

# **CULTURE *IN VITRO***

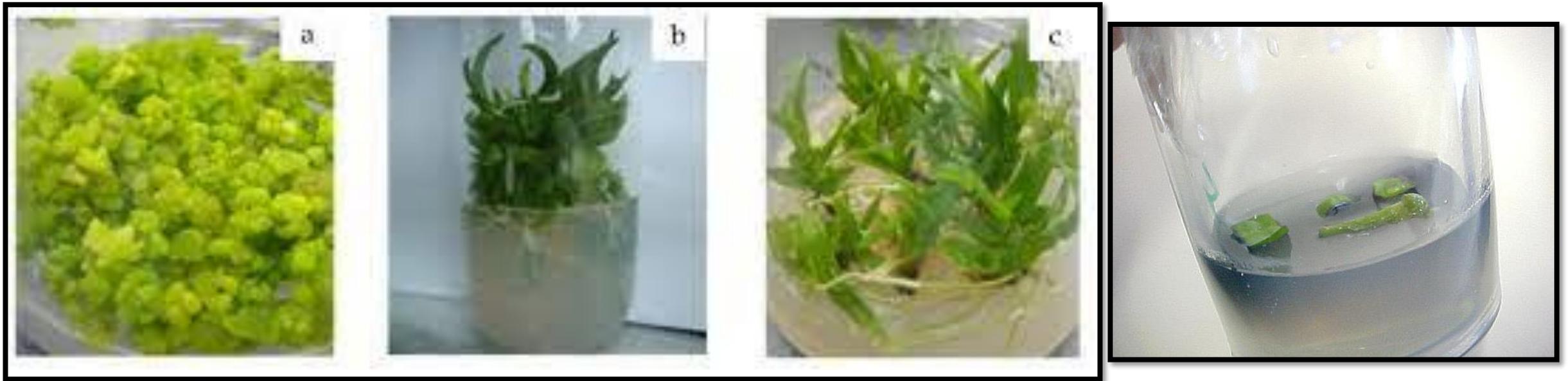


**Capitolo 2, 3, 4, 6**

# COLTURE *IN VITRO*

Si tratta di colture di cellule o tessuti vegetali su substrati artificiali noti come mezzi di coltura in condizioni di sterilità ed in ambiente controllato (pH, temperatura, luce, ecc).

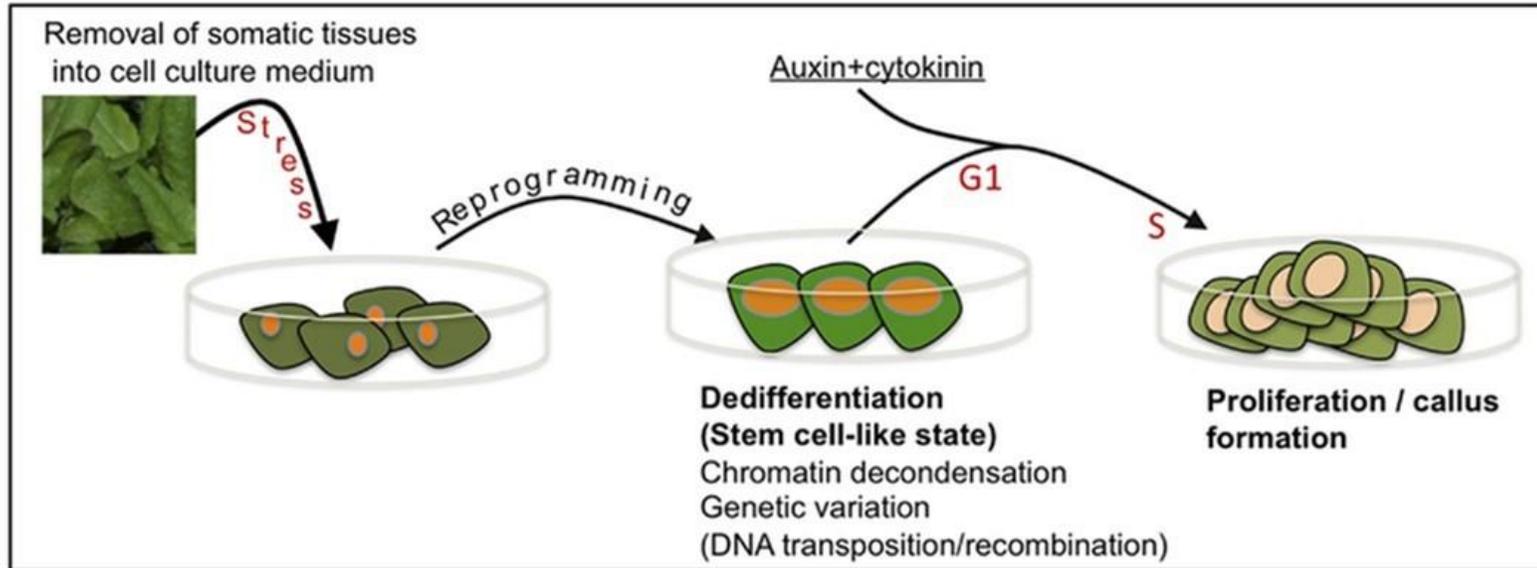
La coltura di cellule e tessuti di piante trova il loro fondamento nella totipotenza cellulare. Ciascun tessuto vegetale vivo, sottoposto a determinati stimoli ormonali, torna in fase 'meristemica' ed inizia a moltiplicarsi.



L'aspetto complesso del processo riguarda sia il **DEDIFFERENZIAMENTO** ovvero il ritorno al contesto di cellula cicliante, sia il **DIFFERENZIAMENTO** ovvero la trasformazione di un tessuto meristemico in un tessuto maturo con ruoli specifici.

# DEDIFFERENZIAMENTO

Le colture cellulari possono essere realizzate partendo da tessuti già meristematici (meristemi embrionali e primari) oppure la moltiplicazione di nuove cellule si può indurre anche da tessuti già differenziati che subiscono un processo di sdifferenziamento.



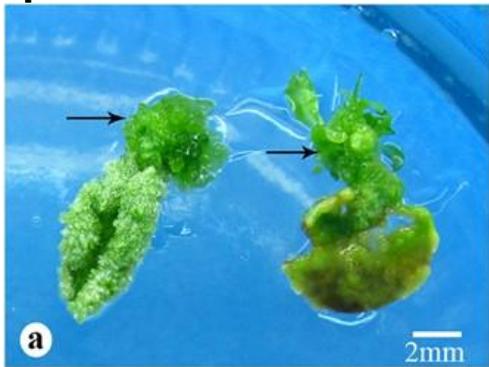
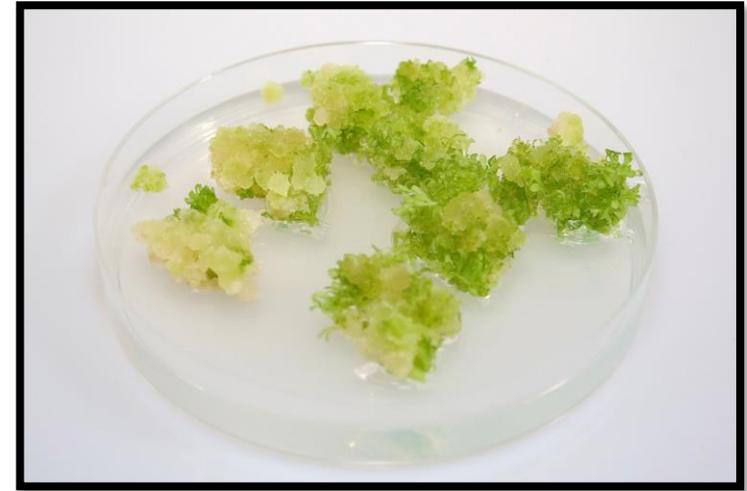
Lo sdifferenziamento o dedifferenziamento è un processo 'stressante' per una cellula vegetale che una volta separata dal suo tessuto deve ricevere stimoli chimici (ormonali) e nutrimento dall'esterno.

Il frammento di pianta che viene utilizzato per creare una coltura cellulare si chiama espianto e può provenire da qualsiasi porzione della pianta. E' importante sia sterile pertanto si devono applicare sistemi di eliminazione dei microorganismi, in quanto all'interno della terreno di coltura potrebbero proliferare e infettare le cellule e i tessuti in coltura. La disinfezione non deve tuttavia essere invasiva per il tessuto quindi spesso si usano disinfettanti blandi come etanolo 70%, ipoclorito di sodio diluito, ecc.



# IL CALLO

La crescita e la moltiplicazione di nuove cellule vegetali in colture liquide ma soprattutto solide dà origine ad ammassi amorfi, definiti **CALLI**. Questi sono composti da cellule tutte ciclanti ed indifferenziate che producono continuamente nuove cellule totipotenti. Queste possono essere mantenute indifferenziate per generare nuovi calli per propagare il tessuto oggetto di interesse; oppure è possibile indurre il differenziamento e generare organi o piante intere.



Il differenziamento del callo richiede l'invio di segnali chimici alle cellule che dovranno differenziarsi e trasformarsi in cellule epiteliali, parenchimatiche ecc.

Questo processo è complesso e richiede un bilanciamento di segnali nel tempo (v. dopo).

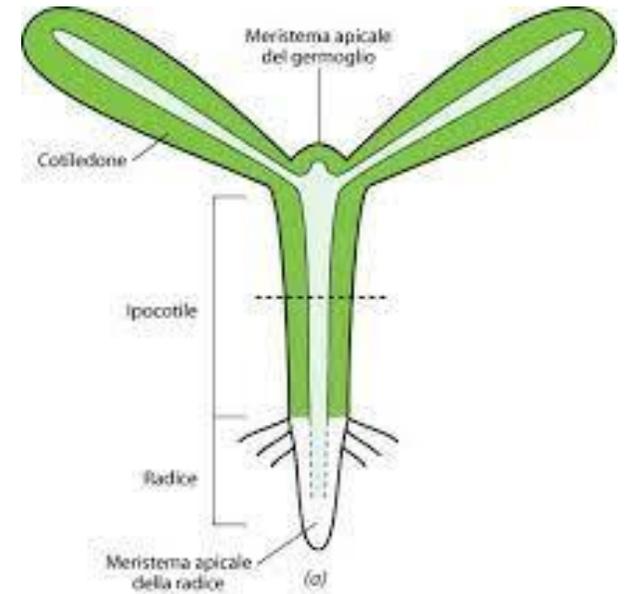
La formazione dei calli nelle piante avviene anche in natura quando un organo vegetale viene ferito; le cellule limitrofe alla ferita dedifferenziano, si moltiplicano e si differenziano riparando il danno.

# TUTTO NASCE DA LONTANO

La possibilità di generare tessuti in attiva proliferazione è intrinseca nel modello di sviluppo delle piante.

In tutte le piante vascolari l'embrione si evolve in una struttura bipolare per la presenza di due meristemi apicali.

