

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE**  
**Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca**

XXI Ciclo del  
Dottorato di Ricerca in  
Scienza, Tecnologia ed Economia nell'Industria del Caffè

---

**Morfo-anatomia dello sviluppo del seme in *Coffea arabica***  
**L. cv. Mundo Novo**

(Settore scientifico-disciplinare BIO/01 – Botanica generale)

DOTTORANDA  
PAOLA CRISAFULLI

COORDINATORE DEL COLLEGIO DEI DOCENTI  
CHIAR.MO PROF. GIORGIO GRAZIOSI - UNIVERSITÀ DI TRIESTE

TUTORE  
P.CH. FABIO SILIZIO - ILLYCAFFÈ

RELATORE  
CHIAR.MO PROF. GIORGIO GRAZIOSI - UNIVERSITÀ DI TRIESTE

CORRELATORE  
FURIO SUGGI LIVERANI - ILLYCAFFÈ

---

ANNO ACCADEMICO 2007/2008



A Nicolas e Simeone



“ecco il caffè, signore, caffè in Arabia nato,  
e dalle carovane in Ispaan portato.  
L'arabo certamente sempre è il caffè migliore,  
mentre spunta da un lato, mette dall'altro il fiore.  
Nasci in pingue terreno, vuol ombra, o poco sole.  
Piantar ogni tre anni l'arboscel si suole.  
Il frutto non è vero, ch'esser debba piccino,  
anzi dev'esser grosso, basta sia verdolino,  
usarlo indi conviene in fresco macinato,  
in luogo caldo e asciutto con gelosia guardato.  
[...] A farlovi vuol poco,  
mettervi la sua dose e non versarla sul fuoco.  
Far sollevar la spuma, poi abbassarla a un tratto  
Sei, sette volte almeno, il caffè presto è fatto.”

*C. Goldoni, "La sposa persiana"*



# INDICE

<b>Riassunto</b>	<b><i>i</i></b>
<b>1 – Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1.1 – La bevanda</b>	<b>1</b>
<b>1.2 – Le coltivazioni dei paesi tropicali</b>	<b>2</b>
<b>1.3 – Trieste, città del caffè</b>	<b>2</b>
<b>1.4 – Classificazione Botanica del caffè</b>	<b>3</b>
<b>1.5 – Le caratteristiche morfo-anatomiche</b>	<b>5</b>
1.5.1 – I Fiori	5
1.5.2 – L’ovulo	6
1.5.3 – La doppia fecondazione nelle <i>Angiospermae</i>	7
1.5.4 – I semi	8
1.5.5 – Caratteristiche peculiari dell’embriogenesi nelle <i>Rubiaceae</i> e in <i>Coffea</i>	10
1.5.6 – Le Drupe	11
<b>1.6 – Lo sviluppo dei frutti: modificazione ed evoluzione dei tessuti</b>	<b>12</b>
<b>1.7 – Il contenuto cellulare dell’endosperma</b>	<b>14</b>
<b>1.8 – Obiettivo dello studio</b>	<b>16</b>
<b>1.9 – Tecniche sperimentali</b>	<b>17</b>
<b>2 – Materiali e Metodi</b>	<b>19</b>
<b>2.1 – Fase di campionamento del materiale</b>	<b>19</b>
2.1.1 – La scelta del cultivar Mundo Novo	19
2.1.2 – Modalità di campionamento per diverse tipologie di parti vegetali	21
<b>2.2 – Analisi dimensionale dei campioni</b>	<b>22</b>
<b>2.3 – Trattamento dei campioni in laboratorio</b>	<b>22</b>
<b>2.4 – Taglio dei campioni e preparazione dei vetrini</b>	<b>25</b>
<b>2.5 – Colorazioni istochimiche dei campioni</b>	<b>26</b>
2.5.1 – Colorazioni per le sezioni in resina	27
2.5.2 – Colorazioni per le criosezioni	28
<b>2.6 – Utilizzo di software di grafica</b>	<b>32</b>
<b>2.7 – Genotipizzazione del cv. Mundo Novo</b>	<b>32</b>
<b>2.8 – Dati climatici</b>	<b>34</b>
<b>3 – Coffea arabica e il cultivar Mundo Novo</b>	<b>35</b>
<b>3.1 – La provenienza e le caratteristiche principali</b>	<b>35</b>
<b>3.2 – Gli stadi fenologici</b>	<b>36</b>
<b>4 – Risultati</b>	<b>39</b>
<b>4.1 – Dati climatici</b>	<b>39</b>
<b>4.2 – Analisi dimensionale delle drupe e dei semi</b>	<b>40</b>
<b>4.3 – Genotipizzazione del cv. Mundo Novo IAC 501-5</b>	<b>43</b>
<b>4.4 – Le fasi di sviluppo del Mundo Novo: caratteristiche morfo-anatomiche</b>	<b>47</b>
4.4.1 – Fase di quiescenza	47
4.4.2 – Fase centrale di sviluppo rapido	47
4.4.3. Fase di maturazione	48

---

<b>4.5 – Immagini al microscopio confocale</b>	<b>49</b>
<b>5 – <i>Discussione e Conclusioni</i></b>	<b>53</b>
<b>5.1 – Problematiche affrontate nel corso dello studio</b>	<b>53</b>
5.1.1 – Il campionamento	53
5.1.2 – Il trattamento del materiale	53
5.1.3 – L’embriogenesi	55
<b>5.2 – Lo sviluppo del cv. Mundo Novo</b>	<b>55</b>
<b>5.3 – La morfo-anatomia del seme e le sue possibili applicazioni</b>	<b>58</b>
<b>6 – <i>Bibliografia</i></b>	<b>61</b>
<b><i>Ringraziamenti</i></b>	<b>71</b>



## RIASSUNTO

Questo lavoro mirato allo studio dello sviluppo del seme di *Coffea arabica*, avvalendosi di differenti tecniche microscopiche, ha cercato di dare un contributo agli studi effettuati precedentemente da Houk (1938), Mendes (1941), Dedecca (1957), Wormer (1966), Dentan (1977, 1985) e De Castro (2002, 2005) che hanno apportato nozioni fondamentali a riguardo.

Il campionamento del materiale è stato effettuato da settembre 2006 a giugno 2007 su piante appartenenti al cv. Mundo Novo, all'Instituto Agronômico di Campinas (IAC, SP, Brasil). Sono stati raccolti quindi circa 60 campioni per ciascun stadio di sviluppo a scadenza bisettimanale dal momento della fioritura fino a completa maturazione del frutto, per un totale di 34 settimane after anthesis (AA). I campioni sono stati quindi subito fissati e spediti in laboratorio a Trieste (Italia).

Per prima cosa è stata effettuata l'analisi dimensionale delle drupe su un pool di campioni scelto casualmente tra quelli arrivati in laboratorio usando un calibro digitale lungo tre linee di misura: lunghezza, asse maggiore e asse minore in millimetri, sia per le drupe che per i semi. I campioni selezionati sono stati inclusi in resina Technovit 7100 (dall'inizio della fioritura fino alla 20<sup>a</sup> settimana AA) e tagliati con un microtomo rotativo (sezioni da 6 µm). I campioni dalla 22<sup>a</sup> settimana in poi sono stati tagliati invece con un criostato a bassa temperatura (da -15°C a -25°C; sezioni da 10-12 µm), a causa dell'aumento della durezza del materiale.

Sulle sezioni preparate sono state usate tecniche standard di osservazione in microscopia (ottica, SEM e TEM) e colorazioni istochimiche (ad es. Toluidin blue-O, Periodic Acid Schiff, DAPI etc.) ed è stata effettuata una messa a punto di protocolli specifici secondo la tipologia di tessuto osservata.

I risultati dell'analisi dimensionale hanno permesso di distinguere tre fasi di crescita dei frutti: 1. fase di quiescenza fino a 4 settimane dopo la fioritura ('after anthesis', AA); 2. fase centrale di sviluppo rapido (da 6 a 14 settimane AA); 3. fase di maturazione (da 16 settimane AA in poi).

La seconda fase è strettamente correlata alle condizioni climatiche del periodo, in particolare all'aumento della frequenza delle piogge.

Nella *fase di crescita lenta* l'ovario osservato in sezione longitudinale presenta la tipica struttura della drupa del caffè con due camere ovariche che ospitano un ovulo anatropo

ciascuna. L'ovulo è composto da un funicolo, da un unico tegumento proveniente dal tessuto materno e da una zona di pochi micron occupata dal sacco embrionale non ancora sviluppato. E' presente anche l'otturatore che, in *Coffea*, è di derivazione funicolare, formato da parenchima, conduce il tubetto pollinico al micropilo. Dopo circa un mese (4<sup>a</sup> -6<sup>a</sup> settimana) non si evidenzia ancora una crescita dimensionale del seme degna di nota.

Durante la *fase centrale di sviluppo rapido* il mesocarpo si accresce fino ad uno spessore di 0,6 mm.

A 8 settimane il seme ha 2 mm e il sacco embrionale fecondato ha iniziato il suo sviluppo con l'accrescimento dell'endosperma, inizialmente di tipo nucleare. A 10 settimane il seme ha 3 mm. Il sacco embrionale è più grande (0,2 mm) ed è formato da circa una ventina di cellule dell'endosperma. A 12 settimane il seme raggiunge i 10 mm. L'endosperma ha circa 1 mm. In questo stadio si nota un particolare strato tissutale che rappresenta la parte del perisperma che diventerà pellicola argentea. In seguito inizia ad intravedersi la pellicola argentea, con alcune cellule ancora vive e nucleate, e il pergamino si sta formando grazie a particolari modificazioni dell'endocarpo della drupa. Il seme ha quasi raggiunto la sua dimensione definitiva, alla 14<sup>a</sup> settimana.

Nella *fase di maturazione* la crescita dimensionale non è più così degna di nota, mentre si osservano cambiamenti chimici e strutturali. La 16<sup>a</sup> settimana è caratterizzata dalla quasi completa formazione della pellicola argentea, anche all'interno del solco. Molte cellule dell'endosperma sono in attività mitotica continua. Il pergamino invece è completamente formato a 18 settimane, caratterizzato da fibre fusiformi a pareti spesse. Dalla 20<sup>a</sup> settimana in poi, il tessuto dell'endosperma ormai formato ha ancora le cellule a pareti sottili (3 µm). In questa fase delicata il materiale ha caratteristiche intermedie, né duro né molle; il contenuto vacuolare delle cellule endospermiche si arricchisce di corpi proteici e strutture zuccherine, evidenziate con diverse colorazioni. L'embrione è formato e anche le sue cellule sono ricche di corpi proteici, evidenziati soprattutto con la colorazione UV-Schiff e l'osservazione in fluorescenza.

Le cellule dell'endosperma alla 26<sup>a</sup> settimana hanno un contenuto vacuolare ancora ricco di proteine e le pareti diventano più spesse (4-6 µm). Si osserva la formazione di alcune nodosità (Dentan, 1977) tipiche delle pareti cellulari dell'endosperma, soprattutto vicino alla cavità embrionale. Lo sviluppo del seme completo viene raggiunto alla 30<sup>a</sup> settimana, stadio in cui anche l'embrione sembra aver concluso la propria maturazione. Le pareti cellulari hanno raggiunto il loro spessore definitivo (da 6 a 10 µm). Infine, all'ultimo stadio (34

settimane AA), le cellule presentano un aspetto differente, risultano quasi più svuotate ed è difficile osservare i componenti cellulari con le colorazioni utilizzate fino ad ora. La maggior parte delle pareti presentano nodosità. Queste caratteristiche rappresentano uno stadio di sovra-maturazione della drupa.

Oltre agli aspetti puramente morfo-anatomici, l'abilità di sezionare i tessuti seminali potrebbe essere di grande importanza per eventuali analisi biomolecolari di espressione genica, come già è stato in parte studiato recentemente (De Castro & Marraccini, 2006). Conoscere infatti gli stadi di sviluppo e i tessuti coinvolti in ciascuna fase, dà la possibilità di evitare errori grossolani di interpretazione dei risultati e di stabilire relazioni interessanti fra la parte genetica e le osservazioni in microscopia.



