

Coltura in vitro di ovuli in due specie di agrumi

TUSA N., CERACI G.

Centro di studio per il Miglioramento Genetico degli Agrumi, C.N.R.
Palermo

OCCORSO G.

Istituto Coltivazioni Arboree
Università di Palermo

Negli agrumi, uno dei metodi utilizzabili per il risanamento delle piante dai virus è quello della coltura degli ovuli. L'applicazione di questa tecnica, d'altronde, comporta delle implicazioni genetiche non indifferenti. E' certamente noto, ad esempio, che nelle colture in vitro, in seguito a successivi trasferimenti su substrati nutritivi, gli espianti possono essere soggetti a instabilità sia nel numero che nella struttura dei cromosomi conseguentemente a processi di endomitosi, formazione di cellule aneuploidi, mutazione, crossingover etc. . Tutti questi fenomeni sono capaci di determinare variazioni del corredo genetico della cellula vegetale coltivata in vitro, per cui con la coltura di ovuli di agrumi è probabile ottenere progenie interessante dal punto di vista genetico.

Le piantine ottenute con tale metodo presentano in modo molto marcato i caratteri giovanili, con tutte le caratteristiche morfo-fisiologiche associate a questa fase. *Navarro e Juarez (1977)*.

Mabeshwari e Ranga Swamy (1958) indussero la formazione di embrioni nel callo sviluppatosi dalla coltura della nucella, estratta da ovuli fecondati di *Citrus microcarpa*. *Singh (1963)* e *Sabbarwal (1963)*, ottennero dalla coltura di ovuli e nucelle di *Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swing e *Citrus reticulata* Blanco numerosi embrioni globulari, calli e masse embriogenetiche, ma non ottennero piantine.

Rangan et al. (1969), *Bitters et al. (1970)*, *Button e Bornman (1971)* ottennero la formazione di piante partendo dalla coltura delle nucelle. *Koch-*

ba et al. (1972) ottennero la formazione di piante partendo dalla coltura di ovuli e nucelle in tre cultivar di Citrus.

Navarro e Juarez (1977) hanno utilizzato la tecnica della coltura degli ovuli in alcune varietà poliembrioniche del gruppo navel (*Citrus sinensis*) (L.) Osbeck per il risanamento delle piante dai virus. Starrantino et al. (1978) ottennero piantine dalla coltura in vitro della nucella di alcune specie di agrumi.

Scopo del presente lavoro è quello di valutare il comportamento evolutivo degli ovuli prelevati a diverso stadio di sviluppo, in relazione alla formazione di callo ed embrioni in due specie di agrumi.

Materiali e metodi

Sono stati prelevati ovuli da due specie di agrumi e precisamente: Mandarino "Tardivo di Ciaculli" (*Citrus deliciosa*) Tenore e Arancio "Vaniglia" (*Citrus sinensis*) (L.) Osbeck (Fig. 1).

Il prelevamento è avvenuto scalaramente a partire dalla fase di preantesi fino a circa 60 giorni dalla piena fioritura.

I fiori ed i frutticini raccolti sono stati immersi in una soluzione diluita di ipoclorito di sodio al 10% per 10' e risciacquati tre volte con acqua sterile. Successivamente con l'ausilio di un binoculare si è proceduto a dissezionare l'ovario e ad estrarre gli ovuli. Questi sono stati seminati in numero di tre per tubo in una soluzione agarizzata di Murashige e Toker (1969) con l'aggiunta di 1mg/l di estratto di malto. Ogni tubo è stato riempito con 25 ml di soluzione e per ogni cultivar sono stati insemnati 50 tubi.

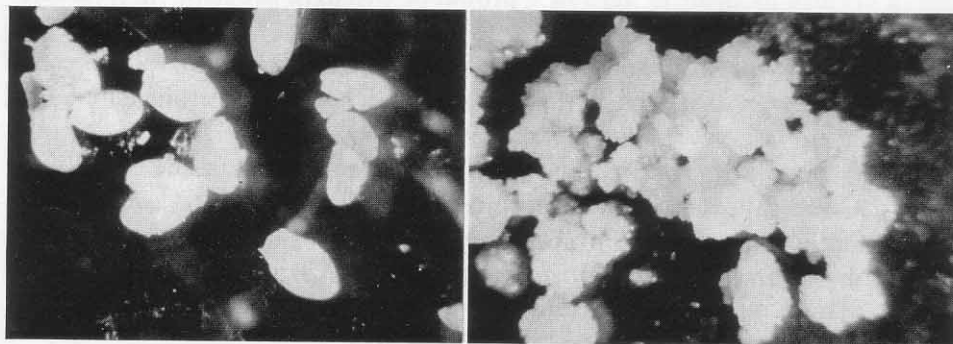


Fig. 1 - Ovuli di agrumi pronti per la semina.
Citrus ovules for culturing.