Durante il ciclo della pianta tali meristemi producono continuamente nuovi organi che si aggiungono a quelli prodotti durante l'embriogenesi.



Durante lo sviluppo, gli apici vegetativi possono modificarsi in apici riproduttivi, sviluppando le strutture tipiche della riproduzione anche dopo una fase più o meno prolungata di dormienza.

Anche i danni a un organo possono indurre il dedifferenziamento e la ripresa della proliferazione cellulare.

In generale possiamo affermare che le cellule somatiche delle piante possono considerarsi differenziate ma hanno in sé l'informazione per generare un potenziale nuovo individuo.

# MEZZI DI COLTURA

I mezzi di coltura o terreni di coltura sono miscele liquide o solide, molto ricche di acqua con addizionanti macro e micronutrienti, oltre a regolatori della crescita.

Un esempio di nutrienti sono nella tabella 2.2.

Molte colture cellulari hanno cellule con una fotosintesi praticamente nulla o molto limitata; per questo tra i macronutrienti vi è sempre zucchero che viene usato dalle cellule come fonte di energia. Un'altro elemento chiave è l'azoto che viene fornito anche in forma organica. Altri macronutrienti sono i fosfati, il potassio, alcuni sali come magnesio, calcio e zolfo.

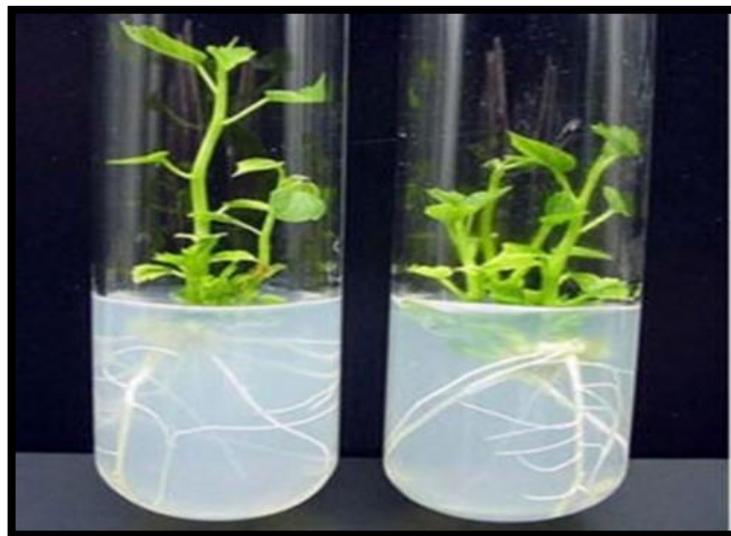


Tabella 2.2 Composizione del mezzo B5\*

Micronutrienti	Concentrazione (mg/l)
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00
KI	0,75
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,00
Macronutrienti	Concentrazione (mg/l)
CaCl <sub>2</sub>	113,23
KNO <sub>3</sub>	2500,00
MgSO <sub>4</sub>	121,56
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130,44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,00
Vitamine	Concentrazione (mg/l)
Mio-inositolo	100,00
Tiamina-HCl	10,00
Acido nicotinico	1,00
Piridossina-HCl	1,00

\* A questo mezzo, contenente nutrienti minerali e vitamine, vengono addizionati zuccheri (generalmente saccarosio), regolatori di crescita e, nel caso di mezzi solidi, un agente gelificante (solitamente agar).

I micronutrienti sono elementi improntati ma che vengono richiesti in tracce e che quindi nei mezzi di coltura sono presenti a basse dosi (micromolari). Sono comunque fondamentali per il corretto sviluppo di cellule e tessuti.

Oltre agli elementi aggiunti come sali (tabella 2.3) vi sono poi le vitamine. La vitamina B1 o tiamina è praticamente presente in tutte le colture cellulari in quanto stimola la crescita. Altre vitamine utili sono B3 e B5.



**Tabella 2.3** Macroelementi necessari per la sopravvivenza, crescita e sviluppo delle cellule vegetali e composti inorganici utilizzati come fonti di tali elementi nei mezzi colturali

Macroelemento	Simbolo chimico	Forma disponibile per le cellule
Zolfo	S	$\text{SO}_4^{2-}$
Fosforo	P	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$
Magnesio	Mg	$\text{Mg}^{2+}$
Calcio	Ca	$\text{Ca}^{2+}$
Potassio	K	$\text{K}^+$
Azoto	N	$\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$
Ossigeno	O	$\text{O}_2$ , $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CO}_2$
Carbonio	C	$\text{CO}_2$
Idrogeno	H	$\text{H}_2\text{O}$

Gli aminoacidi sono un altro elemento importante per le proteine e per avere una fonte di azoto già organico.

# MODULATORI DELLA CRESCITA

I MODULATORI DELLA CRESCITA SONO SOSTANZE SIA ESOGENE CHE ENDOGENE: GLI ORMONI.

Gli ormoni vegetali o fitormoni sono molecole solitamente di piccole dimensioni che già a basse concentrazioni sono in grado di influenzare i processi fisiologici e metabolici della pianta. Nei mezzi di coltura si possono utilizzare diversi ormoni di origine naturale oppure composti di sintesi che mimano gli ormoni naturali. Il bilanciamento tra questi determina la struttura della cultura ovvero la crescita, il dedifferenziamento, il differenziamento, ecc.

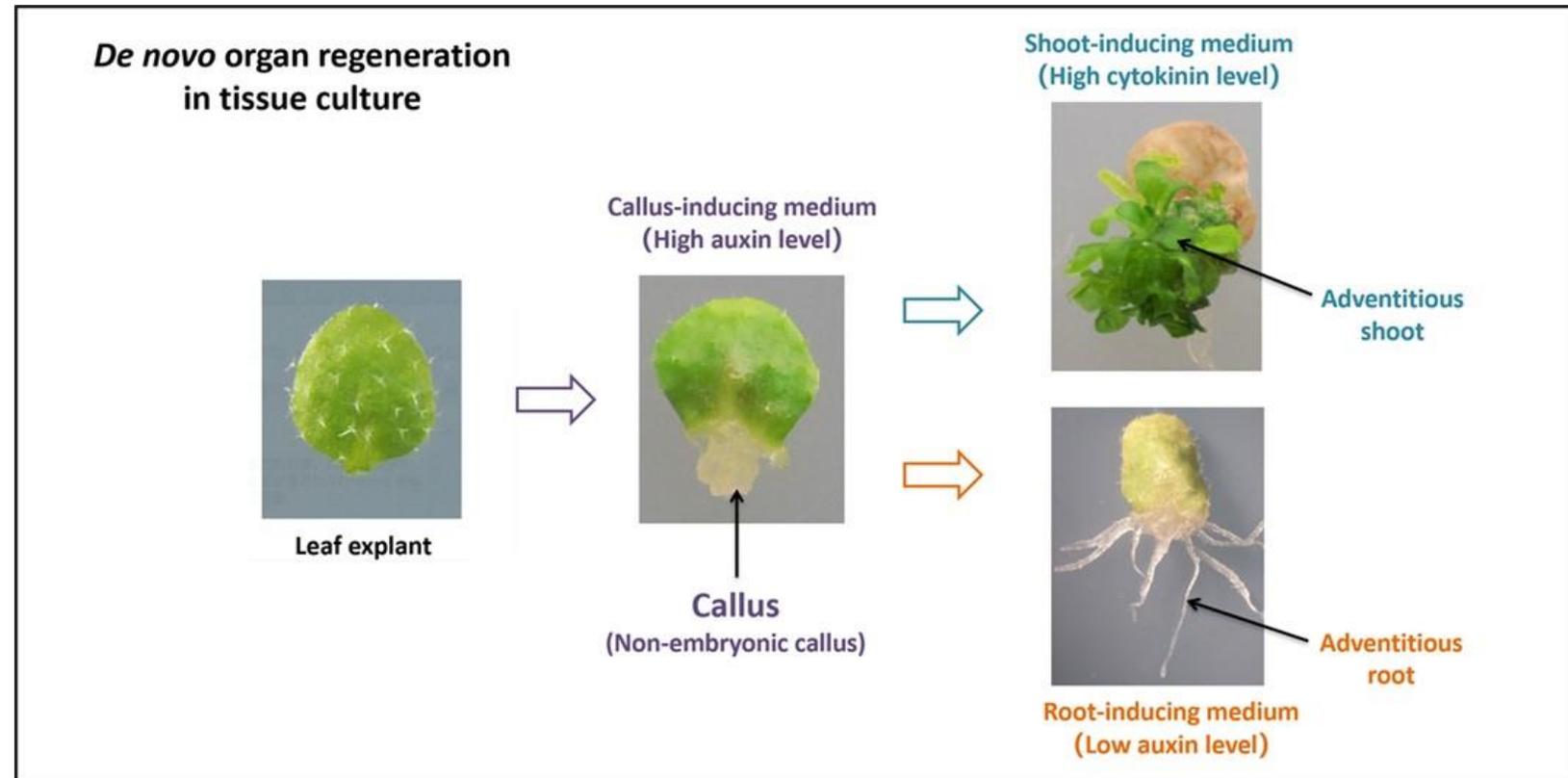
**Gli ormoni delle piante sono 5:**

- ☼ Le auxine
- ☼ Le citochinine
- ☼ Le gibberelline (GA)
- ☼ L'acido abscissico (ABA)
- ☼ L'etilene

- Regolare i processi di sviluppo
- Regolare e coordinare le diverse funzioni metaboliche: nutrizione – riproduzione – crescita - differenziamento
- Rispondere a fattori ambientali

