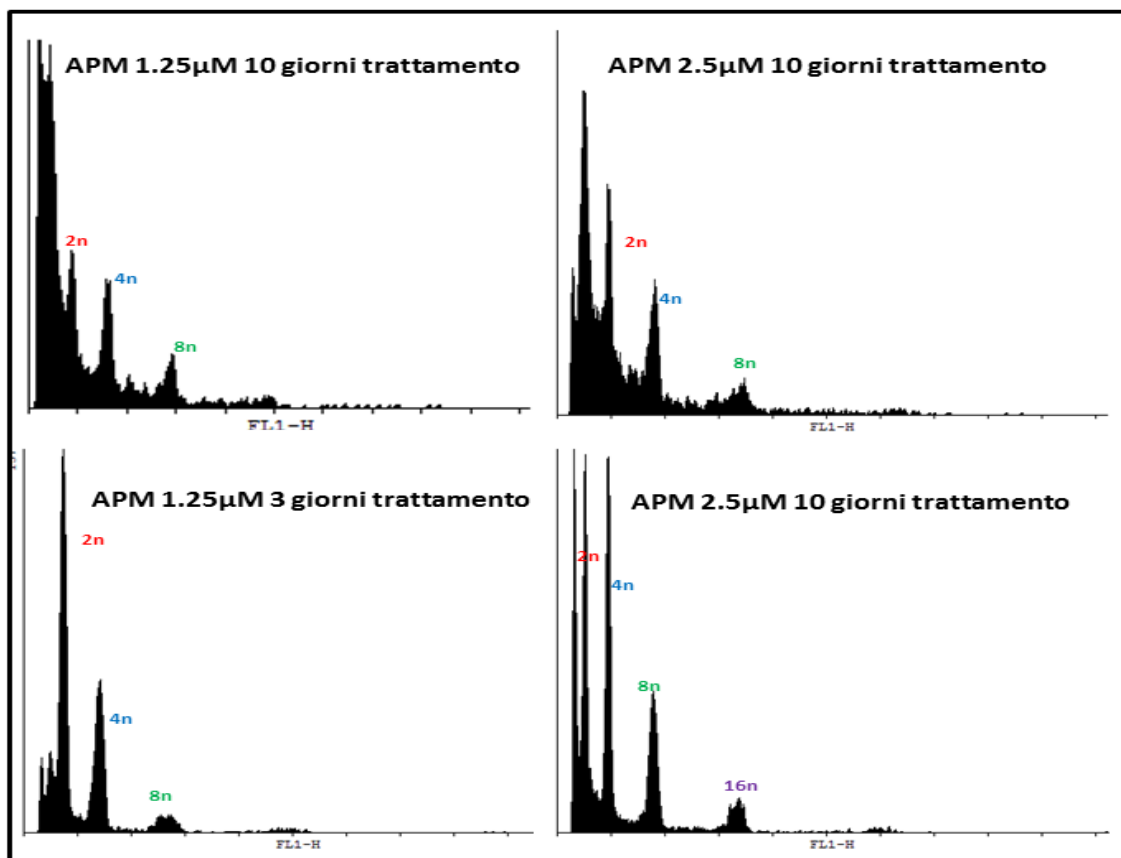


Figura 53. Istogrammi del contenuto relativo di DNA dei PLBs di *Dendrobium* sottoposti a trattamento con APM a 28 giorni dall'inizio della poliploidizzazione. Sono messi a confronto gli istogrammi per i due diversi tempi di trattamento (3 e 10 giorni) e per le due diverse concentrazioni di APM (1,25 e 2,5µM).

L'analisi della varianza, prendendo in esame il *cycle value*, ha dimostrato come in APM il fattore significativo sia la concentrazione dell'agente antimitotico e l'interazione tra la concentrazione e la durata del trattamento (Tab. 27-28).

Concentrazione	Durata	P1 ^x	P2	P3	P4	cycle value
0	10 giorni	60	30	10	0	0,49 d
1,25		39	38	18	5	0,86 c
2,5		41	29	20	10	0,98 b
0	3 giorni	58	33	9	0	0,52 d
1,25		58	33	7	2	0,52 d
2,5		31	36	24	9	1,1 a

Tabella 27. *Cycle value* e percentuale dei diversi livelli di ploidia per i trattamenti con APM su *Dendrobium* a 28 giorni dalla poliploidizzazione. ^x per P1, P2, P3, P4. si intendono i diversi livelli di ploidia 2n, 4n, 8n, 16n; le lettere rappresentano i raggruppamenti significativi secondo il test di Duncan MRTs per p≤0.05.

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	Sign.	C.V. (%)
durata	0,000272222	1	0,000272222	0,073243647	0,79127		
concentrazione	1,146311111	2	0,573155556	154,2122571	2,76E-09	**	
durata x concentrazione	0,220577778	2	0,110288889	29,67414051	2,26E-05	**	
Residual	0,0446	12	0,003716667				8,31964
Total	1,411761111	17					

Tabella 28. Analisi della varianza sull'effetto della durata del trattamento e sulla concentrazione di APM sul cycle value. È mostrata la significatività dei fattori in maniera individuale e della loro interazione.

Le differenze sono da attribuire sicuramente alla differente composizione e modalità d'azione dell'agente poliploidizzante. L'APM ha un effetto meno tossico della colchicina, come dimostrato dalla maggiore crescita dei PLBs in termini di peso fresco rispetto alla colchicina, e dove anche il trattamento a 10 giorni sposta considerevolmente i picchi a livelli di ploidia più elevati. Anche la concentrazione di APM risulta importante, infatti 1.25µM APM con solo 3 giorni di trattamento non ha un effetto significativo sull'aumento dei livelli di ploidia del campione mentre il trattamento a 2.5µM produce poliploidizzazione, a dimostrazione di una diversa efficacia in funzione della concentrazione e del trattamento (Tab. 27).

Nel caso di *Cattleya maxima* invece non ci sono differenze significative tra il controllo ed i PLBs trattati, anche se in questo caso possiamo analizzare solo le differenze tra le varie concentrazioni, in quanto i PLBs trattati per 10 giorni hanno mostrato tutti necrosi dei tessuti. Il numero di nuclei nei picchi varia di circa un 10%, infatti mentre nel controllo il picco 2n rappresenta circa il 70% del nostro campione nei trattati questo picco raggiunge circa il 60% con un aumento invece a carico del picco contenente i nuclei di ploidia 4n, che passa dal 22% del controllo a circa il 30% nei trattati (Fig. 54).

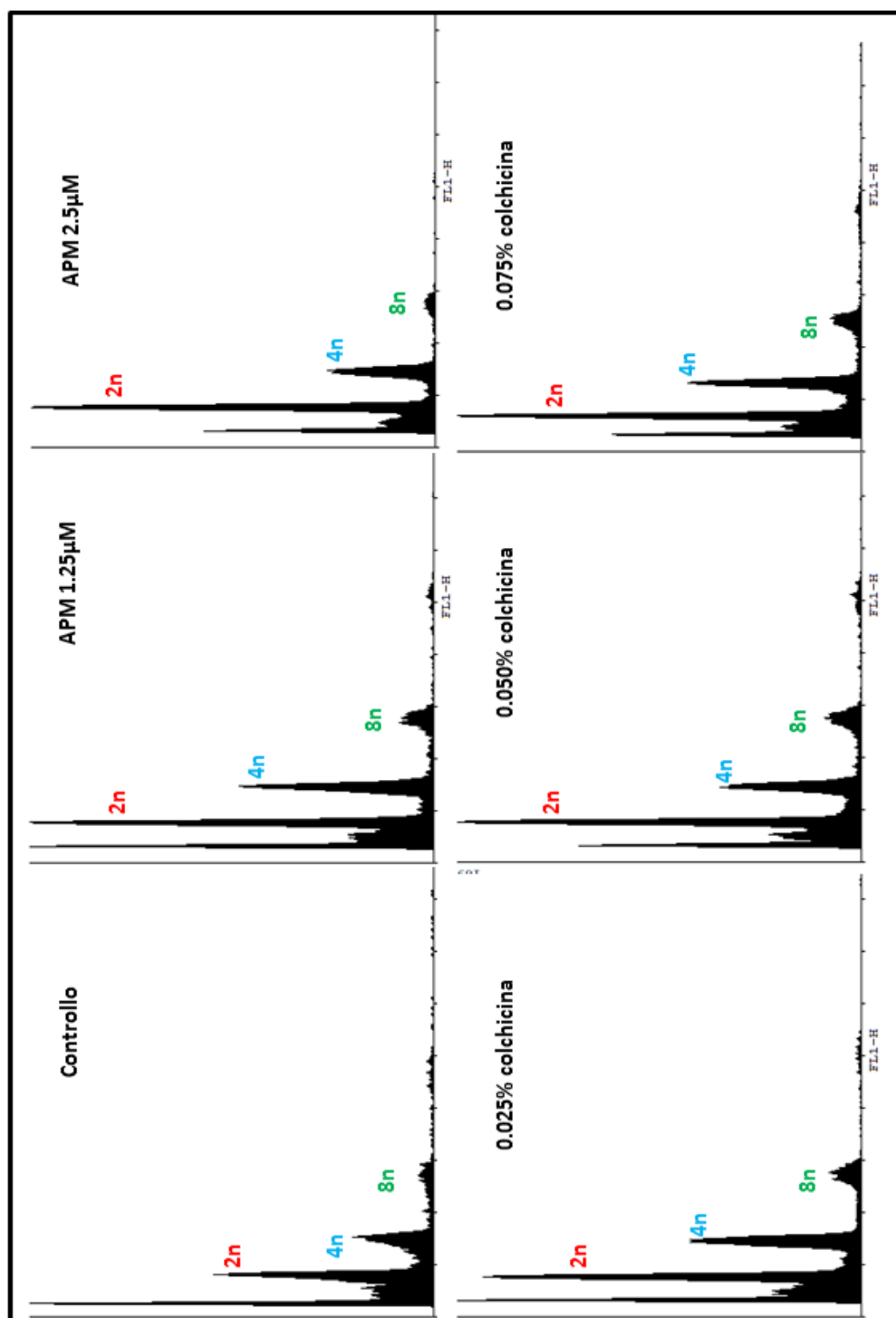


Figura 54. Istogrammi del contenuto relativo di DNA dei PLBs di *Cattleia* sottoposti a trattamento con colchicina o APM a 28 giorni dall'inizio della poliploidizzazione. Sono messi a confronto gli istogrammi per i due diversi tempi di trattamento (3 e 10 giorni) e per le due diverse concentrazioni di APM (1,25 e 2,5μM) e colchicina (0.025, 0.050 e 0,075%) rispetto al controllo.

L'analisi della varianza, effettuata prendendo come valore il *cycle value*, non mostra infatti differenze statisticamente significative tra i vari trattamenti. Infatti gli agenti poliploidizzanti hanno scostato lievemente il valore dei picchi e quello del *cycle value*, dimostrando comunque una seppur minima efficacia sui tessuti (Tab. 29).

concentrazione	P1% [*]	P2%	P3%	cycle value
0	71,98	22,77	4,57	0,34
0,025	59,56	34,19	5,96	0,46
0,05	66,2	28,78	4,85	0,38
0,075	61,34	31,65	6,48	0,46
1,25	60,82	32,78	6,98	0,49
2,5	65,05	28,47	6,62	0,41

Tabella 29. *Cycle value* e percentuale dei diversi livelli di plodia per i trattamenti con colchicina ed APM su *Cattleya* a 28 giorni dalla poliploidizzazione. * per P1, P2, P3 si intendono i diversi livelli di ploidia 2n, 4n, 8n; non c'è differenza significativa tra i vari trattamenti per $p \leq 0.05$, Anova test.

Per quanto invece riguarda *Every spring price* $\times$ *Phalaenopsis* *memole* la situazione è diversa dalle due precedenti. Non è stato possibile fare confronti tra i diversi tempi di trattamento perchè quello a 10 giorni ha portato alla necrosi dei PLBs. Analizzando gli istogrammi, a 28 giorni dall'esposizione all'agente antimittotico, dei trattamenti con le diverse concentrazioni di colchicina e APM, si nota come la differenza con il controllo nel cambiamento dei livelli di ploidia sia minima, tranne nel caso del trattamento con 0.075% colchicina dove in realtà tutti i nuclei hanno subito l'effetto della poliploidizzazione portando alla scomparsa del picco 2n (Fig. 55).

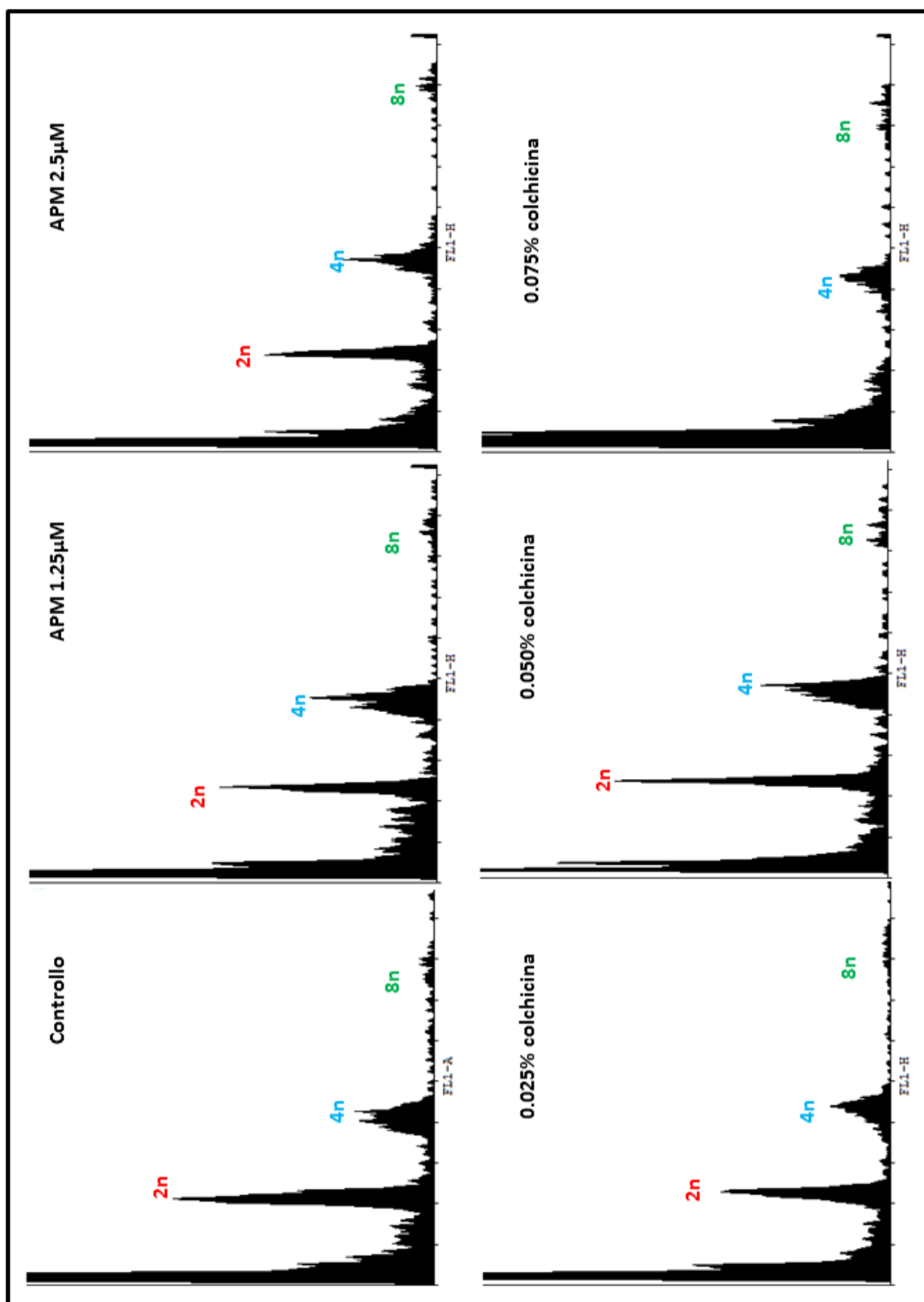


Figura 55. Istogrammi del contenuto relativo di DNA dei PLBs di *Phalenopsis* sottoposti a trattamento con colchicina o APM a 28 giorni dall'inizio della poliploidizzazione. Sono messi a confronto gli istogrammi per i due diversi tempi di trattamento (3 e 10 giorni) e per le due diverse concentrazioni di APM (1,25 e 2,5 μM) e colchicina (0.025, 0.050 e 0.075%) rispetto al controllo.

