



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA

V CONVEGNO NAZIONALE SULLA MICROPROPAGAZIONE

VITRUSOI2024

Viterbo 14-17 ottobre 2024



Gold sponsors



Silver sponsors



ENZA ZADEN





Comitato organizzatore

Cristian Silvestri

Maurizio Lambardi

Maurizio Micheli

Comitato scientifico

Carla Benelli

CNR IBE – Istituto per la BioEconomia (S. Fiorentino)

Margherita Beruto

IRF - Istituto Regionale per la Floricoltura (Sanremo)

Emilia Caboni

CREA-OFA - Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (Roma)

Gabriella De Lorenzis

DSAA UNIMI - Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia (Milano)

Gaetano Distefano

Di3A UNICT – Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Catania)

Luca Dondini

UNIBO - Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (Bologna)

Giancarlo Fascella

CREA DC – Centro di Ricerca Difesa e Certificazione (Palermo)

Giorgio Gambino

CNR-IPSP - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (Torino)

Maria Antonietta Germanà

SAAF UNIPA – Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (Palermo)

Elena Kuzmisky

DIBAF UNITUS - Dipartimento per la innovazione dei sistemi biologici, agroalimentari e forestali (Viterbo)

Concetta Licciardello

CREA OFA – Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (Acireale)

Mauro Masini

Microplant (Cesena)

Maurizio Lambardi

CNR IBE – Istituto per la BioEconomia (S. Fiorentino)

Segreteria organizzativa

Valerio Cristofori

Massimo Muganu

Alberto Pacchiarelli

Michela Lupo

Andrea Ferrucci

Francesco Giovanelli

Giuseppe Vaia

Silvia Turco

Antonella Cardacino

Anna Mensuali Sodi

SSSUP - Scuola Superiore Sant'Anna di Pisa - Centro di Ricerca in Produzioni Vegetali (Pisa)

Maurizio Micheli

UNIPG – Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (Perugia)

Massimiliano Meneghini

Vivai Piante Battistini Soc. Agr. S.S.

Rosario Muleo

DAFNE UNITUS – Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (Viterbo)

Barbara Ruffoni

CREA OF – Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo (Sanremo)

Eddo Rugini

DAFNE UNITUS – Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (Viterbo)

Claudia Ruta

UNIBA-DiSSPA - Dipartimento Di Scienze Del Suolo, Della Pianta E Degli Alimenti (Bari)

Silvia Sabbadini

UNIVPM-D3A - Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (Ancona)

Cristian Silvestri

DAFNE UNITUS – Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (Viterbo)

Chiara Volpi

Enza Zaden

Con il contributo di



**REGIONE
LAZIO**

ARSIAL

Agenzia Regionale
per lo Sviluppo e l'Innovazione
dell'Agricoltura del Lazio

Con il patrocinio di



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA**

**DIPARTIMENTO
DI SCIENZE AGRARIE
E FORESTALI**



D.I.Ver.Sa.

Digitali, Innovativi, Verdi, Sostenibili



**Associazione
Florovivaisti Italiani**

Obiettivo Ambiente

PRESENTAZIONE

Il Gruppo di Lavoro SOI “Micropropagazione e tecnologie in vitro” e il Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali dell’Università degli Studi della Tuscia hanno organizzato il V Convegno Nazionale sulla Micropropagazione – VitroSOI 2024, svoltosi a Viterbo dal 14 al 17 ottobre 2024.

L’evento si inserisce nel solco delle precedenti edizioni di Legnaro (2008), Sanremo (2011), Pescia (2017) e Bari (2022), confermandosi come un appuntamento di riferimento per la comunità scientifica e tecnico-professionale operante nel settore delle colture in vitro.

L’iniziativa, ospitata presso l’Università della Tuscia e organizzata dal Dipartimento DAFNE in collaborazione con il Gruppo di Lavoro “Micropropagazione e tecnologie in vitro” della SOI, ha visto la partecipazione di circa 180 tra ricercatori, vivaisti ed esperti del settore, consolidando il ruolo di Viterbo quale polo scientifico di rilievo nazionale e internazionale per le biotecnologie vegetali. Il Convegno, realizzato con il contributo di numerosi sponsor, ha rappresentato un importante momento di incontro e scambio, offrendo una piattaforma dinamica per la condivisione di idee, esperienze e innovazioni.

VitroSOI 2024 ha affrontato in maniera ampia e integrata le principali tematiche legate alle colture in vitro, dalla micropropagazione alle strategie di conservazione della biodiversità, dall’organogenesi all’embriogenesi somatica, fino ad ambiti emergenti quali il plant molecular farming, la produzione di metaboliti secondari e le tecnologie a supporto del miglioramento genetico. In questo contesto, il Convegno ha rappresentato un’importante occasione di aggiornamento scientifico e di confronto interdisciplinare, favorendo il dialogo tra ricerca di base, ricerca applicata e mondo produttivo.