# AUXINE

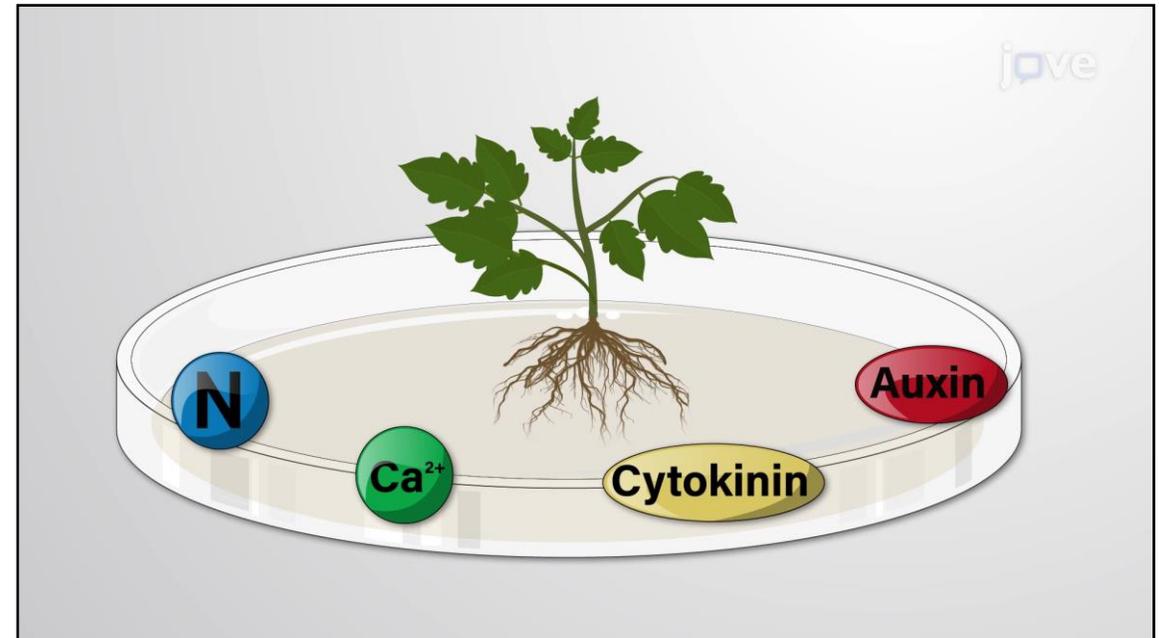
- Sono ormoni fondamentali per la divisione e distensione cellulare. Per questa ragione sono usati sia per indurre la formazione del callo (callogenese), sia per il differenziamento cellulare ovvero per generare embrioni da cellule somatiche (embriogenesi somatica) o radici (rizogenesi). Il loro ruolo è solo nella fase iniziale dei processi poi hanno un feedback negativo ovvero esercitano un processo di rallentamento della crescita.
- La principale auxina naturale è IAA (Indole-3-Acetic Acid). Altri prodotti sintetici sono NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T, Pichloram. Sono meno costosi e più stabili chimicamente.



# CITOCHININE...E ALTRI ORMONI

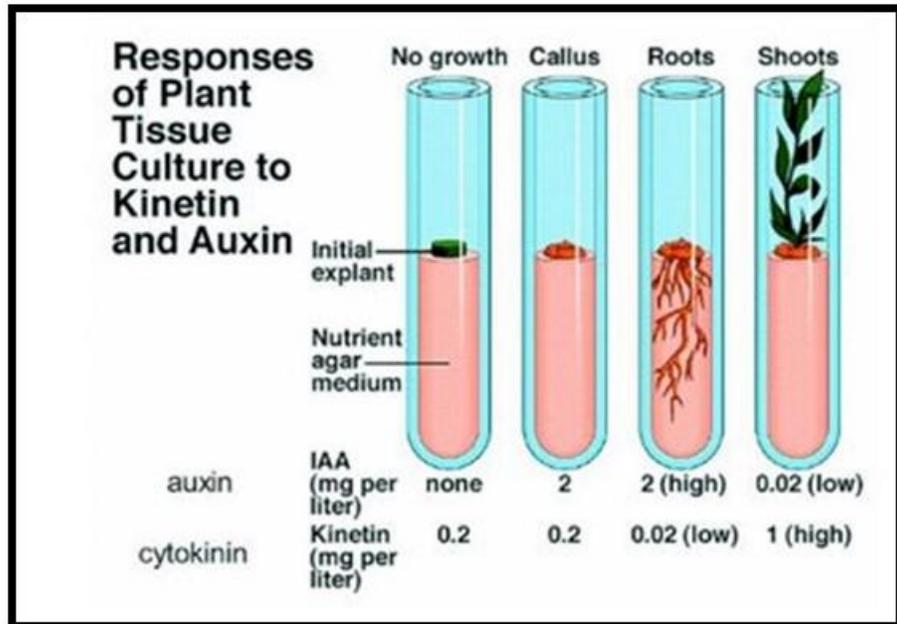
- Sono stimolatori della divisione cellulare ed il loro ruolo è rilevante soprattutto nell'indurre differenziamento. Per esempio promuovono la formazione di gemme avventizie. Sono anche capaci di inibire la crescita per esempio possono inibire la rizogenesi.
- Un solo composto naturale la Zeatina. Analoghi sintetici sono: Benzyladenine (BA) e Kinetin. Queste ultime sono molto meno costose.
- Le giberelline e l'Acido Abscissico (ABA) sono altre classi di ormoni che vengono impiegati nelle colture cellulari ma molto meno frequentemente. Le giberelline si usano per interrompere la dormienza di gemme e bulbi, mentre l'ABA in coltura ha un effetto sul callo (stimolante o inibitorio) e a volte viene usato per stimolare la formazione di gemme.

Uno degli aspetti più complessi delle colture cellulari è predisporre un mezzo di coltura che sia adatto agli scopi della coltura stessa ovvero che dia gli stimoli ideali alle diverse fasi. Combinando macro e microelementi ed ormoni si ottengono diverse tipologie di colture. Per modificare la natura della coltura sarà necessario cambiare mezzo di coltura!

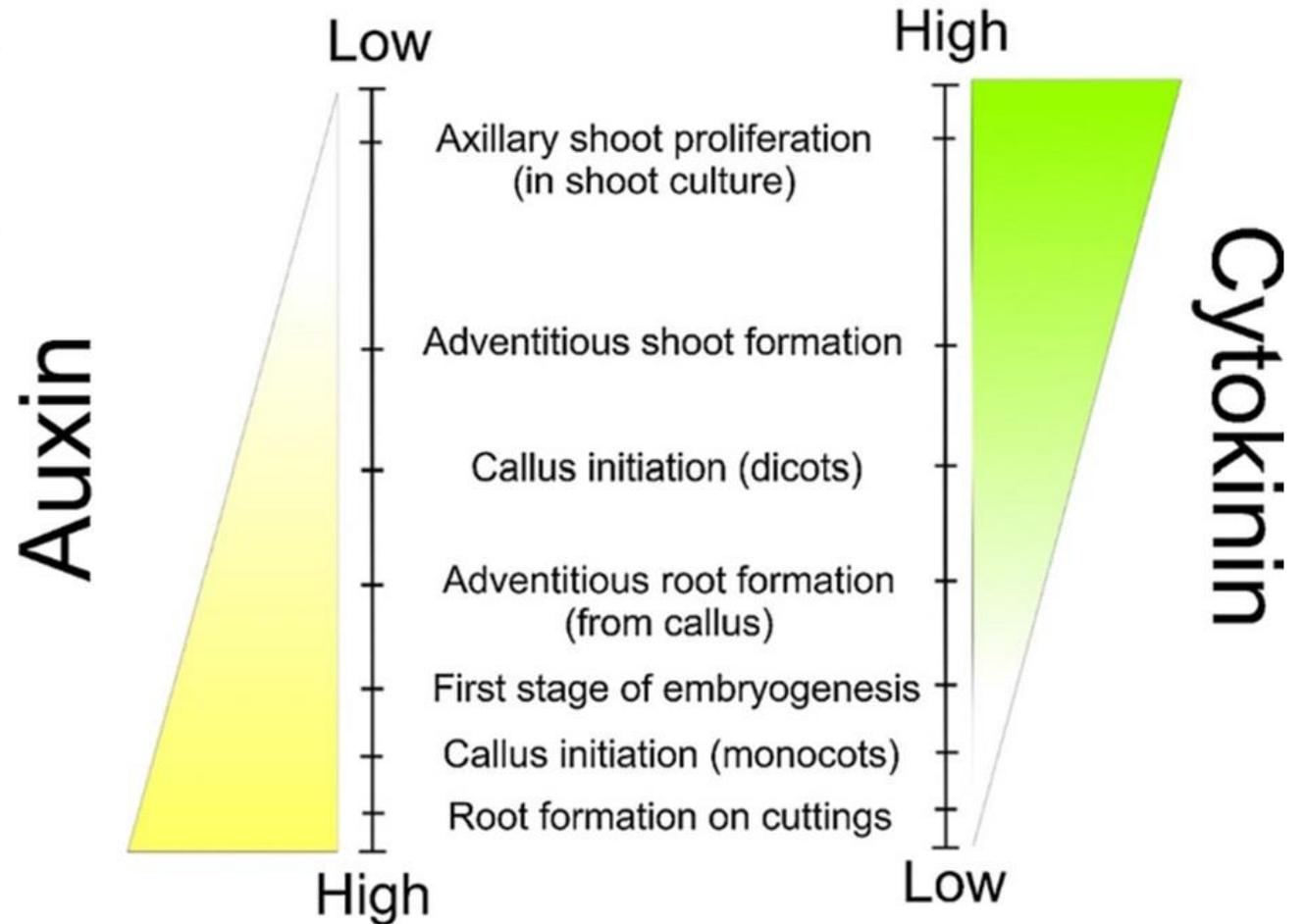


# BILANCIO ORMONALE

Bilanciare Auxine e citochinine è l'aspetto che maggiormente influenza l'evoluzione della coltura. Spesso, per mantenere le proporzioni, le colture cellulare vengono rigenerate con terreni freschi. Se invece si volesse cambiare aspetto alla coltura si deve spostare il callo su un terreno con diverse percentuali e proporzioni di ormoni.