Fig. 2 - Callo di proliferazione di consistenza friabile da ovuli di arancio.
Friable calli of orange.

Dopo la semina le colture sono state trasferite in una cella climatica a 27 C° ed illuminati con tubi fluorescenti con intensità di 3000 lux per 12 ore giornaliere.

I primi trapianti sono stati effettuati ad intervalli di tempo variabile a seconda dell'epoca di prelevamento. Infatti, nella fase di pre-antesi sono stati fatti dopo circa 60 giorni mentre con il progredire delle semine (post-antesi) dopo circa 30 giorni. Successivamente i trapianti sono stati effettuati, mediamente, ad intervalli di circa 30 giorni fino a quando le piantine non avevano differenziato 3-4 foglioline. In quest'ultima fase sono state trasferite in soluzione liquida di Hoogland's con l'aggiunta di acido gibberellico (1 mg/l) e successivamente in vasetti contenenti una miscela di torba e sabbia non sterili.

Per i trapianti sono state utilizzate la soluzione base di M. e T. con l'aggiunta di IAA (1 mg/l) e kinetina (0,1 mg/l) in presenza di embrioni e di M. e T. con estratto di malto (1 mg/l) in presenza di callo.

Allo scopo di accertare lo stadio evolutivo degli ovuli raggiunto ad ogni prelevamento, un certo numero di ovari per ogni specie sono stati destinati alle osservazioni microscopiche. A tal fine sono stati fissati per 24 ore in formalina cromo-propionica, quindi lavati con acqua corrente per alcune ore e successivamente disidratati in alcool etilico a concentrazione crescente a partire dal 10 fino al 50%. Dopo questo trattamento gli ovuli sono stati estratti dagli ovari e si è continuato con la disidratazione con il metodo descritto da *Johansen* (1940), quindi sono stati inclusi in paraplast, sezionati e colorati con ematossilina ferrica di Heidenain.

Risultati e Discussioni

Tenendo conto delle diverse epoche di semina, le specie in esame, seppur diversificandosi in taluni dettagli, hanno dato risultati sostanzialmente simili ed assimilabili come segue.

In pre-antesi in generale gli ovuli hanno avuto un lungo tempo di incubazione (circa 50 giorni), successivamente sono rigonfiati e quindi hanno dato luogo a delle modeste proliferazioni cellulari di colore biancastro.

Con il progredire delle semine si è notato una diminuzione del tempo di incubazione degli ovuli (25-30 giorni) con una sempre più numerosa formazione di callo friabile (fig. 2).

In ogni caso, a prescindere dal periodo di semina, in entrambe le specie esaminate, si è osservato come il callo inizialmente friabile si è indurito assumendo un colore bruno mentre il callo iniziale ha continuato a dividersi senza perdere la condizione di friabilità.

Gli embrioni normalmente si sono differenziati all'interno del callo friabile (fig. 3) ma talvolta si è osservato come il callo di consistenza compatta

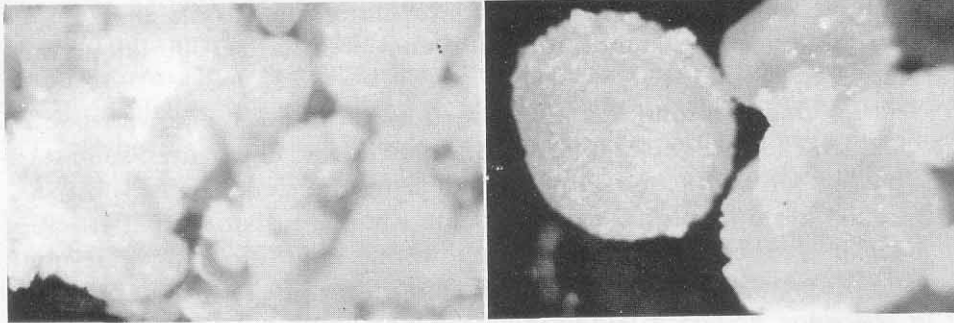


Fig. 3 - Embrioni di *C. sinensis*, che si differenziano all'interno del callo friabile.
C. sinensis embryos from friable calli.