Il programma scientifico, articolato e interdisciplinare, ha incluso oltre 70 contributi tra comunicazioni orali e poster, offrendo una visione ampia delle principali innovazioni nel settore. Le tematiche affrontate hanno spaziato dalla micropropagazione e conservazione della biodiversità al miglioramento genetico, fino all’automazione e robotizzazione dei processi produttivi, evidenziando il ruolo sempre più strategico delle colture in vitro nell’agricoltura moderna, nel florovivaismo e nella tutela del patrimonio vegetale.

I relatori invitati hanno rappresentato uno degli elementi centrali del Convegno, offrendo una panoramica aggiornata delle principali tendenze internazionali. I loro interventi hanno messo in luce l’interconnessione tra innovazione tecnologica, sostenibilità e applicazioni pratiche. Dalle prospettive sull’embriogenesi somatica e sui sistemi automatizzati per la propagazione forestale, alle potenzialità dei bioreattori e delle colture in substrato liquido, fino agli studi sui meccanismi molecolari alla base dei processi rigenerativi e al ruolo degli stress nelle colture *in vitro*, è emerso un quadro ricco e articolato delle opportunità offerte da queste tecnologie. Particolare rilievo è stato inoltre dato alle applicazioni per la produzione di metaboliti secondari e alla valorizzazione del germoplasma, nonché al ruolo delle collaborazioni internazionali nello sviluppo di soluzioni innovative per sistemi agricoli sostenibili.

Le sessioni scientifiche hanno evidenziato come la micropropagazione rappresenti uno strumento chiave per affrontare sfide globali quali la conservazione della biodiversità, il miglioramento della

resilienza delle colture agli stress biotici e abiotici e l'ottimizzazione dei sistemi produttivi. La varietà delle specie oggetto di studio, dalle colture orticole e aromatiche alle specie forestali, fino a taxa rari ed endemici, ha ulteriormente sottolineato la versatilità e l'importanza di queste tecnologie.

Un'attenzione particolare è stata riservata ai giovani ricercatori, studenti e dottorandi, riconosciuti come protagonisti del futuro del settore. In questo contesto si inserisce l'assegnazione dei premi messi a disposizione da ARSIAL per i migliori contributi scientifici presentati durante il Convegno, a testimonianza dell'impegno nel promuovere l'eccellenza e l'innovazione.

Il V Convegno Nazionale sulla Micropropagazione ha dunque tracciato un quadro chiaro e stimolante delle prospettive della disciplina, evidenziando il ruolo centrale dell'integrazione tra ricerca accademica, industria e istituzioni. I contributi presentati testimoniano come l'evoluzione delle tecnologie in vitro, supportata da automazione, digitalizzazione e approcci multidisciplinari, rappresenti una leva fondamentale per lo sviluppo sostenibile dei sistemi agro-forestali.

I lavori presentati durante il Convegno sono raccolti nel presente volume degli atti, pubblicato su *Acta Italus Hortus*, quale testimonianza del livello scientifico raggiunto e punto di partenza per future attività di ricerca e collaborazione.

Un sentito ringraziamento va a tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione dell'evento, dai membri del Comitato Scientifico e Organizzatore ai relatori, agli sponsor e a tutti i partecipanti, il cui contributo ha reso possibile il successo di VitroSOI 2024.

Cristian Silvestri


Coordinatori del GdL SOI "Micropropagazione e tecnologie *in vitro*"

Maurizio Lambardi e Maurizio Micheli

Indice

Trasformazione genetica di colture cellulari di <i>Cannabis sativa</i> per la produzione di metaboliti secondari.....	3
<i>Origanum vulgare</i> var. <i>heracleoticum</i> : messa a punto di un sistema <i>in vitro</i> per lo studio delle interazioni pianta-batteri endofitici.....	11
Il contributo dei peptidi ormonali nella maturazione dei frutti: una strategia di knockout multipli tramite CRISPR/Cas9.....	16
Fattori che influenzano la propagazione <i>in vitro</i> di mandorlo (<i>Prunus dulcis</i> Mill.) e di <i>Prunus webbii</i> (Spach) Vierh.....	23
Definizione di protocolli di micropropagazione di specie rare e minacciate delle Alpi Occidentali.....	29
Metodo efficiente di rigenerazione e trasformazione mediato da <i>Agrobacterium</i> per l'ingegneria genetica in pomodoro.....	38
Effetto del genotipo e del mezzo di coltura su moltiplicazione e radicazione <i>in vitro</i> del Capperò	44
Effetti della qualità della luce sulla moltiplicazione <i>in vitro</i> di <i>Rosa corymbifera</i> Borkh.....	49
Rigenerazione di varietà locali di pomodoro del Lazio e <i>genome editing</i> per il miglioramento della serbevolezza della bacca.....	54
Micropropagazione e UAV come metodologie avanzate per la rinaturalizzazione di aree degradate.....	61
Nuove selezioni di mirtillo: adattamento e ottimizzazione dei protocolli di propagazione.....	65
La micropropagazione dei platani di interesse storico: passato e futuro.....	69
Il risequenziamento di 20 varietà di arancio dolce (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) svela nuovi SNP, Indel e grandi varianti strutturali utili alla identificazione clonale e per la tracciabilità genetica di foglie e succo.....	74
Propagazione <i>in vitro</i> di una cultivar e di alcuni portinnesti di pistacchio.....	88
Risultati preliminari sulla vitalità dei semi e sulla potenzialità germinativa <i>in vitro</i> di <i>Gentiana ligustica</i> R. Vilm. & Chopinet.....	95
Propagazione <i>in vitro</i> di <i>Moringa oleifera</i> L. per produzioni standardizzate di composti bioattivi	101