Effects of Auxin : Cytokinin concentration ratio

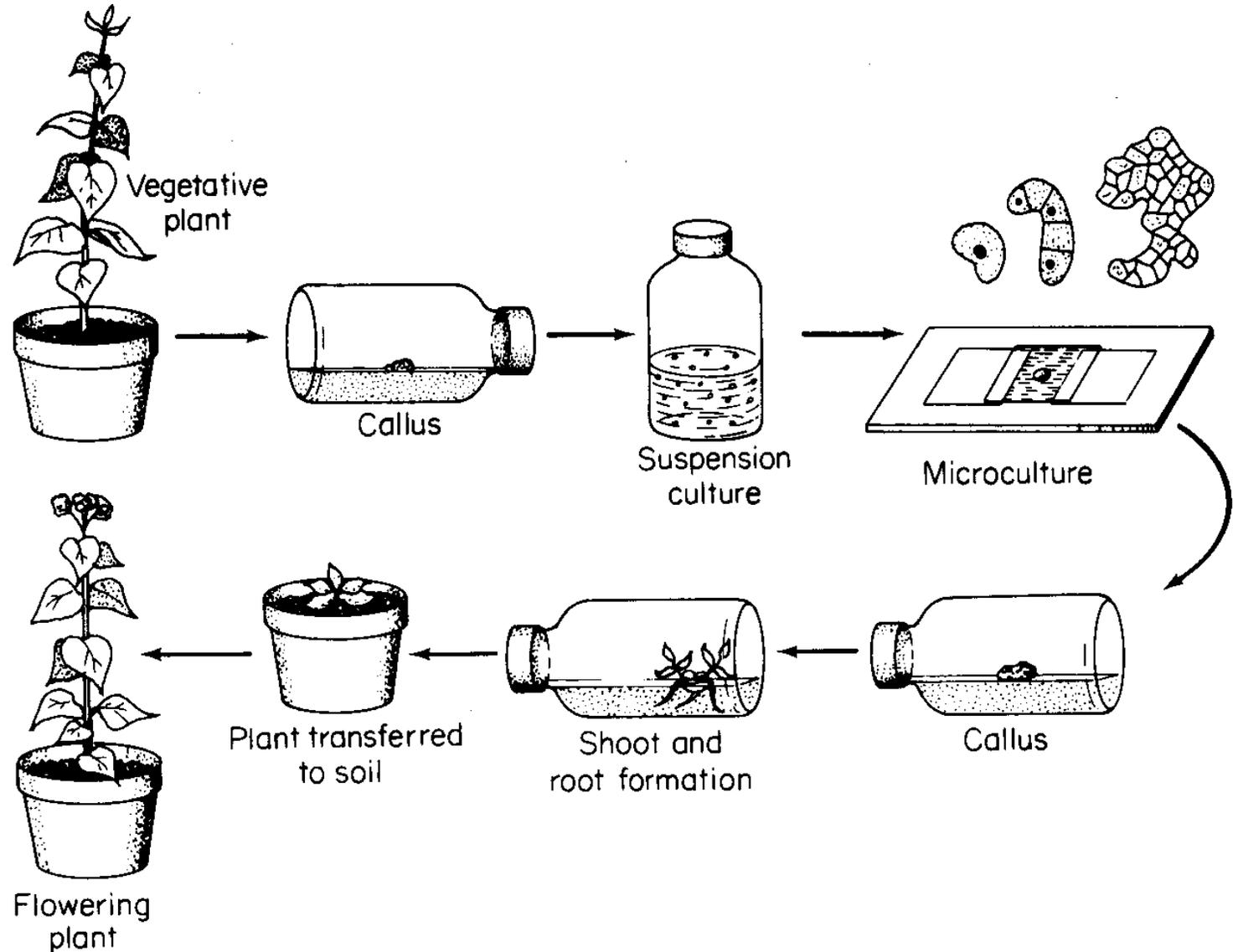


# TIPOLOGIE DI COLTURE CELLULARI

## Colture cellulari indifferenziate

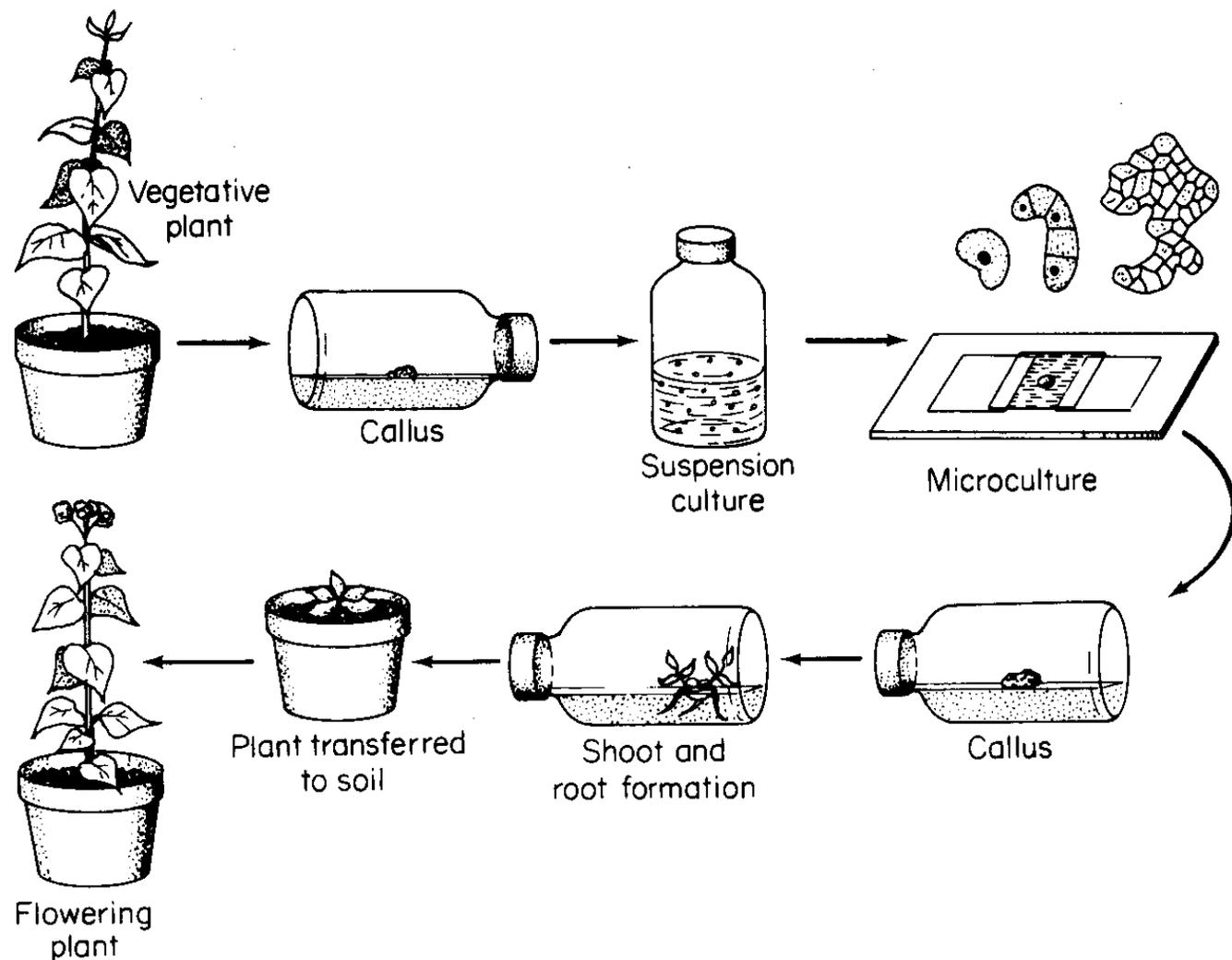
### I CALLI

Si tratta di ammassi di cellule indifferenziate che somigliano per dimensioni a cellule parenchimatiche. Hanno grandi vacuoli.



# TIPOLOGIE DI COLTURE CELLULARI

Utilizzando tessuti differenti e terreni di coltura diversi, è possibile generare colture indifferenziate e poi promuovere il loro differenziamento. Questo consente di selezionare un tessuto specifico e da questo rigenerare una pianta inducendo o meno delle modificazioni nel tessuto primario.

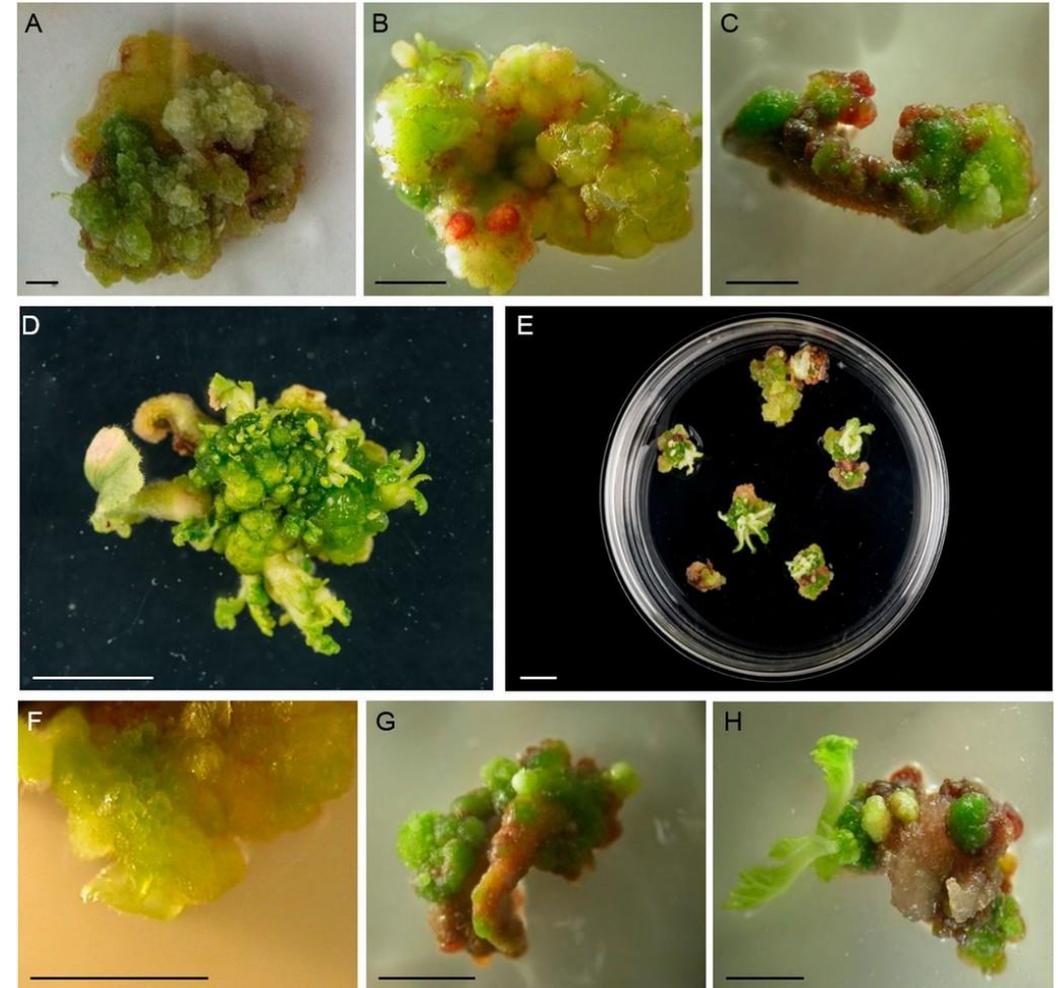
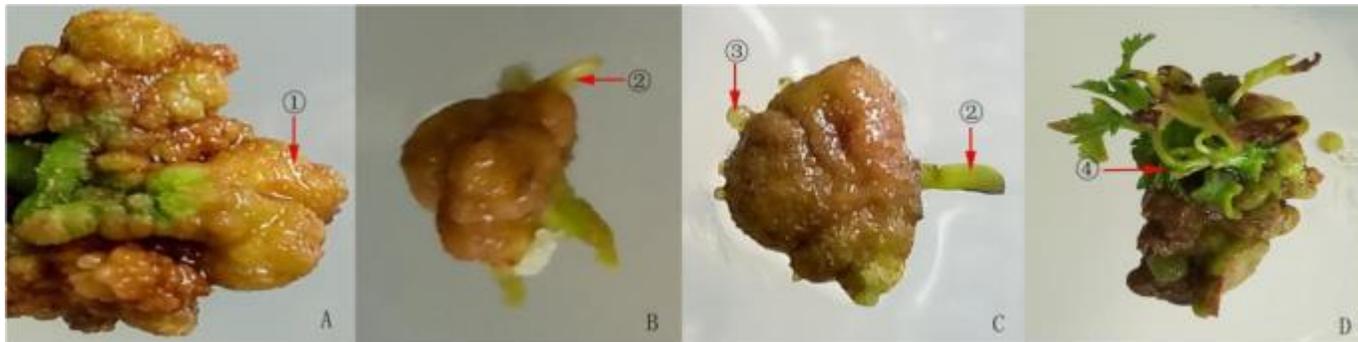


# Colture cellulari indifferenziati

## I CALLI

Si tratta di ammassi di cellule indifferenziate che somigliano per dimensioni a cellule parenchimatiche. Hanno grandi vacuoli e pareti primarie poco rigide (ricche di pectine ed emicellulose).