Fig. 4 - Pseudobulbilli di arancio.
Orange pseudobulbils.

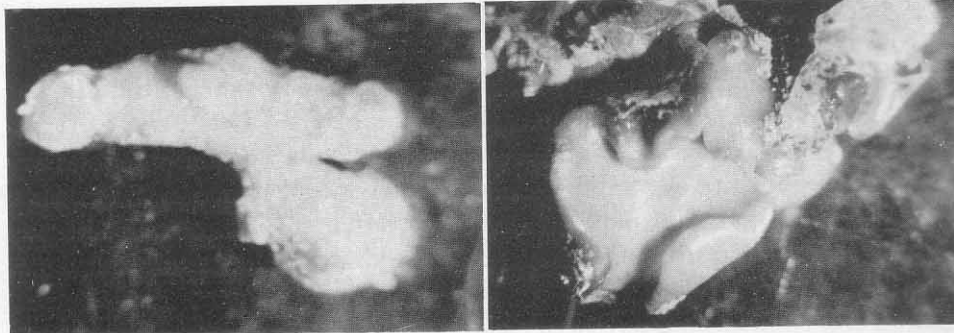


Fig. 5 - Pseudobulbilli di arancio.
Orange pseudobulbils.

Fig. 6 - Embrioni cotiledonari di *C. deliciosa*.
C. deliciosa cotyledonar embryos.

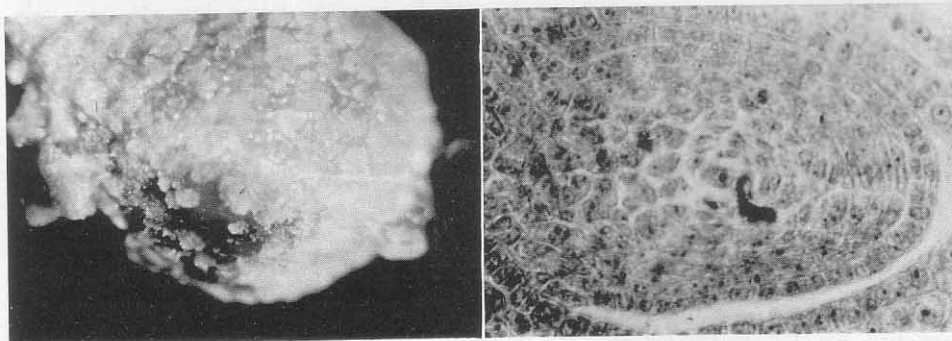


Fig. 7 - Processi di gemmazione in callo di arancio.
C. sinensis embryo proliferated by budding.

Fig. 8 - Megasporecito di arancio in fase di prima divisione.
First division in C. sinensis megasporocyte.

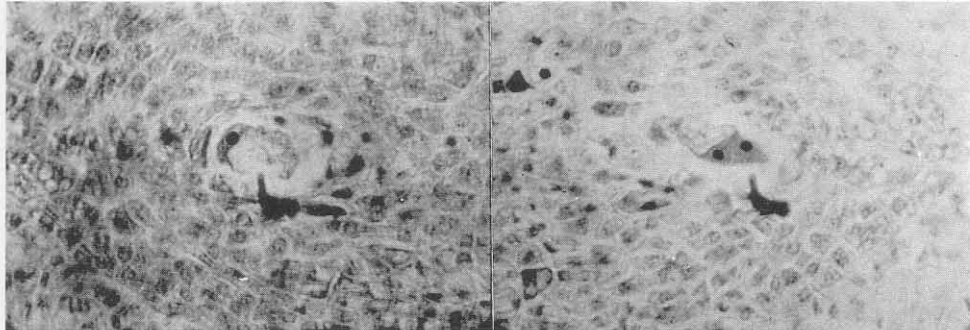


Fig. 9 - Inizio formazione sacco embrionale di *C. sinensis*.
C. sinensis *embryosac* in the starting of formation.