## 1 – INTRODUZIONE

### 1.1 – LA BEVANDA

Il caffè è una delle bevande più diffuse in tutto il mondo che, secondo dati della F.A.O., nel 2002 ha prodotto un volume di traffici commerciali superiori ai cinque miliardi di dollari in importazioni di caffè verde, considerando solamente i mercati dell'Europa e degli Stati Uniti (<http://www.fao.org>). La bevanda deriva dalla tostatura dei semi di due specie, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, che si differenziano per la qualità del prodotto. La prima è la più importante dal punto di vista commerciale e produce una bevanda di ottima qualità. La seconda, invece, viene utilizzata nelle miscele meno raffinate, in quanto produce una bevanda di qualità inferiore ed ha costi di produzione sensibilmente più bassi. La ragione sicuramente primaria che giustifica il consumo di caffè, ben documentata, consiste negli effetti fisiologici della caffeina sull'organismo umano (Viani, 1988). Il caffè è diventato così popolare da essere considerato soltanto secondo all'acqua nella scala delle bevande più largamente consumate nel mondo. Ciò è legato senz'altro al sapore o meglio ancora all'impatto sensoriale che essa è in grado di suscitare (Petracco, 2001). È noto anche come l'accumulo di alcuni composti chimici nel seme maturo giochino un ruolo importante nella qualità della bevanda finale. Per dare un'idea della distribuzione del caffè verde raccolto in tutto il mondo, nel 1998-99 in America latina è stato prodotto circa il 61% del caffè mondiale, mentre il 18% è stato prodotto in Africa e circa il 21% in Asia. Di particolare interesse è stata l'espansione della produzione di robusta in Vietnam e Indonesia con ben più di 400000 t di caffè verde raccolto. Il Brasile ha prodotto in quell'anno anche 300000 t di robusta oltre alle 1,8 milioni di tonnellate di arabica ed ha così superato i principali produttori di robusta, Costa D'Avorio e Uganda. L'India ha tuttavia raddoppiato la sua produzione annuale durante l'ultima decade, raggiungendo una resa di 300000 t di arabica di alta qualità (40%) e di robusta (60%) (Van der Vossen, 2001). Il volume di affari che ruota attorno al chicco di caffè lascerebbe immaginare che la ricerca scientifica portata avanti dai laboratori di tutto il mondo sia intensa. In realtà sono pochi i laboratori che si occupano di questa pianta e delle problematiche ad essa connesse e spesso non è facile spiegare le cause di questo "disinteresse". Una di queste potrebbe essere sicuramente il fatto che le piantagioni di caffè sono localizzate in paesi in via di sviluppo che non possono investire molto in ricerca. D'altra parte le industrie che commercializzano invece il prodotto finito sono situate nei paesi più industrializzati e sono quindi forse poco interessate ad investire ingenti capitali nella ricerca sperimentale.

## **1.2 – LE COLTIVAZIONI DEI PAESI TROPICALI**

Nella seconda metà del XVIII secolo estese piantagioni prosperavano in gran parte dei paesi dei tropici, con un evidente primato della Francia, che ben seppe sfruttare la pianta nelle proprie colonie. Con l'embargo napoleonico, però nei primi anni del 1800, la diffusione delle piantagioni ad opera dei francesi subì una notevole recessione. Furono gli inglesi ad alimentare il mercato europeo per diversi anni, finché l'entusiasmo verso la bevanda da parte di quel popolo non si attenuò. Dall'Arabia e dai paesi africani ad essa limitrofi, grazie agli olandesi, francesi, inglesi e poi agli spagnoli e portoghesi, presto le coltivazioni invasero tutta la fascia tropicale asiatica, le terre dell'arcipelago, per estendersi anche ai paesi continentali dell'America latina. Dalla Guyana, infatti le piantine presero il mare nel 1727, rapidamente alla volta dello sterminato Brasile, per poi diffondersi nelle altre regioni dell'America centro-meridionale, comprese tra i due tropici. Nel 1727 sotto la guida del botanico Fra' Jose Mariano de Conceição Veloso, il caffè iniziò ad essere coltivato a Para per poi estendersi in tutto il Brasile, superando ed anzi spesso sostituendo, le coltivazioni di canna da zucchero e raggiungendo, in pochi decenni, altissime percentuali di produzione, arrivando nel 1928 ai 4/5 di tutta la produzione mondiale. Dall'inizio degli anni trenta, per circa tre lustri, si dovette provvedere alla distruzione di settantasette milioni di sacchi da sessanta chili, poiché l'immagazzinamento richiese il sostenimento di oneri non indifferenti. Furono quelli gli anni in cui i paesi africani, produttori di caffè poterono immettere sul mercato il loro prodotto a prezzi concorrenziali, in quanto l'ammontare della loro produzione non richiedeva immagazzinamento, non avendo essa esubero. Oggi e' tutto più pianificato, la produzione ed i costi si sono normalizzati in rapporto al costo della vita ed il caffè continua ad essere la bevanda energetica per eccellenza, raggiungendo nel giro di tre secoli il culmine del più alto consumo. Brasile e Colombia comunque restano i principali paesi produttori ed esportatori. Il caffè sostituisce il prodotto basilare delle economie di questi paesi, assorbendo ancora la più grande forza occupazionale e realizzando la voce più sostenuta in entrata dei loro bilanci nazionali (<http://www.caffe.it>).

## **1.3 – TRIESTE, CITTÀ DEL CAFFÈ**

Erede di Venezia nei traffici del Mediterraneo, dopo la parentesi napoleonica Trieste inizia una crescita rapidissima che, verso la metà dell'ottocento, la porta ad essere il principale scalo dell'Impero Austro-Ungarico ed uno dei maggiori del Mediterraneo. Nel fervore di traffici che il punto franco esalta, prima esteso alla città, limitato al solo porto a fine secolo, primeggia il commercio del caffè che imprenditori delle provenienze più varie gestiscono con

capacità decisamente moderne. È degli inizi del nostro secolo l'attività di mondatura del caffè che in anni recenti è rinata a livello industriale. Consolidato nel corso del novecento, il commercio del caffè a Trieste è riuscito a mantenere un primato che si rispecchia in quel 30% circa di importazioni italiane che gestisce tuttora. L'attività cafeeicola cittadina oggi è rappresentata da cinque aziende importatrici e grossiste (crudisti); una decina di case di spedizione specializzate in caffè; una ventina di torrefazioni delle dimensioni più varie. Ci sono inoltre alcuni fra i più validi agenti di commercio specializzati nel prodotto, uno dei pochi impianti di decaffeinizzazione presenti in Italia (Demus) e il primo impianto moderno per la lavorazione del caffè (Silocaf). È stato creato anche Qualicaf, un consorzio per la valorizzazione del caffè. Una curiosità è d'obbligo: la popolazione triestina consuma il doppio della media italiana di caffè, circa dieci kg pro-capite/anno, contro i cinque della media italiana (<http://www.asscaffè.it>).

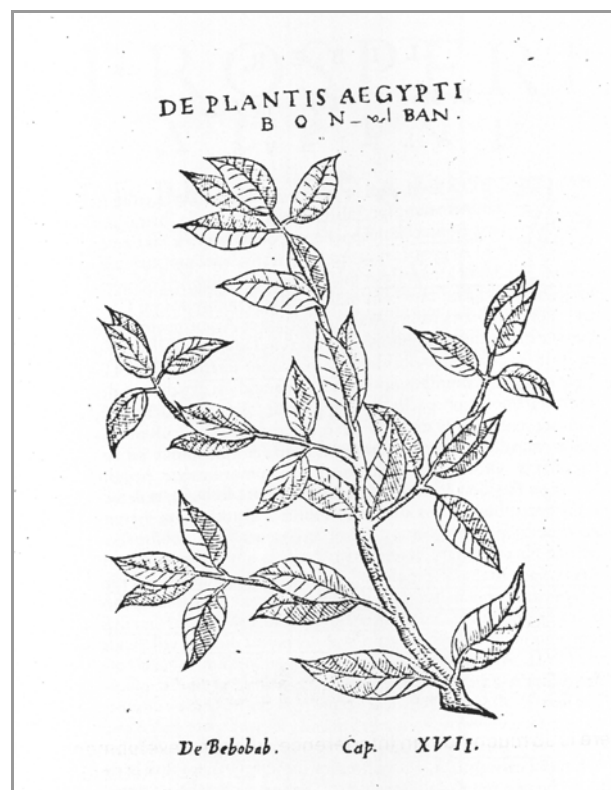
#### 1.4 – CLASSIFICAZIONE BOTANICA DEL CAFFÈ

Si deve a Linneo, nella sua classificazione delle piante del 1737, il nome di *Coffea arabica*. Il primo europeo a nominare il caffè fu Prospero Alpino, fondatore del giardino botanico di Venezia, nel suo libro '*De plantis Aegypti liber*' del 1592 nel quale il caffè venne chiamato per la prima volta con i nomi arabi di 'bon', 'ban' e 'caoua' (fig. 1). Particolarmente dettagliati gli studi condotti ne "Les Cafèiers du Globe", una monografia in tre volumi scritta da Chevalier (1929, 1942, 1947) e dallo studio di Leroy (1980) per raggiungere una caratterizzazione sistematica più precisa di queste specie. Secondo questi studiosi il caffè apparteneva quindi al Regno *Plantae*, Divisione *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Subclasse *Asteridae*, Ordine *Rubiales*, Famiglia *Rubiaceae*, Subfamiglia *Cinchonoidea*, Genere *Coffea* (L.). Esistevano inoltre quattro Sezioni: *Coffea* (o *Eucoffea*), *Mascarocoffea* (note per produrre caffè privo di caffeina), *Paracoffea* e *Argocoffea*. Le varietà commerciali *arabica* e *canephora* appartenevano alla prima Sezione (*Eucoffea*, Subsezione *Erythrocoffea*).

Recentemente però Davis *et al.* (2006) hanno rivisto in parte la classificazione di *Coffea*, in quanto il concetto di 'genere' utilizzato da Chevalier era diverso da quello utilizzato oggi. In ogni caso, le prime due Sezioni (*Eucoffea* e *Mascarocoffea*) corrispondono ancora al moderno concetto di *Coffea*, mentre le altre due fanno riferimento oggi ai generi *Psilanthus*, *Prismatomeris* e *Argocoffeopsis*. Attualmente sono riconosciute 103 specie di *Coffea* più 7 *taxa* infraspecifici, con una principale distribuzione ecologica nell'Africa tropicale, nel Madagascar e nelle Isole Mascarene, che si trovano nell'Oceano Indiano, a est del Madagascar. Le varietà di *Coffea arabica* nello specifico hanno invece una distribuzione più

ristretta: Africa tropicale nord-occidentale, sud-ovest Etiopia e sud-est Sudan, e in Africa orientale, Kenya, prediligendo foreste umide sempreverdi a 950-1200-1950 m. Tutti i cultivar di arabica provengono in realtà dai primi semi introdotti nello Yemen, che erano geneticamente poco differenti. Tuttavia la variabilità genetica delle popolazioni selvatiche in Etiopia risulta invece decisamente maggiore rispetto a quella delle specie coltivate. In molte regioni tropicali e subtropicali, arabica è stata introdotta e naturalizzata, mentre in alcuni luoghi, come la Polinesia francese e il nord-est del Queensland (Australia) questa specie è considerata addirittura come una pianta fastidiosa e invasiva (Davis *et al.*, 2006).

Tutte le specie di *Coffea* sono diploidi ( $2n = 22$  cromosomi) eccetto *C. arabica* che è invece allotetraploide ( $2n = 44$ ) e che si è probabilmente originata da un incrocio interspecifico spontaneo tra due specie diploidi, seguito da duplicazione. Recenti studi citogenetici e molecolari indicano che i possibili progenitori di *arabica* sono *C. eugenioides* e *C. canephora* (o *C. congensis*) (Lashermes *et al.*, 1999). E' una specie che si riproduce per autoimpollinazione: ciò in parte spiega la sua ridotta diversità genetica e anche la difficoltà di introdurre nuove caratteristiche genetiche di interesse commerciale (Charrier & Berthaud, 1985).



**Fig. 1.** La pianta del caffè disegnata per la prima volta nel *De Plantis Aegypti* di Prospero Alpino, indicata col nome arabo di Bon o Ban.



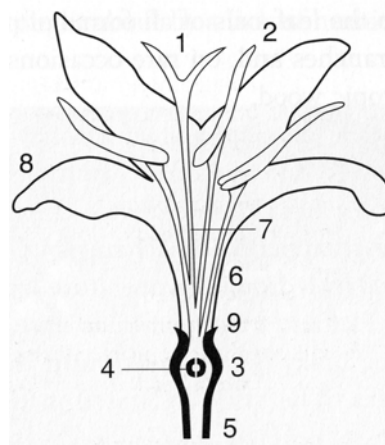
## 1.5 – LE CARATTERISTICHE MORFO-ANATOMICHE

### 1.5.1 – I Fiori

Sono di colore bianco con un profumo dolce, ricordano molto il fiore del gelsomino. Solitamente si trovano raggruppati, due o tre insieme, formando un ‘*glomerulum*’, che raggiunge al massimo il numero di sedici fiori e che si erge dall’asse fogliare in crescita su rami solitamente giovani, di appena un anno di età e mai sul ramo principale.