I calli possono essere utilizzati per mantenere un tessuto indifferenziato per lungo tempo ovviamente rigenerando periodicamente la coltura; oppure per indurre differenziamento e generare radici, foglie ecc.

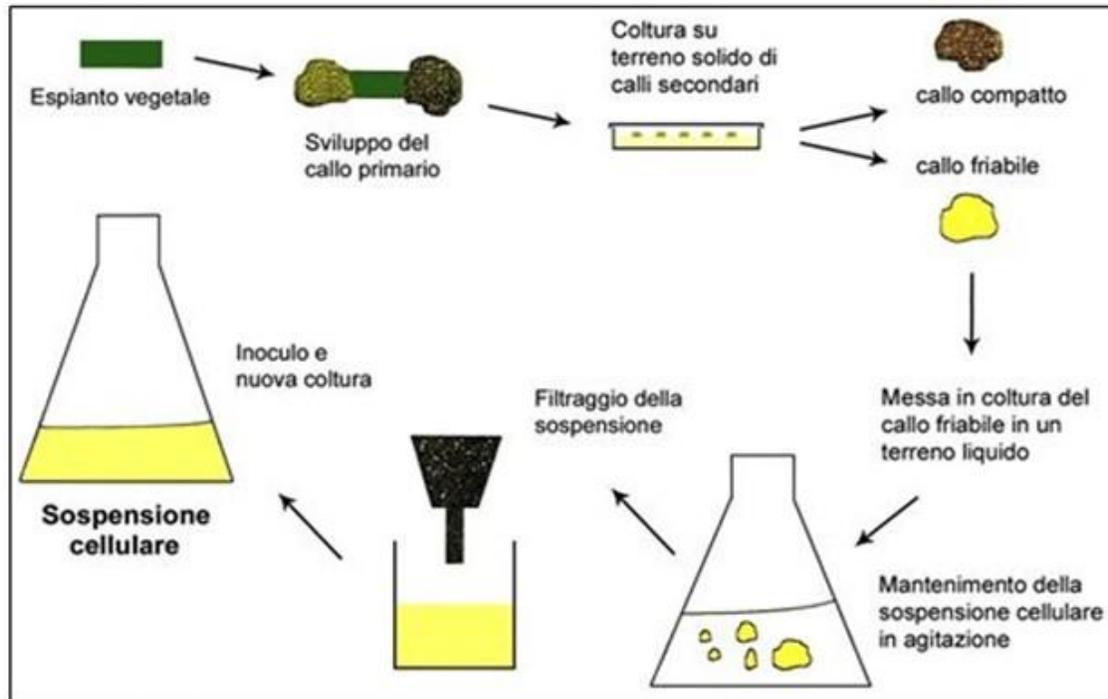


# Sospensioni cellulari

Le **SOSPENSIONI CELLULARI** sono colture di cellule singole o piccoli gruppetti. In generale si realizzano in un terreno liquido in continua agitazione affinché si possa garantire un buono scambio tra il mezzo di coltura e le cellule anche per gli scambi gassosi.

Le sospensioni cellulari si producono partendo da calli friabili che sottoposti ad agitazione liberano cellule singole o piccoli aggregati.

In coltura liquida le cellule si riproducono e nel tempo aumenta quindi la densità delle cellule nel mezzo di coltura. Come per tutte le colture è importante rigenerare la sospensione cellulare con il travaso in terreno fresco con una certa periodicità.

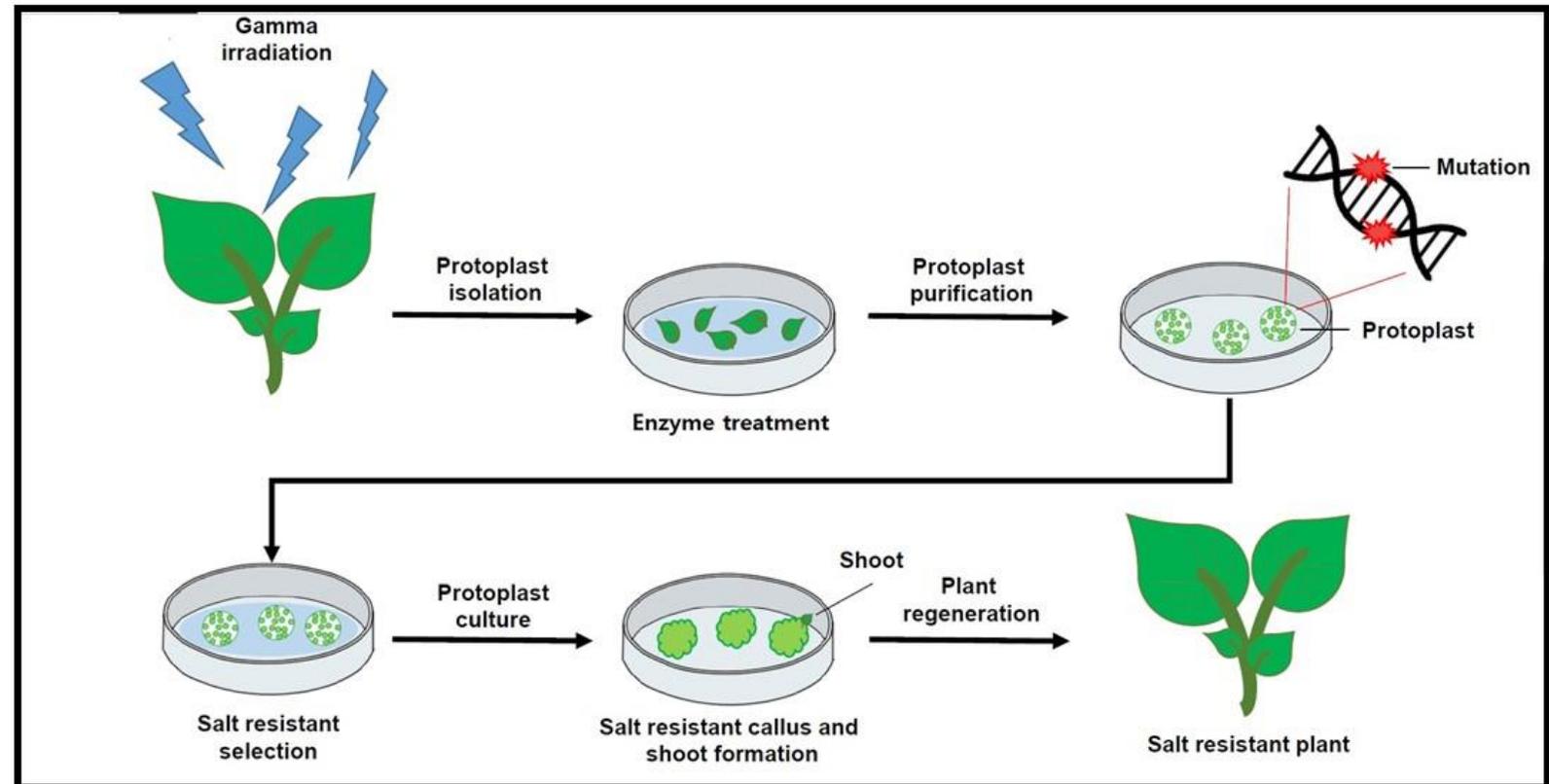


## Colture di protoplasti

Le COLTURE DI PROTOPLASTI sono colture di cellule parenchimatiche private di parete cellulare grazie ad un trattamento enzimatico.

Sono cellule molto sensibili a danni e alterazioni; vengono spesso usati per generare mutanti, ibridazioni ed esperimenti di ingegneria genetica. Per esempio si può indurre mutazione casuale o trasformazione genetica e selezionare i protoplasti trasformati con terreni di coltura selettivi.

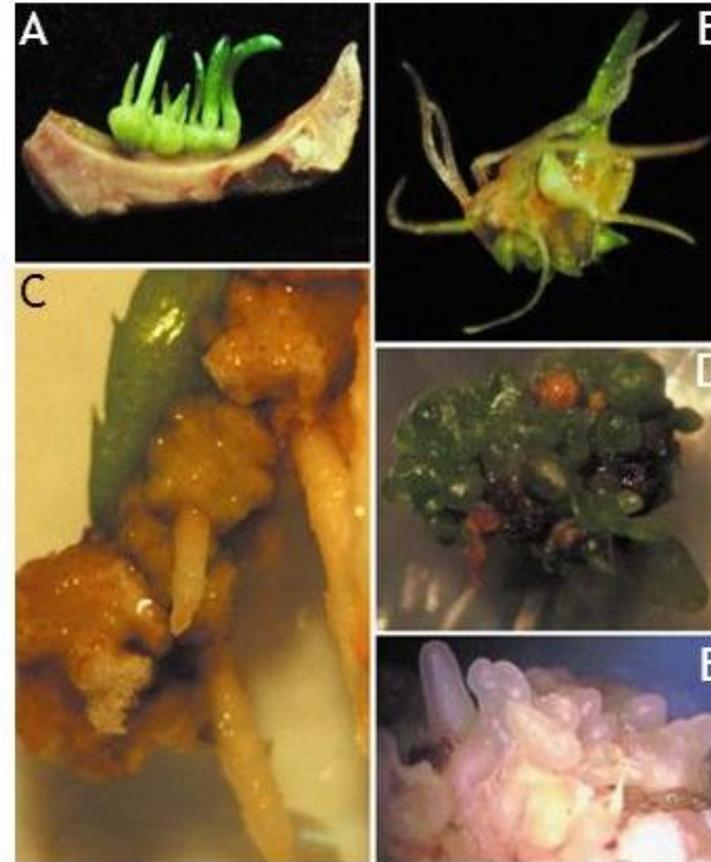
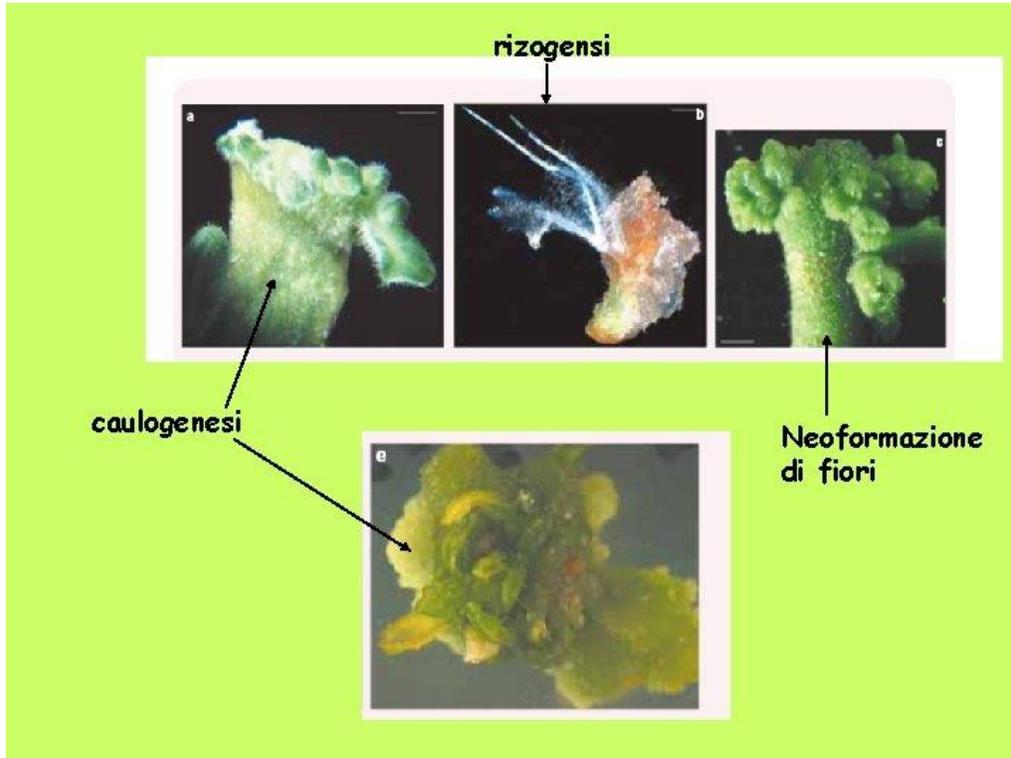
I protoplasti, se messi in un idoneo terreno senza enzimi degradativi della parete, possono rigenerare la parete primaria e successivamente generare calli grazie all'uso di terreno solido ed appositi enzimi.