Fig. 10 - Sacco embrionale binucleato di arancio.
C. sinensis *binucleate* *embryosac*.

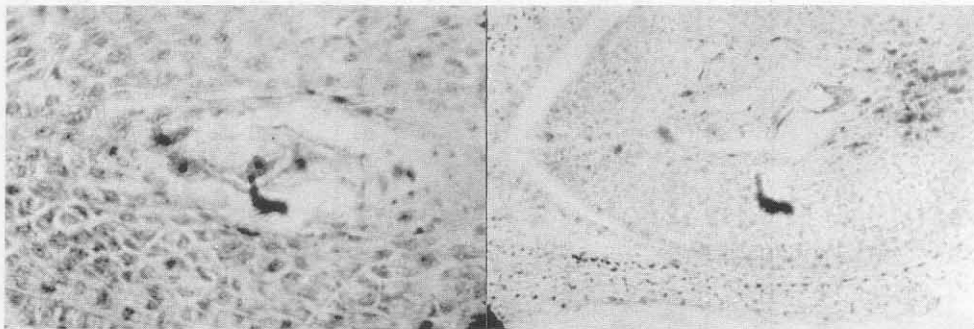


Fig. 11 - Sacco embrionale tetranucleato di arancio.
C. sinensis *tetranucleate* *embryosac*.

Fig. 12 - Inizio embriogenesi con endosperma nucleato in *C. deliciosa*.
Starting of embryogenesis with nucleate endosperm in C. deliciosa.

dopo alcuni trapianti può dare luogo a delle formazioni globulose (pseudobulbilli) (fig. 4-5) che successivamente formeranno embrioni.

Inoltre spesso si sono evidenziati embrioni di diversa forma (fig. 6) e in diverso stadio di sviluppo nonché agglomerati di embrioni dovuti probabilmente a dei processi di gemmazione, *Esan* (1973) (fig. 7).

Le osservazioni microscopiche effettuate per accertare il grado di sviluppo degli ovuli nei diversi periodi di prelevamento hanno messo in evidenza diverse fasi come si può notare dalla tabella n. 1.

Innanzitutto c'è da precisare che per ogni prelievo non c'è stato uniformità di comportamento all'interno di ogni singola specie e tra le due specie in esame si sono messe in evidenza, in particolare nei primi due prelievi (10 gg. prima dell'antesi e preantesi), delle differenze che si traducono in uno stadio evolutivo meno avanzato degli ovuli di mandarino (figg. 8-9) rispetto alle corrispondenti fasi dell'arancio: infatti in quest'ultima specie si possono

Tab. 1 - Differenti stadi di sviluppo degli ovuli al momento della semina.
Development stages of ovules used for vitro culture.

Specie	Stadio di prelevamento	Osservazioni
ARANCIO	10 gg. prima dell'antesi	Ovuli con 4 megaspore
	" "	" " sacco embrionale binucleato
	" "	" " " " tetranucleato
Preantesi		Ovuli con megaspore calazale in fase di inizio divisione mitotica
	" "	" " sacco embrionale binucleato
	" "	" " " " tetranucleato
	" "	" " " " ottonucleato
Antesi		Ovuli con sacco embrionale binucleato
	" "	" " " " tetranucleato
20 gg. dall'antesi		Ovuli con sacco embrionale ottonucleato con evidente inizio embriogenesi
	" "	" " inizio embriogenesi ed endosperma nucleato
40 gg. dall'antesi		Ovuli con inizio embriogenesi ed endosperma nucleato
60 gg. dall'antesi		Embrioni zigotici e nucellari a forma di cuore con endosperma che inizia a cellularizzare

