

FONDO SOCIALE EUROPEO IN SINERGIA CON IL FONDO EUROPEO DI SVILUPPO
REGIONALE
POR 2014-2020 – OBIETTIVO "INVESTIMENTI A FAVORE DELLA CRESCITA E
DELL'OCCUPAZIONE"
STRATEGIE REGIONALI PER IL SISTEMA UNIVERSITARIO
"INNOVAZIONE E RICERCA PER UN VENETO PIÙ COMPETITIVO
ASSEGNI DI RICERCA - ANNO 2019"
DGR NR. 1463 DEL 08/10/2019



UNIONE EUROPEA
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO



POR FSE 2014-2020
REGIONE DEL VENETO



Organismo
di Formazione
accreditato
dalla Regione
del Veneto



UNIVERSITÀ
di **VERONA**

Produzione di vaniglia naturale da coltura cellulare di *Vanilla planifolia* -
OTTIMIZZAZIONE PER LA CRESCITA E LO SVILUPPO DI LINEE CELLULARI DI VANILLA
PLANIFOLIA

COD. ENTE 1695 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
ASSE OCCUPABILITA' - DGR NR. 1463 DEL 08/10/2019

Codice Progetto	1695-0001-1463-2019
Referente progetto	Mauro Commisso
Assegnista	Stefano Negri
Dipartimento	Biotechnologie



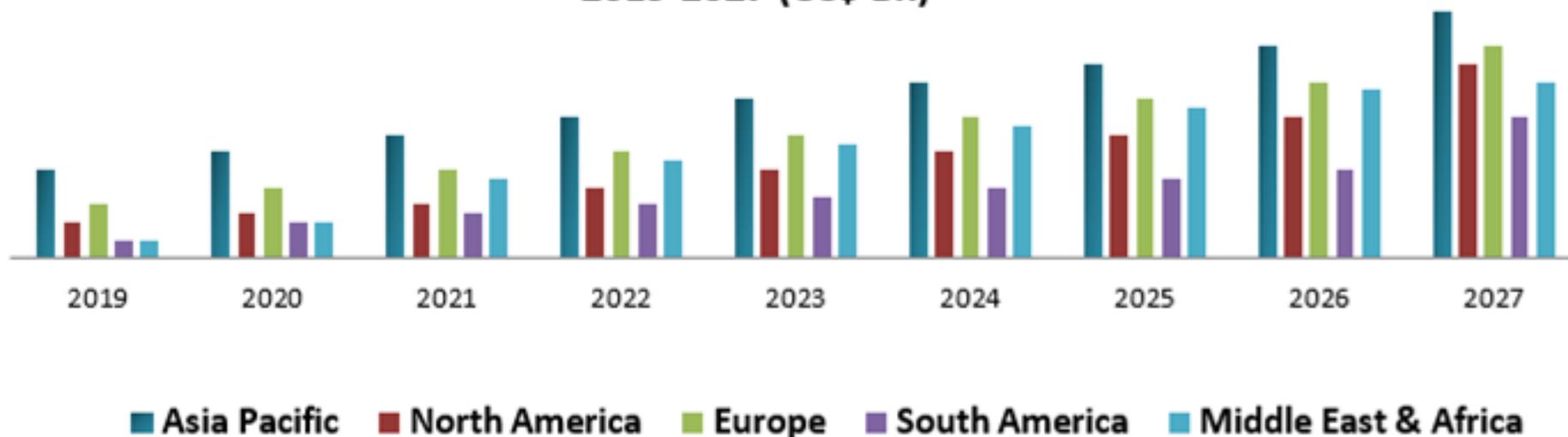
La vaniglia è una spezia aromatica ottenuta dalla fermentazione dei frutti (baccelli) di orchidee del genere *Vanilla*, native di regioni tropicali e subtropicali.



Il consumo di prodotti commerciali a base di vaniglia è una realtà consolidata nel mercato agroalimentare internazionale e recenti previsioni economiche indicano che questo subirà un ulteriore **incremento** nei prossimi anni.



Global Vanilla Market, by Region
2019-2027 (US\$ Bn)



Attualmente la produzione di vaniglia si basa su:



Processo naturale

Raccolta e fermentazione di baccelli maturi di vaniglia, ma...