Infatti anche per *Phalaenopsis*, come per *Cattleya*, abbiamo uno scostamento di circa il 10% per quanto riguarda i nuclei del picco 2n che passano da 70% circa del controllo al 60% nei trattati, con la comparsa in quest'ultimi di nuclei con ploidia 8n. L'analisi della varianza, condotta utilizzando come valore di riferimento il *cycle value*, ha mostrato come la concentrazione di colchicina sia statisticamente significativa al fine della variazione dei picchi di ploidia dei PLBs. In questo caso si può vedere come all'aumentare della concentrazione aumenti esponenzialmente il valore del *cycle value*, fino ad arrivare ad un massimo con la concentrazione 0.075% colchicina (Tab. 30).

concentrazione	P1 ^x	P2	P3	cycle value	
0	68,42	31,58	0	0,32 c	
0,025	61,4	33,51	5,01	0,44 b	
0,05	50,8	43,14	6,04	0,55 b	
0,075	0	77,19	22,8	1,23 a	**
1,25	60,48	34,52	5,04	0,45 b	
2,5	53,69	37,94	8,36	0,55 b	

Tabella 30. *Cycle value* e percentuale dei diversi livelli di plodia per i trattamenti con colchicina o APM su *Phalaenopsis* a 28 giorni dalla poliploidizzazione. ^x per P1, P2, P3 si intendono i diversi livelli di ploidia 2n, 4n, 8n; Le lettere rappresentano i raggruppamenti significativi secondo il test di Duncan MRTs per p≤0.05.

Tutte le analisi condotte in via preliminare sui PLBs poliploidizzati mettono in evidenza come innanzitutto la risposta al processo sia genotipo-specifica. La durata del trattamento influenza in maniera statisticamente significativa lo spostamento dei picchi di ploidia nei PLBs e, ad esempio, nel caso di *Phalaenopsis* si riesce ad evidenziare anche la concentrazione di colchicina migliore. Per quanto riguarda l'APM si dimostra la sua azione meno tossica sui tessuti ed è in questo caso statisticamente significativa la relazione tra la durata e la concentrazione dell'agente antimitotico.

3.9 Analisi della Ploidia

Ad un mese dal trattamento poliploidizzante i PLBs sono stati tolti dal terreno liquido e colturali su terreno solido (MSO) per l'induzione a plantula. A sei mesi dal trattamento la grande maggioranza dei PLBs sottoposti a poliploidizzazione è stato in grado di rigenerare a plantula. I la ploidia dei putativi mutanti sono stati valutati prelevando circa 20mg di tessuto fogliare da ogni giovane plantula, sufficienti per ottenere una caratterizzazione del livello di ploidia, analizzando per ogni trattamento circa 20 plantule.

Le analisi citofluorimetrica sono state condotte con l'inserimento di uno standard interno grazie al quale abbiamo potuto confrontare i diversi istogrammi ed individuare i trattamenti che hanno prodotto il maggior numero di poliploidi (Fig. 56).

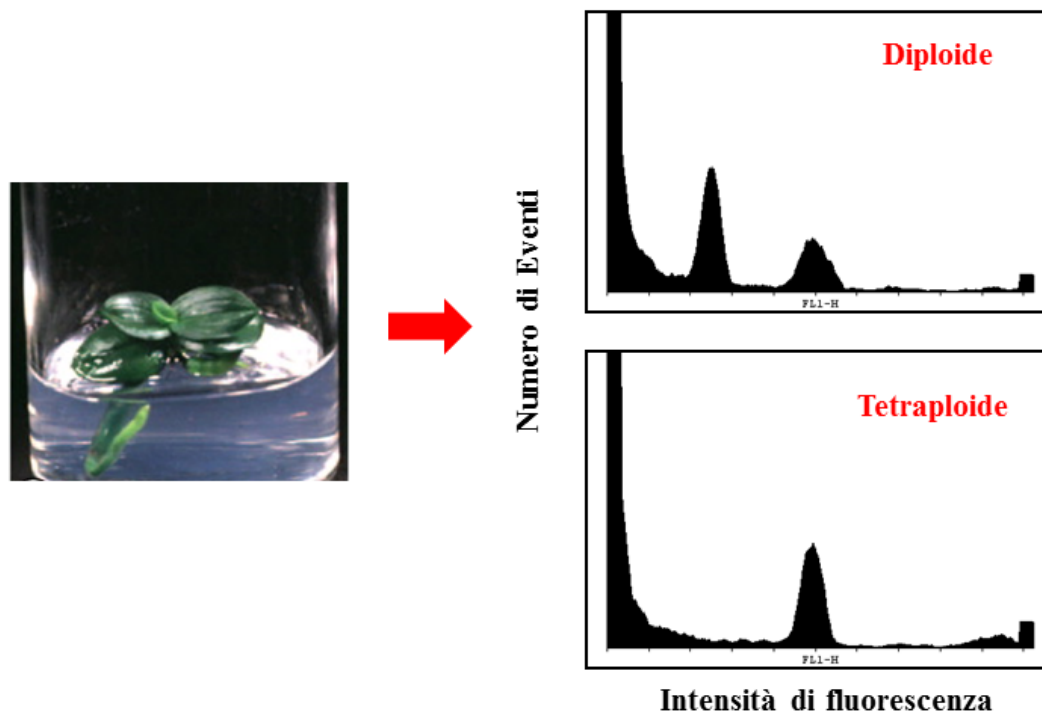


Figura 56. Istogrammi del contenuto di DNA di piante diploidi e tetraploidi. L'analisi è stata condotta a 6 mesi dal trattamento poliploidizzante su giovani foglie.

Per ogni genotipo abbiamo perciò valutato i tetraploidi ottenuti per ogni trattamento, al fine di verificarne l'effettiva efficacia. Per quanto riguarda *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* abbiamo recuperato poliploidi sia con il trattamento a 3 che a 10 giorni e con entrambi gli agenti poliploidizzanti. La percentuale in assoluto maggiore è stata ottenuta con il trattamento a 3 giorni con lo 0.075% colchicina, per il quale il numero di poliploidi recuperati è stato dell'80% (Fig. 57).

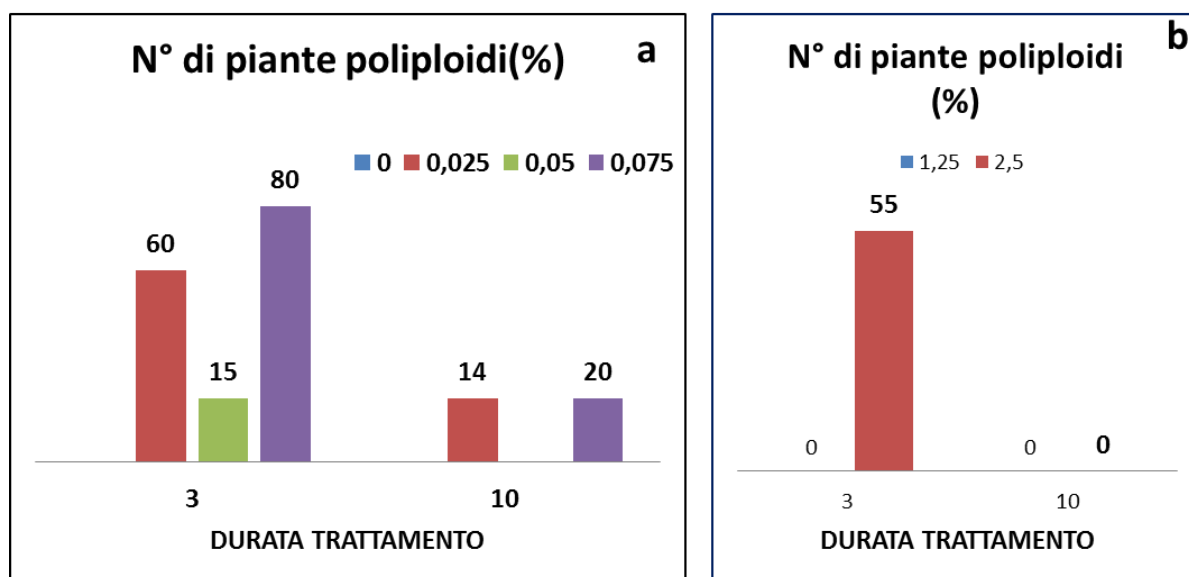


Figura 57. Istogrammi della percentuale di poliploidi recuperati in *Dendrobium* a seconda del diverso trattamento poliploidizzante. In a) la percentuale di poliploidi per i trattamenti in colchicina, in b) la percentuale di poliploidi per i trattamenti con APM.

Come si può vedere dai grafici il trattamento a 3 giorni sia con colchicine che con APM è quello che maggiormente ha portato alla formazione di plantule poliploidi, sia con colchicina 0,025% e 0,075% e che con APM 2,5μM, con un recupero, in poliploidi, del 60%, 80% e 55%, rispettivamente. L'analisi della varianza ha confermato la significatività del trattamento in completo accordo con quanto precedentemente rilevato sui PLBs. In tutto sono state valutate 30 piante poliploidi (Tab. 31).

Concentrazione colchicina(%)	Durata trattamento(d)- N° piante poliploidi (%)	
	3 **	10
0,00	0	0
0,025	60	14
0,05	15	0
0,075	80	20

Tabella 31. Percentuale di poliploidi recuperati per i diversi trattamenti in *Dendrobium*. In giallo sono stati evidenziati i trattamenti statisticamente significativi per $p \leq 0.05$ (Anova test).

Nel caso di *Cattleya maxima* non abbiamo trovato nessuna pianta poliploide a conferma del dato sui PLBs, nei quali nessun trattamento si era discostato significativamente dal controllo.

Le analisi condotte su *Every prince spring* x *Phalaenopsis memole*, hanno mostrato come solo il trattamento 0.075% colchicina si è dimostrato efficace nell'induzione di poliploidi con una percentuale del 45% (Tab. 32).

Concentrazione colchicina(%)	N° piante poliploidi (%)
0,00	0
0,025	0
0,05	0
0,075**	45

Tabella 32. Percentuale di poliploidi recuperati per i diversi trattamenti in *Phalaenopsis*. In giallo sono stati evidenziati i trattamenti statisticamente significativi per $p \leq 0.05$.

Il trattamento con 0.075% colchicina per 3 giorni si è dimostrato statisticamente significativo, mentre per il trattamento in APM non abbiamo ottenuto un recupero in poliploidi.

Confrontando i dati ottenuti sulle plantule con quelli ottenuti con l'analisi della varianza sui PLBs, e utilizzando come parametro il *cycle value*, a 28 giorni dall'inizio del trattamento poliploidizzante, vediamo una completa corrispondenza, ossia i trattamenti che avevano modificato significativamente il livello di ploidia nei PLBs sono poi gli stessi che hanno portato al recupero del maggior numero di poliploidi. Possiamo inoltre affermare che quei trattamenti che sui PLBs hanno mostrato un valore di *cycle value* maggiore di 1 hanno portato anche ad un recupero in poliploidi significativo.

3.10 Analisi del contenuto di DNA

L'analisi del contenuto di DNA è stata effettuata su tutti i materiali di partenza in nostro possesso e su tutti i materiali poliploidi ottenuti. La preparazione di sospensioni nucleari intatte per la stima del contenuto assoluto di DNA è stata eseguita seguendo il metodo di Galbraith *et al.* (1983). Dato che la citometria a flusso analizza l'intensità di fluorescenza relativa, il contenuto di DNA di un campione può essere determinato solo dopo la comparazione con i nuclei di uno standard di riferimento, a contenuto di DNA noto. Ciò è ottenuto tramite una standardizzazione interna, nella quale i nuclei dello standard e del campione sono isolati, colorati e analizzati simultaneamente.

Per le nostre analisi abbiamo utilizzato come standard di riferimento *Raphanus sativus* contenuto di DNA = 1.06pg. I campioni sono stati sminuzzati nel tampone di estrazione TRIS-MgCl₂, il quale si è dimostrato il migliore per il rilascio dei nuclei e l'unico che non ha presentato fenomeni di aggregazione tra il campione e lo standard biologico utilizzato. I campioni così ottenuti sono stati filtrati a 36 µm per rimuovere i detriti di estrazione, e 300 µl di ognuno sono stati prelevati e colorati indipendentemente per analizzare al citometro la concentrazione dei nuclei nel campione e nello standard di riferimento.

La colorazione è stata effettuata con Ioduro di Propidio (PI) alla concentrazione di 100 µg/ml e incubando successivamente il campione per 10 minuti con RNasi alla concentrazione di 100 µg/ml. Una volta stabilita la concentrazione i campioni di *Raphanus* e *Orchidea* sono stati mischiati insieme facendo sì che le concentrazioni risultino simili. Lo standard ed il campione sono stati quindi miscelati nelle proporzioni ottimali e quindi colorati con PI (Fig. 58).

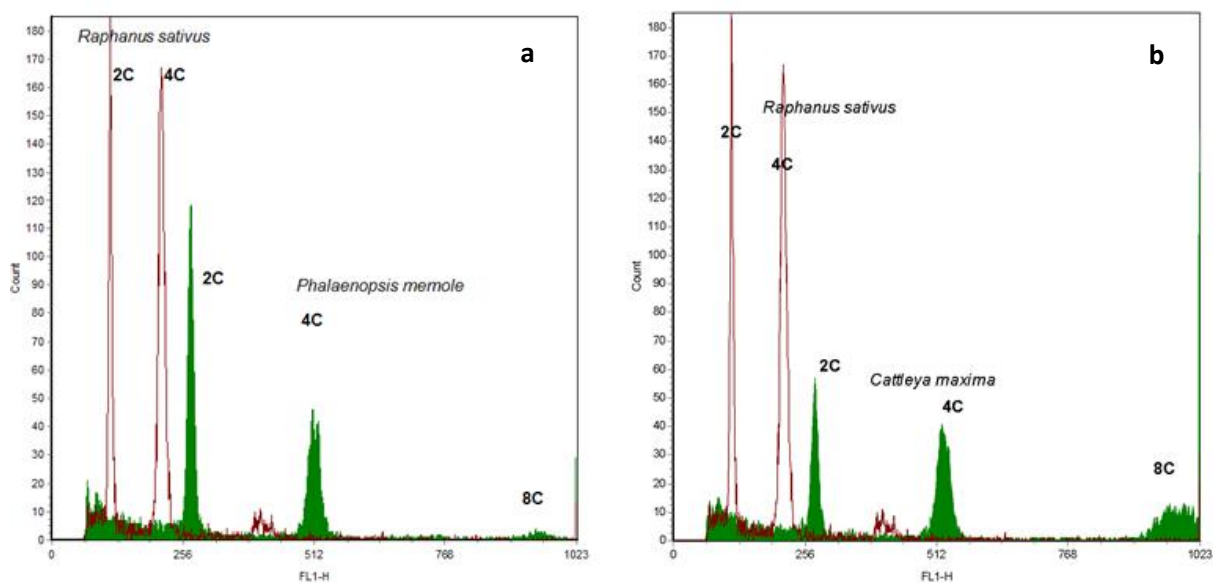


Figura 58. Istogrammi del contenuto di DNA di *Phalaenopsis memole* e *Cattleya maxima*. Nell'istogramma viene mostrata l'analisi al citometro a flusso dei nuclei estratti da foglia in a di *Phalaenopsis memole* ed in b di *Cattleya maxima* (picchi pieni) insieme a nuclei di *Raphanus sativus* (picchi vuoti), specie a contenuto di DNA noto (2C=1,06pg) e utilizzata come standard di riferimento interno. Mettendo a confronto il picco del contenuto 2C di *R. sativus* con quello di una delle nostre specie di orchidea possiamo risalire al contenuto in DNA.

Il contenuto assoluto di DNA è stato stimato applicando la formula:

Contenuto 2C del DNA del campione =

$[(\text{media del picco } G_1 \text{ del campione})/(\text{media del picco } G_1 \text{ dello standard})] \times \text{contenuto 2C del DNA dello standard (pg DNA)}$

I valori del contenuto di DNA ottenuti per i nostri genotipi di partenza sono riassunti in tabella 33.