MANDARINO	10 gg. prima dell'antesi	Ovuli con megasporociti appena formati
	" "	" " alla prima divisione meiotica
	" "	" " 4 megaspore
	" "	" " megaspore calazale all'inizio della prima divisione mitotica
	" "	" " sacco embrionale binucleato
<hr/>		
	Preantesi	Ovuli con 4 megaspore
	" "	" " megaspore calazale in fase di prima divisione mitotica
	" "	" " sacco embrionale binucleato
<hr/>		
	Antesi	Ovuli con megaspore calazale all'inizio della prima divisione mitotica
	" "	" " sacco embrionale binucleato
	" "	" " " tetranucleato
<hr/>		
	20 gg. dall'antesi	Ovuli con inizio embriogenesi ed endosperma nucleato
<hr/>		
	40 gg. dall'antesi	Ovuli con inizio embriogenesi ed endosperma nucleato
<hr/>		
	60 gg. dall'antesi	Embrioni zigotici e nucellari a forma di cuore con endosperma cellularizzato

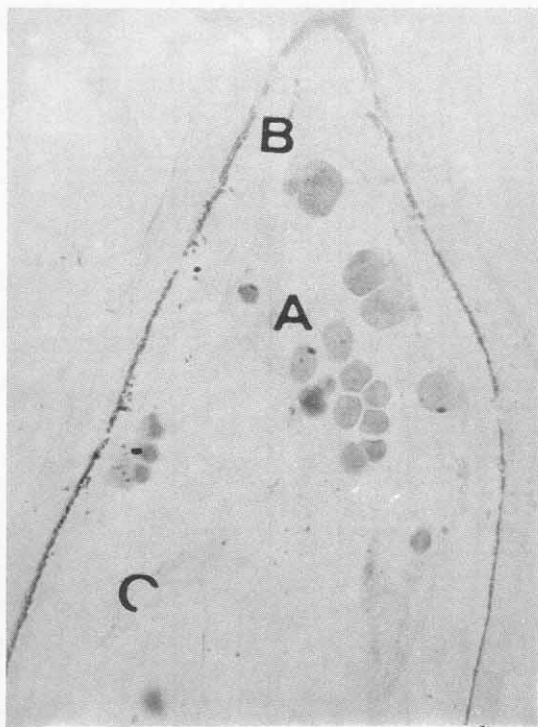


Fig. 13 - *C. deliciosa*, A - sviluppo embrioni nucellari.
 B - inizio degenerazione embrione zigotico.
 C - endosperma cellulare.

C. deliciosa, A - Nucellar embryos.
 B - Starting of degeneration of zygotic embryo.
 C - Cellular endosperm.

osservare cellule con sacchi embrionali tetra ed ottonucleati.

Nell'antesi buona parte degli ovuli esaminati nelle due specie in esame, hanno dato risultati sostanzialmente simili, differendosi nel mandarino poiché assieme alle fasi con sacchi embrionali binucleati e tetranucleati compaiono megaspore alla prima divisione (fig. 10-11).

Nel prelievi successivi all'antesi si è notata una certa uniformità di comportamento degli ovuli sia all'interno che tra le specie considerate. Infatti, è possibile osservare l'inizio dell'embriogenesi con endosperma nucleato a 20 e 40 gg. dall'antesi (fig. 12) ed embrioni zigotici e nucellari con endosperma cellulare nell'ultimo prelievo.

Inoltre è possibile osservare l'embrione zigotico in fase di degenerazione (fig. 13).

Correlando lo sviluppo del callo ed embrioni con l'osservazione microscopica si è osservato come nelle fasi pre-antesi ad una non perfetta organizzazione dell'ovulo corrisponda un tempo più lungo di incubazione e successive formazioni di callo friabile ed embrioni. Con il progredire delle semine (post-antesi) si è osservato l'accorciamento del tempo di incubazione dell'ovulo ed una più rapida e numerosa differenziazione ad embrioni all'interno del callo.

Conclusioni

Per quanto riguarda le diverse epoche di semina che vanno dalla pre-antesi (ovuli non fecondati) a circa 60 giorni dalla piena fioritura (ovuli fecondati), i migliori risultati sono da riferire ad un arco di tempo compreso tra 40-60 giorni dall'antesi, con maggiore produzione di callo, embrioni e quindi piantine.

Si presuppone che il callo di proliferazione prenda origine dai tessuti della nucella, in quanto l'osservazione microscopica spesso ci conferma la degenerazione dell'embrione zigotico e lo sviluppo di quelli nucellari.