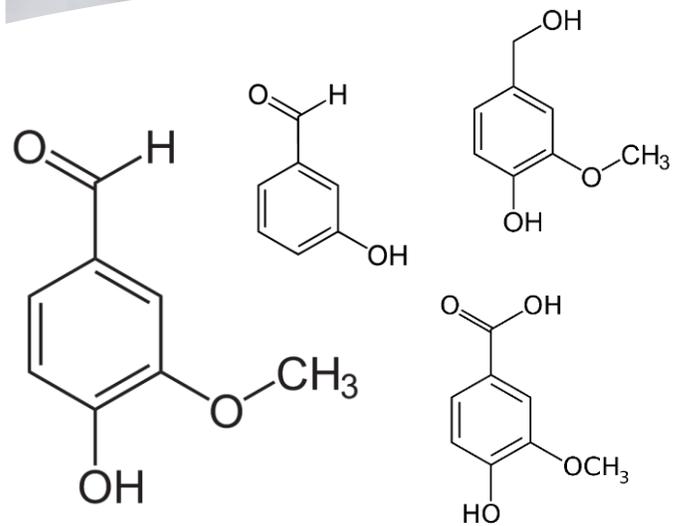
è una produzione lunga e con basse rese



Processo industriale

Sintesi chimica di **vanillina** (la principale molecola responsabile dell'aroma) da varie fonti, ma...

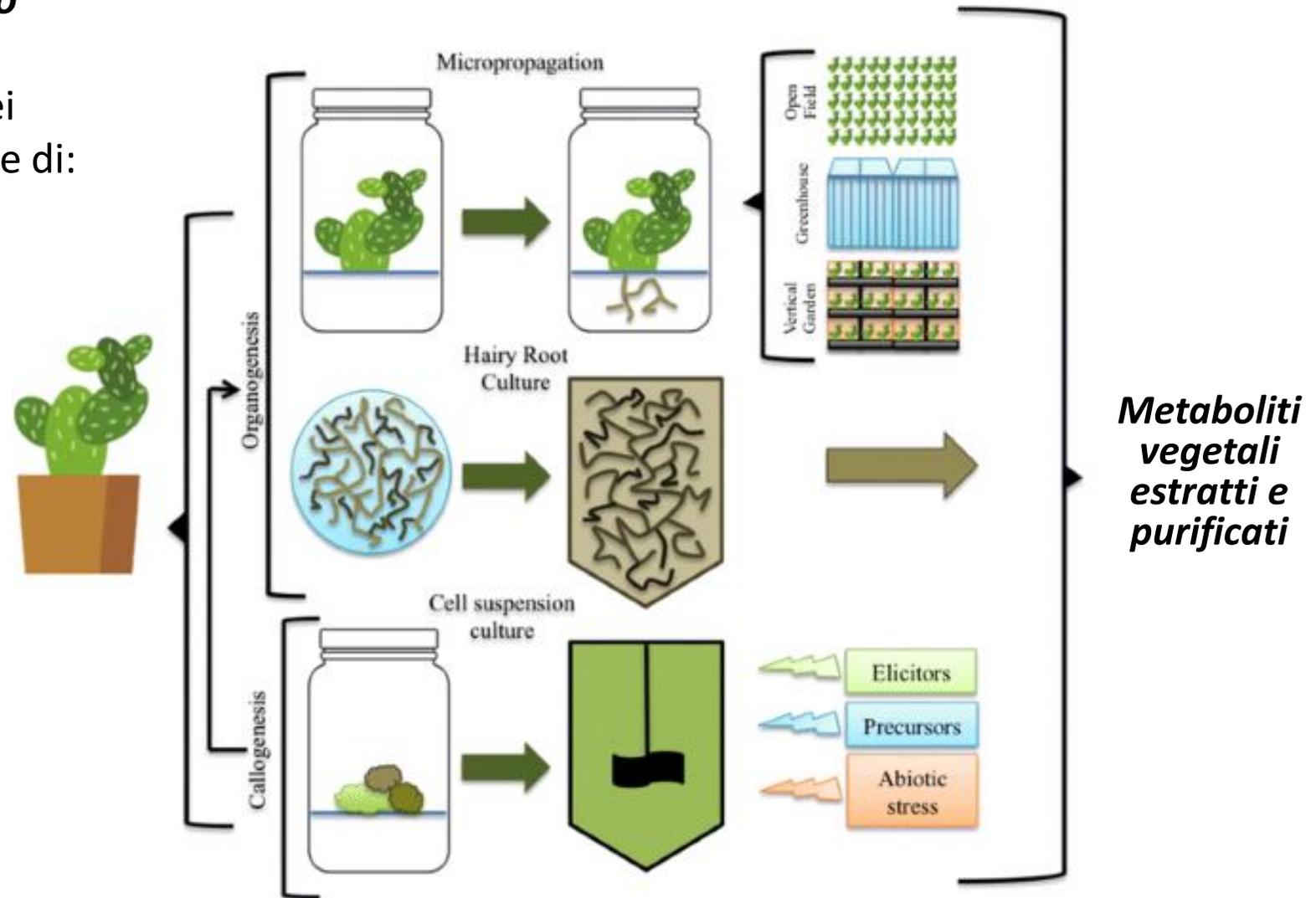
il prodotto non è paragonabile a quello naturale per la minore complessità del bouquet aromatico; il processo risulta inoltre poco sostenibile da un punto di vista ambientale.