Il fiore singolo è formato da cinque lobi nati da un corto peduncolo; la gemma diventerà bianca solamente in prossimità della fioritura e si sfiorirà rapidamente, spesso in poche ore. Il calice è di piccole dimensioni, la corolla è formata inizialmente da un piccolo tubicino di 10 mm che verso la fine si apre in cinque lobi leggermente appuntiti, con una lunghezza pari a 8 mm, perciò il fiore globalmente misurerà 18 mm. Dal tubicino della corolla spuntano le antere che possono avere dimensioni da 6 a 8 mm, dotate di un piccolo filamento attaccato alla base di ciascun lobo. Inferiormente dall’ovario si erge un lungo stilo di 12-15 mm che alla fine si apre, alla stessa altezza delle antere, in due sottili e separati stigmi (fig. 2). Lo stilo è attaccato ad un punto di inserzione circolare dell’ovario che più tardi sarà visibile come una macchia rotonda sul frutto maturo (Rothfos B., 1980).

La fioritura avviene solitamente nel periodo di più corta luminosità che corrisponde al solstizio d’estate per i paesi del sud, come il Brasile. Il suo fotoperiodismo comunque è a giorno breve. Il ritmo di crescita è influenzato poco dalla durata del giorno anche se è provato che con giornate più lunghe la crescita vegetativa è maggiore e più veloce (Pallotti P., 2000).



**Fig. 2.** Anatomia del fiore. 1. stigma; 2. stame con antera; 3. ovario; 4. loculi o camere ovariche con ovuli; 5. ricettacolo; 6. base tubolare della corolla; 7. stilo; 8. petalo; 9. calice ridotto (da Wintgens, 2004)

### 1.5.2 – L'ovulo

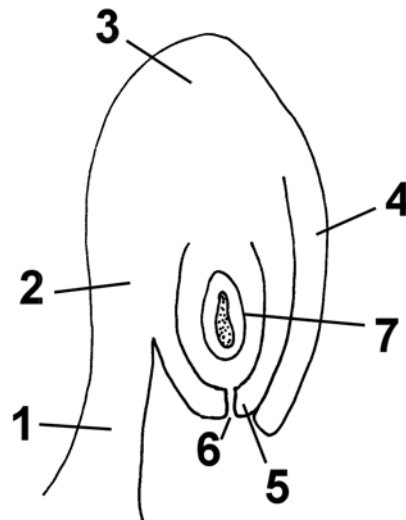
L'ovulo è considerato il precursore del seme. Gli studi sull'ovulo perciò sono di vitale importanza per comprendere la struttura e le funzioni del seme. L'ovulo è formato da una nocella, dal tegumento/i, da una calaza, dal rafe e dal funicolo (fig. 3). La nocella rappresenta l'omologo del megasporangio dei progenitori delle piante a seme, l'organo in cui si svolge la megasporogenesi. Essa è circondata completamente da uno o due tegumenti, che la circondano fino a toccarsi all'apice a formare il micropilo, un'apertura che permetterà il passaggio del tubetto pollinico. I tegumenti proteggono e nutrono la nocella e il suo contenuto. Nei semi maturi, essi formano, assieme alla calaza e al rafe, la testa del seme. La tipologia di ovulo più comune è quella anatropa, tipica anche del genere *Coffea*: durante il suo sviluppo questo tipo di ovulo fa una curvatura di 180°, cosicché diventa completamente invertito e il micropilo si trova vicino all'attacco dell'ovulo. L'ovulo è attaccato alla placenta del gineceo per mezzo di un funicolo che, nella maggior parte degli ovuli, contiene un fascio vascolare. La parte del funicolo che corre parallela alla nocella è chiamata rafe. La calaza è la regione tra il rafe e la nocella, dove i tegumenti sono inseriti. Quindi, funicolo, rafe, calaza e nocella formano un tessuto continuo, ovvero l'asse centrale dell'ovulo, senza confini ben delineati (Johri, 1984).

La condizione unitegmica di *Coffea*, cioè della presenza di un unico tegumento che riveste la nocella o il sacco embrionale, può derivare da differenti vie ontogenetiche durante l'evoluzione delle angiosperme. Il tegumento sovente aumenta in spessore durante lo sviluppo dell'ovulo e del seme, in questo caso è detto 'moltiplicativo'. Il modo di moltiplicarsi dipende dal tipo di tegumento. Uno dei fenomeni più ragguardevoli nell'istogenesi del tegumento è la differenziazione di un tapetum o endotelio, a volte di difficile interpretazione: si tratta spesso di uno strato limitato attorno al sacco embrionale, presente di solito in ovuli con nocella sottile con funzione di nutrizione del sacco embrionale. Nella maggior parte delle famiglie sparisce durante le ultime fasi di sviluppo del seme.

Tra le strutture speciali c'è anche l'otturatore che si trova vicino al micropilo, con funzione di guida e crescita del tubetto pollinico, e che può variare sia in struttura che per l'origine. Negli ovuli che hanno un funicolo distinto generalmente è di derivazione funicolare, come nel caso di *Coffea*. Può essere prominente, spesso subdermale, una protuberanza ricoperta da peli ghiandolari o semplicemente una regione con uno strato epidermico con papille (Tilton & Horner, 1980). Le cellule sono a tutti gli effetti delle transfer cells, adibite al trasporto di metaboliti nelle corte distanze e/o la secrezione di sostanze chemiotropiche per la crescita del

tubetto pollinico. La superficie dell'otturatore si apre sul micropilo o lo riempie. Dopo la fecondazione l'otturatore degenera (Johri, 1984).

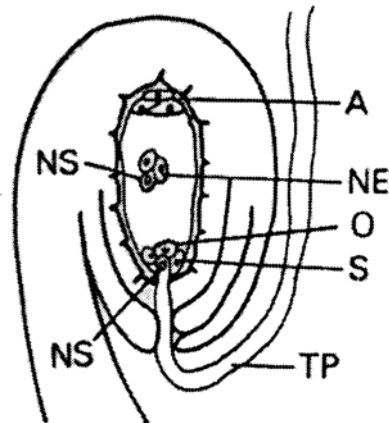
Secondo Leliveld (1938) la fecondazione del sacco embrionale in *Coffea arabica* dovrebbe avvenire da trenta a cinquanta ore dopo l'impollinazione, mentre secondo Mendes (1941) anche solo dopo dodici ore. In alcuni casi è possibile che il periodo di attesa tra impollinazione e fecondazione si protragga per qualche giorno.



**Fig. 3.** Schema dell'anatomia dell'ovulo. 1. funicolo; 2. rafe; 3. calaza; 4. tegumento esterno; 5. tegumento interno; 6. micropilo; 7. nocella con sacco embrionale.

### 1.5.3 – La doppia fecondazione nelle *Angiospermae*

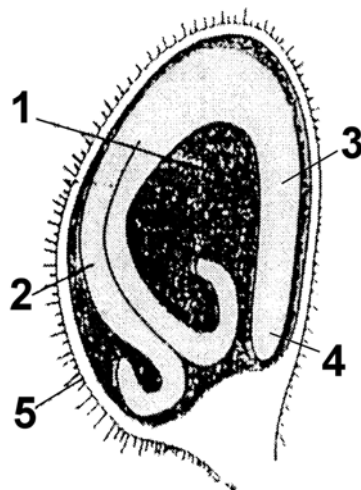
Come già accennato in precedenza, l'ovario del fiore è inizialmente formato da un sacco embrionale dotato di otto nuclei, protetto da un tessuto detto 'nocella' e dal suo tegumento. Durante l'impollinazione i nuclei spermatici del granulo pollinico, aiutati da una struttura chiamata 'tubetto pollinico', raggiungono l'ovario e fecondano rispettivamente l'ovulo e i due nuclei polari, che formeranno successivamente l'endosperma. Questo fenomeno viene comunemente denominato 'doppia fecondazione', tipica delle *Angiospermae* (fig. 4). A fecondazione avvenuta, lo zigote diploide appena formatosi, derivante dall'unione della cellula spermatica del polline con l'ovulo, si accresce all'interno dell'endosperma, che è invece triploide, perchè deriva dall'unione di tre nuclei: due di derivazione materna e uno dal granulo pollinico maschile.



**Fig. 4.** Doppia fecondazione. A, antipodali; NE, nuclei polari dell'endosperma; NS, nucleo spermatico del granulo pollinico; O, cellula uovo; S, sinergidi; TP, tubetto pollinico (tratto da Gerola, 1997).

#### 1.5.4 – I semi

Il seme maturo (dal latino 'semen', letteralmente 'la cosa seminata', ovvero ciò che germoglia e fruttifica) consiste di un tegumento seminale esterno, di un embrione, che rappresenta la nuova fase sporofita e di un endosperma, che funge da tessuto di riserva per l'embrione in crescita (fig. 5).

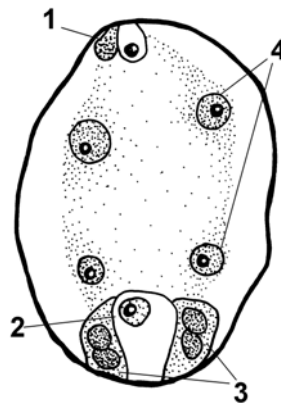


**Fig. 5.** Esempio di seme in sezione longitudinale: 1. endosperma; 2. cotiledoni embrionali; 3. ipocotile; 4. radichetta; 5. tegumento seminale (tratto da Gerola, 1997).

L'embrione maturo è costituito da un asse portante uno o due cotiledoni (le 'foglie' del seme): la parte che si trova sopra il punto di inserzione dei cotiledoni è detta epicotile e

costituisce il meristema apicale del germoglio (ovvero la parte in accrescimento), mentre la parte che si trova sotto il punto di inserzione dei cotiledoni è detta ipocotile (l'asse fra i cotiledoni e l'apice radicale) seguita da una radichetta (fig. 5).

Nel caso di *Coffea*, il seme è formato però principalmente dall'endosperma che si origina direttamente dal sacco embrionale fecondato nell'ovulo. Il nucleo dell'endosperma primario fecondato è sottoposto a divisioni 'free-nuclear'. I nuclei liberi si aggregano nella regione micropilare o calazale, o in entrambe, oppure si possono distribuire in un film di citoplasma intorno a un vacuolo centrale. Nella maggior parte delle piante diventa cellulare. La formazione delle pareti può accadere in diversi stadi di sviluppo come nel caso di *Coffea arabica*, quando l'endosperma ha solo quattro nuclei liberi (Johri, 1992; fig. 6).



**Fig. 6.** Disegno del sacco embrionale: 1. cellule antipodali; 2. cellula uovo; 3. cellule sinergidi; 4. endosperma triploide di tipo nucleare, a quattro nuclei liberi (ripreso da Johri, 1992).

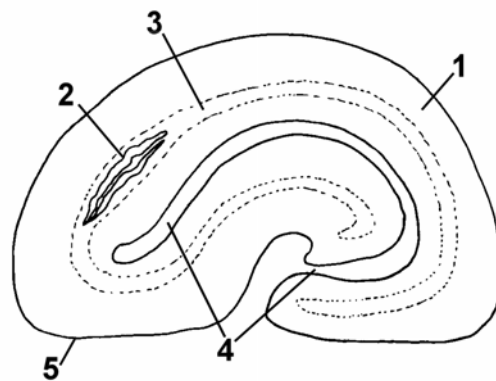
Studiare la 'morfo-anatomia dello sviluppo di un seme' significa analizzare ed osservare l'intero processo che porta alla maturazione dell'embrione e del suo tessuto di riserva. Tale processo può essere brevemente riassunto in tre fasi principali: si parte da alcuni eventi che precedono l'impollinazione del fiore, fino alla fecondazione del fiore stesso e quindi alla completa maturazione del frutto e del seme, anche se i due fenomeni possono avvenire con tempistiche diverse.

I semi maturi del genere *Coffea* presentano delle caratteristiche peculiari (figg. 7, 8): sono di forma piano-convessa, ovale od ellittica, solcati longitudinalmente, avvolti da una struttura denominata 'pellicola argentea' formata da fibre allungate appoggiate ad un tessuto amorfo, che si origina a partire dal tegumento dell'ovulo. Il piccolo embrione si trova alla base del seme, nella parte convessa, dotato di ipocotile e cotiledoni cuoriformi; nelle prime fasi embrionali, lo zigote resta in un periodo di quiescenza di circa sessanta-settanta giorni, prima

di accrescersi. L'endosperma può essere osservato nel seme intorno ai trenta giorni dopo la fecondazione del fiore (Mendes, 1941); nel seme maturo è un tessuto corneo, formato principalmente da cellule poliedriche. La fila di cellule più esterna, a contatto con la pellicola argentea, è più uniforme. Il tipico solco longitudinale presente sulla faccia piana può caratterizzare le diverse varietà di *Coffea* (fig. 7). La tipica forma dei semi in arabica è ovale, con circa 10 mm di lunghezza, 6-7 mm di altezza e 3-4 mm in spessore.