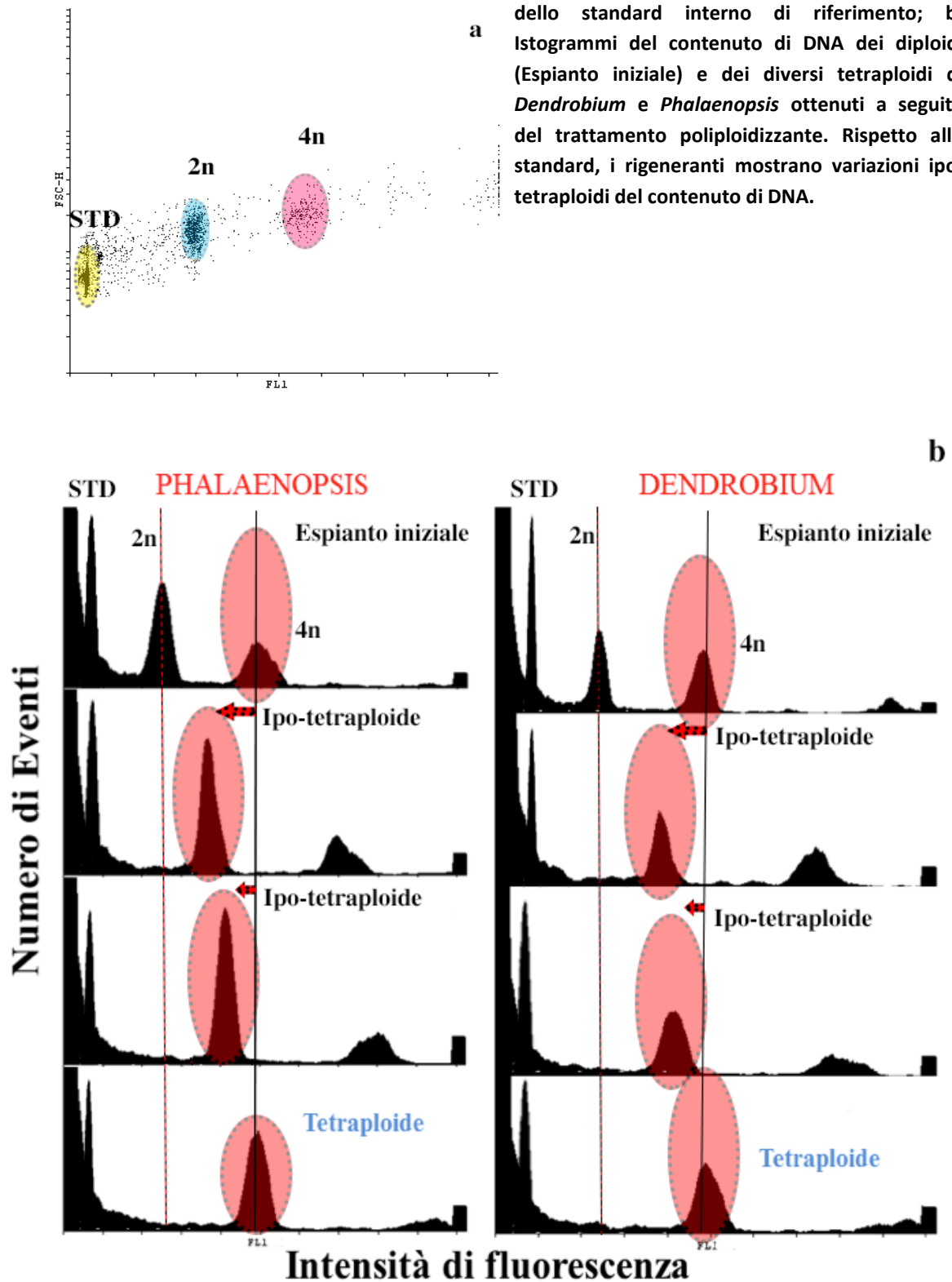
Specie	Tribu	Subtribu	Contenuto DNA (pg*2C-1)	Cromosomi per 2n nuclei
<i>Phalaenopsis memole</i>	Vandaeae	Aeridinae	2,98	38
<i>Phalaenopsis light</i>	Vandaeae	Aeridinae	2,88	38
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Vandaeae	Aeridinae	3,22	38
<i>Cattleya maxima</i>	Epidendreae	Laeliinae	3,03	40
<i>Cattleya intermedia</i>	Epidendreae	Laeliinae	2,45	40
<i>Dendrobium grosso</i>	Dendrobieae	Dendrobiinae	2,40	38
<i>Dendrobium phalaenopsis</i> x <i>D. loddigesii</i>	Dendrobieae	Dendrobiinae	2,05	38
<i>Every spring prince</i> x <i>P. memole</i>	Vandae	Aeridinae	2,10	38

Tabella 33. Contenuto di DNA per le specie di Orchidea prese in esame. Le misurazioni sono state ottenute tramite analisi citofluorimetrica utilizzando come standard interno nuclei di *R. sativus*.

3.10.1 Poliploidi e duplicazione parziale

Analizzando con maggiore attenzione tutti i singoli istogrammi, in relazione allo standard, abbiamo potuto vedere come in realtà molti dei tetraploidi individuati mostravano una duplicazione parziale e non totale, ossia avevano un contenuto di DNA inferiore rispetto all'atteso (Fig. 59).

Figura 59. a) dot plot contenuto di DNA (FL1) versus dimensioni (FSC): STD indica la posizione dello standard interno di riferimento; b) Istogrammi del contenuto di DNA dei diploidi (Espianto iniziale) e dei diversi tetraploidi di *Dendrobium* e *Phalaenopsis* ottenuti a seguito del trattamento poliploidizzante. Rispetto allo standard, i rigeneranti mostrano variazioni ipo-tetraploidi del contenuto di DNA.



Andando a sovrapporre i vari istogrammi relativi al contenuto di DNA, si nota ancora più chiaramente come in realtà si abbiano variazioni della ploidia con valori intermedi tra $2n$ e $4n$. abbiamo un ampio range di variazione e non soltanto alcuni valori di contenuto di DNA (Fig. 60).

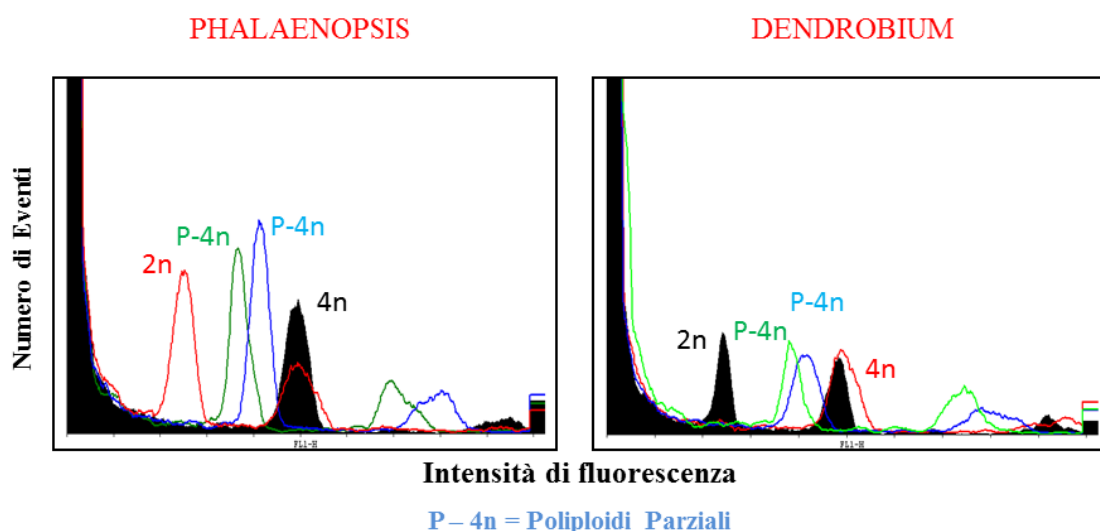


Figura 60. Sovrapposizione degli istogrammi del contenuto di DNA dei tetraploidi di *Dendrobium* e *Phalaenopsis*. Nella figura si può vedere come non ci sia una completa sovrapposizione, ma alcuni tetraploidi presentano un contenuto di DNA inferiore all'atteso e sono stati perciò denominati tetraploidi parziali (P-4n).

Per quanto riguarda *Every spring prince* x *Phalaenopsis* memole il range varia da 3,18pg a 4,10pg, in questo caso l'unico trattamento che aveva portato all'induzione di poliploidi era stato quello a 3 giorni con 0.075% colchicina, che ha generato 9 poliploidi, di cui 6 poliploidi parziali a vario grado (67% dei poliploidi ottenuti).

Nel caso di *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* quasi tutti i trattamenti hanno portato a mutanti poliploidi, per un totale di 30 individui, ma solo alcuni dei trattamenti hanno portato a dei poliploidi parziali con un range di contenuto di DNA variabile tra i 3,38 e i 4,05pg di DNA (Tab. 34).

Concentrazione	durata trattamento	poliploidi totali	poliploidi parziali
0	3	0	0
0,025	3	60	50
0,05	3	15	15
0,075	3	80	60
1,25	3	0	0
2,5	3	55	0
0	10	0	0
0,025	10	14	0
0,05	10	0	0
0,075	10	20	0
1,25	10	0	0
2,5	10	0	0

Tabella 34. Percentuale dei tetraploidi parziali rispetto a quelli totali in *Dendrobium*. In giallo sono evidenziati i trattamenti poliploidizzanti che hanno portato all'ottenimento di tetraploidi parziali, in questo caso solo il trattamento a 3 giorni per tutte le concentrazioni di colchicina provate.

Come possiamo vedere in Tab. 34 i trattamenti che hanno portato a mutanti con grado di poliploidizzazione parziale sono stati solamente quelli a 3 giorni e solo quelli condotti con colchicina. L'APM non ha prodotto effetti di poliploidizzazione parziale.

Dai nostri esperimenti di poliploidizzazione in *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesi* sono stati ottenuti complessivamente 18 mutanti con vario grado di ipo-tetraploidia.

Analizzando i dati di poliploidizzazione in *Dendrobium*, che, tollerando meglio la colchicina non ha subito danni necrotici, e sono perciò quelli più completi, possiamo affermare che la durata del trattamento e il tipo di agente mutagenizzante utilizzato hanno un effetto significativo sull'induzione e lo sviluppo dei poliploidi parziali. Questo fenomeno si evidenzia particolarmente per le esposizioni alla colchicina per i tempi minori (3gg); è possibile affermare che la breve esposizione al mutageno probabilmente non ha permesso la completa poliploidizzazione del materiale genetico di partenza.

3.11 Analisi molecolari

Le analisi molecolari sono state condotte sia con primer di tipo RAPD che con primer di tipo SSR sugli espianti iniziali da cui sono derivati gli ibridi utilizzati per le colture *in vitro* e le prove di poliploidizzazione.

3.11.1 Analisi RAPD

Questa tecnica trova un esteso campo di applicazione nella genetica delle popolazioni, grazie alla sua capacità di identificare marcatori specifici anche nel caso di ricombinazioni con caratteri dominanti (Waugh e Powell, 1992). Nel nostro caso questa tecnica è stata utilizzata per verificare il grado di variazione dei nostri poliploidi rispetto ai loro parentali. La metodologia sviluppata nel corso del lavoro sperimentale, ha consentito di utilizzare quantità minime di materiale vegetale ($\leq 100\text{mg}$ ca.) per l'isolamento rapido di DNA della qualità adatta per l'analisi RAPD. Abbiamo perciò analizzato gli aspianti provenienti da *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* e *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole*.

Per quanto riguarda *Dendrobium* le analisi sono state condotte sui genotipi di partenza, su due poliploidi totali e su sei poliploidi parziali, due per ogni diversa concentrazione di colchicina. Dei 22 primer di partenza ne abbiamo scelti 12 che hanno mostrato il maggior numero di bande sui nostri controlli (OPF-2, OPF-4, OPF-6, OPF-07, OPF-8, OPF-12, OPF-14, OPF-16, OPF-18, OPF-19, OPF-20, OPA-07). Abbiamo così ottenuto 207 bande di cui 62 (30%) sono risultate polimorfiche (Fig. 61).

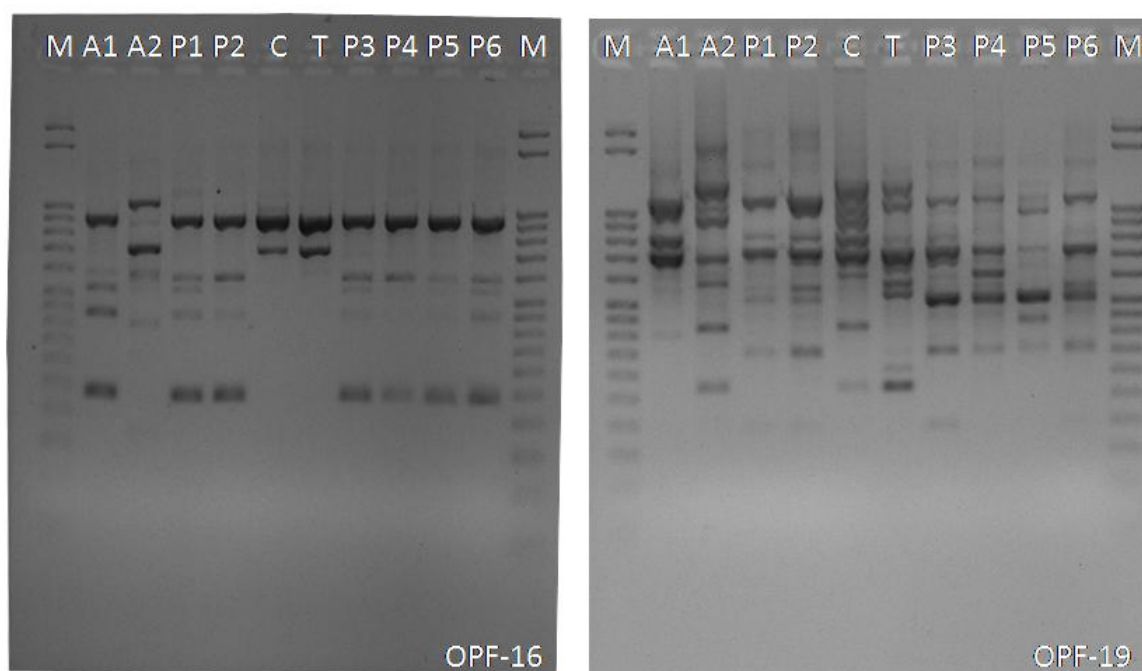


Figura 61. Profili RAPD di *Dendrobium* su gel d'agarosio all'1.5%. M= Marcatore molecolare 50bp ladder; A1 e A2 = Parentali di partenza: *D. phalaenopsis* e *D. loddigesii*; C = controllo: *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii*; T = Tetraploide: *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii*; P1, P2, P3, P4, P5, P6 = tetraploidi parziali: *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii*. Il polimorfismo tra i diversi individui è ben rappresentato.

Dall'analisi dei profili elettroforetici risulta come il controllo sia molto simile al tetraploide totale, mentre i tetraploidi parziali mostrano di profili variabili, a volte con assenza di alcune bande, a volte con presenza di bande in più rispetto al controllo o al tetraploide totale, ad evidenziare il rimaneggiamento genetico a cui sono stati sottoposti i PLBs. L'analisi è stata ripetuta per verificare la consistenza della risposta polimorfica, dimostrando un'eccellente ripetibilità di amplificazione e risoluzione dei polimorfismi.

I profili elettroforetici sono stati analizzati con un software di analisi di immagini per gel (TotaLab v.120, NonLinearDynamics), e sono state ricavate singole matrici di presenza-assenza delle bande che a loro volta ci hanno permesso di costruire un dendrogramma, per analizzare il grado di divergenza di ciascun poliploide analizzato (Fig. 62).

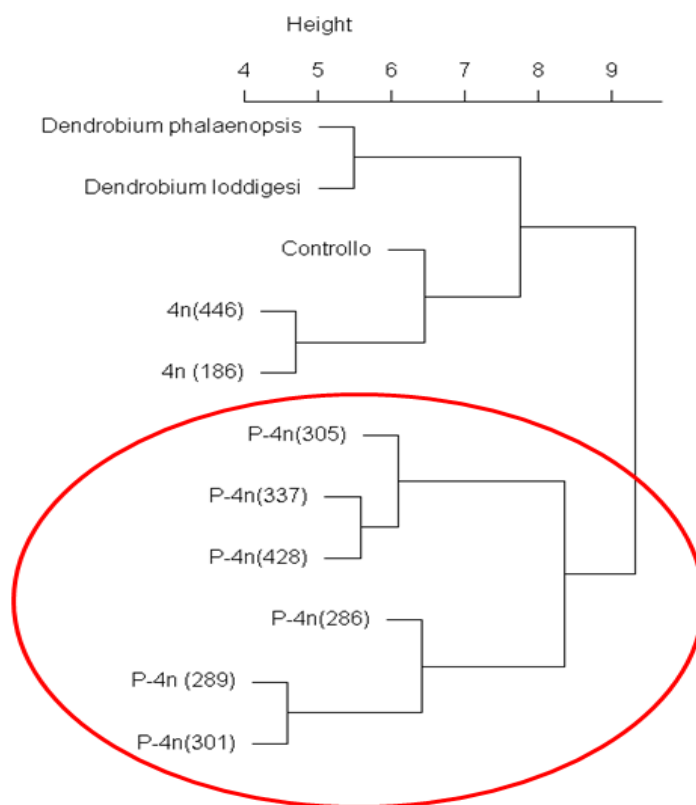


Figura 62. Cluster analysis dei dati ottenuti dall'analisi dei profili elettroforetici RAPD di *Dendrobium*. Si possono discriminare due distinti gruppi di associazione: il primo che comprende il controllo ed i tetraploidi totali, il secondo (cerchio rosso) comprende i tetraploidi parziali. In parentesi sono mostrati gli identificativi di rigenerazione dei singoli individui.