Influenza di diversi fattori sulla micropropagazione e radicazione dei portinnesti di ciliegio Gisela 5 e Gisela 6 (<i>Prunus cerasus</i> × <i>P. canescens</i>).....	108
Effetti di un biostimolante naturale sulla proliferazione in vitro di una sequoia monumentale.....	116
Micropropagazione e inoculazione micorrizica di <i>Myrtus communis</i> L.....	120
Sistema ad Immersione Temporanea, un metodo innovativo per la propagazione in vitro dello zafferano, integrato con Machine Learning per analisi dati.....	128
Embriogenesi somatica e Organogenesi in <i>Vitis vinifera</i> L. var. Greco Bianco e Crimson Seedless.....	137
Ottimizzazione dell'organogenesi avventizia dei germogli nel pero (cv Bartlett): influenza del pre-condizionamento, della composizione del mezzo e della tecnica di doppia rigenerazione.....	145

Somatic embryogenesis and organogenesis in *Vitis vinifera* L. var. Greco Bianco and Crimson Seedless

Antonella Zaccagnino^{1*}, Adriana Lucia Stigliani², Vitale Nuzzo³, Giovanni Giorio², Caterina D'Ambrosio²

¹ Dipartimento per l'Innovazione Umanistica Scientifica e Sociale, Università della Basilicata, Via Lanera 20, Matera, Italia; ² Centro Ricerche Metapontum Agrobios, Agenzia Lucana di Sviluppo e di Innovazione in Agricoltura, SS Jonica Km 448.2, Metaponto (MT), Italia; ³ Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari e Ambientali, Università della Basilicata, Via dell'Ateneo Lucano 10, 85100, Potenza, Italia

*antonella.zaccagnino@unibas.it

Abstract

The global production of wine is achieved using a broad collection of grapevine cultivars belonging to the species *Vitis vinifera* L. The currently cultivated grape varieties are derived from the selection of highly heterozygous wild genotypes propagated vegetatively to preserve the varietal traits that determine the quality and uniqueness of the wines. Therefore, the selection of new clones of wine varieties has primarily relied on the identification of spontaneous somatic mutations. The introduction of new allelic variants into the genetic background of traditional grapevine cultivars, based on desirable agronomic or technological traits, is now possible through genetic editing technology (CRISPR/Cas9). To apply CRISPR/Cas9, it is essential that regeneration and genetic transformation protocols are available for each specific variety. The activities described herein involve the development of somatic embryogenesis regeneration protocols for the Greco Bianco cultivar, used in the production of two DOCG wines, eleven DOC wines, and twenty-seven IGT wines, and for the Crimson S. cultivar, which is amenable to *in vitro* manipulation. For this purpose, immature inflorescences at different stages of pollen differentiation were collected from the field, and floral buds were sub-cultured on a substrate containing auxins and cytokinins in an equimolar ratio. The results of the experimental activities enabled the identification of the stages of explant development and the composition of the substrates that optimized the response in terms of embryogenic callus development, differentiation, and embryo germination. The greater response of the cv Crimson Seedless to *in vitro* manipulation was confirmed. Greco Bianco cultivar also exhibited a good capacity to produce embryogenic calli from immature inflorescences. The use of floral buds as explants for somatic embryogenesis, however, presents a limitation in the regenerative process, since the inflorescences are available in field only during the flowering time. For this reason, vegetative apices of somatic embryos and plantlets, available at any time from *in vitro* cultures, were tested as explants. A consistent cellular proliferation at the base of the explants was obtained on substrates containing auxins and cytokinins in specific molar ratios. This process evolved into the development of numerous growing axes which produced new vegetative apices. Periodic removal of the new shoots promoted the formation of a basal callus, known as Meristematic Bulk, which enabled the continuous production of vegetative apices. For both genotypes, the substrates that optimized the two processes were defined.

Keywords: *in vitro* regeneration, editing, immature inflorescence, meristematic bulk

Embriogenesi somatica e Organogenesi in *Vitis vinifera* L. var. Greco Bianco e Crimson Seedless

Riassunto

Lo sviluppo di protocolli di rigenerazione *in vitro* di genotipi di vite rappresenta una tappa fondamentale per l'applicazione delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) che si configurano come uno strumento molto efficace per il miglioramento genetico della *Vitis vinifera* L.. Le attività sperimentali sono state condotte sulla cultivar Greco Bianco, impiegato in Basilicata per la produzione di vini DOC e IGT, e sulla cultivar di uva da tavola Crimson Seedless caratterizzata da una spiccata attitudine alla manipolazione *in vitro*. L'embriogenesi somatica è stata indotta su infiorescenze immature, mentre la rigenerazione organogenetica è stata ottenuta a partire da apici di embrioni somatici e/o da apici vegetativi. Per entrambi i genotipi sono state definite le condizioni che ottimizzano il processo rigenerativo.