# Colture di organi

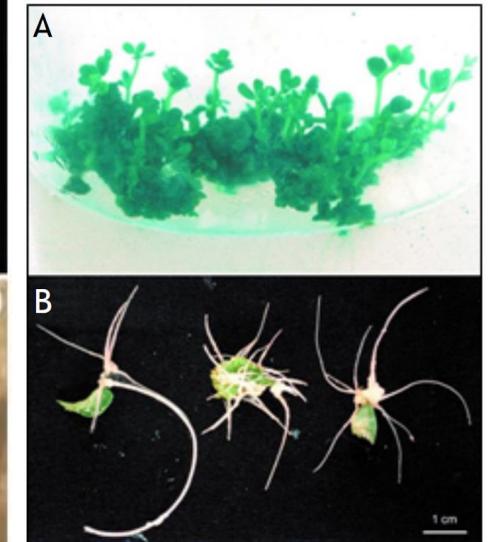
Le COLTURE DI ORGANI si possono ottenere da tessuti già differenziati e posti in coltura (organogenesi diretta) oppure possono rigenerarsi da cellule indifferenziate grazie a miscele ormonali adeguate. Si parla di rizogenesi se si formano radici oppure di caulogenesi se si formano gemme laterali.

Le colture di radici sono molto usate per produrre metaboliti secondari in vitro. Solitamente le radici si ottengono o da giovani semi appena germinati oppure per induzione da calli.



**Figura 16.4**  
Esempi di organogenesi ed embriogenesi diretta e indiretta, rispettivamente in ginseng (A-C) e in melo (D-E) (foto: A. Standardi).

## ORGANOGENESI



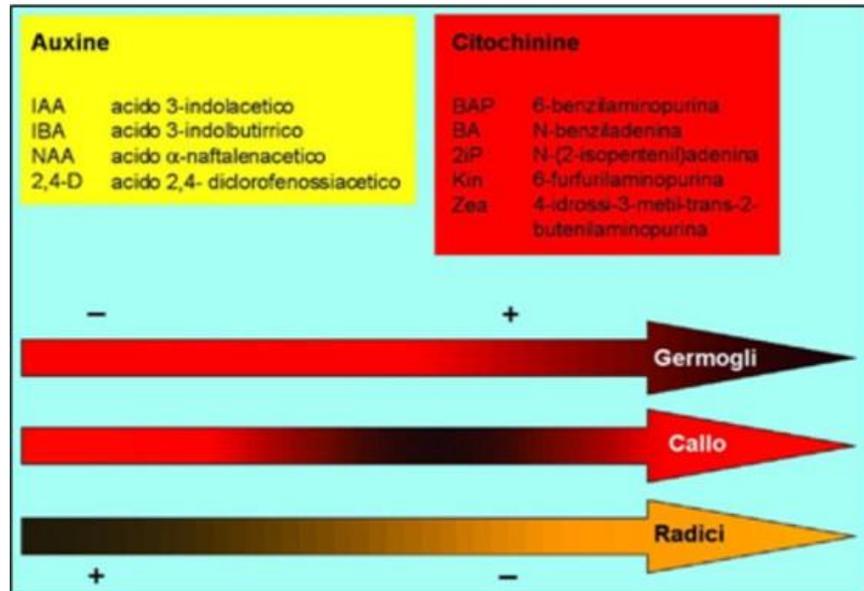
**Figura 16.8**  
Processi di caulogenesi e rizogenesi a partire, rispettivamente, da callo di ginestrino (organogenesi indiretta) (A) e da tessuti fogliari di melo (organogenesi diretta) (B) (foto: A. Standardi).

# Colture di organi

Le COLTURE DI ORGANI possono riguardare anche le porzioni aeree della pianta come gli apici. Le colture di apici si usano per esempio nel risanamento delle piante da virosi. Gli apici possono essere trattati con shock termici che uccidono il virus e successivamente essere propagati in coltura per generare nuove piante.

L'Organogenesi in vitro è un processo che richiede sperimentazione in quanto i bilanci ormonali cambiano da specie a specie e da tessuto a tessuto. A seconda che sia caulogenesi o rizogenesi si sfruttano bilanci ormonali diversi. Come già detto un eccesso di citochinine porta a generare gemme laterali mentre le auxine spingono di più verso la radicazione.

## ORGANOGENESI



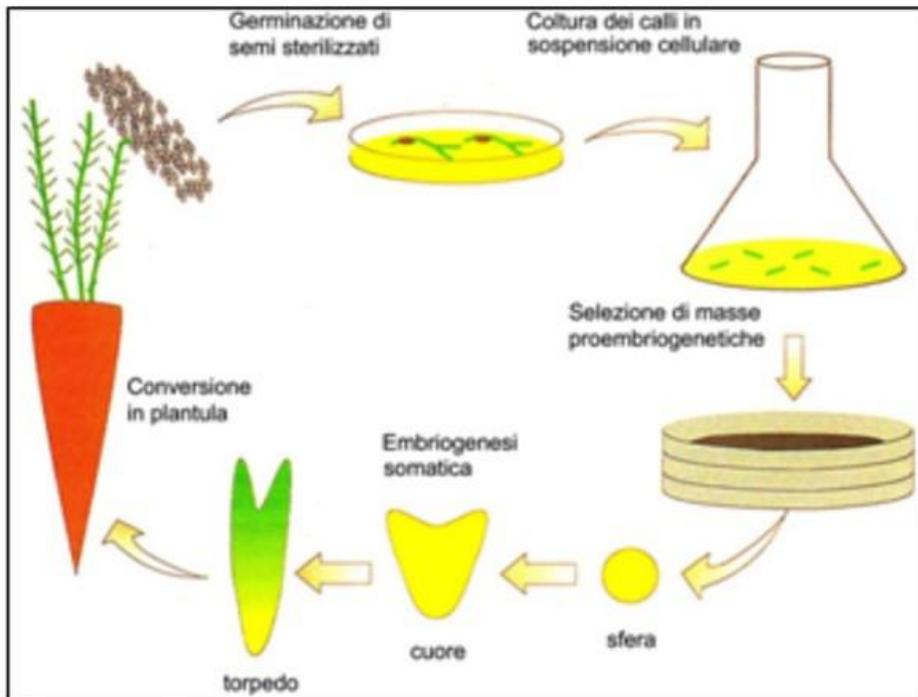
Quando si promuove l'organogenesi si possono anche distinguere diverse fasi sequenziali. Solitamente si parla di fase di induzione in cui si promuove la proliferazione del tessuto (divisione cellulare attiva) e una fase di determinazione. Quest'ultima è la più complessa in quanto guida il differenziamento in un organo specifico. E' in questa fase che il bilancio ormonale diventa essenziale.

# Embriogenesi somatica

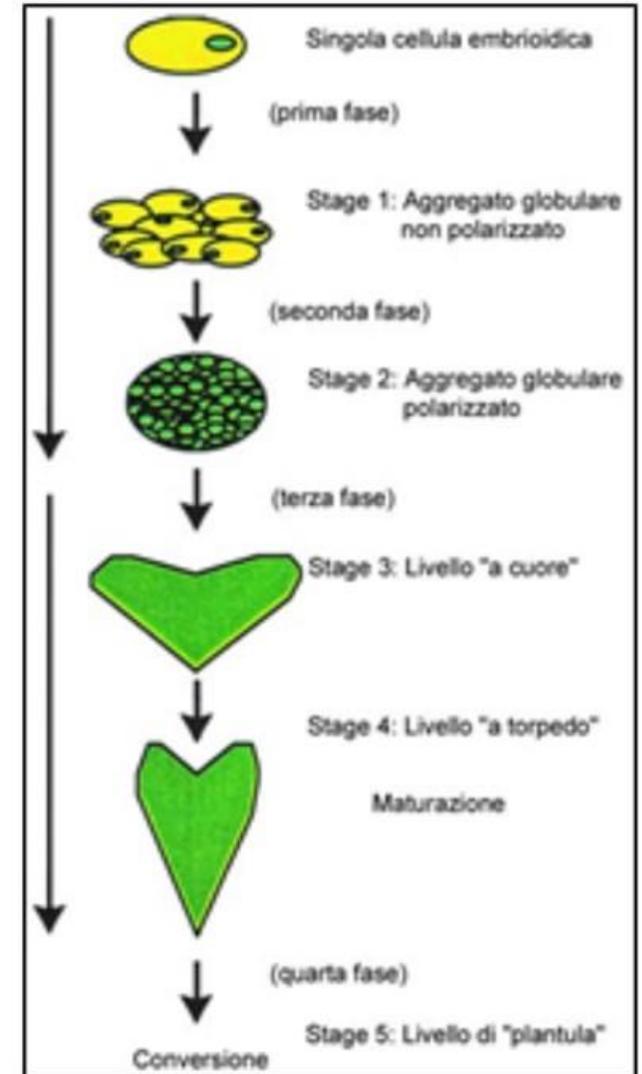
L'EMBRIOGENESI SOMATICA è un processo di formazione di un embrione a partire da cellule somatiche già differenziate senza passare da uno zigote.