In ogni caso sarebbe opportuno condurre un'indagine istologica, per accertare da quali tessuti dell'ovulo avviene la proliferazione cellulare che da origine al callo e successivamente controllare i livelli di ploidia del materiale così ottenuto.

Infine si sottolinea l'importanza che può assumere il callo di proliferazione degli ovuli in relazione alla coltura dei protoplasti.

Riassunto

Si è effettuata la coltura degli ovuli in due specie di agrumi (*C. sinensis* e *C. deliciosa*) procedendo ad una semina scalare dalla pre-antesi a circa 60 giorni dalla piena fioritura.

Ad ogni semina si sono fatte inoltre, le osservazioni microscopiche su una aliquota di ovuli per accertare lo stadio di sviluppo raggiunto dagli stessi in quel periodo.

Da ogni prelievo sono stati ottenuti callo, embrioni e piantine, ma, i migliori risultati sono da ascrivere ad un periodo di tempo compreso tra i 40 e i 60 giorni dall'antesi.

Summary

Vitro culture of Citrus sinensis and Citrus deliciosa ovules.

C. sinensis and *C. deliciosa* ovules, at different stages of development, were cultured on sterile Murashige and Tucker medium supplied with 1mg/l of malt extract and 1% of Agar.

Friable embryogenetic calli obtained from the cultured ovules after different time correlated with the stage of ovules. The embryogenetic calli were trasplanted in sterile M-T medium supplemented with IAA 1mg/l and kinetine 0.1mg/l. Also, in order to study the development stage, ovules were fixed in cromopropionic-phormaldeid, embedded in paraplast following the method of Johansen (1940) and stained with Heidenain hematoxiline.

Several embryos were obtained from subcultured friable calli and several seedlings from embryos, but a larger quantity of embryos have been obtained from ovules cultured at 40-60 days from anthesis.

Bibliografia

- 1) BITTERS W.P., MURASHIGE T., RANGAN T.S., NAUFER R., 1970 : *Investigations on established virus free citrus plants through tissue culture*. Calif. Citrus Nurserymen's Soc. Yearb 9/27-30.
- 2) BUTTON J., BORNMAN C.H., 1971 : *Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange in vitro*. J.S. Afr. Bot. 37, 127-134.
- 3) ESAN E.B., 1973 : *A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae*. Phd thesis, Univ. of California, Riverside.
- 4) JOHANSEN D.A. 1940 : *Plant microtechnique*. New York; Mc Graw-Hill.
- 5) KOCHBA J., SPIEGEL-ROY P., SAFRAN H., 1972 : *Adventive plants from ovules and nucelli of Citrus*. Planta 106:237-245.
- 6) MAHESHWARI P., RANGA SWAMY N.S., 1958 : *Polyembryony and in vitro culture of Citrus and Mangifera*. Indian J. Hort. 15, 275-286.
- 7) MURASHIGE I., TUKER D.P.H. : *Growth factor requirement of citrus tissue culture*. Proc. Ist. Int. Citrus Symp., vol. 3, p. 1155-1161, H.D. Chapman, ed. Univ. Calif. Riverside Publ. Dept. 1969.
- 8) NAVARRO L., JUAREZ J., 1977 : *Elimination fo Citrus pathogens in propagative budwood. II. In vitro propagation*. Proc. Int. Soc. Citruculture 3:973-987.
- 9) RANGAN T.S., MURASHIGE T., BITTERS W.B. : *In vitro studies of zigotic and nucellar embryogenesis in Citrus*. Proc. Ist. Int. Citrus Symp. Vol. 1, p. 226-229; H.D. Chapman, ed Univ. Calif. Riverside: Publ. Dept. 1969.
- 10) SABHARWAL P.S., 1963 : *In vitro culture of ovules, nucelli and embryos of citrus reticulata Blanco var. Nagpuri*. Plant tissue and Organ Culture, Intern, Symp. Delhi, 265-274.
- 11) SINGH V.P., 1963 : *Raising nucellar seedling of some Rutaceae in vitro*. Plant tissue and Organ Culture, Intern, Symp. Delhi, 275-277.
- 12) STARRANTINO A., SPINA P., RUSSO F., 1978 : *Embriogenesi nucellare e sviluppo di piantine in vitro dalle nucelle di alcune specie di agrumi*. Giornale Botanico Italiano 112: 41-52.