Le **colture vegetali *in vitro*** rappresentano un moderno **strumento biotecnologico**, rispettoso dell'ambiente ed economicamente più vantaggioso, per la **produzione di metaboliti** ad elevato interesse applicativo (per esempio nutraceutico, farmaceutico, tintorio, cosmetico, ecc.).

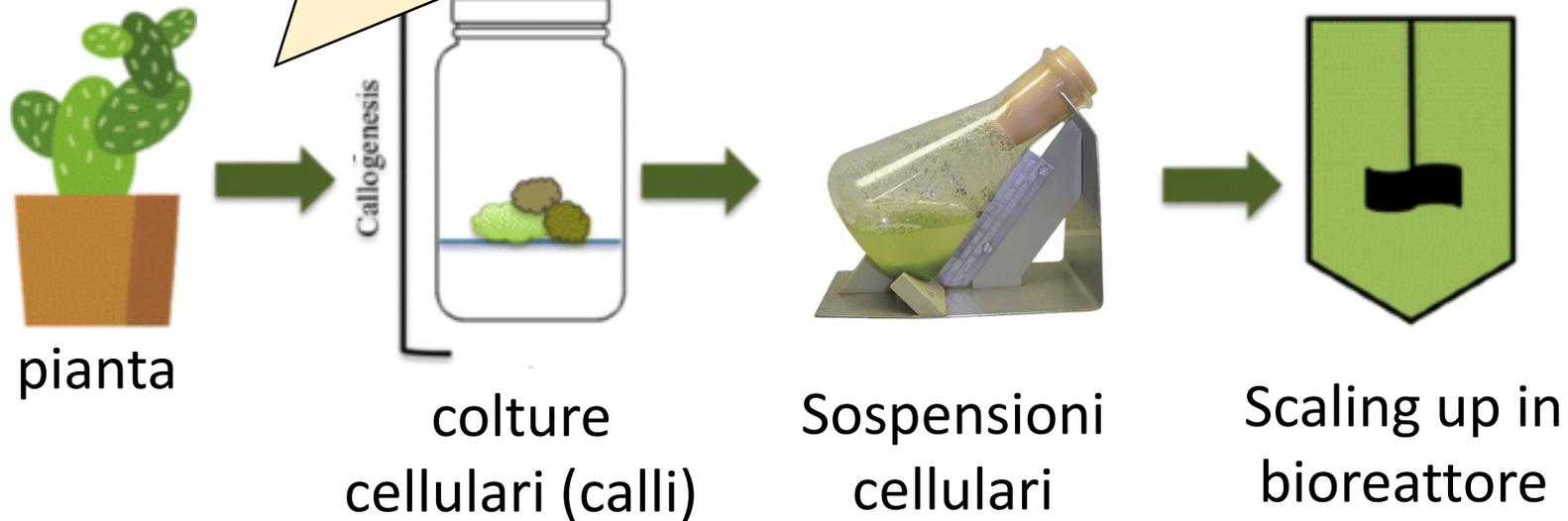
La **produzione di colture vegetali *in vitro*** avviene sempre a partire da una **pianta madre**, dalla quale vengono prelevati dei tessuti o organi, destinati alla produzione di:

- altre piante identiche all'originale (**micropropagazione**)
- sospensioni in liquido di radici
- aggregati composti da **cellule indifferenziate (calli)**



Tuttavia, vi possono essere delle **criticità** nella produzione di colture cellulari *in vitro*.

