

Valutazione di diversi tipi di espianto in *Citrus* per la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

Pappalardo H.¹, Ciacciulli A.¹, Poles L.^{1,2}, Salonia F.^{1,2}, Licciardello C.¹

concetta.licciardello@crea.gov.it

¹CREA Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Corso Savoia 190, 95024 Acireale (Catania)

²Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione ed Ambiente (Di3A), Università di Catania, Via Valdisavoia 5, 95123 Catania

La trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* rappresenta una strategia necessaria per la costituzione di agrumi modificati con attitudini migliorate. Oltre che per la costituzione di piante transgeniche, la trasformazione è indispensabile per l'utilizzo delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) volte, ad esempio, alla produzione di agrumi arricchiti in sostanze antiossidanti. Le TEA devono però fare i conti con l'ottimizzazione di protocolli di rigenerazione e trasformazione per quelle varietà che si intendono migliorare, e che, generalmente, presentano una efficienza minore rispetto ai genotipi modello. Quindi il nostro obiettivo è individuare le migliori condizioni di rigenerazione e i tipi di espianti più adatti alla trasformazione di genotipi contenenti licopene o antocianine, pigmenti noti per le loro proprietà antiossidanti e la cui presenza nei frutti di agrume appare essere mutualmente esclusiva.

La rigenerazione, in via preliminare, è stata valutata su internodi di varietà di riferimento, in terreno Murashige & Skoog con concentrazioni differenti di ormoni di crescita: RMD1 1mg/L 6-benzilamino-purina (BAP), RMD2 1mg/L BAP e 0.5mg/L acido naftalenacetico (NAA), RMS1 3mg/L BAP, RMS2 3mg/L BAP e 0,5mg/L NAA. Il terreno con la percentuale di rigenerazione più alta, RMD1, è stato utilizzato per le prove di trasformazione.

I diversi tipi di espianti valutati per la trasformazione sono stati: (I) internodi eziolati di semenzali cresciuti *in vitro* per varietà con seme; (II) espianti di callo embriogenico derivante da ovuli non sviluppati cresciuti *in vitro* per varietà apirene o con pochi semi. Inoltre (III) per ridurre i tempi di crescita dei semenzali si è partiti da cotiledoni di semi maturi, (IV) in aggiunta a materiale semi-adulto come foglie di piante cresciute *in vitro* per 6-7 mesi. I germogli ottenuti sono stati prima posti in terreno selettivo (Kan 70mg/L Cefotaxime 400mg/L) in linfabox per garantire l'accrescimento e poi mininnestati su Carrizo.

Le trasformazioni sono tutt'ora in corso. Mentre i dati sulla rigenerazione hanno mostrato una percentuale di germogli rigenerati maggiore del 150% in espianti di callo embriogenico, sebbene pochi siano sopravvissuti in terreno selettivo risultando non trasformati. I cotiledoni di seme maturo hanno dato una percentuale di germogli rigenerati (13%) nelle prime 3 settimane post-trasformazione. Le foglie derivanti da materiale adulto hanno invece mostrato una scarsa capacità rigenerativa (8%).

Pertanto, l'elevata percentuale di rigenerati da cotiledoni sembra garantire una buona alternativa al classico utilizzo di internodi per le trasformazioni di agrumi, riducendo il tempo necessario per la trasformazione da 4 (1 mese crescita semenzali più 3 post trasformazione) a 2 mesi.

Parole chiave: rigenerazione, agrumi, internodi, callo embriogenico, cotiledoni.