Parole chiave: rigenerazione, TEA, apici, infiorescenze immature

Introduzione

La produzione mondiale di vino si basa su una vasta gamma di cultivar di vite appartenenti alla specie *Vitis vinifera* L. L'editing genetico (CRISPR/Cas9) offre oggi la possibilità di introdurre nuove varianti alleliche nel patrimonio genetico dei vitigni tradizionali, con l'obiettivo di ottenere caratteristiche agronomiche o tecnologiche desiderabili. Tuttavia, l'applicazione di questa tecnologia dipende dalla disponibilità di protocolli di rigenerazione affidabili. Questo studio si concentra sulla messa a punto di protocolli di rigenerazione, sia attraverso l'embriogenesi somatica che l'organogenesi, per due vitigni specifici: Greco Bianco e Crimson Seedless. La cv Greco Bianco è ampiamente coltivata in Italia per la produzione di molti vini a denominazione d'origine e IGT, mentre la cv Crimson Seedless, un'importante varietà di uva da tavola, è nota per la sua elevata attitudine alla manipolazione *in vitro* (Lopez-Perez *et al.*, 2005; Lopez-Perez *et al.*, 2006).

Materiali e Metodi

Materiale vegetale

Per gli esperimenti di embriogenesi somatica le infiorescenze immature delle cv Greco Bianco e Crimson Seedless sono state prelevate da piante allevate in pieno campo in pre-fioritura. Gli apici vegetativi utilizzati, invece, negli esperimenti di rigenerazione organogenetica sono stati prelevati da piantine delle due cultivar presenti nella collezione di germoplasma *in vitro* dell'ALSIA di Metaponto.

Coltura delle infiorescenze

Le infiorescenze sono state classificate, dopo osservazione microscopica, sulla base dello stadio di differenziazione del polline (Gribaudo *et al.*, 2004) in: cellule madri delle microspore, tetradi, polline immaturo, polline. Le classi individuate per ogni cultivar sono

state impiegate nella sperimentazione. Dopo un rapido lavaggio in etanolo al 70%, le infiorescenze sono state tenute per 10 minuti in immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio (1,4%) e 0,1% di sodio dodecile solfato (SDS). Dopo un abbondante risciacquo in acqua sterile, gli espianti, che consistono in singoli bocci fiorali, sono stati sezionati in corrispondenza dell'ovario e trasferiti sul substrato nutritivo MSI (Dhekney *et al.*, 2016) modificato (sali e vitamine Murashige & Skoog (MS), 20 g/L di saccarosio, 4,4 μ M di 6-benzil-amminopurina (BAP), 5,0 μ M di acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), 2,5 g/l di *Phytigel* (Sigma P8169), pH 6,0). Gli espianti sono stati posizionati con la caliptra verso l'alto in modo da consentire il contatto del filamento delle antere con il substrato, posti al buio ad una temperatura di 25 °C e sub-colturati mensilmente su terreno fresco al fine di ottenere callo embriogenico. La differenziazione di embrioni somatici è stata indotta trasferendo i calli embriogenici sul substrato di induzione MS1B (Dhekney *et al.*, 2016) modificato e denominato EG (sali e vitamine MS, 30 g/L di saccarosio, 1,0 μ M di BAP, 4 g/l di *Phytigel*, pH 5,8). Dopo la differenziazione, gli embrioni sono stati distanziati e fatti crescere fino alla lunghezza di circa 1 cm. A questo stadio, gli embrioni sono stati trasferiti alla luce per consentirne lo sviluppo degli apparati fotosintetici e l'ulteriore accrescimento. Quando l'apparato radicale è risultato sufficientemente sviluppato, gli embrioni sono stati trasferiti in Magenta Box, su substrato MS/2 così denominato in quanto contiene la metà dei sali MS, e 50 mg/l di mio-inositolo, 0,2 mg/l di tiamina HCl, 15 g/l di saccarosio, 7 g/l di *Plant agar* (DUCHEFA), e pH di 5,8.

Coltura degli apici

Gli apici vegetativi, provenienti da piante adulte della collezione di germoplasma *in vitro* di vite dell'ALSIA, sono stati tenuti per 30 giorni sul substrato MSB (Sim, 2006) (sali e vitamine MS, 4,4 μ M BAP, 30 g/l saccarosio, 8 g/l *Plant agar*, pH 5,8) e successivamente trasferiti sul substrato MSB contenente NAA 0.05 μ M (IM1). Dopo ulteriori 30 giorni di coltura, gli espianti sono stati sub-colturati su un substrato denominato IM2, caratterizzato da un contenuto di BAP doppio rispetto a quello del substrato IM1 (Mezzetti *et al.*, 2002).