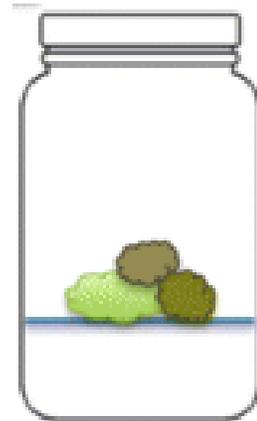
In particolare, la messa a punto di **nuovi protocolli** volti ad identificare le condizioni ideali per lo **sviluppo di colture cellulari** verso **specie recalcitranti**, come lo è vaniglia, rappresenta uno dei punti cruciali di questo approccio



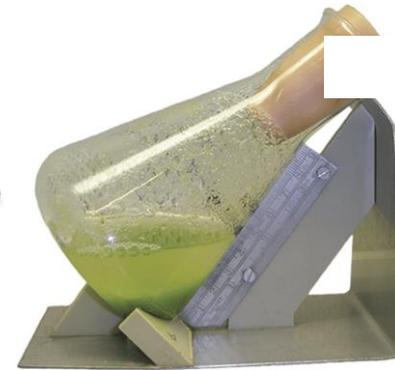
L'intervento di questo Assegno di Ricerca si è rivolto principalmente all'**ottimizzazione** dei metodi di coltura *in vitro* per lo **sviluppo e mantenimento** di **linee cellulari** dell'orchidea *Vanilla planifolia*



Tessuti prelevati da piante di *Vanilla planifolia*

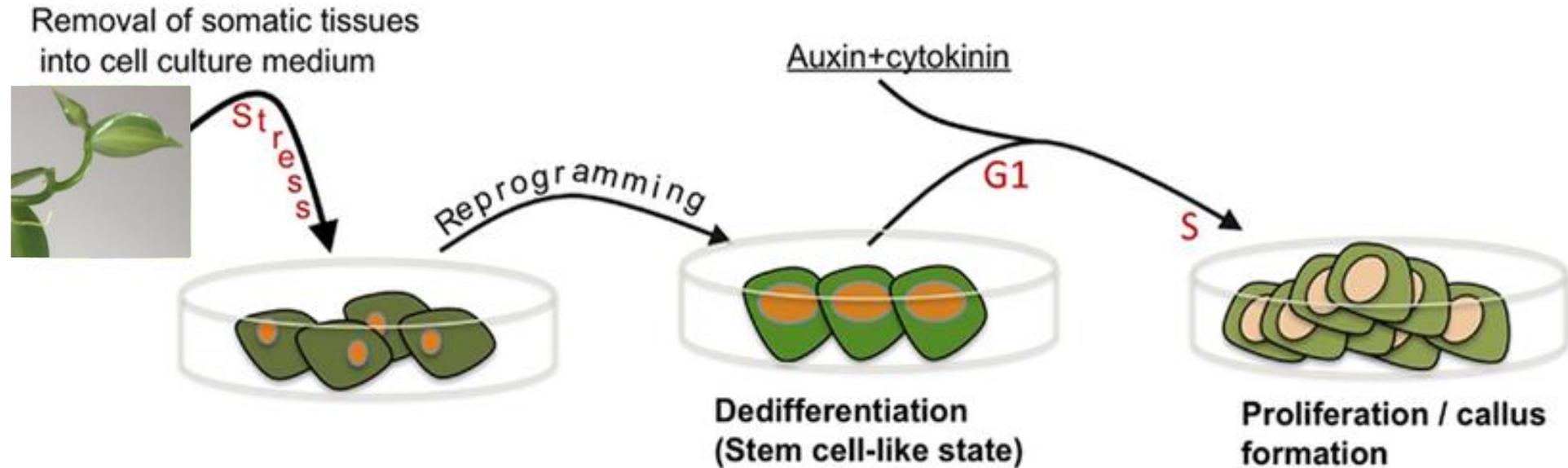


Colture cellulari (calli)



Sospensioni cellulari

Inizialmente, sono state prelevate parti di foglie e fusto di piante di *V. planifolia* cresciute in serra. Tali espianti sono stati poi sterilizzati, disposti in due specifici terreni di coltura gelificati con l'aggiunta di **diverse combinazioni di fitormoni** e posti in condizioni di luce o buio.



In queste condizioni di coltura, gli espianti hanno dato origine, dopo circa 6-8 settimane, a **protocormi**, ossia strutture vegetali parzialmente sdifferenziate con caratteristiche morfologiche intermedie tra un callo (tessuto completamente sdifferenziato) e un tessuto adulto (completamente differenziato).



Protocormi mantenuti alla luce su terreno B5 con picloram 0.5 mg/L e BAP 2 mg/L



Protocormi mantenuti al buio su terreno B5 con picloram 0.25 mg/L e BAP 3 mg/L

Alcuni protocormi in mantenimento alla luce tendevano a differenziare e a formare strutture organizzate, come ad esempio alcuni abbozzi di germogli (indicati dalla freccia rossa nell'immagine).