Come si può vedere in Figura 62 i poliploidi parziali formano un *cluster* a sè, ben distinto dal controllo e dai poliploidi completi, perciò la poliploidizzazione parziale in realtà ha fatto sì che si sviluppassero tutta una serie di variazioni genetiche, per cui ogni rigenerante a ploidia parziale risulta essere geneticamente diverso dall'altro.

Nel caso di *Every spring prince x Phalaenopsis memole* la situazione risulta simile, ma con meno marcatori polimorfici (10%) generati dai primer RAPD.

3.11.2 Analisi SSR

Le analisi SSR sono state condotte utilizzando 11 primer, sui poliploidi completi e parziali. Abbiamo ottenuto un 20% di bande polimorfiche.

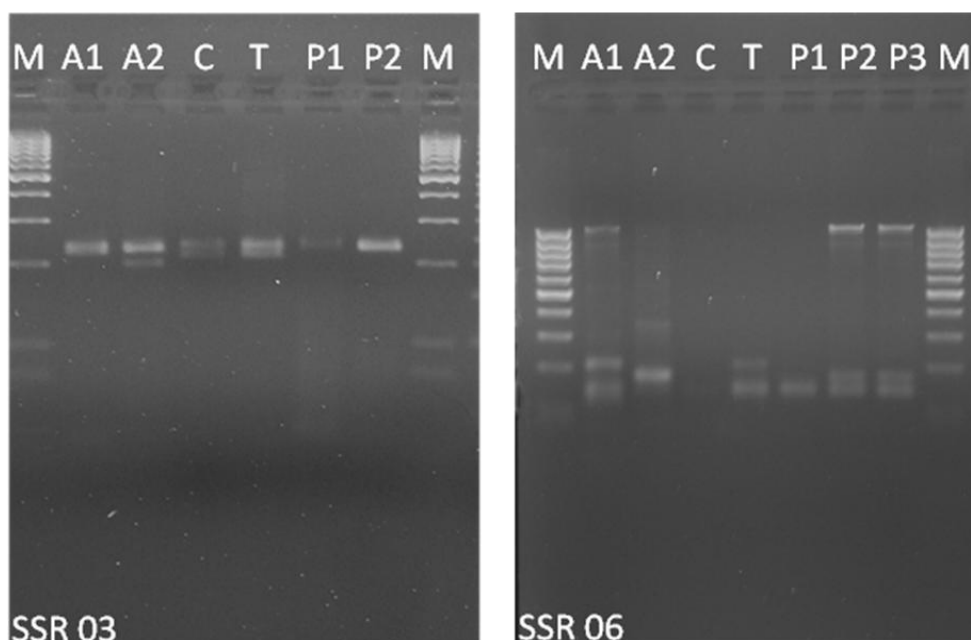


Figura 63. Profili SSR di *Dendrobium* su gel d'agarosio al 3%. M= Marcatore molecolare 100bp ladder; A1 e A2 = Parentali di partenza: *D. phalaenopsis* e *D. loddigesii*; C = controllo: *Dendrobium phalaenopsis x Dendrobium loddigesii*; T = Tetraploide: *Dendrobium phalaenopsis x Dendrobium loddigesii*; P1, P2, P3= tetraploidi parziali: *Dendrobium phalaenopsis x Dendrobium loddigesii*.

Anche in questo caso i poliploidi parziali di *Dendrobium* hanno mostrato profili elettroforetici diversi dai poliploidi totali e dai diploidi. Nel caso di *Phalaenopsis* le analisi SSR non hanno mostrato differenze significative tra poliploidi completi e parziali.

3.12 Analisi citogenetiche

Le analisi citogenetiche sono state condotte sui due genotipi di *Dendrobium* e *Phalaenopsis* posti a trattamento poliploidizzante col fine di riuscire ad evidenziare eventuali riarrangiamenti prodotti durante il processo di poliploidizzazione totale e/o parziale. Sono state perciò intraprese delle analisi citologiche per individuare il nuovo numero cromosomico anadatosi a formare e delle analisi FISH sui nuclei per riuscire ad individuare, laddove possibile, eventuali riarrangiamenti.

3.12.1 Conteggio cromosomico

Le analisi cariologiche sono state condotte su apici fogliari di giovani plantule in rapido accrescimento. È stata tentata una sincronizzazione del ciclo cellulare in metafase utilizzando 8-idrossichinolina il DNA è stato colorato seguendo il metodo Feulgen classico, ma questa metodica non ha portato risultati in quanto non è stato possibile visualizzare nuclei presenti nella parte meristemica dell'apice radicale.

Abbiamo quindi modificato la procedura di preparazione degli espianti rimuovendo il *velamen* e tagliando longitudinale la radice esponendola quindi al bloccante mitotico ed alla fissazione. Questa procedura ha consentito una migliore penetrazione dell' 8-idrossichinolina e l'accumulo di cellule in metafase. Ma ci siamo subito dovuti scontrare con il fatto che i cromosomi dei nostri espianti fossero molto piccoli e difficilmente individuabili (Fig. 64).

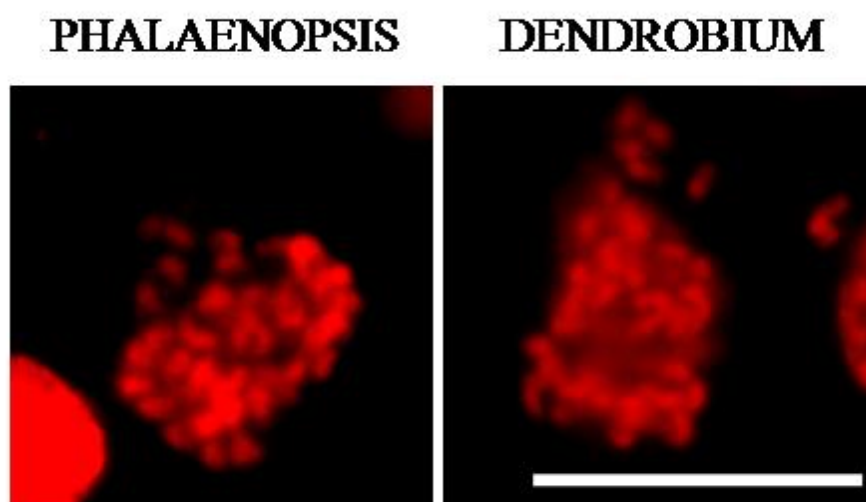


Figura 64. Colorazione Feulgen di piastre metafasiche, di apici radicali, di *Phalaenopsis* e *Dendrobium*. Barra=3 μ m.

Il conteggio è risultato particolarmente difficoltoso per la minima dimensione dei cromosomi delle due specie, anche piuttosto difforni tra loro. La rimozione del *velamen* ed il taglio longitudinale della radice è risultato possibile solo su radici di ampie dimensioni, provenienti da piante di più di un anno già in procinto di poter essere acclimatate in serra. Nei nostri espianti, con radici minute e piante di pochi mesi, questa operazione non è stata possibile. Tutti questi problemi tecnici non hanno reso possibile il conteggio dei cromosomi dei nostri poliploidi completi e parziali. Il numero cromosomico base riportato in bibliografia per entrambi i genotipi, è di 38 cromosomi (Tanaka e Kamemoto, 1974).

3.12.2 Caratterizzazione FISH

Le analisi di caratterizzazione FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) non potendo essere condotte sui cromosomi, sono state effettuate sui nuclei in sospensione estratti da tessuto fogliare fissato in formaldeide. Per la prima volta è stata messa a punto un sistema integrato che permette di utilizzare la FISH su nuclei in sospensione (FISHIS, Giorgi *et al.* 2013) estratti da tessuto fogliare.

Il procedimento per il rilascio dei nuclei in sospensione è molto simile a quello utilizzato per l'analisi citometrica della ploidia e del contenuto di DNA (Galbraith *et al.* 1983) ma con l'aggiunta di una fissazione iniziale in formaldeide (Sgorbati *et al.* 1986), preliminare alla marcatura dei nostri nuclei (Giorgi *et al.* 2013).

Innanzitutto abbiamo messo a punto il processo di fissazione sulle foglie provando 4 diversi tempi di fissazione a 5-10-20-40 minuti, prima di procedere con lo sminuzzamento dei tessuti. Il rilascio è stato valutato dopo sminuzzamento dei tessuti fissati e contando il numero di nuclei rilasciati per 30µl di soluzione tampone.

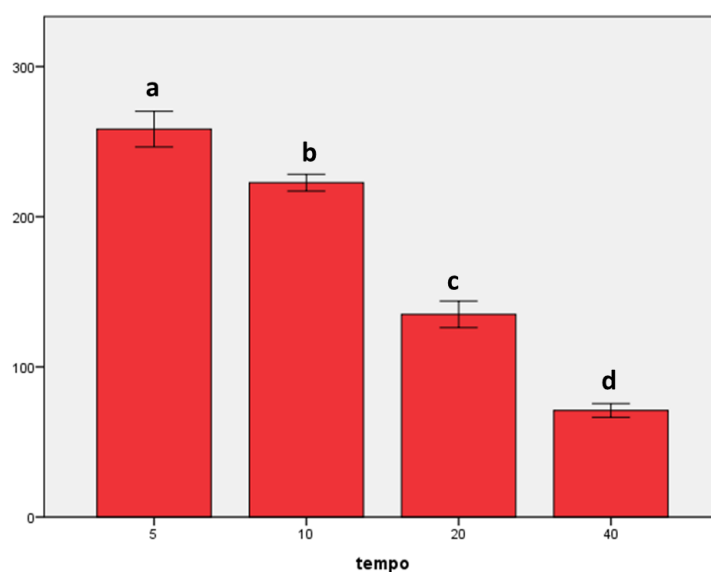


Figura 65. Istogramma che mostra il rilascio dei nuclei in funzione del tempo di fissazione in formaldeide delle giovani foglie. Il rilascio in ordinata è espresso per numero di nuclei presenti in 30 μ l di sospensione; le barre indicano l'errore standard. Le lettere indicano i raggruppamenti statisticamente significativi secondo il test di Duncan MRTs per $p \leq 0.05$.

Il rilascio migliore è stato ottenuto con 5 minuti di fissazione, all'aumentare del tempo di fissazione è corrisposta una diminuzione del rilascio dei nuclei (Fig. 65). I nuclei rilasciati e fissati sono stati sottoposti a marcatura in sospensione tramite denaturazione alcalina, che ha mostrato un effetto negativo sui nuclei fissati per 5 minuti in formaldeide degradandone il DNA, per cui abbiamo deciso di utilizzare i nuclei fissati in formaldeide per 10 minuti, che presentavano un rilascio inferiore ma che non mostravano danni dovuti alla denaturazione alcalina.

Le sonde utilizzate sono stati degli oligonucleotidi, marcati terminalmente da fluorocromi, che vanno ad ibridare su sequenze ripetute in specie vegetali ed in Orchidea (GAA, GA, pTa71, TTAGGG). L'ibridazione ha dato dei segnali chiari di marcatura fluorescente sia su *Dendrobium* che su *Phalaenopsis* (Fig. 66).

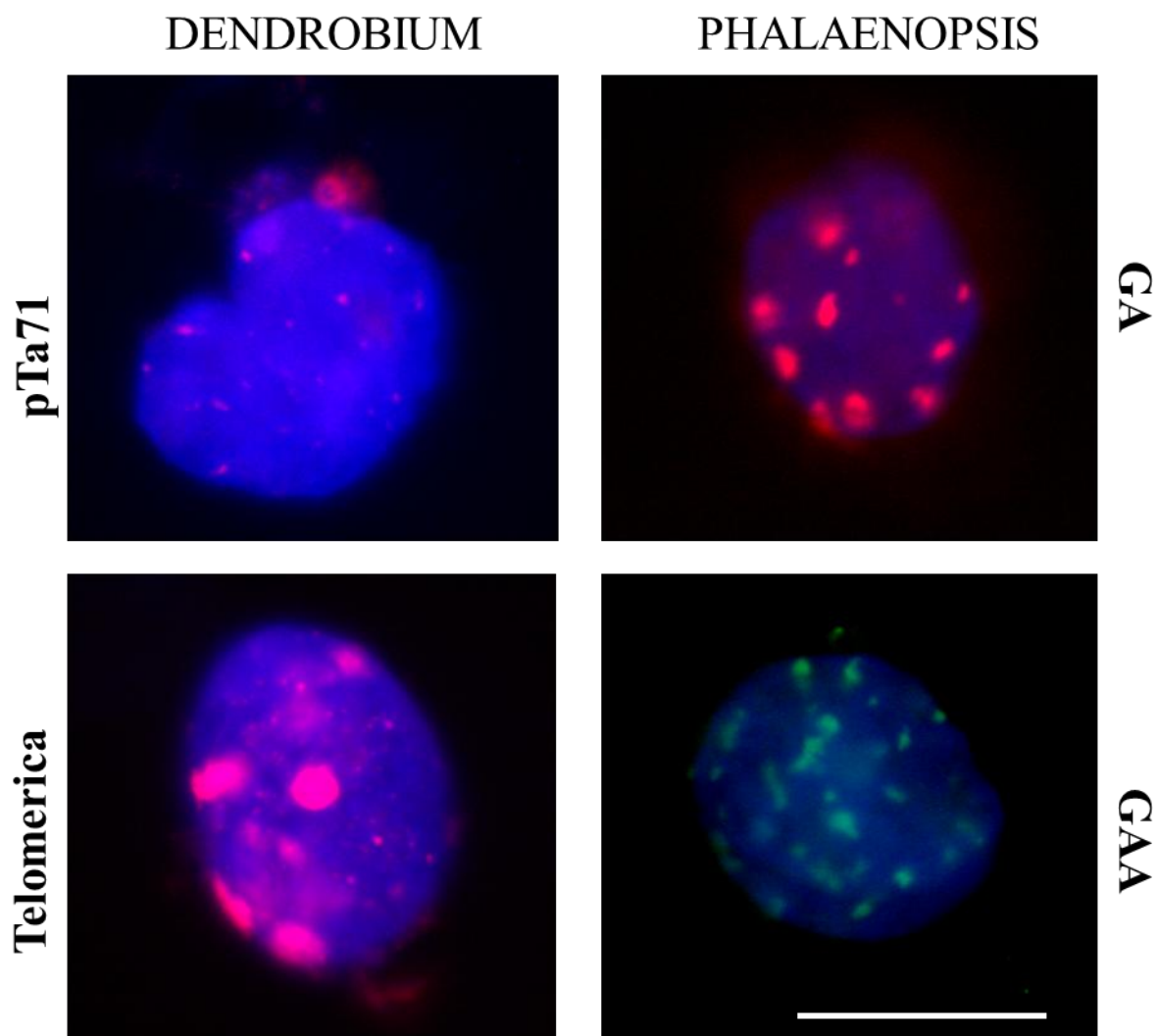


Figura 66. FISH in sospensione su nuclei di *Dendrobium* e *Phalaenopsis* estratti da tessuto fogliare fissato con le sonde fluorescenti: pTa71, GA, TTAGGG (Telomerica) e GAA. In rosso abbiamo le sonde marcate con fluoroforo CY3, in verde le sonde marcate FITC, la fluorescenza blu è quella emessa dal DAPI. Barra= 10µM.

Per la prima volta abbiamo ottenuto una marcatura FISH in sospensione di nuclei estratti da tessuto fogliare fissato in formaldeide. I segnali di ibridazione si sono dimostrati molto intensi in entrambi i genotipi, a conferma della buona presenza di sequenze ripetute nel genoma delle orchidee. Le due sonde che hanno mostrato la maggiore presenza sono state la sonda telomerica (TTAGGG) e la GA. Dall'esame microscopico, proprio a causa dell'abbondante presenza di segnali non è stato possibile evidenziare eventuali differenze di intensità di marcatura sui genotipi poliploidi completi e poliploidi parziali.

3.13 Analisi morfometriche

Le analisi morfometriche sono state condotte sui mutanti poliploidi ottenuti per *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* e *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole* al fine di identificare mutazioni fenotipiche. Sono stati presi in considerazione una serie di parametri come: il tasso di differenziamento (inteso come il numero di PLBs dai quali si è differenziata una plantula); la dimensione e la densità stomatica (un carattere da sempre utilizzato per stabilire il grado di ploidia di una pianta).