**Fig. 7.** Seme di *C. arabica* avvolto dal pergamino con solco longitudinale in evidenza (Biolab, Illycaffè).



**Fig. 8.** Disegno del seme in sezione trasversale: 1. endosperma; 2. embrione (cotiledoni); 3. cavità embrionale; 4. solco; 5. pellicola argentea.

### 1.5.5 – Caratteristiche peculiari dell’embriogenesi nelle *Rubiaceae* e in *Coffea*

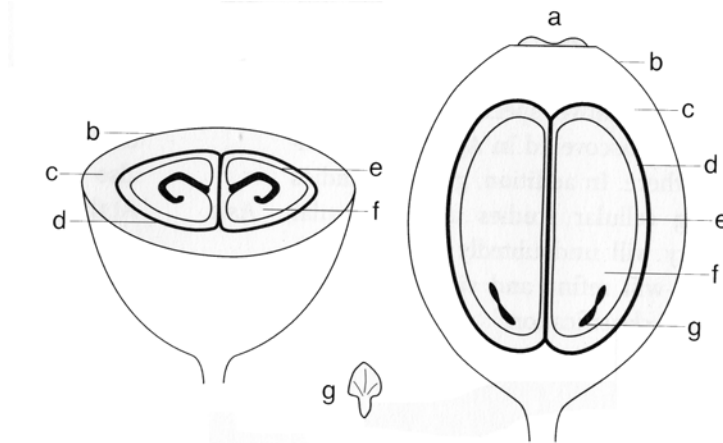
La famiglia delle *Rubiaceae* è caratterizzata da alcuni eventi embriologici che la contraddistingue in parte dal resto delle *Angiospermae*. Innanzitutto la nocella, il tessuto che riveste il sacco embrionale è di ridotte dimensioni o addirittura a volte anche assente e lo sviluppo del sacco embrionale può essere variabile e seguire diverse tipologie, come ‘*Polygonum*’, ‘*Allium*’ o ‘*Peperonia type*’. All’interno del sacco embrionale le cellule antipodali sono effimere oppure persistenti, nel qual caso possono andare incontro a ulteriori

divisioni cellulari e quindi essere in soprannumero. Lo sviluppo dell'endosperma è inizialmente di tipo nucleare; dopo un certo numero di divisioni 'free-nuclear', precisamente allo stadio di 4 nuclei (Johri, 1992, fig. 6), diventa di tipo cellulare. Il seme ha uno strofiolo, parte carnosa che deriva dal peduncolo che tiene legato l'ovulo all'ovario, ed ha una calaza, cioè la parte basale dell'ovulo da cui deriva, più ispessita (Corner, 1976).

Nel caffè alcune di queste strutture hanno caratteristiche peculiari: l'ovulo è di tipo anatropo (figg. 3, 4), cioè l'asse dell'ovulo è parallelo al suo funicolo, è dotato di un unico tegumento e la nocella è estremamente sottile, formata da poche cellule, unita al tessuto del tegumento tanto da essere indistinguibile da esso (Roth & Lindorf, 1974 a). Le cellule antipodali si trovano in soprannumero, come già accennato precedentemente. In *Coffea arabica* possono essere anche una decina (Davis, 1966).

### **1.5.6 – Le Drupe**

L'ovario si sviluppa in una drupa globulare o ovoidale che di norma contiene due semi, con un diametro di 10-15 mm ed una lunghezza di 14-18 mm. Quando il frutto raggiunge la maturazione, l'esocarpo (la buccia) diventa rosso, ricoprendo un mesocarpo (la polpa) viscido, dolce e mucillaginoso. All'interno del frutto si trovano i due semi conosciuti come 'chicchi di caffè'. I semi sono dotati di una parte appiattita e l'altra parte convessa; la parte piatta mostra il solco centrale causato dalla rotazione dell'endosperma in formazione, che gira soltanto da un lato. In sezione trasversale infatti il solco ha un andamento a spirale e risulta ancora più visibile se il frutto contiene solamente un unico seme. Entrambi i semi sono ricoperti da una pellicola sottile e giallastra, l'endocarpo del frutto (il pergamino), dotata anch'essa di solco. A sua volta, il pergamino è ricoperto da una sostanza mucillaginosa. A stretto contatto con il seme, sotto il pergamino si trova la pellicola argentea, sottile membrana che lo ricopre (fig. 9).



**Fig. 9.** Anatomia del frutto. a. disco b. epicarpo (buccia); c. mesocarpo (polpa); d. endocarpo (pergamino); e. pellicola argentea; f. endosperma; g. embrione (da Wintgens, 2004).

### 1.6 – LO SVILUPPO DEI FRUTTI: MODIFICAZIONE ED EVOLUZIONE DEI TESSUTI

Nel genere *Coffea* lo sviluppo dei frutti dalla fioritura alla loro completa maturazione, avviene solitamente in un periodo variabile fra poche settimane, come nel caso di *C. racemosa* e *pseudozanguebariae*, a più di un anno, come per *C. liberica*. I frutti di *C. arabica* raggiungono la maturazione in 6-8 mesi. Spesso la loro crescita è asincrona e nella stessa pianta è possibile trovare anche frutti di diverse dimensioni. In ogni caso, è stata osservata una tendenza alla sincronia negli ultimi stadi di sviluppo quando il frutto raggiunge la sua massima dimensione, allo stadio cosiddetto di ‘cherry’ (De Castro *et al.*, 2005).

Nonostante l’asincronia nella crescita e le differenze in lunghezza del ciclo riproduttivo fra specie di caffè, gli step e lo sviluppo del seme sembrano essere identici, almeno per le specie commerciali.

I primi studi sono stati svolti negli anni ’40 prima da Houk (1938) e poi da Mendes (1941), i primi ricercatori che hanno studiato le principali fasi di sviluppo del seme del caffè e le loro problematiche legate all’interpretazione dei tessuti presenti. In particolare, Mendes ha lavorato sulle varietà *Typica* e *Semperflorens*; è riuscito ad osservare l’accrescimento dell’endosperma fin dalle prime divisioni cellulari, circa tre settimane dopo la fecondazione dei fiori. Dopo due mesi, l’endosperma poteva contare da quarantaquattro a centoventi cellule, mentre lo zigote iniziava la sua prima divisione. A quattro mesi, l’endosperma aveva rimpiazzato completamente il perisperma di derivazione materna, che si limitava a formare la ben nota pellicola argentea; allo stesso tempo, l’embrione era già formato ed iniziava il differenziamento dei cotiledoni.



Dedecca (1957) ha effettuato invece uno degli studi più imponenti sull'anatomia di *C. arabica* L. cv. *Typica* Cramer, caratterizzando in maniera minuziosa, tutti i tessuti vegetali della pianta, dal caule alle foglie e ai frutti, con descrizioni molto precise e con l'accompagnamento di disegni esplicativi.

Nello studio di Wormer (1966) è stato studiato lo sviluppo della varietà Bourbon. Egli ha osservato una rapida crescita dei semi da zero a sette settimane dopo la fioritura, fino al raggiungimento della dimensione finale alla diciassettesima settimana. La crescita iniziale ha coinciso con il repentino sviluppo del perisperma oltre la dodicesima settimana, quando l'endosperma ha iniziato ad essere osservato. Dopo ciò, esso ha continuato a crescere gradualmente fino a occupare completamente lo spazio lasciato dalla porzione interna del perisperma verso la diciannovesima settimana. Allo stadio maturo del frutto, intorno alla trentesima settimana, solamente lo strato esterno del perisperma è rimasto intorno all'endosperma (pellicola argentea). L'endosperma è considerato la parte preminente nel chicco che, dopo i trattamenti post-raccolta, è denominato 'caffè verde'.

Anche studi più recenti sulla varietà di *C. arabica* Acaia Cerrado (De Castro *et al.*, 2002, 2006) hanno dimostrato che le fasi di sviluppo dei semi, seppur di poco variabili temporalmente nell'ambito delle fasi stesse, seguono lo stesso andamento. È stata sempre osservata una fase di quiescenza di circa un paio di mesi dopo la fecondazione, dopodiché la nocella si è accresciuta fino a formare il cosiddetto 'falso seme'; in maniera impropria per nocella si intendeva in questo studio il tessuto del perisperma. Dopo tre mesi il perisperma si è degradato o è stato consumato dall'endosperma in formazione, mentre l'embrione si trovava già nella fase di torpedine. Si è inoltre osservata una formazione tardiva della pellicola argentea tra la 32<sup>a</sup> e la 36<sup>a</sup> settimana di sviluppo.

Studi precedenti hanno anche mostrato citologia e istologia del seme in sviluppo (Dentan, 1977, 1985 a, b) a livello microscopico e ultrastrutturale, mettendo in evidenza il fatto che questo tipo di materiale è considerato molto difficile da trattare. Lo spessore delle pareti cellulari, soprattutto nello stadio maturo del seme, e la particolare modalità di raccolta del materiale di riserva all'interno del citoplasma, hanno ostacolato la fissazione, l'inclusione e il sezionamento dei tessuti. In questi studi sono state così sviluppate delle tecniche ad hoc per il trattamento dei tessuti seminali. Dopo ciò è stato effettuato uno studio particolarmente importante sullo sviluppo del seme nella varietà Catuai amarelo. I chicchi di questa varietà sono considerati maturi a circa solo sei mesi dopo la fioritura, utilizzando i primi cinque mesi e mezzo per la loro crescita e gli ultimi venticinque giorni per la loro maturazione. Durante i

primi tre mesi i chicchi si erano accresciuti ed avevano accumulato energia sotto forma di granuli di amido primario. In seguito, avevano invece immagazzinato le sostanze di riserva (lipidi, proteine e polisaccaridi) nel citoplasma e nelle pareti cellulari delle cellule endospermiche. Durante l'ultimo mese di sviluppo era stato osservato un fenomeno interessante: il triptofano, amminoacido precursore della serotonina, si era degradato completamente in serotonina e c'era stata una migrazione di acido clorogenico e di sali minerali verso le pareti cellulari. Questi fenomeni erano collegati direttamente alla maturazione del seme. Chicchi immaturi avevano invece ancora una quantità apprezzabile di triptofano ed un elevato rapporto di acidi dicaffeilchinici. Queste caratteristiche in corso di torrefazione del caffè, erano considerate responsabili, assieme ad altri composti, del sapore astringente e metallico della bevanda, nel caso in cui chicchi immaturi, di taglia adulta, apparivano sul mercato (Ohiokpehai *et al.*, 1982; Dentan, 1985 a).

Infine, dai riferimenti bibliografici conosciuti risulta che sono state studiate le seguenti varietà di *arabica*: Semperflorens, Mundo Novo, Typica, Bourbon, Acaia Cerrado e Catuai Amarelo (Houk, 1938; Mendes, 1941; Dedecca, 1957; Wormer, 1966; Dentan, 1985; De Castro *et al.*, 2002, 2006), che portano alcune differenze morfo-anatomiche, oltre che genetiche e chimiche, e tempistiche diverse di accrescimento.

### **1.7 – IL CONTENUTO CELLULARE DELL'ENDOSPERMA**

Le sostanze di riserva dell'endosperma rivestono sicuramente un'enorme importanza per l'industria del caffè, in quanto la loro presenza e il loro rapporto quantitativo sono strettamente correlati con la qualità della bevanda. In microscopia sono stati studiati i composti principali, ovvero lipidi, proteine e polisaccaridi, in diverse forme di stoccaggio e in differenti stadi di sviluppo del seme.

I lipidi fin dall'inizio sono presenti sotto forma di globuli isolati nel citoplasma delle cellule parenchimatiche e formano delle masse più o meno sferiche vicino alle pareti cellulari. Dopo i primi tre mesi di sviluppo, compaiono invece i lipidi di riserva veri e propri, inizialmente più in periferia e poi progressivamente in tutto il chicco. A volte possono anche essere circondati da una fine matrice proteica (Dentan, 1985 a). La loro quantità aumenta considerevolmente negli ultimi stadi di sviluppo.

Le proteine di riserva sono contenute all'interno di piccole vescicole, dette anche corpi proteici ('protein bodies') delimitate da una sottile membrana. I primi corpi proteici appaiono dopo tre mesi dalla fecondazione del sacco embrionale; essi si trovano generalmente alla

periferia della cellula, e tendono a formarsi in tutte le porzioni del seme. Aumentano progressivamente in dimensione e in numero e formano veri e propri grappoli, vicino alle pareti cellulari; all'interno sono dotati di un contenuto dall'aspetto abbastanza denso e relativamente compatto. Esistono però anche proteine di riserva nel citoplasma non necessariamente raggruppate in questi corpi proteici (Dentan, 1985 a).

I polisaccaridi appaiono sotto forma di filamenti sottili e vescicole dopo i primi tre mesi di sviluppo del seme. Durante questo periodo si osserva anche la comparsa dello strato mucillaginoso centrale, localizzato nella cavità embrionale. Le vescicole di polisaccaridi tendono ad agglomerarsi fra loro e, negli ultimi stadi di maturazione, hanno una distribuzione diffusa nel citoplasma di alcune cellule (Dentan, 1985 a, b).