Dopo varie prove di trasferimento e mantenimento su mezzo di coltura MS è stato sviluppato **un protocollo per rigenerare *in vitro* l'intera pianta di vaniglia.**



Queste piante possono essere utilizzate per produrre nuovi espianti da testare in nuove condizioni di coltura, evitando pertanto la fase iniziale di sterilizzazione di tessuti prelevati da piante cresciute in ambiente non sterile.





Protocormi mantenuti al buio su terreno B5 con
tidiazuron 0.1 mg/L

Altri protocormi, invece, hanno mantenuto uno stato più indifferenziato rispetto ad altri. Tuttavia, vari tentativi di trasferimento e coltura **non hanno portato al completo sdifferenziamento a callo.**

Inoltre, le analisi metabolomiche, condotte mediante spettrometria di massa, dei protocormi hanno evidenziato che questi non producono livelli apprezzabili di vanillina o di suoi derivati.



Protocormi di *V. planifolia*

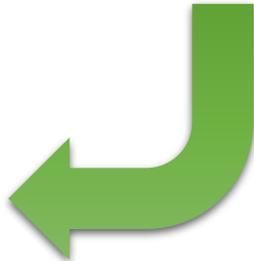
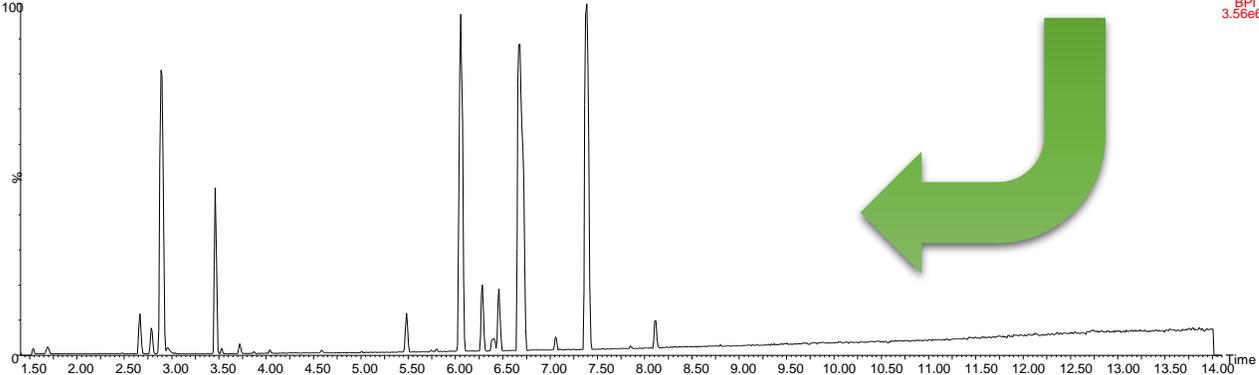