Gli apici vegetativi prelevati da embrioni somatici (3-5 mm) sono stati testati su due differenti substrati, l'M1 (sali e vitamine MS, 15 g/l di saccarosio, 4,4 μ M di BAP e 0,49 μ M di acido indol-3-butyrico (IBA), 7g/l di *Plant agar*, pH 5,7) e l'M2 (sali e vitamine MS, 15 g/l di saccarosio, 13,2 μ M di BAP, 7g/l di *Plant agar*, pH 5,7) (Capriotti, *et al.*, 2023). Le masse differenziate su substrato M1 sono state trasferite su un nuovo substrato caratterizzato da un minore contenuto di 6-BAP (1,1 μ M), mentre quelle sviluppatesi su M2 sono state trasferite su un terreno contenente 4,4 μ M di 6-BAP (Capriotti, *et al.*, 2023).

I germogli prodotti sui nuovi substrati sono stati recisi allo stadio di 2-4 foglie e posti su un MS/2 addizionato con 0.57 μ M di IAA e denominato S/2.

Risultati

Nel presente lavoro sono stati sperimentati sulla varietà di vite Greco Bianco e Crimson Seedless due sistemi di rigenerazione: l'embriogenesi somatica e l'organogenesi.

Embriogenesi somatica

Le infiorescenze immature delle due varietà Greco Bianco e Crimson Seedless sono state prelevate dal campo e, dopo osservazione microscopica (Figura1), classificate in base allo stadio di differenziazione del polline (Gribaudo *et al.*, 2004). La proliferazione delle cellule, come atteso, ha interessato prevalentemente la porzione distale del filamento delle antere (Figura2) ed è stata ottenuta sul substrato MSI, contenente auxine e citochinine in rapporto equimolare. Per la varietà Greco Bianco sono state messe in coltura antere allo stadio di cellule madri delle microspore, tetradi e polline (Tabella1) e solo sull'8% dei filamenti delle antere contenenti cellule madri delle microspore si sono differenziati calli proembriogenici.

La varietà Crimson Seedless ha risposto diversamente, in quanto sia le antere allo stadio di tetrade (24%) che quelle allo stadio di polline immaturo (15%) hanno prodotto calli proembriogenici (Tab2). Questi risultati hanno confermato la maggiore attitudine alla manipolazione *in vitro* del genotipo Crimson Seedless rispetto alla cultivar Greco Bianco. Infatti mentre per la Crimson Seedless sono stati ottenuti 1317 calli da 6655 antere messe in coltura (Tabella2), cioè il 20% degli espianti ha prodotto un callo embriogenico, nel caso della cultivar Greco Bianco solo il 6% delle antere messe in coltura ha differenziato un callo embriogenico, in quanto sono stati ottenuti 395 calli a partire da 6315 antere (Tabella1). Le fasi di differenziazione, germinazione e crescita degli embrioni somatici (Figura3) sono state indotte trasferendo i calli su terreno EG caratterizzato dall'assenza di auxine e da una consistente riduzione del contenuto di citochinine rispetto al MSI. A differenza della cv Crimson, che richiede circa 6 mesi per la differenziazione di calli embriogenici, la cv Greco Bianco produce un callo embriogenico dopo circa 4 mesi dall'inizio della coltura.

Organogenesi somatica

L'utilizzo dei bocci fiorali come espianto può presentare delle limitazioni se non si dispone di un protocollo per l'induzione della fioritura di tralci recisi in ambiente controllato. Le infiorescenze di piante coltivate in campo sono disponibili infatti solo in periodi specifici dell'anno. Per superare questo limite, è stato sviluppato un protocollo alternativo (Mezzetti *et al.*, 2002) basato sull'impiego di apici vegetativi di piante di Greco Bianco e Crimson S. coltivate *in vitro*.

L'impiego dei substrati MSB, IM1 e IM2 in sequenza ha indotto la proliferazione cellulare alla base dell'espianto, consentendo lo sviluppo di numerosi assi di accrescimento i quali si sono differenziati in nuovi apici vegetativi. La rimozione periodica dei nuovi germogli ha favorito la formazione di un callo basale (*Meristematic Bulk*, MB), caratterizzato dalla tendenza ad una produzione continua di nuovi germogli (Figura 4 e 5). È stata, inoltre, valutata la possibilità di produrre il MB partendo da apici vegetativi di embrioni somatici (Figura 6). A tale scopo la porzione apicale di embrioni somatici germinati al buio è stata prelevata e posta su M1 ed M2.

Nel caso della messa in coltura di apici vegetativi prelevati dalle piantine *in vitro*, l'avvio della proliferazione cellulare alla base degli espianti è avvenuto, per entrambe le cultivar, in 4-6 settimane e la formazione dei MB si è realizzata in circa 6-8 settimane. Sebbene

entrambi i genotipi abbiano differenziato i MB, il loro comportamento *in vitro* è stato notevolmente differente. In particolare, mentre la Crimson Seedless ha prodotto MB che, subculturati in terreno IM2, hanno differenziato numerosi nuovi germogli, i MB ottenuti dalla cv Greco Bianco si sono accresciuti ad un ritmo inferiore e, dopo il loro trasferimento sul substrato IM2, hanno manifestato una ridotta proliferazione di nuovi germogli. Anche in questo caso si conferma la maggiore attitudine alla manipolazione *in vitro* della cv Crimson Seedless rispetto al Greco Bianco.