Dal punto di vista biochimico sono stati osservati gli scambi di zuccheri e acidi organici nella fase di passaggio tra il tessuto del perisperma di origine ancora materna e quello dell'endosperma del nuovo seme (Rogers *et al.*, 1999; Marraccini *et al.*, 2001a). Inoltre, lo strato sottile del perisperma (la futura pellicola argentea), non consumato dall'endosperma, resta come un tessuto verdastro, che sembra possa avere importanti funzioni durante la formazione del seme, per esempio nella traslocazione degli assimilati all'endosperma in sviluppo (De Castro *et al.*, 2005).

L'endosperma (o il perisperma) può essere copioso, come nel caso di *Coffea*; i semi quindi sono detti endospermici o albuminosi. Esso ha funzione non solo di nutrizione per la crescita e il differenziamento dell'embrione ma anche di fermare fisicamente l'espansione dell'embrione (in particolare dell'emergenza radicale) durante la fase antecedente alla germinazione. La struttura e la composizione dell'endosperma come anche il controllo della sua funzione è fondamentale, ad esempio, per lo studio della germinazione. L'endosperma può avere cellule vive (come nella maggior parte delle famiglie) o cellule vive e morte (es. *Gramineae*) (Jacobsen, 1984).

Le riserve nell'endosperma, come già detto, sono polimeri che includono proteine, lipidi e carboidrati (amido o polimeri di parete) ma anche composti come fitina o ossalato di calcio. Esse non sono distribuite uniformemente all'interno del seme. Nell'endosperma con cellule vive raramente si trova amido, invece comunemente ci sono lipidi (oleosomi), fitina e proteine (corpi proteici), ossalati di calcio (cristalli all'interno dei corpi proteici) e carboidrati conservati nella parete cellulare spessa di emicellulosa. Nelle pareti cellulari delle dicotiledoni troviamo anche mannani (in *Coffea* Wolfrom *et al.*, 1961).

È noto che le *Rubiaceae* hanno dal 10 al 20% di contenuto proteico, e dal 10 al 20% di contenuto oleico, quindi lipidico (Earle and Jones, 1962).

Le cellule possono contenere inoltre sostanze come l'acido clorogenico e la caffeina, che rivestono un'enorme importanza in quanto composti fisiologicamente attivi, oltre che responsabili anch'essi dell'aroma della bevanda. *Coffea arabica* ha una composizione chimica che la rende unica e pregiata: il contenuto di caffeina e di acidi clorogenici è pari rispettivamente all'1,2% e al 6,5% del peso di un suo seme, mentre il 16% è costituito da lipidi totali, il 10,3% da proteine e il 58,9% da carboidrati (Illy & Viani, 2005). Quest'ultimi sono costituiti da saccarosio (8%) e il resto (circa il 43%) è costituito in gran parte da arabinogalattani (14%), mannan e galattomannani (22%) e cellulosa (7%), componenti della parete cellulare (Bradbury, 2001; Homma, 2001; Speer & Kölling-Speer, 2001). Arabica contiene inoltre due importanti diterpeni, cafestolo e kahweolo, tipici del genere *Coffea* e che non si ritrovano in altre specie vegetali. Il rapporto tra questi composti viene infatti utilizzato come indicatore nella composizione delle miscele di caffè.

## 1.8 – OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è stato quello di creare un atlante di morfo-anatomia del seme e del suo sviluppo in una delle più conosciute varietà commerciali di *Coffea arabica* L. (Mundo Novo). Ciò è stato possibile anche grazie alla collaborazione del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste con Illycaffè, che ha permesso prima di tutto di effettuare il campionamento *in situ* del materiale. Illycaffè ha inoltre messo a disposizione il BioLab e parte della strumentazione necessaria per questo tipo di studio, nonché l'esperienza delle persone che lavorano su questo materiale da molto tempo e che hanno saputo dare preziosi consigli soprattutto dal punto di vista tecnico-strumentale.

Le immagini microscopiche ed i disegni esplicativi possono essere uno strumento di comprensione dei meccanismi di generazione, mantenimento e degradazione della “qualità” del caffè. Una particolare attenzione è stata data infatti allo sviluppo dell'endosperma, che rappresenta dal punto di vista commerciale, la struttura di interesse, fondamentale per studiare la qualità del caffè. L'importanza economica dei semi dipende molto dalla presenza di materiale di riserva nutritivo come lipidi, carboidrati e proteine di cui si è parlato precedentemente. Una delle funzioni principali è appunto quella di conservare energia. Durante la germinazione infatti i semi necessitano di una risorsa di precursori per formare i propri costituenti e la risorsa di energia per assemblare questi precursori; quest'ultima funzione in particolare è affidata ai lipidi sotto forma di oil bodies, molto più presenti rispetto

ai carboidrati sia nell'endosperma che nell'embrione (Boesewinkel & Bouman, 1984). Nel caffè i carboidrati sono arabinogalattani, in forma soprattutto di arabinogalattani-proteins o AGPs, che hanno un ruolo importante nella regolazione dello sviluppo del seme (van Hengel *et al.*, 2002) e galattomannani formati oltre che da galattosio e mannosio, anche da altri residui di zucchero (Redgwell & Fisher, 2006).

Gli studi di tipo morfo-anatomico, completati anche da dati chimici e genetici, possono ampliare le conoscenze su un prodotto di interesse mondiale, dare nuove informazioni sulle variazioni a cui sono soggetti sia il seme che il frutto, anche nelle fasi successive alla raccolta e durante il trasporto del prodotto; inoltre, questi studi sono in grado di fornire immagini fedeli e significative, che possono fungere da esempio per tutti gli addetti ai lavori o anche soltanto per gli amatori.

## **1.9 – TECNICHE SPERIMENTALI**

Le tecniche sperimentali che si possono utilizzare negli studi di morfologia sono essenzialmente tutte quelle tecniche che permettono di analizzare microscopicamente i tessuti seminali. La difficoltà nel seme del caffè è che, essendo formato da un tessuto molto compatto, è stato necessario studiare un protocollo sperimentale valido per conservare al meglio il materiale e quindi per poterlo tagliare, senza romperlo, rovinarlo o perdere alcune parti. Superato questo passaggio, la possibilità di lavorare in microscopia è stata decisamente molto ampia: si è deciso infatti di utilizzare diverse tecniche per caratterizzare al meglio il materiale a disposizione ed acquisire quindi una buona quantità di informazioni. La microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM), è stata in grado di evidenziare dettagli tridimensionali e di effettuare un'accurata analisi morfologica cellulare. Lo studio più corposo è stato effettuato al microscopio ottico, con la possibilità di osservazione in fluorescenza del materiale, tecnica che è stata ampiamente utilizzata negli anni '80.

Infine, è stato possibile testare anche qualche campione con un microscopio ottico confocale, di ultima generazione, in grado di migliorare la qualità delle osservazioni in microscopia ottica, nonché di aprire nuove possibilità di indagine.

Queste tecniche potrebbero essere utilizzate per studiare il seme anche durante la sua lavorazione e durante la sua conservazione, per stabilire quindi il rapporto fra embrione ed endosperma in questa fase, in dipendenza di alcuni fattori, come ad esempio temperatura e umidità dell'aria, o anche la vitalità del seme stesso.



## 2 – MATERIALI E METODI

### 2.1 – FASE DI CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE

#### 2.1.1 – La scelta del cultivar Mundo Novo

Per ottenere un numero di campioni sufficiente per effettuare lo studio è stato necessario recarsi *in situ* (Campinas, S. Paulo, Brasile) al momento della fioritura principale, grazie alla collaborazione fra illycaffè e l'Instituto Agronômico de Campinas (IAC). E' stato possibile quindi iniziare il campionamento dei primi stadi di sviluppo delle drupe, organizzare i campionamenti successivi e le spedizioni dello stesso materiale da effettuare subito dopo. Per questo lavoro è stata scelta una coltivazione sperimentale di *Coffea arabica* L. cv. 'Mundo Novo', in particolare il cultivar IAC 501-5, che discende dalla prima coltivazione di semi di 'Mundo Novo' a Campinas, appartenente all'Instituto Agronômico (fig. 10).



**Fig. 10.** Coltivazione sperimentale del Mundo Novo IAC 501-5 a Campinas, SP, Brasile.

Innanzitutto, il materiale è stato scelto accuratamente: visto che le piante di *Mundo Novo* presentavano segni di sofferenza a causa di una forte siccità estiva nel corso del 2006, e quindi la fioritura non è stata abbondante come gli anni precedenti, si è deciso di selezionare non singole piante intere ma rami secondari di diverse piante appartenenti alla stessa coltivazione. Sono stati quindi selezionati 132 rami fioriti segnati con un numero (linea di coltivazione) e una lettera (pianta selezionata), es. 8° (fig. 11). Il 10 settembre 2006 le piante

hanno dato la fioritura principale; per problemi logistici non si è riuscito ad iniziare subito il campionamento e quindi i primi campioni raccolti avevano già 4 giorni. In ogni caso tutti i fiori presenti successivamente a questa fioritura sono stati eliminati per evitare di raccogliere erroneamente diversi stadi di sviluppo durante la stessa raccolta. Durante il primo campionamento sono stati raccolti anche campioni di radice, fusto e foglie di alcune delle piante selezionate.



**Fig. 11.** Selezione dei rami fioriti su una pianta di Mundo Novo con cartellino identificativo.

Il campionamento di tutto il materiale è stato quindi effettuato da settembre 2006 a giugno 2007. Sono stati raccolti con scadenza bisettimanale circa 60 campioni per ciascun stadio di sviluppo dal momento della fioritura fino a completa maturazione del frutto, per un totale di 34 settimane dopo la fioritura (after anthesis, AA). Gli stadi di sviluppo analizzati sono stati 19.

I campioni prelevati random dai rami selezionati sono stati messi immediatamente in una provetta di tipo Falcon con soluzione di fissativo (formaldeide tamponata al 10%, pH 7,2) preparata preventivamente (fig. 12). Per i primi stadi di sviluppo la permanenza nel fissativo è stata soltanto di un giorno, poi i campioni sono stati lavati con acqua corrente per togliere ogni traccia del fissativo in eccesso e quindi sono stati messi in etanolo 50% per essere così conservati e spediti. Dopo i primi due mesi, le drupe invece sono state spedite direttamente in fissativo, in quanto è stato necessario prolungare la loro permanenza nella soluzione.





**Fig. 12.** Campioni appena raccolti in Falcon con soluzione di fissativo.

### 2.1.2 – Modalità di campionamento per diverse tipologie di parti vegetali

Per prelevare diverse parti vegetali (radice, fusto, foglie, fiori e frutti) e quindi analizzare poi diversi tessuti è stato necessario creare un protocollo per trattare al meglio il materiale nella fase di campionamento e permettere quindi la sua sicura conservazione fino all'arrivo in laboratorio; vediamo quindi schematicamente i passaggi seguiti per ciascuna tipologia:

- **Radice:** rimozione di radici secondarie laterali da piante scelte casualmente sulla linea di campionamento delle altre parti vegetali; pulizia delle stesse in campo per eliminare i residui di terra più grossolani, se possibile con risciacquo in acqua corrente. Il materiale è stato messo direttamente in una soluzione di formaldeide tamponata al 10% per la sua conservazione. La durata minima nella soluzione è di un paio di giorni (a seconda dello spessore), prima di poter essere utilizzata per qualsiasi test istologico.
- **Fusto in struttura primaria:** ovvero fusto in accrescimento con l'epidermide ancora verde non lignificata. Taglio con bisturi o lama di una porzione possibilmente non apicale del ramo secondario, risciacquo in acqua corrente e fissazione per un periodo di almeno due giorni (si tratta sempre di campioni molto grandi).
- **Fiore:** delicata rimozione manuale del fiore (bocciolo, apertura e post -fioritura) con particolare attenzione a campionare anche e soprattutto l'ovario in questa specie tipicamente infero. Non è previsto nessun risciacquo. I campioni sono stati

posti direttamente in fissativo e la loro permanenza non è stata superiore a ventiquattro ore a causa della fragilità dei tessuti presenti. Successivamente i campioni sono stati messi in una soluzione di alcool etilico al 70% (eventualmente al 50 % per facilitare la preparazione della soluzione in campo) per conservarli più a lungo, tenendo conto che questo tipo di materiale in questa soluzione alcolica può deteriorarsi facilmente. Con l'accrescimento dell'ovario post fioritura è cambiato anche il tempo di conservazione nel fissativo, perciò ovari di una settimana potevano resistere in fissativo anche per più di un giorno.

