

Sterilizzazione della foglia e preparazione dell'espianto per la generazione dei calli

a cura di V. Soglio, G. Palazzi e E. Scortecci

È possibile verificare che cellule vegetali già differenziate, conservano la capacità di sdifferenziarsi ritornando alla condizione di pluripotenza e dando origine ad ammassi amorfi di cellule chiamati calli.

I calli possono essere ottenuti e mantenuti indefinitamente in vitro a partire da foglie, radici o fusti. Possono inoltre essere indotti a rigenerare organi o piante con l'aggiunta di specifiche combinazioni di ormoni.

Obiettivo

Sterilizzare una foglia da cui ottenere dei frammenti di 1 cm² circa, gli espienti, da porre su terreno con una quantità di ormoni tale da indurre lo sdifferenziamento delle cellule e la conseguente formazione di un callo.

Procedimento

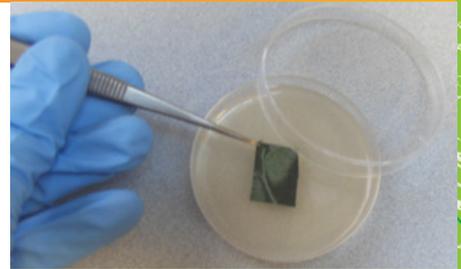
Sterilizzazione della foglia

Le foglie più adatte per la generazione di calli sono risultate quelle di geranio, si possono ottenere discreti risultati anche con *Saintpaulia* e ciclamino. In questi ultimi due casi l'efficienza di generazione è inferiore e i tempi sono più lunghi.

1. Sciacquare velocemente sotto l'acqua corrente la foglia per eliminare residui di terra, polvere e piccoli insetti.
2. Porre la foglia all'interno di una bottiglia e aggiungere la soluzione contenente sapone liquido.
3. Chiudere il tappo, agitare e aspettare 3 minuti.
4. Eliminare la soluzione facendo attenzione a non perdere la foglia.
5. Nella stessa bottiglia aggiungere la candeggina.
6. Chiudere il tappo, agitare e aspettare 10 minuti.
7. Eliminare la candeggina.
8. LA FOGLIA È STERILE.
9. Aggiungere l'acqua sterile.
10. Chiudere il tappo, agitare e aspettare 2 minuti.
11. Eliminare l'acqua e ripetere il lavaggio per altre 3 volte.
12. Ogni volta che si aggiunge una soluzione fare in modo che la foglia sia completamente coperta. Gli strumenti come pinzette e bisturi possono essere sterilizzati passandoli su una fiamma.



Foglia di geranio immersa nella soluzione contenente sapone liquido.



Tempo previsto

1 ora

Materiali e reagenti

- ✓ Materiale vegetale fresco
- ✓ 500 ml di soluzione acquosa contenente 1 goccia di sapone liquido per i piatti
- ✓ Candeggina commerciale
- ✓ Acqua distillata sterile
- ✓ Bottiglia di vetro con tappo, in alternativa vasetto della marmellata
- ✓ Becher da litro per gli scarti
- ✓ Pinzette sterili
- ✓ Bisturi sterile
- ✓ Piastre sterili con terreno per la generazione dei calli

Strumentazione

- ✓ Fornellino o fiamma per sterilizzare

Preparazione dell'espianto

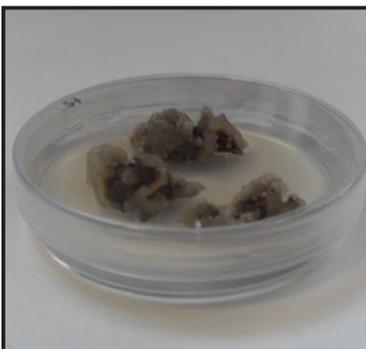
1. Prelevare la foglia con la pinzetta sterile e posizionala su una superficie il più possibile pulita.
2. Tagliare una porzione di foglia di circa 1 cm² usando il bisturi sterile e aiutandosi con la pinzetta.
3. Sempre usando la pinzetta sterile, trasferire l'espianto su una piastra con terreno per la generazione di calli.
4. Chiudere la piastra con il parafilm per limitare l'evaporazione ed eventuali contaminazioni.
5. Porre la piastra in un luogo luminoso (non alla luce solare diretta) e con una temperatura di circa 25°C.
6. Dopo circa 3 settimane, i calli diveranno visibili a occhio nudo.
7. Controllare periodicamente le piastre per verificare eventuali contaminazioni da muffe, in tal caso trasferire l'espianto o il callo su una nuova piastra.
8. Dopo circa 1 mese i nutrienti presenti nel terreno si esauriscono, è perciò necessario trasferire l'espianto o il callo su una nuova piastra.

Dopo aver ottenuto il callo tramite lo sdifferenziamento delle cellule adulte, è possibile indurre il ri-differenziamento trasferendo il callo su terreni contenenti opportune concentrazioni di ormoni.

Per il differenziamento delle radici, trasferire il callo su terreno contenente una maggior quantità di auxina, mentre per il differenziamento delle foglie, trasferire il callo su terreno contenente una maggior quantità di citochinina (vedi protocollo "Preparazione dei terreni"). Anche in questo caso sarà possibile osservare a occhio nudo le prime radici o foglie dopo circa un mese.



Taglio dell'espianto dalla foglia sterile.



Piastra con espanti di foglia da cui si sono generati dei calli.