Gli apici prelevati da embrioni somatici hanno, invece, mostrato un'attività intensa di proliferazione cellulare alla base già dopo 15 giorni dalla messa in coltura. La formazione dei MB è avvenuta per entrambe le cultivar dopo circa 4-6 settimane di coltura. Tutti gli espianti provenienti da embrioni somatici hanno dato origine a MB, sebbene siano state evidenziate delle differenze nella risposta delle due cultivar in funzione dei terreni impiegati. Nel caso del Greco Bianco il substrato che ha ottimizzato la proliferazione di apici e la differenziazione di MB è stato l'M2, mentre per la Crimson S. il substrato M1 è risultato il più idoneo per l'induzione di organogenesi da embrioni somatici. In entrambi i casi la risposta degli espianti al substrato è risultata essere strettamente correlata al genotipo come osservato anche da Capriotti *et al.* (2023). Tutti i germogli prelevati dai MB e posti sul terreno di radicazione S/2 hanno prodotto un apparato radicale tale da consentirne un rapido trasferimento in vaso.

Discussione e Conclusioni

L'utilizzazione di programmi di miglioramento genetico della vite, basati sull'impiego delle nuove Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), richiede la definizione di efficienti protocolli di rigenerazione e di trasformazione specifici per il vitigno di interesse. L'obiettivo del presente studio è stato quello di mettere a punto i protocolli di rigenerazione mediante embriogenesi somatica e organogenesi per la cultivar da vino Greco Bianco e per quella da tavola Crimson Seedless.

Le attività sperimentali condotte sulle antere della cv Greco Bianco hanno consentito di definire la sequenza di substrati nutritivi che ottimizza l'ottenimento di calli embriogenici, evidenziando che la criticità del processo risiede nello stadio di maturazione del polline. Infatti, mentre i substrati impiegati sono molto simili a quelli utilizzati anche per altri vitigni, per la cv Greco Bianco l'ottenimento di calli embriogenici è possibile solo se vengono messi in coltura i filamenti di antere contenenti cellule madri delle microspore, mentre per la cv Crimson S. e la maggior parte dei vitigni lo stadio ottimale risulta essere quello di tetrade (Bouamama *et al.*, 2007).

Per entrambe le cultivar studiate, la differenziazione dei MB è avvenuta con successo utilizzando come espianto sia gli apici vegetativi di piante coltivate *in vitro*, sia gli apici di embrioni somatici, sebbene questi ultimi mostrino una maggiore produzione di assi vegetativi. Questo comportamento può essere una conseguenza del fatto che gli embrioni somatici derivanti dai calli embriogenici contengono una maggiore quantità di cellule totipotenti che, opportunamente stimulate, differenziano nuovi apici.

La definizione in questo studio di protocolli affidabili di rigenerazione *via* embriogenesi somatica e/o *via* organogenesi per la cultivar da vino Greco Bianco, per la quale non esistevano studi precedenti, rende questo vitigno un valido candidato per l'applicazione delle TEA finalizzate alla selezione di cloni idonei a rendere la viticoltura più sostenibile.

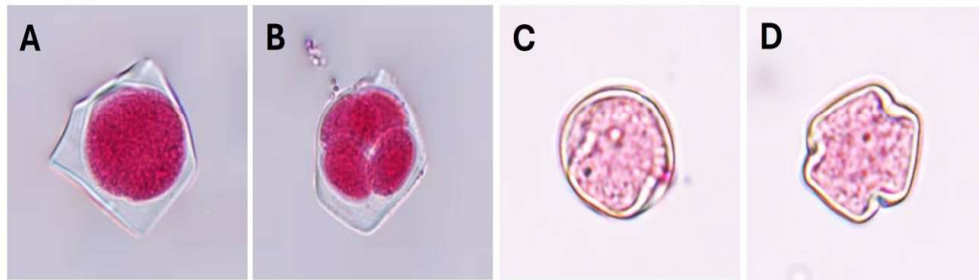


Figure 1: Pollen development stages of the cv Greco Bianco (40x). A: microspore mother cell; B: tetrad; C: immature pollen; D: mature pollen.

Figura 1: Stadi di sviluppo del polline della cv Greco Bianco (40x). A: cellula madre delle microspore; B: tetrade; C: polline immaturo; D: polline maturo.