Produzione di estratti vegetali per analisi metabolomica



Analisi con spettrometro di massa ad alta risoluzione

Cromatogramma di un estratto da protocormo di *V. planifolia*



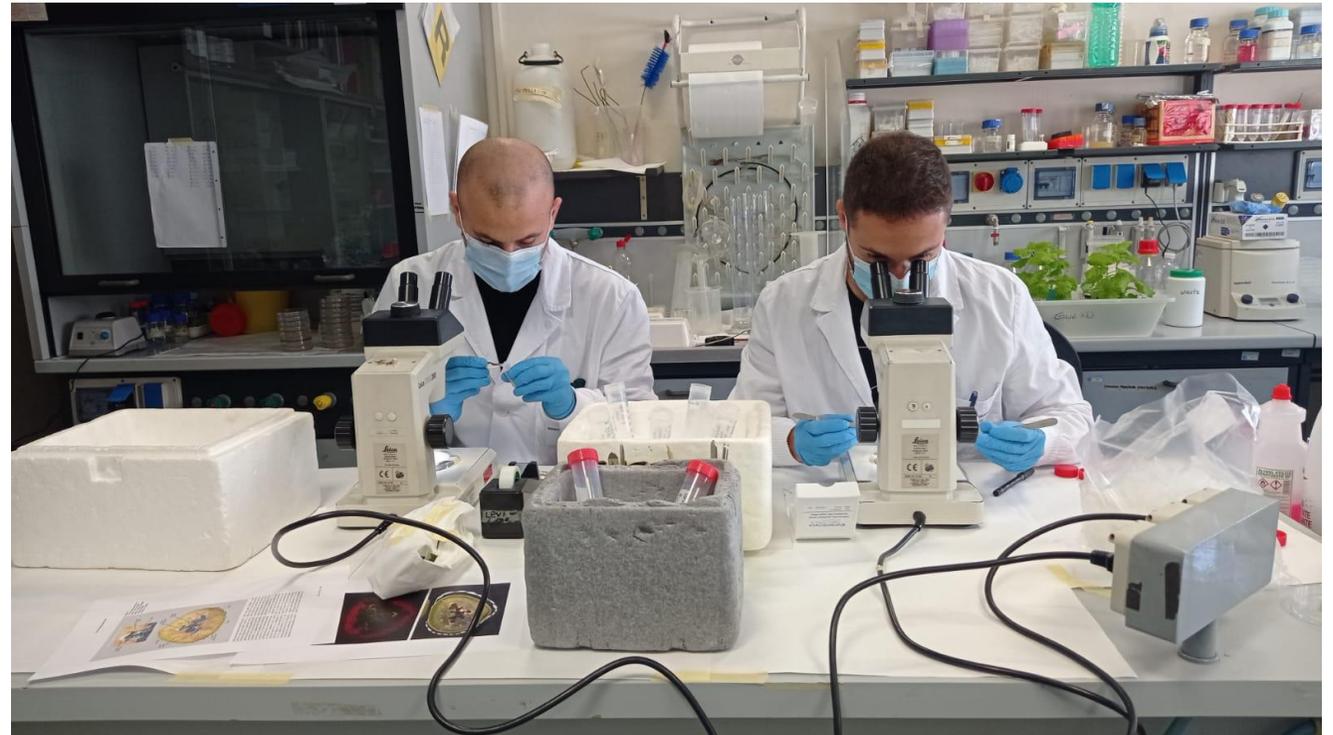
Non è stata riscontrata presenza di vanillina e altri componenti dell'aroma di vaniglia dalle analisi

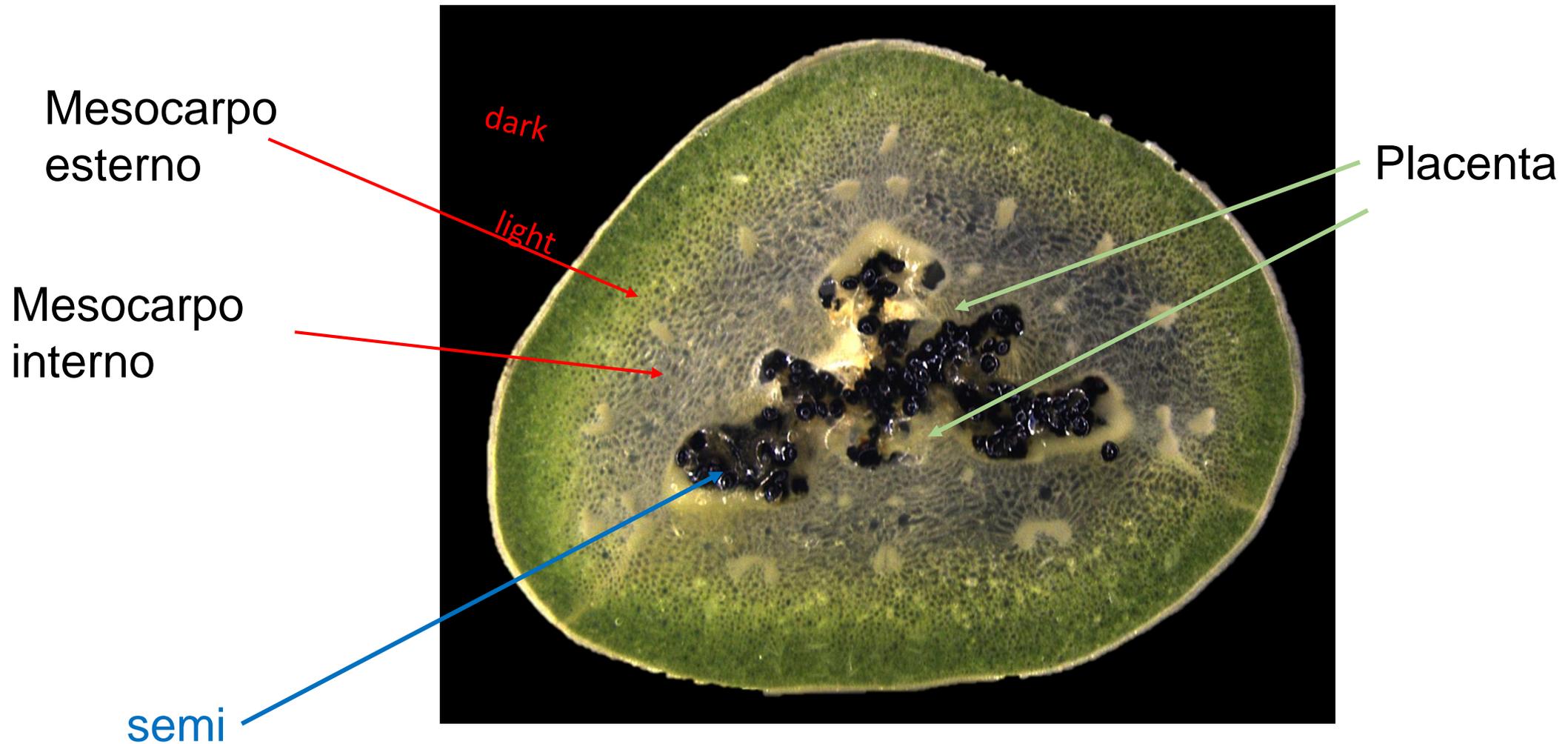
Ulteriori prove per lo sviluppo di colture cellulari di vaniglia sono state effettuate partendo da **espianti di organi riproduttivi**, nei quali la vanillina può essere prodotta o accumulata in determinati stadi di sviluppo (es. placenta del seme all'interno del baccello).