3.13.1 Tasso di differenziamento a plantula

A due mesi dal trattamento poliploidizzante, i PLBs sono stati trasferiti dal substrato liquido a quello solido al fine di indurre la proliferazione delle giovani plantule. Per quanto riguarda gli espianti di *Dendrobium*, lo sviluppo a plantula ha seguito tempi diversi, infatti non tutti i trattamenti hanno presentato lo sviluppo a plantula nello stesso momento. I trattamenti a 3 giorni con colchicina e tutti quelli con APM, hanno portato allo sviluppo di plantule. Mentre i trattati con colchicina per 10 giorni hanno impiegato più tempo per raggiungere il differenziamento, impiegando circa 9 mesi prima di arrivare allo stadio di plantula.

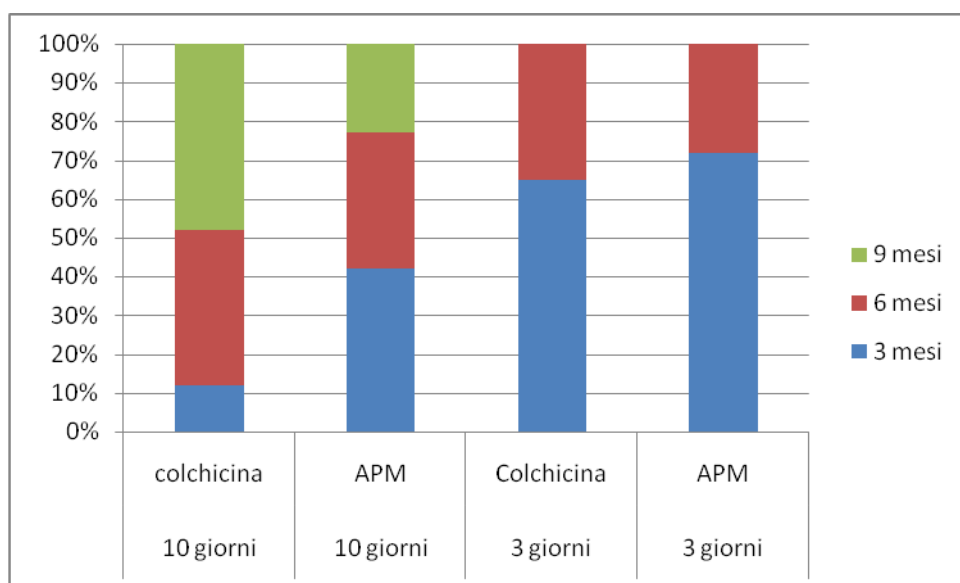


Figura 67. Istogramma cumulato della percentuale di rigenerazione a plantula dei PLBs nel tempo, secondo il trattamento poliploidizzante effettuato. Le valutazioni sul tasso di differenziamento delle plantule è stata effettuata a 3, 6 e 9 mesi.

Per quanto riguarda invece *Phalaenopsis* non ci sono state differenze nel tasso di sviluppo a plantula, ma dopo circa 6 mesi tutti i PLBs avevano raggiunto lo stadio di plantula.

3.13.2 Analisi morfometriche: dimensione e densità degli stomi

È stata valutata la dimensione e la densità degli stomi sulla pagina inferiore delle foglie dei nostri due genotipi sottoposti a poliploidizzazione. L'analisi è stata condotta su individui diploidi e poliploidi al fine di valutare eventuali differenze tra i due. A causa della ridotta dimensione delle foglie, è stato ritenuto opportuno utilizzare un "calco", fatto con un misto di colla ed acqua a fedele riproduzione della pagina fogliare, quest'ultima praticamente impossibile da esfoliare dell'epidermide per l'effettuazione dell'analisi. L'analisi microscopica e di immagine ci ha permesso di stimare dimensione e densità stomatica dei nostri espianti (Fig. 68). Le analisi, condotte su entrambi i genotipi, hanno conseguito risultati molto simili, consentendo di valutare la ploidia maggiore, ma non le variazioni di ipotetraploidia.

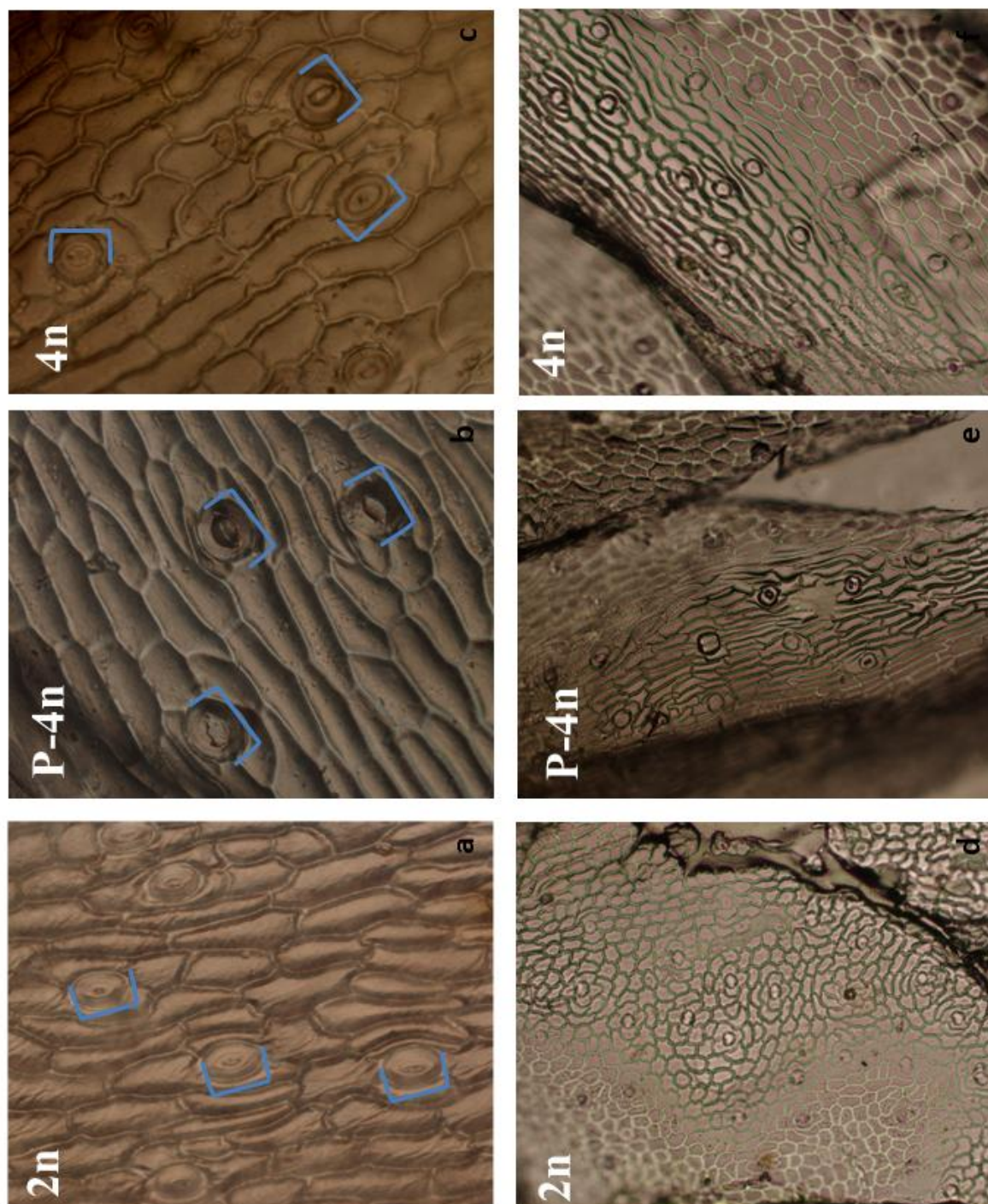


Figura 68. Analisi degli stomi e densità stomatica per i diploidi, tetraploidi parziali e tetraploidi completi di *Dendrobium*. Nelle figure a), b), c), possiamo vedere gli stomi, rispettivamente, di un diploide, di un tetrapode parziale e di un tetraploide totale. Nelle figure d), e), f) possiamo vedere la densità stomatica rispettivamente, del diploide, del tetraploide parziale e del tetraploide completo.

Per le dimensioni stomatiche è stata valutata la lunghezza e la larghezza degli stomi misurando le immagini acquisite al microscopio con un software di analisi di immagine. Mentre per quanto riguarda la densità stomatica, sono stati contati gli stomi presenti su una superficie di 1mm².

Ploidia	Frequenza degli stomi (no./campo microscopico)	Dimensione stomi	
		Lunghezza	Larghezza
Diploide	55,3 ± 0,45 ^b	12,5 ± 0,98 ^a	10,75 ± 0,88 ^a
Tetraploide parziale	20,1 ± 1,2 ^a	15,86 ± 0,74 ^b	14,5 ± 0,91 ^b
Tetraploide	18,67 ± 0,62 ^a	16,14 ± 1,1 ^b	13,73 ± 0,67 ^b

Tabella 35. Medie della frequenza, lunghezza e larghezza degli stomi dei diploidi, tetraploidi parziali e tetraploidi totali di *Dendrobium*. Le lettere indicano i raggruppamenti significativi secondo il Duncan MRTs per p≤0.05.

Come si può vedere in Tabella 35 le plantule diploidi di *Dendrobium phalaenopsis* x *Dendrobium loddigesii* hanno una densità stomatica elevata, pari a 55,3 stomi/mm², rispetto ai tetraploidi parziali e completi che invece ne possiedono rispettivamente 20,1 e 18,67, ma hanno una dimensione degli stomi inferiore rispetto a quest'ultimi. Le differenze riscontrate sono risultate essere statisticamente significative, tra i diploidi e i poliploidi parziali e completi, ma non tra i poliploidi parziali e completi. Infatti entrambi i tipi di poliploidi non mostrano differenze tra di loro ma solo con i diploidi, come dimostrato dal test di Duncan MRTs.

Situazione molto simile è stata trovata per quanto riguarda *Every spring prince* x *Phalaenopsis memole*, dove la dimensione e la densità stomatica sono state valutate simultaneamente a *Dendrobium*.

Ploidia	Frequenza degli stomi (no./campo microscopico)	Dimensione stomi	
		Lunghezza	Larghezza
Diploide	45,66 ± 0,95 ^b	14,5 ± 0,58 ^a	11,96 ± 0,98 ^a
Tetraploide parziale	15,52 ± 1,22 ^a	18,86 ± 0,61 ^b	15,32 ± 0,72 ^b
Tetraploide	14,12 ± 0,62 ^a	17,95 ± 1,08 ^b	16,24 ± 0,59 ^b

Tabella 36. Medie della frequenza, lunghezza e larghezza degli stomi dei diploidi, tetraploidi parziali e tetraploidi completi di *Phalaenopsis*. Le lettere indicano i raggruppamenti significativi secondo il Duncan MRTs per $p \leq 0.05$.

Come possiamo vedere in Tabella 36 le plantule diploidi hanno una densità stomatica superiore, con 45,66 stomi/mm², rispetto a quelle tetraploidi parziali e totali (rispettivamente di 15,52 e 14,12). Anche le dimensioni sono diverse, le plantule diploidi possiedono degli stomi più piccoli rispetto a quelle tetraploidi, ma come in *Dendrobium* non c'è una differenza significativa tra i poliploidi parziali ed i poliploidi completi.

3.13.3 Valutazioni morfometriche

I poliploidi parziali e completi ed i diploidi di partenza hanno raggiunto lo stadio di plantule, ma non è stato ancora possibile condurre delle valutazioni morfologiche attendibili in quanto le dimensioni attuali di queste giovani plantule non permettono un'analisi statisticamente significativa (Fig.69).



Figura 69. Giovani plantule rigenerate da PLBs in seguito a trattamento poliploidizzante. Da sinistra verso destra, abbiamo un esempio di pianta diploide, tetraploide parziale e tetraploide totale.

DISCUSSIONE

4.0 Discussione

Le *Orchidaceae*, grazie alle loro innumerevoli specie e bellissimi fiori, occupano un ruolo centrale nel commercio delle specie a scopo ornamentale, con un ingente fatturato annuo (Griesbach, 2002). Nonostante questa enorme variabilità di forme, già presente all'interno della, la richiesta per nuove varietà di anno in anno è sempre più forte. Questo fa sì che il commercio sia sempre alla ricerca di combinazioni nuove e migliori, sempre più appetibili dal punto di vista del consumatore finale.

Questa richiesta costante di nuove varietà si va però a scontrare con i lunghi tempi di sviluppo delle Orchidee che rendono il processo di produzione molto laborioso e dispendioso, condizione quest'ultima che ha portato lo spostamento delle produzioni dall'Europa al Sud-Est Asiatico.

Lo sviluppo di tecniche e metodiche che velocizzino l'intero processo gioca perciò un ruolo chiave per l'industria modiale. In quest'ottica, l'obiettivo del dottorato ed il lavoro di ricerca è stato concepito con l'idea di mettere a punto delle tecniche veloci, riproducibili ed altamente efficienti nell'induzione di nuova variabilità genetica nelle Orchidee.

Per fare questo abbiamo selezionato delle metodiche, quali l'ibridazione somatica e la poliploidizzazione *in vitro*, che si sono già dimostrate efficienti su altre specie e le abbiamo applicate ad i nostri genotipi di interesse, aggiungendo come tecnica fondamentale la citometria a flusso. La citometria a flusso si è dimostrata una tecnica efficace nel discriminare in maniera precoce il materiale di interesse.

I materiali vegetali oggetto della sperimentazione sono stati scelti in collaborazione con la ditta Floramiata S.p.A. ciò ci ha permesso di lavorare su varietà di interesse commerciale, quindi già in possesso una solida base di caratteristiche ornamentali interessanti. La prima fase del processo è stata quella di indurre negli espianti una alta proliferazione *in vitro*, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo dei PLBs, strutture uniche delle Orchidee, con spiccate caratteristiche embriogenetiche, e sulle quali si è incentrato principalmente il lavoro. La proliferazione dei PLBs partendo da seme si è dimostrata rapida ed efficiente, su terreno privo di ormoni, per tutti i genotipi presi in esame (Fig. 25-26); la risposta per quanto riguarda

l'induzione dei PLBs partendo da tessuti differenziati come le foglie è stata variabile e imprevedibile (Fig. 31). Lo sviluppo da PLBs a plantula ed il loro mantenimento ha richiesto il supplemento di ormoni nel terreno di coltura e dell'utilizzo di carbone attivo per quanto riguarda *Phalaenopsis*, a causa dell'eccessiva produzione di polifenoli (Fig. 29). Tra i diversi generi presi in esame (*Dendrobium*, *Phalaenopsis* e *Cattleya*) è stato evidenziato un diverso tasso di accrescimento e sviluppo, il che rende molto difficile pensare ad una condizione di coltura *in vitro* unica per tutti. A conferma di questo, non sono presenti in letteratura studi che riportino condizioni di coltura ed induzione embriogenetica su un ampio spettro di orchidee, infatti i protocolli sono molto spesso genotipo e tessuto specifici (Chugh *et al.* 2009), ad ulteriore conferma dell'enorme variabilità presente nella famiglia. La scelta dei genotipi da analizzare è ricaduta perciò su quegli espianti che hanno dimostrato un'alta adattabilità a diverse condizioni di coltura ed una buona risposta moltiplicativa.