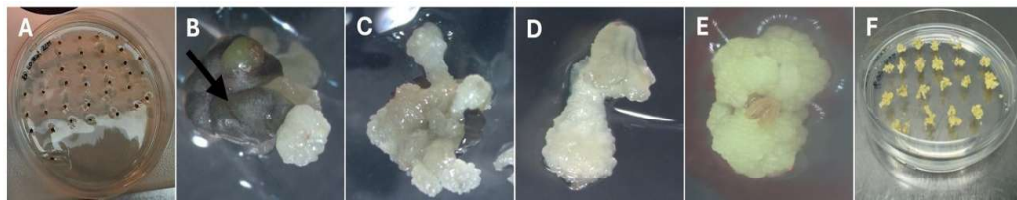


Figure 2: Embryogenic callus induction from flower buds of cv Crimson S. A: calyptrae; B: calli deriving from anther filaments observed from above and degenerating calyptra (arrow); C: calli observed from below; D: proliferating filament still attached to the anther; E: pro-embryogenic callus; F: pro-embryogenic calli on induction medium.

Figura 2: Induzione di callo embriogenico da bocci fiorali della cv Crimson S. A: caliptrre; B: calli derivanti dai filamenti delle antere osservati dall'alto e caliptra in fase di degenerazione (indicata dalla freccia); C: calli osservati dal basso; D: filamento ingrossato ancora legato all'antera; E: callo pro-embriogenico; F: calli pro-embriogenici su terreno d'induzione.

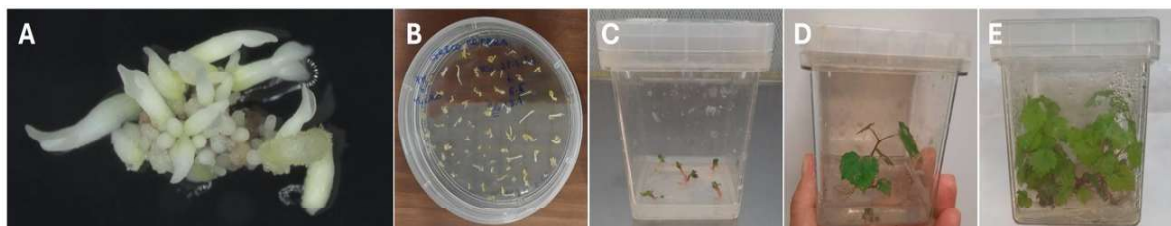


Figure 3: Regeneration via somatic embryogenesis of Greco Bianco and Crimson S. cultivars. A, B: somatic embryos differentiated from embryogenic callus of cv Greco Bianco; C: embryos growth in the light; D, E: plants regenerated from Greco Bianco and Crimson S. cultivars.

Figura 3: Rigenerazione *via* embriogenesi somatica delle cv Greco Bianco e Crimson S. A, B: embrioni somatici differenziati da callo embriogenico della cv Greco Bianco; C: accrescimento degli embrioni alla luce; D, E: piante rigenerate dalle cv Greco Bianco e Crimson S.

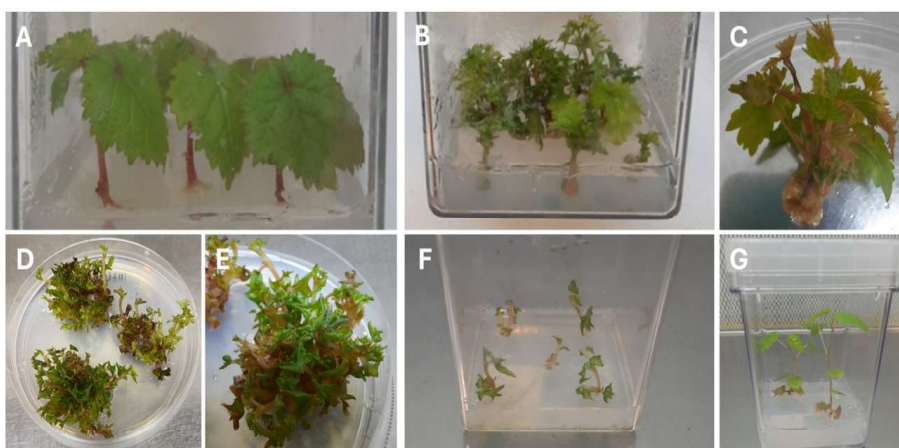


Figure 4: Meristematic Bulk (MB) differentiation from vegetative apices of adult plants in cv Crimson S. A: vegetative apices on induction medium culture; B: development of new shoot apices and thickening of their distal portion; C: Basal callus differentiation (MB); D-E: shoot proliferation on MB; F: excised shoots from the MB on rooting medium; G: regenerated plantlets.

Figura 4: Formazione del Meristematic Bulk (MB) da apici vegetativi di piante adulte nella cv Crimson S. A: apici vegetativi in coltura su terreno di induzione; B: sviluppo di nuovi apici ed ispessimento della base; C: formazione del callo basale (MB); D-E: proliferazione di germogli su MB; F: apici prelevati dal MB su terreno di radicazione; G: piantine rigenerate.