L'ottenimento di embrioni a partire da singole cellule già differenziate e tutte uguali è utile sia per eseguire studi e test di laboratorio, sia per ottenere piante identiche dopo eventi di trasformazione genetica. Come per un normale embrione anche gli embrioni somatici passano le diverse fasi di sviluppo come nella figura affianco.

## EMBRIOGENESI



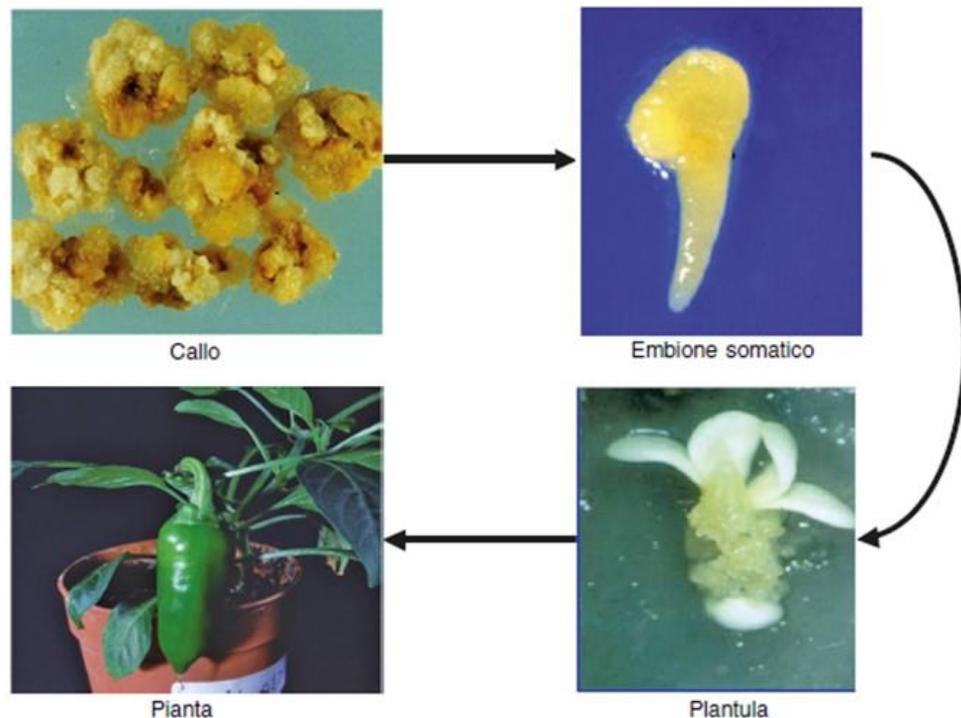
Tecnicamente dopo aver indotto il differenziamento è necessario selezionare gli embrioni e trasferirli in un terreno con altra tipologia di ormoni per farli moltiplicare e/o differenziare.



## Embriogenesi somatica

L'embriogenesi somatica può essere indotta in modo **DIRETTO** ovvero partendo da espianto che trattato con auxina origina cellule ciclanti totipotenti. Alcune di queste cellule possono diventare proembriogenetiche modificando la propria cromatica e attivando geni specifici. Su queste cellule si agisce con altri ormoni per indurre la formazione di embrioni.

Il metodo **INDIRETTO** prevede il passaggio da callo. Quindi c'è uno stato proliferativo seguito da uno di differenziamento.



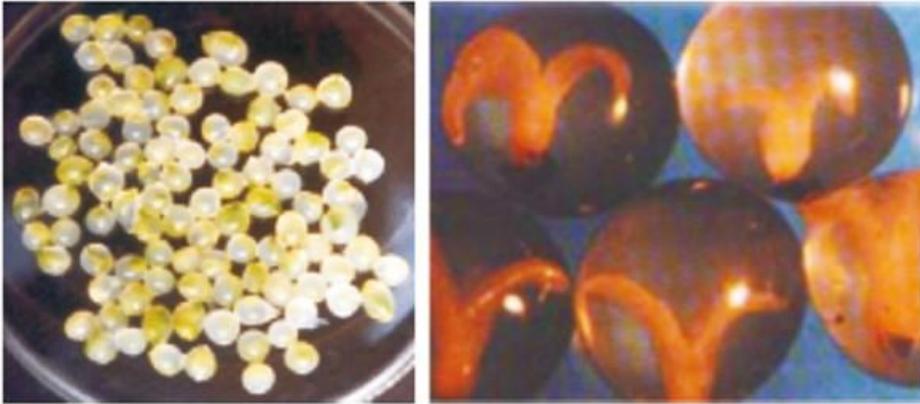
L'induzione di embriogenesi è un processo sperimentale che richiede un adeguato bilanciamento dei **FATTORI DI CRESCITA** che sono per lo più ormoni differenti o proporzioni diverse di cocktail di ormoni.

Potenzialmente da una cellula-tessuto adulto si può prima indurre callo, poi embriogenesi e rigenerare una nuova pianta ma tutto questo processo richiede terreni differenti e quindi spostamento del tessuto-organo-organismo man mano che questo procede nei diversi stadi di sviluppo.

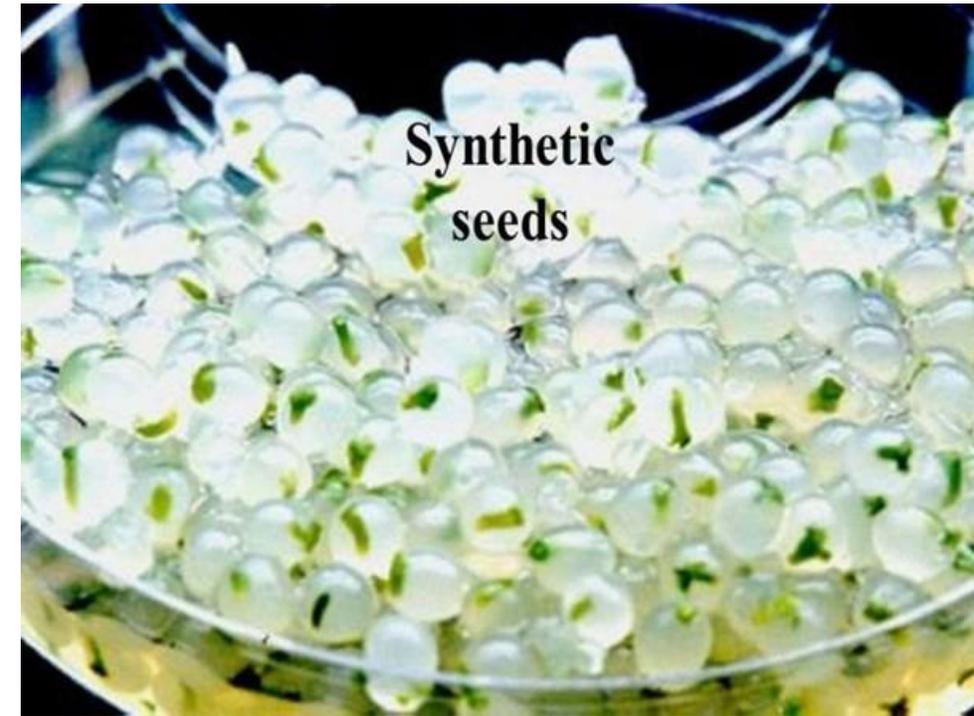
**Figura 4.4** Rigenerazione di pianta di peperone attraverso embriogenesi somatica indiretta (osservazioni di G. Pasqua).

## Semi Artificiali

Le biotecnologie e i nuovi materiali hanno aperto la strada alla produzione di semi artificiali che si realizzano incapsulando embrioni somatici. In generale si usano sostanze collose capaci di aggregarsi e formare dei film protettivi. Lo scopo di questo processo è la conservazione degli embrioni e la possibilità di produrre un gran numero di piante clonali, utilizzabili in diversi contesti, più semplici da gestire rispetto ad una coltura di embrioni.



**Figura 4.6** Semi sintetici incapsulati in pallini di alginato di calcio.



I semi sintetici sono molto meno resistenti e protettivi dei semi presenti in natura. L'embrione somatico, nonostante abbia potenzialità analoghe a quello zigotico, manca di endosperma e/o perisperma pertanto la capsula deve contenere anche 'fattori di crescita' e di sviluppo. Va precisato che la tecnica non è semplice, vi sono elevate percentuali di contaminazione, di aborto dell'embrione e di difficoltà nella gestione nel tempo.

Come per le cellule animali anche le cellule vegetali si prestano al bioprinting sia bi- che tridimensionale per generare dei tessuti/organi funzionali.

L'avanzamento tecnologico permette oggi di sfruttare software dedicati capaci di generare strutture con forme diverse oltre che inserire molecole ed elementi extracellulari e fattori di crescita.

L'interesse per colture vegetali tridimensionali nasce dalla necessità di usare le piante come fabbriche, mettendo insieme più tessuti – cellule che trasformano un certo substrato in prodotto. Di recente è stato possibile stampare cellule indifferenziate e, usando ormoni diversi, promuovere il differenziamento in diverse direzioni. Sfruttando modelli 3D è stato possibile indurre la produzione di pareti secondarie e quindi di sintetizzare lignina. Questo elemento non si ottiene con le normali colture cellulari.



### Green 3D bioprinting of plant cells: A new scope for 3D bioprinting

Solène Landerneau<sup>a</sup>, Lucas Lemarié<sup>a,b</sup>, Christophe Marquette<sup>b</sup>, Emma Petiot<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> SEGULA Technologies, Bron, France

<sup>b</sup> 3d.FAB, Univ Lyon, Université Lyon1, CNRS, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, UMR 5246, 43, Bd du 11 Novembre 1918, 69622, Villeurbanne, Cedex, France

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

3D printing  
Bioink  
Green bioprinting  
Green plants  
Plant cells

#### ABSTRACT

Over the past few decades, additive manufacturing, commonly known as three-dimensional (3D) printing, has proven to be a powerful innovation in numerous scientific areas. Thanks to continuous and progressive advances, 3D printing has demonstrated tremendous possibilities offered for tissue engineering and regenerative medicine, where complex structures of living cells and biocompatible materials were shaped into functional tissues and organs. Unlike animal cells, the use of green plant cells (green algae and land plants cells) for 3D bioprinting is still at its very early stage. The main feature that could be explored by green plant 3D bioprinting is the totipotency of the land plant cells. This asset enables any given part of the plant to regenerate a complete individual, identical or almost identical to the original one. Moreover, due to their high growth rate, green algae appear to be a handy tool to characterize the process of printing plant cells, called "Green bioprinting". Successful transfer of 3D bioprinting know-how to green plants could lead to a breakthrough in the understanding of the so-called in planta behavior, but also in innovation within plant-based industry as for food industry, bioproduction of active biomolecules or plant-based (bio)materials. Here we review the use of 3D bioprinting in plant science and biotechnology and we define the requirements to achieve plant cell 3D bioprinting by microextrusion. On the other hand, we discuss current and future applications, as well as the limitations that may be encountered.