Notevoli sforzi sono stati dedicati alla messa a punto di un protocollo per l'isolamento e la rigenerazione dei protoplasti di orchidea. Le giovani foglie sono state inizialmente il nostro espianto di scelta, ma nonostante la messa a punto di un protocollo efficiente, sia in termini di rilascio che di vitalità, i protoplasti si sono dimostrati recalcitranti alla rigenerazione (Fig. 44). Abbiamo perciò utilizzato come sorgente di protoplasti i PLBs. Il nuovo tipo di espianto ha richiesto uno specifico protocollo per l'isolamento che comunque ha prodotto buoni risultati (Fig. 37; Tab. 22). Una volta messi in coltura, i protoplasti isolati da PLBs si sono dimostrati più reattivi e infatti sono stati gli unici che hanno mostrato una risposta rigenerativa con l'avvio di alcune divisioni cellulari (Fig. 44). Per incrementare la risposta di proliferazione cellulare sono stati utilizzati diversi terreni, sia già sperimentati nelle orchidee, sia derivati da utilizzi su altre specie, supplementati con diversi ormoni a diverse concentrazioni e con diverse sostanze note per la loro capacità di stimolazione delle divisioni cellulari (Tab. 23). Il complesso piano sperimentale ci ha permesso di trovare le condizioni a sostegno delle prime divisioni cellulari, senza tuttavia riuscire nell'obiettivo di ottenere completo differenziamento e rigenerazione da colonie generate da protoplasti di orchidea. La prima componente rilevante che ha influenzato la risposta *in vitro* è stata la scelta del tipo di espianto da utilizzare. Infatti, i protoplasti isolati da strutture differenziate come le foglie si sono dimostrati recalcitranti ad entrare in uno stadio proliferativo, anche a espianti causa di sostanze inibenti la crescita rilasciate durante l'isolamento. I risultati ottenuti dall'utilizzo di espianti in fase proliferativa come i PLBs sono stati incoraggianti e possono indicare una strada da percorrere per ottenere

rigenerazine in una famiglia sino ad oggi dimostratasi ostinatamente recalcitrante nella produzione di protoplasti totipotenti ((Davey *et al.* 2005a; Davey *et al.* 2005b; Davey *et al.* 2007). Il secondo fattore che si è dimostrato in grado di promuovere una risposta proliferativa è stato l'alginato di sodio. L'utilizzo di microcapsule come ambiente di allevamento dei protoplasti ha stimolato l'induzione delle prime divisioni cellulari, fornendo anche un ausilio tecnico importante nel facilitare le successive manipolazioni, e facendo sì che venisse ridotta la produzione di polifenoli, inibenti la crescita cellulare (Power *et al.* 2004). L'alginato di sodio si è dimostrato più efficiente dell'agar o dell'agarosio (Dovzhenko *et al.* 2003), soprattutto grazie al suo processo di polimerizzazione che avviene a temperatura standard. Le concentrazioni di alginato maggiormente addensanti sono state quelle che hanno prodotto i migliori effetti in termini di proliferazione cellulare, come già dimostrato nel caso di *Phalaenopsis* per i protoplasti isolati da sospensioni cellulari (Shesthra *et al.* 2007). L'utilizzo di varie concentrazioni di ormoni, come NAA e 2;4-D di per sé non è risultato significativo nell'incrementare le divisioni (Tab. 25), senza però mostrare effetti detrimental per la coltura. Il fatto che i protoplasti di Orchidea non fossero influenzati dai supplementi presenti nel terreno di coltura ci ha portato a ipotizzare che il problema potesse essere lo scambio tra il protoplasto ed il mezzo circostante. Abbiamo perciò utilizzato un surfattante, il Pluronic F-68, per aumentare gli scambi protoplasto in ambiente di coltura. L'uso di surfattanti non ionici come il Pluronic F-68 è molto diffuso nelle colture animali e da non molto è stato utilizzato su cellule vegetali (Kumar *et al.* 1992; Lowe *et al.* 2001). Questo composto è noto interagire con le proteine lipidiche di membrana favorendo gli scambi e l'apporto di nutrienti ed ossigeno, e di conseguenza aumentando e promuovendo le divisioni cellulari (Lowe *et al.* 2001; Kumar *et al.* 1992). Partendo da queste evidenze sperimentali ottenute per *Solanum dulcamara* (Kumar *et al.* 1992), abbiamo utilizzato il Pluronic F-68 per implementare il nostro sistema di protoplasti di Orchidea. L'effetto del composto si è dimostrato determinante per l'induzione delle prime divisioni (Tab. 25), tanto che solo quelle combinazioni di coltura che hanno previsto il Pluronic all'1% hanno mostrato un aumento significativo del numero di divisioni (Fig. 45). Questa osservazione, a nostro giudizio, può essere d'importanza per lo sviluppo di ulteriori studi sull'utilizzo di surfattanti in grado di aumentare il metabolismo e fornire stimolo per l'induzione di proliferazione cellulare in specie recalcitranti. Per le prove con ormoni, un'interazione positiva con il Pluronic F-68 è stata rilevata per il 2,4-D, a tutte le concentrazioni utilizzate, tanto che il trattamento che ha

prodotto il maggior numero di divisioni cellulari è stato quello con alginato di sodio allo 0.5%, 1% Pluronic F-68 e 10 μ M 2;4-D .

I dati raccolti con le sperimentazioni sull'induzione della totipotenza in protoplasti di orchidea testimoniano il ruolo fondamentale dell'espianto di partenza in tutto il futuro sviluppo del sistema di rigenerazione, con gli altri fattori che rivestono ruoli decrescenti di importanza a partire dal supporto solido, l'alginato di sodio, e dall'utilizzo del Pluronic F-68.

La scarsa capacità rigenerativa dei protoplasti non ci ha permesso di spingerci molto oltre con lo sviluppo e l'implementazione delle metodiche di fusione, dato che non potevamo monitorare l'influenza di tale processo sul successivo sviluppo, però abbiamo comunque utilizzato la citometria a flusso come mezzo per discriminare precocemente i prodotti di fusione generati. Utilizzando la capacità del citometro di discriminare le particelle presenti nel campione in base alla loro forma ed emissione fluorescente, abbiamo analizzato i protoplasti in seguito al processo di fusione e siamo riusciti ad individuare quelle cellule che presentavano l'intensità di fluorescenza ed il *forward scatter* atteso per i protoplasti fusi (Fig. 42). Questa analisi è stata condotta solo per i prodotti generati dall'elettrofusione in quanto la fusione chimica, non essendo controllabile nel processo di appressamento dei protoplasti, ha prodotto dei macro aggregati non adatti all'analisi ciotfluorimetrica. Gli ibridi somatici da elettrofusione sono stati individuati precocemente, subito dopo la fusione delle membrane e grazie al riconoscimento vitale effettuato tramite il *cell sorter*, sono stati selezionati ed incapsulati in microgocce di alginato, secondo la tecnologia sviluppata da Lucretti (1992). Il poter portare avanti solo il materiale di reale interesse riduce notevolmente i costi ed i tempi dell'intero processo, potendo da subito verificare le caratteristiche del materiale fuso. La micro incapsulazione via *cell sorter* si presta anche all'analisi di prodotti non necessariamente di fusione come protoplasti isolati che possono essere arricchiti per determinate caratteristiche, come vitalità, forma, contenuto di particolari sostanze.

L'altro filone su cui ci siamo concentrati è stato quello dell'induzione di mutanti poliploidi. La poliploidizzazione indotta ha rappresentato da sempre, in campo ornamentale, una sorgente di nuovo materiale con caratteristiche fiorali di rilievo. Nelle orchidee è stata ampiamente documentata (Kamemoto *et al.* 1972; Griesbach, 1981; Watrous e Wimber, 1988; Sarathum *et al.* 2010), trovando il principale ostacolo al suo impiego nei lunghi tempi di sviluppo della pianta che ritardando la valutazione ne aumenta i costi, dovendo portare avanti

tutto il materiale sottoposto a processo prima di giungere ad una selezione dei nuovi genotipi di interesse. Nell'ottica di ridurre i tempi di selezione e massimizzare l'efficienza abbiamo sviluppato un sistema integrato di poliploidizzazione dei PLBs ed analisi citometrica. L'aver messo a punto un protocollo efficiente per lo sviluppo dei PLBs in coltura liquida, ci ha permesso di poter indurre mutanti poliploidi in un sistema ad alta produttività e di facile manipolazione. I PLBs in coltura liquida offrono due vantaggi fondamentali, da un lato aumentano in maniera esponenziale il materiale che è possibile trattare, in quanto in sospensione è possibile mantenere centinaia di PLBs occupando lo spazio di una beuta, e riducendo costi e tempi; dall'altro lato, i PLBs immersi in un mezzo liquido possiedono tutte le loro cellule esposte all'agente poliploidizzante, condizione favorevole rispetto al mezzo solido dove le cellule esposte direttamente al mutageno sono quelle a contatto del substrato. Sono stati utilizzati due tipi di agenti antimitotici, la colchicina, da tempo ampiamente impiegata in campo vegetale (Dhooghe *et al.* 2011), e l'APM, quest'ultimo caratterizzato da una maggiore affinità per la tubulina vegetale, rispetto alla colchicina (Morejohn e Fosket, 1982).. Le fasi della poliploidizzazione sono state controllate durante l'esperimento, valutando l'accrescimento nel tempo come peso fresco dei PLBs e il loro grado di contenuto di DNA, attraverso l'analisi citofluorimetrica. Come nel caso della coltura *in vitro* per la propagazione degli espianti, anche in questa serie di esperimenti abbiamo potuto constatare la differente risposta al trattamento in base al genotipo analizzato, sia in termini di peso fresco (Fig. 46-47), che in termini di efficacia del processo di poliploidizzazione e di tossicità al trattamento (Fig. 51-54), *Dendrobium* si è dimostrato un genotipo che ben tollera al trattamento rispetto a *Cattleya* e *Phalaenopsis*, che invece hanno mostrato uno scarso grado di accrescimento e necrosi dei tessuti per alcuni dei trattamenti utilizzati. Per quanto riguarda *Dendrobium* il primo dato interessante è stato quello riscontrato per l'incremento del peso fresco, a due mesi dall'inizio del trattamento poliploidizzante; i PLBs trattati, hanno mostrato un tasso più elevato rispetto al controllo (Fig. 46), con delle differenze interne dovute alla durata del trattamento e al tipo di agente antimitotico utilizzato (Fig. 46). Il trattamento che ha prodotto una maggior resa è stato quello con il tempo di esposizione a 3 giorni, con la resa maggiore ottenuta con il trattamento con APM (Fig. 46), questo risultato è stato molto probabilmente dovuto ad un effetto meno tossico sui tessuti vegetali rispetto alla colchicina (Wan *et al.* 1991; Hansen e Andersen, 1996; Dooghe *et al.* 2011) alla quale si propone come un'ottima per l'induzione di poliploidi per alcune specie vegetali. Questo tasso di accrescimento differente rispetto al controllo non è stato significativo invece per quanto

riguarda i genotipi di *Cattleya* e *Phalaenopsis* (Fig. 47), anche se confrontando tra loro i controlli dei tre diversi genotipi, si vede come i PLBs di *Cattleya* e *Phalaenopsis* abbiano in sospensione uno sviluppo minore rispetto a *Dendrobium*, e quindi molto probabilmente la proliferazione minore non permette, in una prima fase di osservazione, di notare differenze tra il controllo ed i trattati.

Alla valutazione degli effetti sulla propagazione *in vitro*, e' stata affiancata quello di sviluppo e messa punto di un sistema di rilevazione della ploidia rapido, efficiente e non distruttivo del campione biologico, in grado di consentire l'individuazione precoce della variabilita' indotta, in termini di poliploidizzazione, con riflessi positivi sia sui tempi che sui costi di produzione dei materiali. Un ruolo fondamentale è stato rivestito dall'analisi citometrica effettuata durante il corso dell'esperimento di poliploidizzazione sui PLBs. L'analisi è stata condotta prendendo un insieme rappresentativo di PLBs (150mg, pari a circa 10 singoli PLBs) ed estraendone i nuclei per l'analisi al citometro. Quello che si è visto è stato una curva di distribuzione della fluorescenza associata al contenuto di DNA, con una serie di picchi, o associazioni modali, che abbiamo assunto come rappresentativi del contenuto di DNA dell'insieme delle sottopopolazioni a ploidia variabile presenti nel campione totale. Ripetendo questa analisi nel tempo, abbiamo monitorato l'andamento della poliploidizzazione del campione evidenziandone la sua struttura ed il cambiamento della composizione di ploidia nel tempo. Monitorare l'evoluzione della popolazione cellulare ci ha permesso di poter valutare l'influenza della colchicina e dell'APM sui tessuti di Orchidea. Abbiamo utilizzato come indice sintetico il *cycle value* (Barow e Meister, 2003), che ci fornisce una misura sul grado di endopoliploidizzazione del tessuto. Guardando in Fig. 50 possiamo vedere come l'andamento sia differente a seconda del tempo di esposizione all'agente poliploidizzante. Nel caso dell'esposizione a 3 giorni, eliminando il bloccante dalla coltura liquida, il grado di ploidia del tessuto continua ad aumentare, fino a raggiungere un massimo intorno ai 15 giorni: Nel caso del trattamento a 10 giorni l'andamento tende a revertire verso quello del controllo poichè, già prima di togliere la colchicina, o l'APM, il grado di ploidia comincia a decrescere. La spiegazione più plausibile per questo andamento paradossale potrebbe essere dovuto alla tossicità della colchicina quando rimane a contatto dell'espianto per tempi prolungati (Dooghe *et al.* 2011). È stato ampiamente dimostrato come per concentrazioni elevate o per tempi molto lunghi la colchicina abbia un effetto dannoso producendo poliploidi con numeri cromosomici diversi e anormali (Dhooghe *et al.* 2001); in questo senso quindi è probabile

che, durante il trattamento a 10 giorni, le cellule proliferanti dei PLBs, esposte così a lungo alla colchicina o all'APM, siano andate incontro a questo tipo di aberrazione che ha eliminato le cellule così alterate. Ciò potrebbe spiegare il decremento del grado di ploidia durante il trattamento e il minor peso fresco rispetto ai PLBs trattati per 3 giorni. Il più rapido mostra invece una spinta alla proliferazione e, una volta rimosso l'agente bloccante, le cellule a varia ploidia hanno ripreso il loro accrescimento. Gli espianti trattati mostrano un incremento del peso fresco ed una vigoria di crescita molto probabilmente dovuto alla condizione poliploide che stabilizza il genoma ibrido di partenza e ne consente una migliore funzionalità (Chen, 2010).

Le plantule rigenerate dai PLBs trattati sono state sottoposte ad analisi citometrica che ci ha permesso di individuare e discriminare i poliploidi ottenuti dai diploidi di base. La percentuale di poliploidi maggiore è stata recuperata con il trattamento a 3 giorni. Il dato interessante è la corrispondenza con il risultato ottenuto effettuando lo *screening* precoce sui PLBs. Infatti quei trattamenti che valutati dopo un mese sui PLBs si erano dimostrati significativi per il loro valore di *cycle value* sono poi stati quelli che hanno prodotto il numero di tetraploidi maggiormente significativo (Tab. 31). In particolar modo tutti i trattamenti che hanno portato a valori di *cycle value* maggiori di 1, hanno poi prodotto un numero consistente di tetraploidi. D'altra parte invece quei trattamenti che in una prima analisi non avevano valori di *cycle value* che si scostavano significativamente dal controllo non hanno prodotto tetraploidi, come nel caso di *Cattleya maxima* dove non c'è stato alcun effetto poliploidizzante. Questo dato consente di poter utilizzare in futuro lo *screening* precoce sui PLBs come una tecnica per poter stabilire in maniera rapida ed efficiente i trattamenti che favoriscono lo sviluppo di genotipi poliploidi ed eliminare tutto il materiale sperimentale che non risulti di interesse.

L'analisi attenta del contenuto di DNA dei tetraploidi ha mostrato delle differenze tra singoli rigeneranti in termini di quantità di DNA in pg, ossia abbiamo ritrovato delle piante con contenuto di DNA minore di quello atteso (Fig. 59). Questa situazione è già stata osservata nelle piante e trae origine da un fenomeno denominato *Genome Downsizing* (Leitch *et al.* 2002), ossia la perdita di una porzione di DNA a seguito di un fenomeno di poliploidizzazione naturale (Leitch *et al.* 2002) e/o indotta tramite agenti antimitotici (Bennet e Jellings 1975). Nelle Orchidee questo fenomeno è stato recentemente scoperto, attraverso l'analisi citofluorimetrica, in *Vanilla* (Bory *et al.* 2002) e in *Gymnadenia* (Travnicek *et al.* 2011), dove

alcuni genotipi andati incontro a poliploidizzazione naturale hanno mostrato un contenuto di DNA minore dell'atteso e dove, negli stessi tessuti endopoliploidi presenti nella pianta, i nuclei rappresentanti i diversi livelli di ploidia presentavano fenomeni di endoreduplicazione parziale. Nel *Genome Downsizing* l'eliminazione di parte del DNA è stato recentemente dimostrato essere a carico delle sequenze ripetute presenti nel genoma (Renny-Byfield *et al.* 2011). In questo lavoro, abbiamo documentato per la prima volta il fenomeno nelle Orchidee in seguito a poliploidizzazione indotta invece che naturale. I poliploidi parziali ottenuti sono teoricamente differenti l'uno dall'altro. Le analisi citologiche per individuare il numero e le dimensioni dei cromosomi non hanno portato risultati utili, in quanto i cromosomi sono molto piccoli e le radici sulle quali fare le analisi citologiche non sono facilmente ottenibili e quindi non è stato possibile effettuare una corretta analisi microscopica. Più promettente è stata la marcatura FISHIS dei nuclei in sospensione. Per la prima volta abbiamo messo a punto un metodo per marcare in sospensione nuclei estratti da tessuto fogliare fresco, le sonde utilizzate sono state delle brevi sequenze di DNA che andavano ad ibridare sequenze microsatelliti, con l'intento di indagare se la variazione del contenuto di DNA fosse a carico di queste zone come dimostrato in altre specie attraverso il sequenziamento dell'intero genoma (Renny-Benfield *et al.* 2011). I nostri genotipi di *Dendrobium* e *Phalaenopsis* hanno mostrato una buona marcatura FISHIS, confermato l'elevata presenza nel genoma delle *Orchidaceae* di sequenze ripetute (Fig. 63).