- **Frutto:** rimozione manuale delle drupe programmata temporalmente per ogni stadio di sviluppo. Non è previsto nessun risciacquo. I campioni sono stati messi direttamente in fissativo, la permanenza in esso può variare da un minimo di quindici giorni fino ad un massimo di un anno o più; ciò dipende sia dalla grandezza della drupa che dal suo stadio di sviluppo o da ciò che si vuole osservare.

## 2.2 – ANALISI DIMENSIONALE DEI CAMPIONI

All'arrivo in laboratorio del materiale è stata subito effettuata l'analisi dimensionale delle drupe su un pool di trenta campioni brasiliani scelto casualmente tra quelli inviati, utilizzando per le misure un calibro digitale (Mitutoyo CD-6-csx Absolute Digimatic). E' stato così possibile determinare le dimensioni degli ovari e dei frutti, misurandoli arbitrariamente lungo tre linee di misura: lunghezza, asse maggiore e asse minore (mm) per tutte e due le tipologie di materiale. L'analisi dimensionale sui semi è stata effettuata sui alcuni campioni utilizzati per la sperimentazione, misurando lunghezza, larghezza e spessore del seme, soltanto per vedere l'andamento della curva e confrontarlo quindi con quella delle drupe. Le rielaborazioni dei dati sono state effettuate con il programma Microsoft Excel.

## 2.3 – TRATTAMENTO DEI CAMPIONI IN LABORATORIO

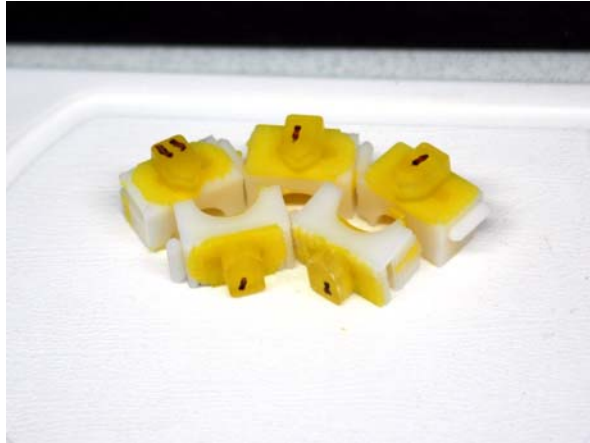
Dall'inizio della fioritura fino alla 20<sup>a</sup> settimana AA i campioni selezionati sono stati inclusi in resina Technovit 7100 (Kulzer®, Germany) e quindi tagliati con un microtomo rotativo ottenendo sezioni da 6 µm. Il taglio è stato effettuato su diverse orientazioni dei campioni: longitudinale di lato e di faccia e trasversale (fig. 13). Dalla 22<sup>a</sup> settimana AA, a causa dell'aumento della durezza del materiale, per il taglio è stato utilizzato un criostato a bassa temperatura (variabile tra -15°C e -25°C); considerando le dimensioni ormai grandi dei semi, il taglio è stato effettuato solo trasversalmente.



**Fig. 13.** Orientazioni del seme per il taglio: longitudinale di faccia, di lato e trasversale.

Nel dettaglio, sono stati riportati i seguenti trattamenti a seconda dell'età del materiale:

- **A fresco.** Durante gli studi preliminari, i campioni appena raccolti sono stati lavati accuratamente, asciugati dall'acqua in eccesso e prontamente tagliati a mano con bisturi o lamette. Le sezioni sono state montate semplicemente in acqua sul vetrino portaoggetti e osservate immediatamente con microscopio ottico in luce normale o UV. Alcune di esse sono state colorate con tecniche istochimiche a seconda dei composti che si volevano osservare.
- **Inclusione in resina Technovit 7100 (Kulzer®, Germany)**(fig. 14). Dopo la fissazione e la permanenza dei campioni in etanolo al 70%, il campione in toto o porzioni di esso sono stati sottoposti a lenta disidratazione per mezzo di una serie di alcoli ascendente (normalmente 70%, 80%, 90%, 95% e 100%); anche se il campione si trovava già in alcool 70, il primo passaggio in alcol è stato ripetuto con nuovo alcool 70 (o eventualmente alcool 50, a seconda di quello che è stato utilizzato per conservare il campione). Per i campioni di caffè è stato utilizzato l'etanolo in diverse proporzioni per una durata di dieci minuti per ciascun passaggio. La durata poteva essere soggetta a variazione nel caso in cui il materiale era più grande o i tessuti più induriti. In ogni caso non si sono mai superati i trenta minuti per qualsiasi tipo di tessuto, in quanto l'alcool sembra essere a quel punto troppo aggressivo con conseguente danneggiamento irreversibile del materiale (disidratazione aggressiva). Dopo l'ultimo passaggio in etanolo puro è stato seguito il protocollo per l'inclusione in resina Technovit 7100.



**Fig. 14.** Esempio di ovari del Mundo Novo inclusi in resina Technovit 7100 (Kulzer®, Germany).

- **Sezioni al Microtomo Criostatico (Reichert-Jung 2800 frigocut con microtomo Leica 2040).** I campioni fissati, sono stati accuratamente lavati in acqua corrente per almeno un'ora in modo da eliminare i residui di fissativo non assorbiti dal tessuto. In questa fase si è visto che è necessario effettuare il lavaggio direttamente sui semi prelevati dalle drupe piuttosto che lavare solo l'intera drupa e poi prelevare i semi, come era stato fatto in precedenza (Dentan, 1985). I semi sono stati tagliati a metà in senso trasversale; la porzione prescelta è stata posizionata su un pezzetto di carta assorbente preventivamente bagnato sull'apposito supporto metallico. Campione e supporto vengono così messi a congelare alla temperatura prescelta per il taglio ( $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-24^{\circ}\text{C}$  per semi immaturi, da  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$  per semi maturi o già in fase di 'over-ripening').
- **SEM (Microscopio a sistema integrato LEICA STEREOSCAN 430i per microscopia elettronica a scansione con microanalisi a raggi x a dispersione di energia).** Normalmente i campioni avrebbero dovuto essere fissati con una soluzione di glutaraldeide (da 1,7% a 3,3%) in tampone fosfato a pH variabile da 6,8 a 7,6. Il materiale invece è stato mantenuto nella soluzione fissativa utilizzata (formaldeide tamponata al 10%). Dopo aver raggiunto un buon grado di disidratazione in etanolo a percentuale crescente, i campioni sono stati montati direttamente sugli appositi supporti metallici. Campioni di frutto non riescono ad essere metallizzati correttamente. Sono risultati migliori i preparati non troppo grandi (di qualche millimetro) che permettono di focalizzare l'attenzione sulle porzioni di interesse.

- **TEM (Microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 208).** La fase della fissazione dei tessuti è considerata la fase più importante. Il tempo di fissazione dei campioni (qualche settimana) per le analisi al microscopio ottico è stato sufficiente per garantirne una buona preparazione anche per il TEM. Negli studi preliminari è stato possibile utilizzare su materiale fresco un fissativo istologico composto da 4% di paraformaldeide v/v, 0,25% di glutaraldeide v/v in tampone cacodilato pH 7,8, 0,1M. Nei campioni proveniente dal Brasile, ciò non è stato possibile. Si è utilizzata la soluzione di formaldeide al 10% in tampone fosfato a pH 8, seguita da tre lavaggi di qualche ora nello stesso tampone.
- **Microscopio confocale (Laser Scanning Confocal Microscopy, TCS-NT/SP2, Leica).** Sono state utilizzate sezioni di caffè verde maturo non trattate soltanto per alcune prove preliminari.

Il materiale è stato studiato attraverso tecniche standard di osservazione in microscopia ottica (Microscopio ottico *Leica modello Leitz DMRXE*; Stereomicroscopio *Leica Wild M10*), in fluorescenza (filtri H3: violet/blue 420-480 nm e D: UV/violet 355-425 nm, *Leica DMRXE*), elettronica a scansione (SEM, *Leica Stereoscan 430i*) e a trasmissione (TEM, *Philips EM 208*): per permetterne l'osservazione è stato quindi trattato attraverso protocolli specifici a seconda della metodologia scelta. Qui di seguito verranno riportate le tecniche utilizzate per ciascuna metodica e le tecniche istochimiche saggiate su diversi tipi di tessuto (vedi par. 2.5).

#### 2.4 – TAGLIO DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DEI VETRINI

- **Campioni in resina (dall'ovario del fiore fino allo stadio di sviluppo della 20<sup>a</sup> settimana).** I campioni sono stati tagliati con un microtomo di tipo rotativo *Leica RM 2035*. Lo spessore scelto per le sezioni incluse era di 6 µm, soddisfacente per le osservazioni da effettuare. Nei casi in cui il materiale era particolarmente difficile da tagliare sono state effettuate sezioni con uno spessore massimo di 10 µm. Le sezioni, prelevate con un'apposita pinzetta d'acciaio con punte arrotondate, sono state posizionate su un vetrino portaoggetti ricoperto da un sottile strato d'acqua distillata per agevolare la loro distensione. Usando una pipetta capillare in vetro è stato possibile eliminare l'acqua in eccesso per permettere una prima adesione al vetrino delle sezioni. Su un vetrino potevano essere posizionate al massimo quattro sezioni. Il vetrino è stato poi posto su un piatto riscaldante (circa 35°C) in grado di

asciugare l'acqua rimanente. I vetrini utilizzati erano vetrini polisinati (polysine™ Menzel-Glaser), specifici per le sezioni in resina, che permettono un'adesione migliore del campione.

- **Campioni in resina (TEM).** Dopo la fissazione i campioni sono stati sottoposti a tre lavaggi con il medesimo tampone e disidratati con successive immersioni in una miscela di acqua e alcool progressivamente crescente dal 10% all'alcool puro (la temperatura delle soluzioni era mantenuta intorno ai 2, 4 gradi). Data la scarsa permeabilità del materiale è stata scelta una resina molto fluida quale l'LR White™ Hard Acrylic Resin e per favorirne la penetrazione i campioni hanno soggiornato per 12 ore in miscele successivamente crescenti di resina/alcool (1/3, 1/1, 3/1) per poi subire 5 cambi in resina pura e polimerizzare a 54° per 36 ore. E' stato utilizzato un ultramicrotomo Leica Ultracut con lama di diamante e sono state ottenute sezioni di 100 nm, raccolte su retini di Nickel da 300 mesh. La colorazione di contrasto è stata effettuata ponendo le sezioni 20 minuti in acetato di uranile al 4% e 3 minuti in piombo citrato.
- **Al criostato (dalla 20ª settimana fino a maturazione).** I campioni in stadi di sviluppo più avanzati risultavano meno fragili e sono stati quindi tagliati al microtomo criostatico. Lo spessore ottimale per una buona osservazione dei campioni era di 10 µm. La temperatura adottata era variabile da -24°C a -15°C a seconda dello stadio di maturazione della drupa, solitamente si sono utilizzate temperature più basse per tessuti più giovani. Le sezioni sono state deposte su piccole gocce d'acqua distillata già preparate sul vetrino portaoggetti e le sezioni sono state lasciate asciugare all'aria. Si sono utilizzati vetrini del tipo SuperFrost®Plus (Menzel-Glaser) per sezioni criostatate che permettono un'adesione perfetta alla superficie del vetrino.

## 2.5 – COLORAZIONI ISTOCHIMICHE DEI CAMPIONI

Per ciascuna colorazione è stata riportata una breve descrizione del tipo di soluzione, il protocollo adottato nonché i composti chimici che possono essere messi in evidenza in questo tipo di studio (Pearse, 1960; Clark, 1997).

### 2.5.1 – Colorazioni per le sezioni in resina

1. **TBO (Toluidin blue O)**. È stata utilizzata una soluzione di blu di toluidina allo 0,05% in tampone acetato a pH 4,4; questa soluzione permette di evidenziare le capacità metacromatiche del blu di toluidina. Il protocollo di utilizzo prevede:
  - immersione dei vetrini con campioni per 30 sec nel colorante
  - breve risciacquo con acqua distillata
  - risciacquo con abbondante acqua corrente
  - asciugatura del vetrino con aria calda
  - montaggio del vetrino con mounting media sintetico a presa rapida
  - in caso di tessuti più maturi, dalla 14<sup>o</sup> settimana in poi si può tenere il vetrino nel colorante fino ad un massimo di 1 min e 30 sec
  - colora in blu le pareti ed evidenzia i nuclei; in rosa-violetto qualche residuo citoplasmatico di probabile composizione polisaccaridica; in verde i composti fenolici
2. **PAS (Periodic Acid Schiff)**. Colorazione è stata utilizzata per evidenziare amido, cellulosa, polisaccaridi insolubili e mucopolisaccaridi. Il protocollo di utilizzo prevede:
  - immersione dei vetrini con campioni per 5 min in acido periodico allo 0,5 %
  - risciacquo con acqua corrente
  - immersione per 30 sec nel reattivo di Schiff (che può essere utilizzato più volte se conservato in frigorifero)
  - risciacquo con acqua corrente
  - immersione 1 o 2 min in solforata (5 ml HCl 1 N + 6 ml NaHSO<sub>3</sub> al 10% + 89 ml H<sub>2</sub>O dist)
  - risciacquo con acqua distillata
  - asciugatura del vetrino con aria calda
  - montaggio in mounting media sintetico a presa rapida

- in caso di tessuti più maturi, dalla 14<sup>a</sup> settimana in poi si può tenere il vetrino nel colorante fino ad un massimo di 1 min
  - colora in rosa qualsiasi componente polisaccaridico e i granuli di amido; a volte si possono notare i composti fenolici in giallo-marroncino; le pareti cellulari si colorano in rosa più accentuato.
3. **DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)**. Colorante fluorescente che si lega al DNA, eccitato dagli UV, emette luce blu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Il protocollo di utilizzo prevede:
- immersione del vetrino con campioni nel colorante allo 0,001%
  - montaggio in acqua
  - la colorazione permane solo qualche ora, quindi osservazione e fotografie sono state effettuate subito dopo il trattamento
  - utilizzo di filtri di tipo A (UV= 340-380 nm) e H2 (blue= 390-490 nm)
  - si evidenziano soprattutto i nuclei che possono presentarsi in diverse fasi di attività; si colora a volte anche il resto del tessuto e ciò può creare un disturbo durante l'acquisizione delle fotografie.