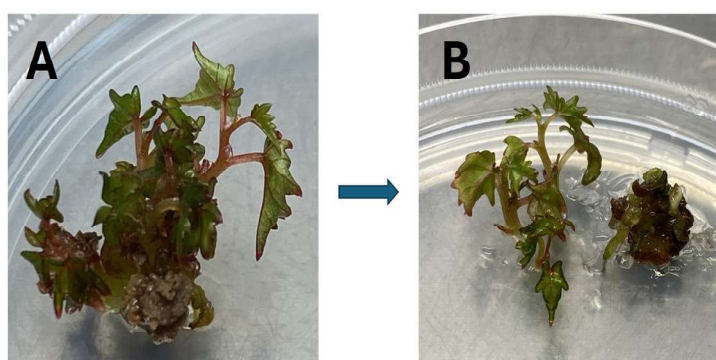


Figure 5: Shoot cutting from Meristematic Bulk (MB) in cv Greco Bianco. A: MB before shoot cutting; B: MB (on the right) after shoot cutting and the excised shoots (on the left).

Figura 5: Prelievo dei germogli dal Meristematic Bulk (MB) nella cv Greco Bianco. A: MB prima del prelievo dei germogli; B: MB dopo il prelievo dei germogli (a destra) con i germogli prelevati (a sinistra).

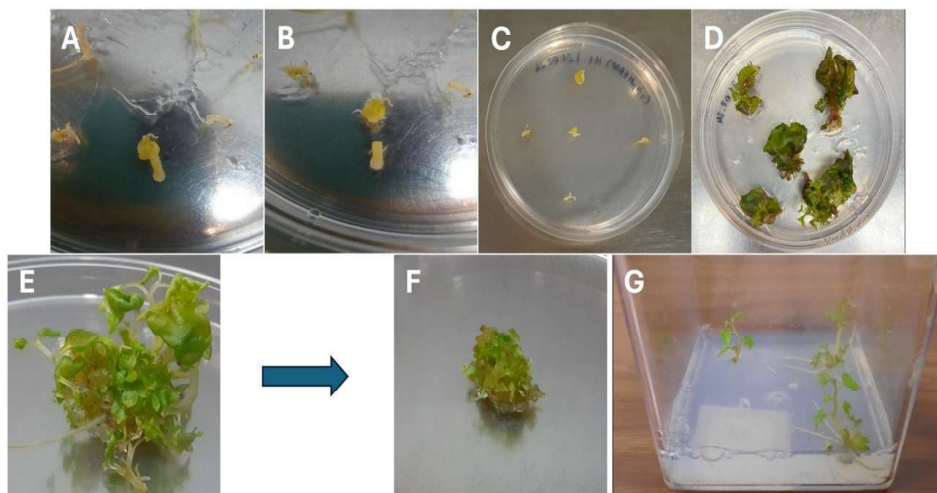


Figure 6: Meristematic Bulk (MB) differentiation from somatic embryos apices in cv Crimson S. and Greco Bianco. A: germinating embryos; B, C: apex excisions; D: differentiation of new meristematic apices; E: shoot elongation; F: MB after shoot cutting; G: rooting shoots regenerated from cv Greco Bianco.

Figura 6: Formazione del Meristematic Bulk (MB) da apici di embrioni somatici nelle cv Crimson S. e Greco Bianco. A: embrioni germinanti; B, C: taglio e messa in coltura degli apici; D: formazione di nuovi apici meristematici; E: allungamento dei germogli; F: MB dopo il prelievo dei germogli; G: germogli rigenerati dalla cv Greco Bianco in radicazione.

Table 1: Calli obtained from anther filaments of cv Greco Bianco.

Tabella 1: Calli ottenuti dai filamenti di antere del genotipo Greco Bianco.

N° antere cv Greco Bianco	Stadio	N° calli	% calli
5090	Cellule madri delle microspore	395	8%
750	Tetradi	0	0%
475	Polline	0	0%

Table 2: Calli obtained from anther filaments of cv Crimson S.

Tabella 2: Calli ottenuti dai filamenti di antere del genotipo Crimson S.

N° antere cv Crimson S.	Stadio	N° calli	% calli
3610	Tetradi	861	24%
3045	Polline immaturo	456	15%

Bibliografia

- Bouamama, B. *et al.* (2007) 'Influence of the flower stage and culture medium on the induction of somatic embryogenesis from anther culture in Tunisian grapevine cultivars', *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 41(4), pp. 185–192.
- Capriotti, L. *et al.* (2023) 'Efficient protocol of de novo shoot organogenesis from somatic embryos for grapevine genetic transformation', *Frontiers in Plant Science*, 14, p. 1172758.
- Dhekney, S.A. *et al.* (2016) 'Somatic embryogenesis and genetic modification of *Vitis*', in Germanà, M. and Lambardi, M. (eds.) *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Methods in Molecular Biology, 1359. New York: Humana Press, pp. 263–277.
- Gribaudo, I. *et al.* (2004) 'Somatic embryogenesis from grapevine anthers: The optimal developmental stage for collecting explant', *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, pp. 427–430.
- Mezzetti, B. *et al.* (2002) 'Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis', *BMC Biotechnology*, 2, p. 18.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) 'A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures', *Physiologia Plantarum*, 15, pp. 473–497.
- Sim, S.T. (2006) 'Virus elimination from grape selections using tissue culture', *FPS Grape Program Newsletter*, November, pp. 30–31.