Le analisi molecolari condotte con RAPD ed SSR sui nostri espianti poliploidi parziali e completi hanno messo in evidenza l'effettiva presenza di differenze genetiche tra gli individui (Fig. 61-63). Infatti, i poliploidi parziali hanno mostrato profili elettroforetici diversi da i poliploidi completi e dal controllo, come confermato a livello di analisi statistica dei polimorfismi rilevati su gel tramite *Cluster Analysis* condotta sulle matrici di presenza/assenza delle bande. I dati hanno formato un cluster a sé per i materiali di partenza e per i tetraploidi completi verso quelli parziali (Fig. 62). I diversi profili RAPD ed SSR dimostrano che è presente una differenza genetica di circa il 30% tra i diversi poliploidi ottenuti.

Conclusioni

Il presente lavoro di dottorato ha avuto come obiettivo quello di individuare e mettere a punto un sistema per l'induzione di nuova variabilità nelle specie ornamentali, e specificamente nelle orchidee. Ci si è prefissi il raggiungimento di questo risultato con metodiche che, sfruttando le possibilità offerte dalle moderne biotecnologie, consentissero di ridurre sia i tempi che l'impegno in materiale biologico da trattare, contenendo anche i costi finali del progetto complessivo per la produzione del nuovo materiale vegetale. L'ottenimento di nuovi mutanti è quindi stato ricercato attraverso l'affiancamento, alle metodologie classiche proprie della citogenetica e della micropropagazione, dei nuovi strumenti biotecnologici, in particolar modo dell'analisi citofluorimetrica a flusso.

I genotipi iniziali utilizzati nelle ricerche oggetto del dottorato hanno mostrato risposte genotipo-dipendenti, rendendo più articolata la messa a punto di un protocollo unico per lo sviluppo e la proliferazione di nuove linee; di contro ciò ha consentito di delineare un processo applicabile a più ampio raggio nel settore delle specie ornamentali.

I diversi approcci seguiti per cercare di indurre variabilità genetica in Orchidea, hanno conseguito risultati alterni, come nel caso degli esperimenti condotti per indurre totipotenza e rigenerazione da protoplasti. Questi hanno confermato la loro recalcitranza alla rigenerazione *in vitro* ma, nonostante non sia stata ottenuta la rigenerazione dal protoplasto di una plantula, sono stati fatti passi avanti nel definire ulteriori condizioni che possono influire sul differenziamento *in vitro*, quali l'uso dell'alginato di sodio come mezzo di supporto solido alla crescita del protoplasto e del Pluronic F-68 per favorire gli scambi di nutrienti e gas tra la cellula e l'ambiente circostante.

E' stato perseguito anche l'approccio di ibridazione di somatica, affiancando le due metodologie di fusione più utilizzate, quella via PEG e quella tramite elettrofusione, cercando di capire se una fusione tra cellule derivanti da espianti reattivi e proliferanti come i PLBs potesse far recuperare la totipotenza cellulare ai protoplasti di orchidee. Queste prove, condotte anche con l'ausilio del citofluorimetro *cell sorter*, hanno consentito di valutare l'efficienza del processo di fusione e gli effetti benefici di un microincapsulamento specifico dei singoli ibridi, almeno per le prime fasi di dedifferenziamento.

Molto utile si è rivelato lo sviluppo e l'uso di strutture altamente rigenerative protocormo-simili, i PLBs, per i quali è stato sviluppato un sistema di propagazione in terreno liquido in grado di promuoverne il rapido sviluppo con alta densità colturale. Questo risultato si è dimostrato di grande importanza per il passo successivo verso la messa a punto di un protocollo di induzione di variabilità tramite agenti poliploidizzanti inibitori del ciclo cellulare.

Dal punto di vista delle procedure analitiche per uno *screening* precoce sui PLBs sottoposti a poliploidizzazione, l'analisi citometrica, si è rivelato un metodo efficace per la determinazione del trattamento migliore nell'induzione di poliploidi. Con l'uso di una semplice procedura preparativa di isolamento di nuclei in sospensione da minime quantità di tessuto vegetale, si è potuta valutare l'efficacia ed il grado di ploidia dei materiali, senza distruggere il materiale di partenza e quindi consentendo il recupero dei mutanti indotti, eliminando dagli studi i materiali simili ai non trattati.

In questa maniera in futuro si potranno valutare rapidamente i materiali che effettivamente poliploidi, eliminando quello che non è di interesse, riducendo così tempi e costi del processo produttivo.

La poliploidizzazione con colchicina ed APM in mezzo liquido è risultata altamente efficiente nell'induzione di poliploidi, con rese fino all'80%. Lo *screening* precoce della ploidia, oltre all'individuazione dei mutanti poliploidi, ci ha anche permesso di evidenziare piccole variazioni del contenuto di DNA, individuando dei tetraploidi parziali, che sono risultati, attraverso successive indagini molecolari e morfologiche, diversi geneticamente dai parentali di partenza e dai poliploidi completi, con una "vitalità" complessiva maggiore rispetto ai diploidi.

Sono stati creati perciò, tramite manipolazioni cellulari, dei nuovi poliploidi con caratteristiche genetiche diverse dai parentali di partenza; ciò avvalendoci dell'ausilio di tecnologie ad alta processività, come la citometria a flusso, che hanno permesso una valutazione precoce del materiale. Tale approccio apre nuove prospettive nel campo delle biotecnologie applicate alle specie ornamentali, incluse le Orchidee, per l'ottenimento di nuovi mutanti.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their application in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27 (4): 671-631.
- Arditti J. Fundamentals of orchid biology. New York: John Wiley and Sons, Inc; 1992.
- Asghar S., Ahmad T., Hafiz I.A., Yaseen M. 2011. In vitro propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology* 10(16): 3097-3103.
- Atwood J.T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Barow M., Meister A. 2003. Endopoliploidy in seed plants is differently correlated to systematic, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ* 26: 571-184.
- Barow M. 2006. Endopoliploidy in seed plants. *BioEssays* 28: 271-281.
- Bass HW e Birchler JA. 2012. Plant cytogenetics: genome structure and chromosome function. Springer press.
- Begum A.A., Tamaki M., Kako S. 1994. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development trough in vitro culture of outer tissue of *Cymbidium* PLBs. *Journal Japanese Society Horticulturae Science* 63: 663-673.
- Belarmino M.M. and Mii M. 2000. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. *Plant Cell Reports* 19 (5): 435-442.
- Benner MS, Braustein MD, Weisberg MU. 1995. Detection of DNA polymorphism within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). *Plant molecular Biology Reporter* 13(2): 147-155.
- Bennett MD, Jellings AJ. 1975. DNA content of colchicines induced endopolyploid nuclei in *Vicia faba* L. *Heredity* 25: 261–272.
- Bennett MD e Leitch IJ. 2005. Nuclear DNA amount in Angiosperms: Prrogres, Problems and Prospects. *Annals of Botany* 95(1): 45-90.
- Bhadra, S.K., Hossain, M.M. 2003. In vitro germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. *Plant Tissue Culture* 13: 165–171.

Blakeslee A. F. and Avery A. G. 1937: Methods inducing doubling of chromosomes in plants. *The Journal of heredity* 28: 393–411.

Bory S., Catrice O., Brown S., Leitch IJ, Gigant R., Chiroleu F., Grisoni M. Duval MF., Besse P. 2008. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome* 51: 816-826.

Cai XY, Feng ZY, Hou BW, Xing WR, Ding XY. 2012. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Dendrobium loddigesii* Rolfe, an endangered orchid in China. *Biochemical Systematics and Ecology* 43: 42-47.

Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T., Hills HG, Goldman DH .1999. A phylogenetic analysis of Orchidaceae: Evidence from *rbcl* nucleotide sequences. *Am J Bot* 86:208-224.

Chapman MA e Abbott RJ. 2010. Introgression of fitness genes across a ploidy barrier. *New phytologist* 186 (1): 63-71.

Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003. DNA data and Orchidaceae systematic: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural Hystory publications 69-89.

Chen J.T., Chang C., Chang W.C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Report* 19: 143-149.

Chen J.T. and Chang W.C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum* 50(2): 169-173.

Chen WH, Chen TM, Fu YM, Hsieh RM, Chen WS. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 18(1-2): 7-13.

Chen WH e Chen HH. 2007. *Orchid biotechnology*. Wiley press.

Chen W.H., Tang C.Y., Kao Y.L. 2009. Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98(2): 229-238.

Chen WH, Tang CY, Lin TY, Weng YC, Kao LY. 2011. Changes in endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis Aphrodite* subsp. *Formosana* (Orchidaceae). *Plant Science* 18: 31-38.

- Chen ZJ. 2010. Molecular mechanism in polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15(2): 57-71.
- Chugh S., Satyakam G., Rao UI: 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* 122 (4): 507-520.
- Chung HH, Chen JT, Chang WC. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biologia Plantarum* 51(2): 346-350.
- Cocking E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles. *Nature* 187: 962-963.
- Cocking E.C. 1972. Plant cell protoplast-isolation and development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 23: 29-50.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploidy. *Nature Reviews Genetics* 6: 836-846.
- Compton ME, Preece JE (1986) Exudation and explants establishment. *Plant Tissue Culture* 50: 9-18.
- Cozzolino, S. and Widmer, A. (2005) Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol. Evol.* 20: 487–494.
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. 2005. Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23(2): 131-171.
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. 2005. Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiologiae Plantarum* 27(1): 117-129.
- Davey M. Anthony P., Lowe K., Castellanos M., Ribas-Vargas G., Power B. 2007. Somatic cell technologies for genetic improvement of ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants* 7(3): 122-128.
- Davina JR, Grabiele M., Cerutti JC, Hojsgaard DH, Almada RD, Insaurralde IS, Honfi AL. 2009. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 32(4): 811-821.

- De Laat A., Göhde M. M., Vogelzang W. 1987. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed.* 99 : 303–307.
- Dennis T. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances* 26(6): 618-631.
- Divakaran M., Pillai G.S., Babu K.N., Peter K.V. 2008. Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Current Science* 94(1): 115-120.
- Dhooghe E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissue in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Dolezel, J., Binarova P., Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 85:625-631.
- Dolezel J., 1991. Flow cytometric analysis of nuclear-DNA content in Higher Plants. *Phytochemical Analysis* 2(4): 143-154.
- Dolezel, J., S. Sgorbati, S. Lucretti .1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 625-631.
- Dolezel J., Greilhuber J., Suda J. 2007. Flow cytometry with plant cells. Wiley eds.
- Dolezel J., Greilhuber J. 2010. Nuclear Genome Size: Are we getting closer?. *Cytometry Part A* 77(7): 635-642.
- Dovzhenko A, Dal Bosco C, Meurer J, Koop HU. 2003. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 222:107–111.
- Dunn BL, Lindstrom JT. 2007. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. *Hortscience* 42:1326–1328.
- Eymar E., Alegre J., Toribio M., Lopez Vela D. 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63(1): 57-65.
- Ferreira W., Kerbaui GB, Costa AP. 2006. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). *In vitro cellular & Developmental Biology-Plant* 42(6): 568-571.

- Fukai S., Hasegawa A., Goi M. 2002. Polysomaty in *Cymbidium*. Hortscience 27(7): 1088-1091.
- Galbraith, DW., KR. Harkins, JM. Maddox, NM. Ayres, DP. Sharma, E. Firoozabady .1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220: 1049-1051.
- Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Xu DR .1996. Autotetraploid plants from colchicine treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell Tissue Organ Cult 47:73–77.
- Giorgi D., Farina A., Grosso V., Gennaro A., Ceoloni C., Lucretti S. 2013. FISHIS: fluorescence in situ hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. Plos One 8 (2): e57994.
- Goh MWK, Kumar PP, Lim SH, Tan HTW .2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae). Euphytica. 141: 11-22.
- Gow W.P., Chen J.T., Chang W.C. 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiologiae Plantarum 30(4): 507-512.
- Grandbastien M-A, Audeon C., Bonnivard E., Casacuberta JM, Chalhoub B., Costa APP, Le QH, Melayah D., Petit M, Poncet C. et al. 2005. Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. Cytogenetic and Genome Research 110: 229–241.
- Greilhuber J., Dolezel J. 2009. 2C or not 2C: a closer look at cell nuclei and their DNA content. Chromosoma 2009 118: 391-400.
- Greilhuber J. e Obermayer R. 1997. Genome size maturity in *Glicine max* (soybean). Heredity 78: 547-551.
- Greilhuber J. 1998. Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. Annals of botany 82: 27-35.
- Griesbach RJ .1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell Tissue Organ Cult 1:103–107.

- Griesbach J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. *Journal of Heredity* 76 (1): 74-75.
- Griesbach, R.J. 2002. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. *Trends in New Crops and New Uses*: 458-465.
- Grosser JW e Gmitter FG. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Review* 8: 339-374.
- Hahn-Hagerdal B., Hosono K., Kachrisson A., Bornman CH. 1986. Polyethylene glycol and electric field treatment of plant protoplasts: characterization of some membrane properties. *Physiologia Plantarum* 67: 359-364.
- Hansen NJP and Andersen SB. 1996. In vitro chromosome doubling potential of colchicines, oryzalin, trifluralin and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica* 88: 159-164.
- Haugland RP. 1992. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Edited by Larison KD. Molecular Probes Inc.
- Heller FO. 1973. *DNS*-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437–441.
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., Kanda M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* 93(15): 7783-7788.
- Hsu CC, Chung YL, Chen TC, Lee YL, Kuo YT, Tsai WC, Hsiao YY, Chen YW, Wu WL, Chen HH. 2011. An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC and sequence analysis. *BMC Plant Biology* 11(3).
- Huan L.T., Takamura T., Tanaka M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science* 166(6): 1443-1449.
- Ichihashi S. and Shigemura S. 2002. *Phalaenopsis* callus and protoplast culture. *Proceedings of the 17th World Orchid Conference, Malaysia*, pp. 257–261.
- Inze D., De Veylder L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review Genetic* 40: 77-105.

Ishii Y., Takamura T., Goi M., Tanaka M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Report* 17: 251–255.

Jean GT. 2008. Morphological observation and nuclear DNA content analysis in ovule and seed development of *Phalaenopsis Aphrodite* subsp. *Formosana*. National Kaohsiung University, Kaohsiung, Taiwan, Master's Thesis.

Jones K. 1974. Cytology and the study of orchids. In Withner, C. L. (Ed.): *The orchids: scientific studies*, 383–392. — New York-London: John Wiley & Sons.

Jones WH, Kuehnle AR. 1998. Ploidy identification using flow cytometry in tissue of *Dendrobium* species and cultivars. *Lindleyana* 13: 11-18.

Jones WH, Kuehnle AR, Arumuganathan K. 1998. Nuclear DNA content of 26 Orchid (*Orchidaceae*) Genera with Emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany* 82: 189-194.

Kamemoto H., Meeyot W., Takeshita M. 1972. Breeding behaviour of polyploid *Dendrobium* orchids. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97: 3–5.

Kanchanapoom K., Jantaro S., Rakchad D. 2001. Isolation and Fusion of Protoplasts from Mesophyll Cells of *Dendrobium Pompadour*. *Science Asia* 27: 29-34.

Kao K.N. and Michayluk M.R. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115: 355-367.

Kao YY, Chang SB, Lin TY, Hsieh CH, Chen YH, Chen WH, Chen CC. 2001. Differential Accumulation of Heterochromatin as a cause of Karyotype variation in *Phalaenopsis* Orchids. *Annals of Botany* 87: 387-395.

Keskitalo M. 2001. Can protoplast production from in vitro cultured shoots of *Tanacetum* vary during the season?. *Agricultural and Food Science in Finland* 10(3): 145-151.

Khentry Y., Parodomvat A., Tantiwiwat S., Phansiri S., Thaveechai N. 2006. Protoplast isolation and culture of *Dendrobium Sonia* “Boom 17”. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 40: 361-369.

Khosravi AR, Kadir MA, Kadzemin SB, Zaman FQ, De Silva AE. 2009. RAPD analysis of colchicine induced variation of *Dendrobium Serdang beauty*. *African Journal of Biotechnology* 8 (8): 1455-1465.