### 2.5.2 – Colorazioni per le criosezioni

1. **NILE BLUE A**. il colorante commerciale contiene tre composti: il sale osazinico (solfato) del blu Nilo, la base del colorante osazinico (il blu Nilo) di colore rosso, insolubile in acqua ma solubile nei lipidi e il rosso Nilo anch'esso liposolubile. I lipidi neutri si colorano in rosso/rosa e quelli acidi in blu. Il protocollo di utilizzo prevede:
- utilizzo di una soluzione all'1% di Nile Blue in acqua distillata (Pearse, 1984)
  - controprova: utilizzando un po' di xilolo con una goccia di soluzione appena preparata è stato possibile osservare la presenza della componente rossa nella soluzione. Ciò assicura una buona preparazione del colorante.
  - copertura delle sezioni con la soluzione 1% di Nile Blue per 30 sec a 37°C
  - risciacquo con acqua calda (37°C)
  - due risciacqui di 30 sec con acido acetico 1% (37°C)



- montaggio del vetrino in glycerin jelly (7 g gelatina + 50 ml di acqua calda + 10 ml di glicerolo) o meglio con un mounting media acquoso
  - è possibile distinguere una porzione cerosa che si colora in rosa o rosso pallido e una porzione lipidica che si colora in varie tonalità di blu (più leggero sulla parete cellulare e più intenso per alcune componenti citoplasmatiche).
2. **UV – SCHIFF.** Colorazione specifica per i lipidi insaturi da osservare in fluorescenza. Il protocollo di utilizzo prevede:
- posizionamento del vetrino con le sezioni sotto la lampada UV a circa 4 cm di distanza, usando la short ‘wavelength’ a 254 nm per almeno 10 min (dipende dalla stadio di sviluppo); per sezioni più datate, prima reidrattare con acqua
  - copertura del vetrino con la soluzione di Schiff per circa 10-15 min (controllare l’intensità del colore)
  - 3 lavaggi di 2 min con la soluzione di tiosolfato
  - lavaggio con acqua distillata
  - disidratazione con alcool etilico, aspettare che il vetrino sia asciutto
  - montaggio in mounting media per criosezioni
  - i lipidi insaturi si colorano in ‘violetto chiaro’ se osservati in luce trasmessa. Agli UV risulteranno di colore rosso, con le proteine evidenziate in giallo. Per l’osservazione al microscopio utilizzare il filtro H3 (Blue) che evidenzia oli insaturi e proteine (la parte fluorescente è data dalla fluoresceina presente).
3. **OIL RED O.** Colorazione specifica per i lipidi neutri. Il protocollo di utilizzo prevede:
- soluzione di base: soluzione satura in alcool isopropilico 99% ( $\text{CH}_3\text{-CHOHCH}_3$ ) con durata annuale a T ambiente; soluzione d’impiego: 6 ml di sol satura + 4 ml di acqua distillata, attendere 15 min e poi filtrare (durata 24 h)
  - applicazione della soluzione d’impiego sulle sezioni per circa 10 min
  - lavaggio in acqua distillata (verificando allo stereo) finché il colorante in eccesso è stato tolto
  - montaggio in acqua

- si evidenziano in color ‘rosso-arancio’ i lipidi neutri.
4. **BLACK SUDAN B.** Colorazione liposolubile, detta lisocromo, insolubile in acqua, parzialmente in etanolo, ha affinità per i trigliceridi e lipidi neutri. Il protocollo di utilizzo prevede:
- Preparazione della soluzione con 0,7 g in 100 ml di propylene glycol (in alternativa può essere usato anche l’ethylene glicol) ad una temperatura di 100-110°C (non superare i 110°C!!); filtrare quindi la soluzione ancora calda con carta da filtro Whatman n.2 e lasciar raffreddare; filtrare nuovamente con vuoto attraverso un filtro di fibre di vetro a media porosità
  - disidratazione delle sezioni per 3-5 min in propylene glicol puro
  - colorazione con la soluzione di Sudan Black B per 5-7 min
  - differenziamento per 2-3 min in una soluzione di propylene glicol 85%
  - lavaggio per 3-5 min in acqua distillata
  - montaggio in glycerin jelly o mounting media acquoso
  - è possibile usare anche una contro colorazione per i nuclei (es. Fast Red)
  - trigliceridi e lipidi neutri si colorano in blu-nero, ma anche i flavonoidi e i terpenoidi. Il citoplasma delle cellule resta incolore.
5. **METHYL GREEN + PYRONIN Y.** Colorazione combinata per evidenziare l’acido ribonucleico. Il protocollo di utilizzo prevede:
- Preparazione della soluzione: a 100 ml di acqua distillata calda aggiungere 0,5 g di Methyl green. Una volta raffreddata, estrarre la soluzione in un imbuto separatore con successive aliquote di cloroformio (20-30 ml), finchè il rimanente non sia incolore o leggermente tinto di verde (si estrae così la componente del Methyl violet considerata come contaminante). Lasciare la soluzione senza tappo overnight affinché evapori il cloroformio rimanente. Il giorno dopo, aggiungere 0,05 g di Pyronin Y (specificata per l’RNA). Conservare in bottiglia scura.
  - fissazione dei campioni con il fissativo di Carnoy (alcool assoluto, cloroformio, acido acetico glaciale in proporzione 6:3:1) ma va bene anche la formalina
  - colorazione con la soluzione MGP per un minuto

- risciacquo in acqua distillata e asciugatura con carta da filtro liscia
- differenziamento per almeno 2 min in alcool butilico terziario/alcool assoluto (3:1) (passaggio non sempre necessario)
- montaggio del vetrino con resina sintetica
- si evidenziano soprattutto i nucleoli (in rosa/rosso dovuto alla Pyronin Y) e quindi l'RNA, oltre che la cromatina (in blu-verde dovuto al Methyl green) e alcuni granuli citoplasmatici (in rosa scuro o violetto).

6. **GILL'S EMATOXYLIN II.** Il protocollo di utilizzo prevede:

- Colorazione delle criosezioni per 1 min, per quelle in resina 30 sec
- Lavaggio in abbondante acqua corrente (la resina purtroppo resta colorata)
- Colorazione in eosina in soluzione acquosa all'1% per 1 min o 30 sec
- Lavaggio in abbondante acqua corrente
- Montaggio in mounting media d'uso (per criosezioni o sintetico a seconda del tipo di sezione)
- si evidenziano i nuclei in viola e il citoplasma in rosa-rosso; l'eosina Y in particolare colora in rosso-arancione le proteine del citoplasma e quindi anche i corpi proteici presenti in abbondanza nelle cellule dell'endosperma.



**Fig. 15.** Esempio di campioni colorati in PAS e TBO; in tutto sono stati catalogati e archiviati circa 800 vetrini.

## 2.6 – UTILIZZO DI SOFTWARE DI GRAFICA

In seguito all'osservazione dei preparati, sono stati utilizzati alcuni software di grafica per l'acquisizione e la rielaborazione delle immagini al microscopio, in particolare: Corel Paint Shop Pro vers. XI, Microimaging NT (Leica, 2008), Inkscape e Adobe photoshop CS2.

## 2.7 – GENOTIPIZZAZIONE DEL CV. MUNDO NOVO

Il materiale era costituito da una decina di semi di *Mundo Novo* appartenenti all'ultimo stadio di sviluppo della drupa, per assicurarsi di avere embrioni completamente sviluppati e quindi più facilmente estraibili. Il DNA è stato quindi isolato proprio da embrioni singoli prelevati dai chicchi, seguendo il protocollo ivi descritto:

- reidratazione dei semi in acqua overnight;
- estrazione dell'embrione dal resto del seme per mezzo di una lametta metallica, posizionato poi sul fondo di un tubo Eppendorf da 1,5 ml;
- aggiunta di 100 µl CXG Buffer e 5 µl CXG Enzyme mix (Promega) ad ogni campione;
- incubazione a 50°C mescolando in modo continuo; la digestione è stata protratta per 2-3 ore;
- aggiunta di 200 µl Red Blood Lysis Solution (Talent) e incubazione di 30 min a 68°C;
- se necessario estrazione con un volume di soluzione cloroformio:alcol isoamilico (24:1);
- purificazione del DNA con il kit Cleanmix (Talent) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Si tratta di un metodo basato sul legame selettivo del DNA ad una matrice ad alta capacità in presenza di un agente caotropico (guanidinio tiocianato);
- quantizzazione del DNA estratto utilizzando un fluorimetro (Qubit, Invitrogen).

Il DNA così ottenuto è stato successivamente utilizzato per caratterizzare a livello genetico il materiale in oggetto, dal momento che l'équipe che lavora presso il Laboratorio di Genetica dell'Università di Trieste ha sviluppato un metodo per effettuare questo tipo di analisi. Lo scopo è stato quello di stabilire le relazioni tra il cv. *Mundo Novo*, che è stato messo a disposizione per effettuare questo studio, rispetto alla collezione di materiale noto già presente, selezionato in base alle diverse provenienze e pedigree. Non è stato possibile

riportare in questa sede la metodologia seguita nel dettaglio, in quanto al momento essa fa parte di una domanda di brevetto depositata (“Metodo per la discriminazione tra varietà di *Coffea arabica* basato su polimorfismi del DNA nucleare”, num. PD2008A000336 del 18/11/2008). In ogni caso, il procedimento si è basato sull’utilizzo di microsatelliti. I metodi di caratterizzazione ed identificazione basati su tecniche molecolari sono infatti risultati recentemente molto più efficaci ed attendibili rispetto a quelli basati su caratteristiche fenotipiche, spesso pesantemente influenzate dall’ambiente.

I microsatelliti o “simple sequence repeats” (SSR) sono ritenuti i marcatori molecolari più adatti nell’analisi di organismi viventi, perché dotati di caratteristiche peculiari, quali l’abbondanza nei genomi eucariotici, l’alto livello di polimorfismo, l’ereditarietà di tipo mendeliano, la co-dominanza, la locus-specificità, il rilevamento basato su una metodologia ormai consolidata come la PCR e l’elevata riproducibilità dei risultati. Con il termine “microsatelliti” sono indicate corte sequenze di mono-, bi-, tri- tetra-, penta- o esa-nucleotidi, costituenti il monomero, ripetute almeno una volta all’interno di una certa sequenza nucleotidica e fiancheggiate da sequenze uniche non ripetute. Questi sono rappresentati dalla formula generale  $(N_1N_2\dots N_i)_n$ , in cui N rappresenta i nucleotidi A, T, C o G,  $i$  il numero dei nucleotidi ripetuti ed  $n$  il numero di volte in cui il monomero della SSR è ripetuto (per esempio  $(G_2A)_5$ , rappresenta un monomero consistente in un tri-nucleotide ripetuto 5 volte in una data sequenza).

Il DNA ottenuto dall’estrazione iniziale è stato quindi amplificato mediante Polymerase Chain Reaction (PCR). Per l’amplificazione è stato applicato il metodo descritto da Schuelke M. (2000) che prevede l’utilizzo di tre primers, due locus-specifici e un terzo primer universale complementare ad una sequenza costante (detta KS (5’-TCGAGGTCGACGGTATC-3’)). Quest’ultima è stata aggiunta all’estremità 5’ di ogni primer *forward*. L’amplificazione dei loci contenenti i microsatelliti è stata condotta con il metodo della touchdown PCR, che è finalizzata ad aumentare la specificità di una reazione (per le metodiche specifiche si riporta a Tornincasa P., 2008).

