

## Preparazione dei terreni per la generazione di calli o per il loro ri-differenziamento

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

*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. In natura i calli generano quei tessuti relativamente indifferenziati che si formano con evidenti ispessimenti in zone cicatriziali. 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

Preparazione di 3 tipi di terreno: uno per la generazione di calli vegetali, uno per il differenziamento delle radici e uno per il differenziamento delle foglie.

### Procedimento

La preparazione del terreno per la crescita di calli vegetali descritta in questo protocollo utilizza prodotti Sigma-Aldrich. In commercio esistono diverse ditte che producono materiale simile.

Per la preparazione si utilizza una miscela di agar, saccarosio e vari nutrienti che è generalmente usata nelle colture di cellule vegetali nei laboratori di ricerca (Murashige and Skoog Basal Medium).

1. Versare nel becher 42,4 g di miscela base.
  2. Aggiungere 900 ml di acqua deionizzata e un'ancoretta magnetica per agevolare il mescolamento del terreno.
  3. Porre il becher sulla piastra rotante (è preferibile scaldare la soluzione mentre è in agitazione).
  4. Controllare che la soluzione abbia  $5,5 < \text{pH} < 6,3$ . Se risulta basico, aggiungere una goccia di HCl, se risulta acido, una goccia di NaOH.
  5. Portare a volume con  $\text{dH}_2\text{O}$ .
  6. Trasferire la soluzione nella bottiglia.
  7. Sterilizzare il terreno ponendo la bottiglia in autoclave a  $121^\circ\text{C}$  per 15'.
  8. Lasciare raffreddare fino a quando si riesce a tenere in mano la bottiglia.
- Terreno per la generazione dei calli: aggiungere 500  $\mu\text{l}$  di chinetina (citochinina) e 500  $\mu\text{l}$  di 2,4-DAA (auxina) e mescolare.
  - Terreno per il differenziamento delle radici a partire da calli: aggiungere 100  $\mu\text{l}$  di chinetina (citochinina) e 5 ml di 2,4-DAA (auxina) e mescolare.
  - Terreno per il differenziamento delle foglie a partire da calli: aggiungere 5 ml di chinetina (citochinina) e 100  $\mu\text{l}$  di 2,4-DAA (auxina) e mescolare.
9. Versare la soluzione nelle piastre sterili.
  10. Lasciare solidificare il terreno.
  11. Conservare in frigorifero.



### Tempo previsto

2 ore

### Materiali e reagenti

- ✓ Murashige and Skoog Basal Medium in polvere (codice M9274, rivenditore Sigma)
- ✓ 1L acqua distillata
- ✓ 2,4 DAA 1 mg/ml (acido 2,4 diclorofenossiacetico, codice D6679, rivenditore Sigma)
- ✓ Chinetina 1 mg/ml (citochinina, codice K3253, rivenditore Sigma)
- ✓ Piastre di petri sterili
- ✓ Becher da litro
- ✓ Bottiglia con tappo
- ✓ Spatole
- ✓
- ✓ HCl e NaOH per la titolazione

### Strumentazione

- ✓ Autoclave (o pentola a pressione)
- ✓ Micropipette
- ✓ Agitatore (o piastra rotante)
- ✓ Misuratore di pH