- Kishor R., Sha Valli Khan P. S., Sharma G. J. 2006. Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid *Ascocenda* `Kangla`. *Scientia Horticulturæ* 108: 66-73.
- Knudson, L., Nonsymbiotic germination of orchid seed. *Bot. Gaz.*, 1922. 73: p. 1-25.
- Kobayashi S., Kameya T., Ichihashi S. 1993. Plant regeneration from protoplasts derived from callus of *Phalaenopsis*. *Plant Tissue Culture Letter* 10: 267–270.
- Kostenyuk I., Oh B.J., So I.S. 1999. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak in vitro. *Plant Cell Report* 19:1-5.
- Kuehnle A.R. and Nan G.L. 1990. Factors influencing the isolation and culture of protoplasts from Hawaiian *Dendrobium* cultivars. In: Bonham D.G., Kernohan J. (eds) *Proceedings of the 13th World Orchid Conference*, Auckland, New Zealand, pp. 259–262.
- Kumar P., Gupta VK, Misra AK, Modi DR, Pandey BK. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics* 2(4): 141-162.
- Kumar V, Laouar L, Davey MR, Mulligan BJ, Lowe KC. 1992. Pluronic F-68 stimulates growth of *Solanum dulcamara* in culture. *J Exp Bot* 43:487– 93.
- Larkins BA, Dikes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y. 2001. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* 52: 183-192.
- Lee HC, Chiou DW, Chen WH. 2004. Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid floral development. *Plant Science* 172(9): 588-595.
- Leitch IJ, Bennett MD. 2004 Genome downsizing in polyploidy plants. *Biol. Journal of Linnean Society* 82: 651-663.
- Leitch IJ, Kahandawala I., Suda J., Hanson L., Ingrouille MJ, Chase MW, Fay MF. 2009. Genome size diversity in Orchids: Consequences and evolution. *Annals of Botany* 104: 469-481.
- Li, Y.H. 2000. Investigation on the physical distribution of microsatellites in *Phalaenopsis* orchids by fluorescence in situ hybridization. Master thesis, Institute of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

- Liao Y.J., Tsai Y.C., Sun Y.W., Lin R.S. Wu F.S. 2011. In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 47(6): 702-709.
- Lim WL, Loh CS. 2003. Endopolyploidy in *Vanda Miss Joaquim* (Orchidaceae). *New Phytologist* 159: 279-287.
- Lin S., Lee HC, Chen WH, Chen CC, Kao YY, Fu YM, Chen YH, Lin TY. 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp and *Doritis pulcherrima*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126(2): 195-199.
- Loureiro J., Rodriguez E., Dolezel J., Santos C. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann Bot* 98:679–689.
- Lowe KC, Anthony P, Davey MR, Power JB. 2001. Beneficial effects of Pluronic F-68 and artificial oxygen carriers on the post-thaw recovery of cryopreserved plant cells. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 29:297– 316.
- Lu IL, Sutter E., Burger D. 2001. Relationships between benzyladenine uptake, endogenous free 1NAA levels and peroxidase activities during upright shoot induction of *Cymbidium ensifolium* cv Yuh Hwa rhizomes in vitro. *Plant Growth Regulation* 35(2): 161-170.
- Lu JJ, Wang S., Zhao HY, Liu JJ, Wang HZ. 2012. Genetic linkage of EST-SSR and SRAP markers in the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4654-4667.
- Lucretti S. Flow-cytometric microencapsulation of plant elements, ENEA, Editor. 1992: Italy.
- Micheli MR, Bova R., Pascale E., D'Ambrosio E. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res* 22: 1921-1922.
- Miguel TP, Kenneth LW. 2011. In vitro polyploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia Horticulturae* 130(1): 314-319.
- Morejohn S., e Fosket A. 1982. Higher plant tubulin identified by self-assembly into microtubules in vitro. *Nature*. 297.

Morel G.M. 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. American Orchid Society Bulletin 29: 495-497.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.

Murashige T. and Nakano R. 1966. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploidy plants. *Journal of Heredity* 57: 115-118.

Nadel BL. 1989. Use of fluoresceine diacetate in Citrus tissue culture for the determination of cell viability and the selection of mutants. *Scientia Horticulturae* 39: 15-22.

Nakasone HY, Kamemoto H. 1961. Artificial induction of polyploidy in orchids by the use of colchicine. *Hawaii Agri Exp Stn Tech Bull* 42: 1-27.

Ochatt SJ, Delaitre C., Lionneton E., Huchette O., Patat-Ochatt EM, Kahane R. 2005. One team, PCMV, and one approach, vitro biotechnology, for one aim, the breeding of quality plants with a wide array of species. In: Dris R (ed) *Crops growth, quality and biotechnology*. WFL, Helsinki, pp 1038–1067.

Ochatt S., Muilu R., Ribalta F. 2008. Cell morphometry and osmolarity as early indicators of the onset of embryogenesis from cell suspension cultures of grain legumes and model systems. *Plant Biosyst* 142:480–486.

Ochatt SJ, Patat-Ochatt EM, Moessner A. 2011. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 104: 329-341.

Osborn T.C., Pires J.C., Birchler J.A., Auger D.L., Chen Z.J., Lee H.S., Comai L., Madlung A., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R.A. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19(3): 141-147.

Otero, J.T. and Flanagan, N.S. (2006) Orchid diversity—beyond deception. *Trends Ecol. Evol.* 21: 64–65.

Otto FJ. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods cell biology* 33: 105-110.

Otto S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131(3): 452-462.

- Parisod C., Holderegger R., Brochmann C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* 186:5–17.
- Pfossner, A., Amon A., Lelley T., Heberle-Bors E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21: 387-393.
- Philips RL, Vasil IK. 2001. DNA-based markers in Plants. Kluwer Academic Publishers.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2(3): 225-238.
- Power J. B., Cummins S.E., Cocking E.C. 1970. Fusion of isolated plant protoplast. *Nature* 225: 1016-1018.
- Power JB, Davey MR, Anthony P, Lowe KC. Protoplast culture and regeneration. In: Goodman RM, editor. *Encyclopaedia of plant and crop science*. New York, USA7 Marcel Dekker; 2004. p.1065– 8.
- Price G.R. and Earle E.D. 1984. Sources of orchid protoplasts for fusion experiments. *American Orchid Society Bulletin* 53:1035–1043.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MA, Rasmussen F (Eds) (1999) *Genera Orchidacearum*, Volume 1: Introduction, Apostasioidieae and Cypripedioideae, Oxford University Press, Oxford, 240 pp.
- Ramsey J. and Schemske D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467-501.
- Ranney GT. 2006. Polyploidy from evolution to new plant development. *Combined Proceedings International Plant* 56: 137-142.
- Renny-Byfield S., Chester M., Kovarik A., Le Comber SC, Grandsebastien MA, Deloger M., Nichols RA, Macas J., Novak P., Chase MW, Leitch AR. 2011. Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2843-2854.

Riddle NC, Kato A., Birchler JA. 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. *Theoretical Applied Genetic* 114: 101-111.

Sajise J.U., Valmayor H.L., Sagawa Y. 1990. Some problems in isolation and culture of orchid protoplasts. *Proceedings of the Nagoya International Orchid Show (NIOS), Japan* pp. 84–89.

Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sarathum S., Hegele M., Tantivivat S., Nanakorn M. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilobum* L. *European Journal of Horticultural Science* 75(3): 123-127.

Sato S. 1968. Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiologia Plantarum* 21: 1067-1075.

Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P.: *Practical in situ Hybridization*. - BIOS Scientific Publishers,. Oxford 2000. Paperback, 216 pp. GBP 21.95.

Seeni S., Latha PG. 2000. In vitro multiplication of the endangered Blu Vanda. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61(1): 1-8.

Senda M., Takeda J., Abe S., Nakamura T. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant and Cell Physiology* 20: 1441-1443.

Sgorbati S., Levi M., Sparvoli E., Trezzi F., Lucchini G. 1986. Cytometry and flow cytometry of 4',6-Diamino-2-Phenylindole (DAPI)-stained suspension of nuclei released from fresh and fixed tissue of plants. *Physiologia Plantarum* 68(3): 471-476.

Sharma DP, Firoozabady E., Ayres NM, Galbraith DW. 1983. Improvement of anther culture in *nicotiana* media, cultural condition and flow cytometric determination of ploidy levels. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 111 (5): 441-451.

Shrestha B.R., Tokuhara K., Mii M. 2007. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 26 (6): 719-725.

Sinha A., Wetten A.C., Caligari P.D.S. 2003. Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts. *Australian Journal of Botany* 51(1): 103-109.

- Silvera, K., Santiago, L.S., Cushman, J.C. and Winter, K. (2009) Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiol.* 149: 1838–1847.
- Stebbins G.L. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University press, New York.
- Steward F.C. and Mapes M.O. 1971. Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*. *Botanical Gazette* 132(1): 65-70.
- Sweet, H.R. 1980. The genus *Phalaenopsis*. Day Printing Corp., Calif. Teuscher, H. 1977. *Phalaenopsis*, *Doritis* and *Kingidium*. *Amer. Orchid Soc. Bul.* 46:216–228.
- Tai TH, Tanksley SD. 1990. A rapid and Inexpensive method for isolation of total DNA from Dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Report* 8(4): 297-303.
- Tanaka R., Kamemoto H. 1974. List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae. In: *The orchids, a scientific study*. Withner CL. Eds Wiley & Sons, New York.
- Tang C.Y. and Chen W.H. 2007. Breeding and developments of new varieties in *Phalaenopsis* in *Orchid Biotechnology*. World Scientific.
- Teixeira da Silava J.A., Yam T.W., Fukai S., Nayak N.R., Tanaka M. 2005. Establishment of optimum nutrient media for in vitro propagation of *Cymbidium* sw. (Orchidaceae) using protocorm-like body segments. *Propagation of Ornamental Plants* 5(3): 129-136.
- Teixeira da Silva J.A., Singh N., Tanaka M. 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 135–144.
- Teixeira da Silva J.A. and Tanaka M. 2006. Multiple Regeneration Pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 203-210.
- Teixeira da Silva J.A., Chin D.P., Van P.T., Mii M. 2011 Transgenic orchid. *Scientia Horticulturae* 130(4): 673-680.
- Teo C.K.H. and Neumann K.H. 1978a. The culture of protoplasts isolated from *Renantanda* Rosalind Cheok (J). *Orchid Review* 86(2):156–158.

Teo, C.K.H. and Neumann K.H. 1978b. The isolation and hybridisation of protoplast from orchids. *Orchid Rev* 86(2): p. 186-189.

Than MM, Pal A., Jha S. 2011. Chromosome number and modal karyotype in a polisomatic endangered orchid, *Bulbophyllum auricomum* Lindl., The Royal Flower of Myanmar. *Plant Systematic Evolution* 294: 167-175.

Tokuhara K. and Mii M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports* 13(1): 7-11.

Tokuhara K. and Mii M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37(4): 457-461.

Tokuhara K. and Mii M. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39(6): 635-639.

Travnicek P., Kubatova B., Curn V., Rauchova J., Krajnikova E., Jesakova J., Suda J. 2011. Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. *Annals of botany* 107(1): 77-87.

Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K. and Calvo, R.N. (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linn. Soc.* 84: 1–54.

Tusa N., Grosser JW, Gmitter FG. 1990. Plant regeneration of “Valencia” Sweet Orange, “Femminello” Lemon and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion, *Journal of American Society of Horticultural Science* 115: 1043-1046.

Vacin, E.F. and F.W. Went, Culture solution for orchid embryos. *Bot. Gaz.*, 1949. 110: p. 605-613.

Varshney RK, Graner A., Sorrells ME. 2005. Genetic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23 (1): 48-55.

- Wan Y., Duncan DR, Rayburn AL, Petolino JF, Widholm JM. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics* 81:205-211.
- Watrous SB, Wimber DE. 1988. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum Lindleyana* 3: 177-183.
- Waugh R., Powell W. 1992. Using RAPD marker for crop improvement. *Tibtech* 10: 186-191.
- Wimber D.E. 1963. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of shoot meristem. *American Orchid Society Bulletin* 32: 105-107.
- Wojcieszyn JW, Schlegel RA, Lumleysapanski K., Jacobson Ka. 1983. Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell-fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *Journal of cell biology* 96(1): 151-159.
- Xiong YC, Li FM, Zhang T. 2006. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta* 224:710–718.
- Yam TW, Yeung EC, Ye XL, Zee SY, Arditti J. 2002. *Orchid biology: reviews and perspectives*. 8th edn. Kull T, Arditti J, editors; Orchid embryos. Dordrecht: Kluwer; p. 287-385.
- Yam TW, Arditti J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports* 3(1): 1-56.
- Yang M., Loh CS. 2004. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. *BMC Cell Biol* 5: 33-39.
- Yu, H. and Goh, C.J. (2001) Molecular genetics of reproductive biology in orchids. *Plant Physiol.* 127: 1390–1393.
- Yue GH, Lam-Chan LT, Hong Y. 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. *Molecular Ecology Notes* 6(3): 832-834.

Zhao P., Wu F., Feng F.S., Wang W.J. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 44(3): 178-185.

Zimmerman U., Scheurich P. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151: 26-32.

APPENDICE

APPENDICE

	MSO	A3	ORCHIMAX	
MICRO ELEMENTI				mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0125	0,0125	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0125	0,0125	
FeNaEDTA	36,7	18,35	36,7	
H ₃ BO ₃	6,2	3,1	3,1	
KI	0,83	0,415	0,415	
MnSO ₄ ·2H ₂ O	16,9	8,45	8,45	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,125	0,125	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	4,3	5,3	
MACRO ELEMENTI				mg/L
CaCl ₂	332,02	166,01	166	
KH ₂ PO ₄	170	85	85	
KNO ₃	1900	950	950	
MgSO ₄	180,54	90,27	90,35	
NH ₄ NO ₃	1650	825	825	
VITAMINE				mg/L
Glicina	2	2		
Mio-Inositolo	100	100	100	
Acido nicotinico	0,5	0,5	1	
Pirossidina HCl	0,5	0,5	1	
Tiamina HCl	0,1	0,1	10	
ORMONI				mg/L

BAP		3,0		
SUBSTRATO ORGANICO				g/L
Saccarosio	20	10	20	
Tryptone			2	
Carbone attivo			2	
BUFFERS				mg/L
MES			1000	
PLANT AGAR	6,4	6,4	6,4	g/L
pH	6,8	6,8	6,8	

Tabella 1. Composizione terreni di coltura utilizzati per la propagazione dei PLBs e delle plantule.

	EME	BH3	NDM	K3	
MICRO ELEMENTI					mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	
FeNaEDTA	27,8	37,3	21	36,70	
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	0,5	3	
KI	0,83	0,83		0,75	
MnSO ₄ .2H ₂ O	22,3	22,3	3	10	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,025	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	0,5	2	
KCl	750	1500	150		
MACRO ELEMENTI					mg/L
CaCl ₂	440	440		900	
KH ₂ PO ₄	170	170	550		
KNO ₃	950		200	2500	
MgSO ₄	370	370	250	250	
NH ₄ NO ₃	825		480	250	
(NH ₄) ₂ SO ₄				134	
NaH ₂ PO ₄				150	
VITAMINE					mg/L
Glicina	2	2			
Mio-Inositolo	100	100	100	100	
Acido nicotinico	1	1	1	1	
Pirossidina HCl	10	10	1	1	

Tiamina HCl	10	10	1	10	
Glutamina	1550				
Caseina	125	250			
ORMONI					mg/L
BAP				0,2	
NAA				1	
2,4-D				0,1	
SUBSTRATO ORGANICO					g/L
Saccarosio	88,2	51,4		136	
Sorbitolo			20		
Mannitolo	40,9	81,9			
pH	6,2	6,2	5,6	5,8	

Tabella 2. Composizione base dei terreni utilizzati per la coltura dei protoplasti.

Componenti (mg/L)	EME	BH3	NDM	K3
Fruttosio	125	250		
Ribosio	125	250		
Xilosio	125	250		250
Mannosio	125	250		
Ramnosio	125	250		
Cellobiosio	125	250		
Galattosio	125	250		
Glucosio	125	250		
Piruvato di sodio	10	20		
Acido citrico	20	40		
Acido Malico	20	40		
Acido Fumarico	20	40		
Vitamina B12	0,01	0,02		
Pantotenato di Ca	0,5	1	1	
Acido Ascorbico	1	2		
Cloruro di Colina	0,5	1		
Ac. p-aminobenzoico	0,01	0,02		
Acido Folico	0,2	0,4		
Riboflavina	0,1	0,2		
Biotina	0,005	0,01	0,1	
Vit. A (Retinolo)	0,005	0,01		
Vit. D3 (coleciferolo)	0,005	0,01		

Tabella 3. Supplementi organici dei terreni utilizzati per la coltura dei protoplasti.