Come per tutte le strutture 3D, le cellule richiedono una sostanza gelatinosa per aggregarle, oltre a polimeri strutturali per poter generare accumuli cellulari pluridimensionali strutturati.

Di seguito una coltura di cellule di lattuga tenute insieme grazie a pectine e fibre di zuccheri.

3

Extrusion based bioprinting  
Lettuce cells

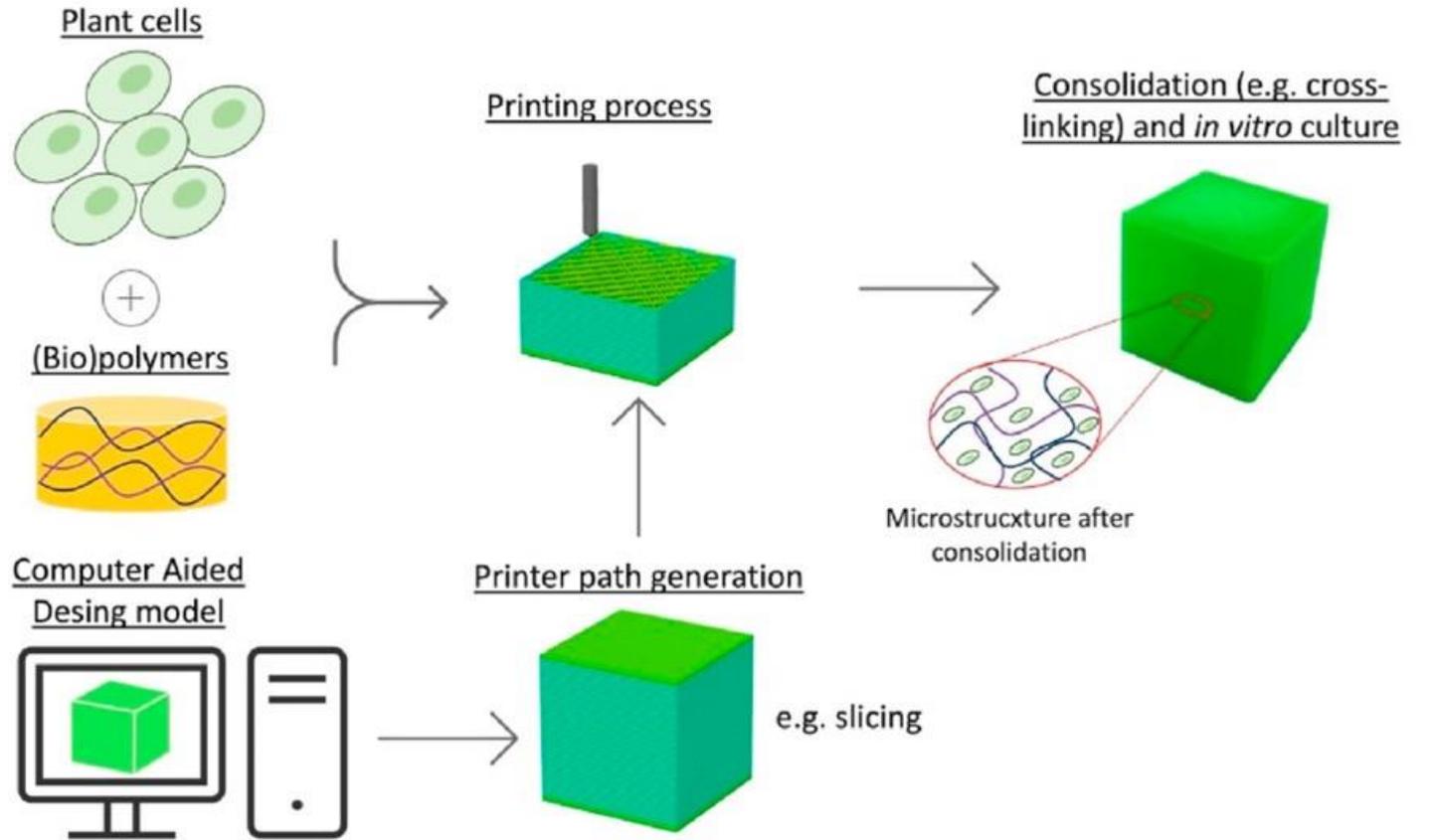
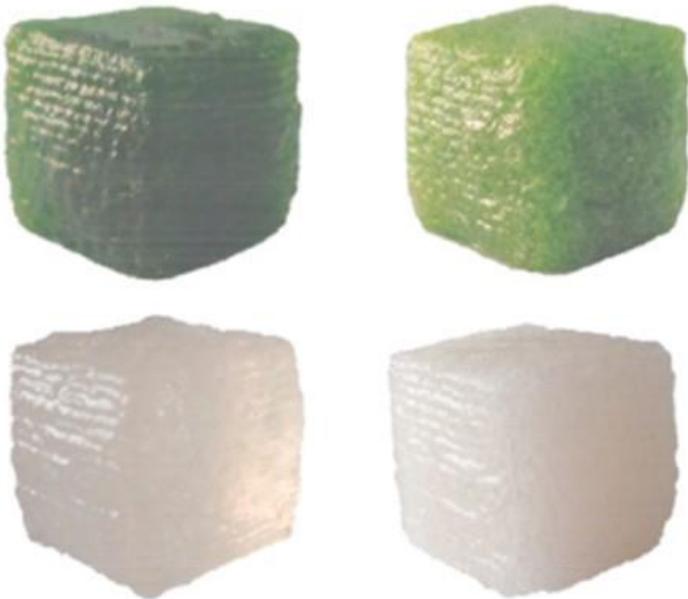


Fig. 1. Scheme showing A the isolated cells production pathways and B the 3D bioprinting process of plant cells.

Il Green bioprinting è un tema di grande attualità e le ricerche si stanno dirigendo sia a risolvere temi più tecnici come la fabbricazione di supporti idonei alle cellule vegetali, sia ai biomateriali esterni al 'tessuto' multicellulare.

Biofabrication


---

**PAPER**

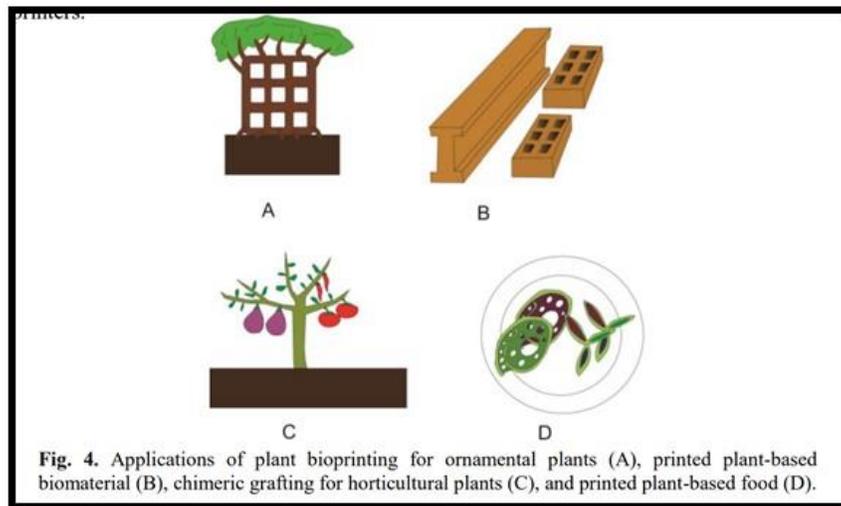
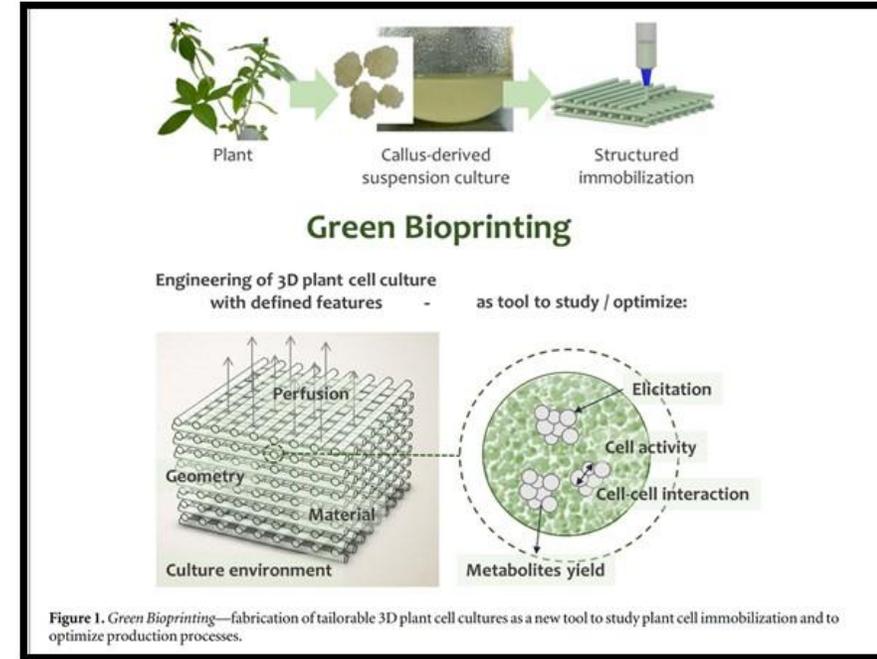
Green bioprinting: extrusion-based fabrication of plant cell-laden biopolymer hydrogel scaffolds

To cite this article: Julia Seidel et al 2017 *Biofabrication* 9 045011

You may also like

- [Engineering considerations on extrusion-based bioprinting: interactions of material behavior, mechanical forces and cells in the printing nozzle](#)  
Julia Emmertmacher, David Spura, Jasmina Czommer et al.
- [The middle lamella—more than a glue](#)  
M S Zamil and A Gelmann

Oltre a fare studi sullo sviluppo e a valutare alcuni processi biologici, i sistemi 3D aprono molte prospettive per esempio per la produzione di biomateriali vegetali come nanocellulose, alginati, amidi, pectine, agarosio o per stampare tessuti e organi per innesti di varia natura o ancora per produrre metaboliti secondari ad elevato valore aggiunto.





**Bioprinting**

Volume 27, August 2022, e00216



---

**Green 3D bioprinting of plant cells: A new scope for 3D bioprinting**

Solène Landerneau <sup>a</sup>, Lucas Lemarié <sup>a, b</sup>, Christophe Marquette <sup>b</sup>, Emma Petiot <sup>b</sup> ✉

[Show more](#) ▾

+ Add to Mendeley   Share   Cite