Bacelli di vaniglia di 8 mesi
provenienti dalle isole Mauritius

Studio microscopico dei baccelli e dissezione per individuare i tessuti dal quale produrre gli espanti





Sezione trasversale del baccello di vaniglia fotografata allo stereomicroscopio

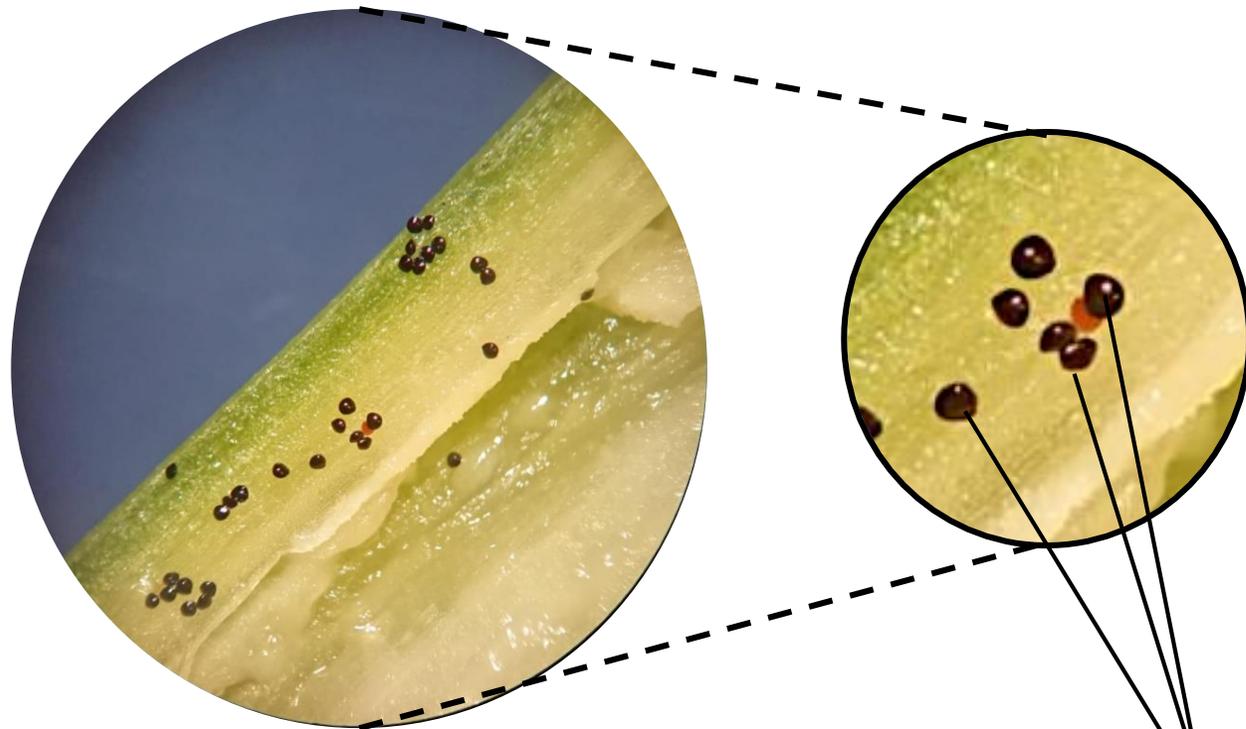
La riproduzione dell'unico protocollo disponibile in letteratura per lo sviluppo di calli friabili di vaniglia a partire da espianti di placenta e semi immaturi non ha ancora portato allo sviluppo della coltura cellulare con le caratteristiche desiderate. Nuove condizioni colturali devono pertanto essere testate.

3 Biotech (2017) 7:242
DOI 10.1007/s13205-017-0871-x

ORIGINAL ARTICLE

Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) cell suspension cultures: establishment, characterization, and applications

Marco A. Ramírez-Mosqueda¹ · Lourdes G. Iglesias-Andreu¹

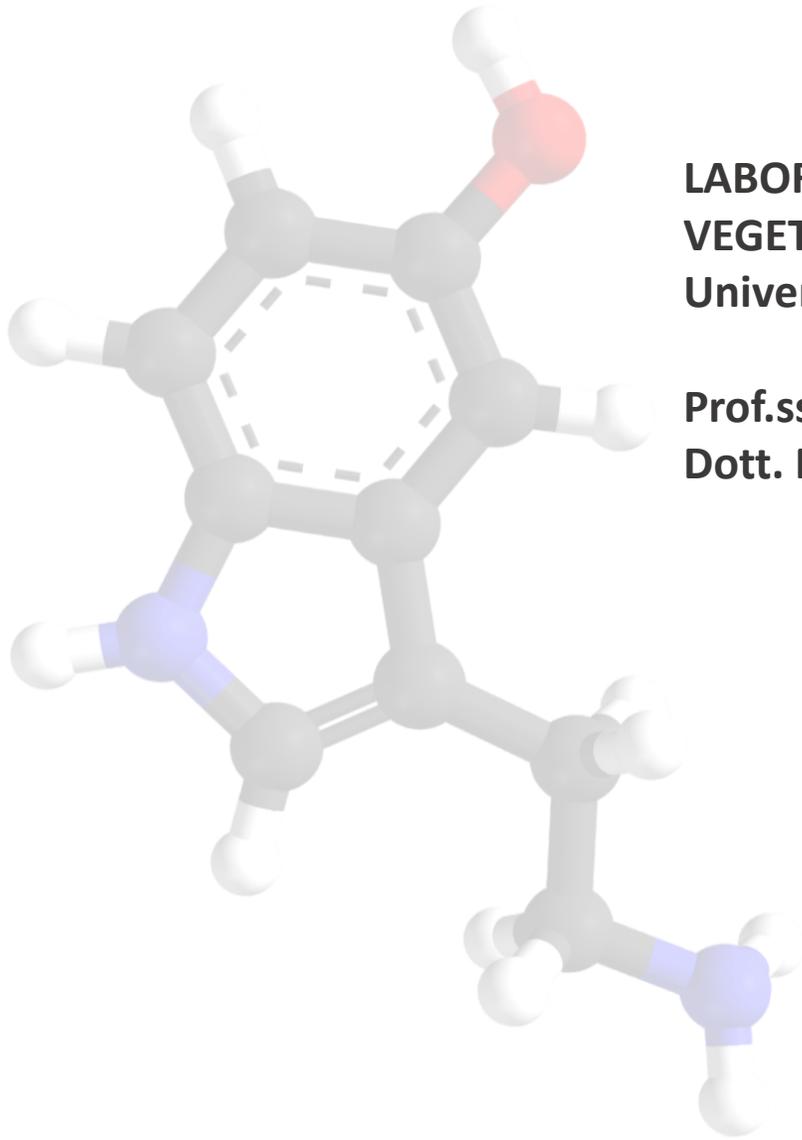


Tessuto interno del baccello di vaniglia

Semi di vaniglia



Espianti di placenta e semi su MS con tiazuron 0.45 µM



**LABORATORIO DI BIOLOGIA
VEGETALE E METABOLOMICA**
Università degli Studi di Verona

Prof.ssa Flavia Guzzo
Dott. Mauro Commisso



Dott.ssa Giovanna Pressi