I prodotti di amplificazione sono stati perciò separati in base al peso molecolare mediante elettroforesi, utilizzando il sequenziatore ABI 3130 (Applied Biosystems) e le diverse varianti alleliche sono state identificate mediante il software Peak Scanner v. 1.0 (Applied Biosystems, 2006).

Analizzando contemporaneamente gli alleli propri di ogni pianta e quindi anche del *Mundo Novo*, è stato possibile generare una matrice di distanze genetiche basate sulla similarità

complessiva, formando così un albero fenetico o fenogramma, che descrive proprio le relazioni fra specie sulla base delle diversità o somiglianze morfologiche, molecolari e anatomiche, senza però considerare gli aspetti evolutivi e filogenetici. In questo caso specifico, le differenze trovate nell'albero si sono basate su diversi alleli presenti nelle diverse specie. E' interessante notare che, grazie a questa analisi di tipo statistico, le piante sono state raggruppate in cluster corrispondenti proprio alle loro origini geografiche e genealogiche. La matrice delle distanze genetiche costruita sulla base degli alleli polimorfici è stata calcolata secondo le regole descritte da Bruvo R. *et al.* (2004). Essa viene così utilizzata come file di input compatibile con il software NEIGHBOR di PHYLIP (Felsenstein J., 1989), che permette di ottenere un albero fenetico basato sull'algoritmo Neighbor-joining, visualizzato con il programma MEGA 3.1 (Kumar S. *et al.*, 2004) o DRAWGRAM di PHYLIP.

## 2.8 – DATI CLIMATICI

Per comprendere al meglio lo sviluppo fenologico del cv. *Mundo Novo*, è stato importante tenere conto delle variazioni climatiche durante tutte le fasi di crescita delle drupe: è noto infatti che, come detto in precedenza, il tempo necessario per la completa maturazione è influenzato in parte anche dalle condizioni climatiche (Kumar, 1979). Ciò è stato possibile grazie all'acquisizione dei dati meteorologici da parte del Centro Integrado de Informações agrometeorológicas (CIIAGRO; <http://www.ciiagro.sp.gov.br/>), presente all'interno della struttura dell'Instituto Agronomico di Campinas (IAC, Brasile), che fornisce informazioni e consulenze per le attività agricole sulla base di parametri agrometeorologici e delle previsioni del tempo. Quotidianamente vengono inseriti dati meteorologici attraverso il web, in un database composto da 126 posizioni o punti di raccolta. I dati inseriti sono perlopiù precipitazioni (mm), temperature (°C) minime e massime dell'aria, parametri ecologici indispensabili per questo studio. Due volte a settimana, sulla base del file ottenuto con i dati di questi parametri, sono prodotti dei bollettini che tengono conto del tipo di suolo e della coltura presenti nel punto di raccolta. I dati meteorologici sono ottenuti da stazioni sia automatizzate che meccaniche, appartenenti al Ministero delle Politiche Agricole e di Approvvigionamento coordinato e gestito da IAC di vari partner, enti, pubblici o privati statali e federali. Il CIIAGRO incorpora informazioni provenienti da stazioni meteorologiche meccaniche, nonché da una rete di stazioni automatizzata.

### **3 – COFFEA ARABICA E IL CULTIVAR MUNDO NOVO**

#### **3.1 – LA PROVENIENZA E LE CARATTERISTICHE PRINCIPALI**

Circa il 70% del caffè prodotto e commercializzato a livello mondiale è arabica. Le specie native provengono da regioni ristrette, localizzata nel sud-est dell’Etiopia e nel Kenya, tra i 1000 e i 3000 m di altitudine. Considerata allotetraploide di tipo segmentale ( $2n = 4x = 44$  cromosomi), autocompatibile, si moltiplica essenzialmente per autofecondazione. I cultivar di arabica sono molto affini fra loro e per la maggior parte derivano dalle varietà Typica, originariamente introdotta in Brasile nel 1727 e Bourbon Vermelho, che deriva dall’isola che porta lo stesso nome. Anche se le basi genetiche sono molto affini, i cultivar commerciali rappresentano una grande variabilità fenotipica che dipende da una serie di mutazioni e incroci naturali o realizzati in parte anche artificialmente (Tosoni da Eira Aguiar *et al.*, 2004).

Il Mundo Novo è conosciuto come il risultato di un incrocio naturale tra i cv. Sumatra (Typica-type) e Bourbon Red (Bourbon-type), ottenuto a Mineiros do Tietê, nello stato di S. Paulo. I semi furono piantati a Mundo Novo, attualmente città di Urupês (S.P.), dove furono selezionate piante che hanno dato origine al cv. Mundo Novo. In questo luogo, dal 1943 al 1952, sono state selezionate diverse progenie per eliminare varie tipologie di difetti all’interno della popolazione. Alcune selezioni  $S_1$  e  $S_2$  denominate allora Mundo Novo, furono moltiplicate per essere distribuite agli agricoltori (Carvalho *et al.*, 1952; Fazuoli, 1977).

In un esperimento condotto a Campinas, Jeù e Mococa alcuni studiosi verificarono che la progenie migliore del Mundo Novo produce l’80% in più rispetto al materiale non selezionato, il 50% in più della migliore selezione di Bourbon Amarelo, il 95% in più della migliore selezione di Bourbon Vermelho e ben il 240% in più di Typica.

La discendenza di questo cultivar possiede un’elevata produttività ed è considerata molto vigorosa; la maturazione dei frutti è considerata media, mentre la bevanda viene descritta dagli intenditori ‘di qualità eccellente’. La pianta ha un sistema radicale piuttosto sviluppato, tollerante ai suoli acidi, con i germogli nuovi di color verde o bronzeo e ramificazioni secondarie abbondanti (ramificazione plagiotropica orizzontale).

Piante adulte, da 12 a 14 anni, possono raggiungere un’altezza media di 3 metri (da 2,60 a 3,70 m) e un diametro della base di 2 m (da 1,4 a 2,7 m). L’altezza della pianta del caffè è determinata per la maggior parte da un singolo gene principale denominato ‘caturra’, studiato appositamente per ridurre i costi di produzione delle coltivazioni. Piante con genotipo *ct ct* hanno un maggiore accrescimento rispetto alle *Ct Ct* o *Ct ct*; i cultivar del gruppo Mundo

Novo (*ct ct*) sono stati così classificati ad alto accrescimento (Tosoni da Eira Aguiar *et al.*, 2004). La fioritura principale si può ottenere da settembre a ottobre e la maturazione dei frutti avviene da aprile a luglio, tenendo conto delle condizioni climatiche della regione di S. Paulo. Il numero medio dei giorni che passano tra la fecondazione dei fiori fino alla maturazione dei frutti nelle coltivazioni a Campinas (S.P.) è di 224. I frutti relativi ai diversi cultivar di arabica hanno una forma oblunga e non presentano sepali sviluppati, che invece si trovano nella varietà botanica denominata ‘goiaba’ (Krug & Carvalho, 1946). Il peso medio del frutto maturo è di 1,2 g, mentre il peso medio di mille semi di tipo fresco è di 127,8 g (da 116 a 149 g) e la sua densità assoluta è di 1,057 (da 1,050 a 1,065). La densità dei chicchi è una caratteristica che riveste grande importanza per i cultivar commerciali, un tempo rappresentava la relazione inversa del numero di semi per unità di massa, mantenendo una stretta correlazione con la dimensione dei semi (Tosoni da Eira Aguiar *et al.*, 2004).

Il valore medio del setaccio, indicatore della grandezza del seme, è di 17,2 (da 16,1 a 18,1).

Una delle caratteristiche negative di questo cultivar è l’elevata suscettibilità all’*Hemileia vastatrix*, fungo dell’ordine degli *Uredinales*, responsabile della cosiddetta ‘ruggine del caffè’, in grado di devastarne intere piantagioni.

È stato verificato che il Mundo Novo mostra un’ampia capacità di adattamento, circa il 45% delle coltivazioni brasiliane e il 35% delle coltivazioni mondiali è proprio Mundo Novo.

### **3.2 – GLI STADI FENOLOGICI**

Il ciclo fenologico o di sviluppo vegetativo del caffè è stato suddiviso in sei fasi distinte: 1. formazione delle gemme fogliari; 2. induzione e maturazione delle gemme fiorali; 3. fioritura; 4. formazione dei frutti; 5. maturazione dei frutti; 6. riposo e senescenza dei rami terziari e quaternari (Camargo & Camargo, 2001). Alcuni lavori effettuati a Campinas in Brasile e Chinchiná in Colombia hanno stabilito che il frutto del caffè si matura alla 32<sup>a</sup> settimana dopo la fioritura; è noto però che il tempo necessario per la completa maturazione è influenzato sia dalle condizioni climatiche (Kumar, 1979) che dalla costituzione genetica (Sondhal & Sharp, 1979). In ogni caso, gli stadi fenologici descritti fino ad ora sono dodici (Pezzopane *et al.*, 2003):

- 0 – nei rami plagiotropici serve un aumento sostanziale di potenziale idrico, provocato da pioggia o irrigazione (gema dormente)
- 1 – gemme cresciute (gema entumescida)

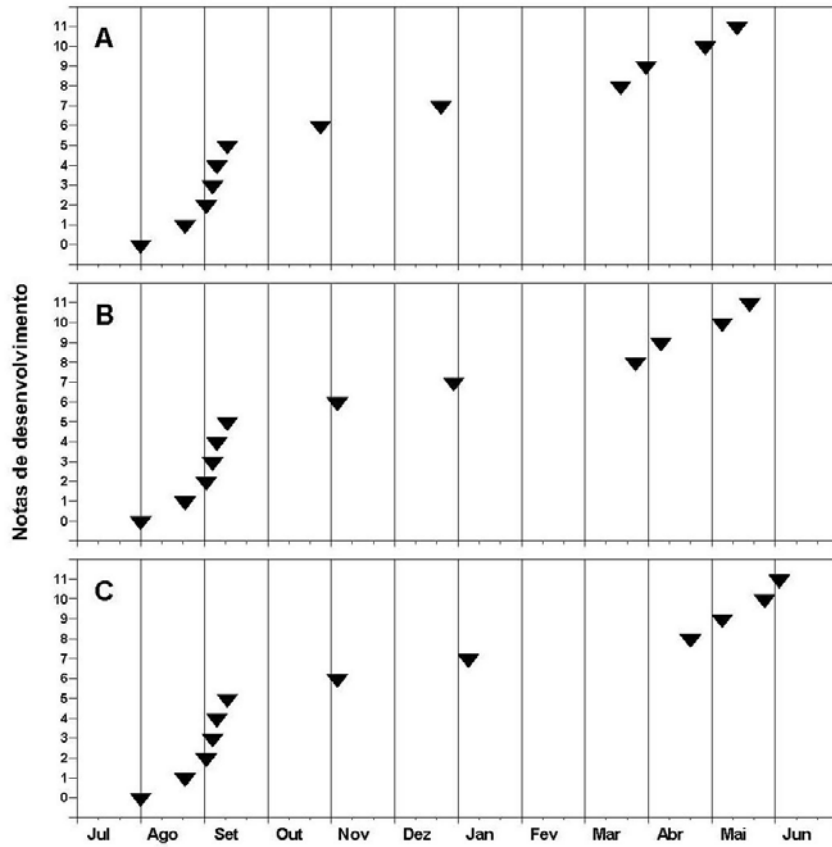


- 2 – i boccioli fiorali crescono con grande mobilitazione di acqua e nutrienti (abotoado - bocciolo florale)
- 3 – apertura dei fiori (florada)
- 4 – caduta dei petali (pós-florada)
- 5 – prima formazione dei frutti dopo la fecondazione (chumbinho)
- 6 – crescita del frutto (expansão dos frutos)
- 7 – formazione dell'endosperma, frutto verde (grão verde)
- 8 – inizio della maturazione (verde cana)
- 9 – frutto cambia colore da verde a rosso (cereja)
- 10 – frutto che inizia a seccarsi (passa)
- 11 – frutto secco (seco)

Nella fig. 16 è possibile associare questi stadi fenologici al periodo in cui sono stati osservati nel corso dell'anno 2001-2002 all' Instituto Agronômico di Campinas.

Camargo nel 1985 stabilì che l'arrivo delle piogge in agosto favorisce in Brasile la fine della dormienza delle gemme. Dalla fase di chumbinho (n.5) i cultivar presentano delle differenze nelle fasi successive di sviluppo, il 'Mundo Novo' è solitamente più precoce. Inoltre, secondo Camargo & Camargo (2001) quando si presenta un problema di deficienza idrica accentuata durante il periodo di riposo delle gemme, la fioritura principale è molto ben definita, anche se può essere seguita da fioriture successive secondarie.

Le caratteristiche di questo cultivar e il suo tipico ciclo fenologico, oltre che la sua massiccia presenza nello stato del Brasile, sono stati ottimi motivi per sceglierlo come oggetto di questo studio morfologico.



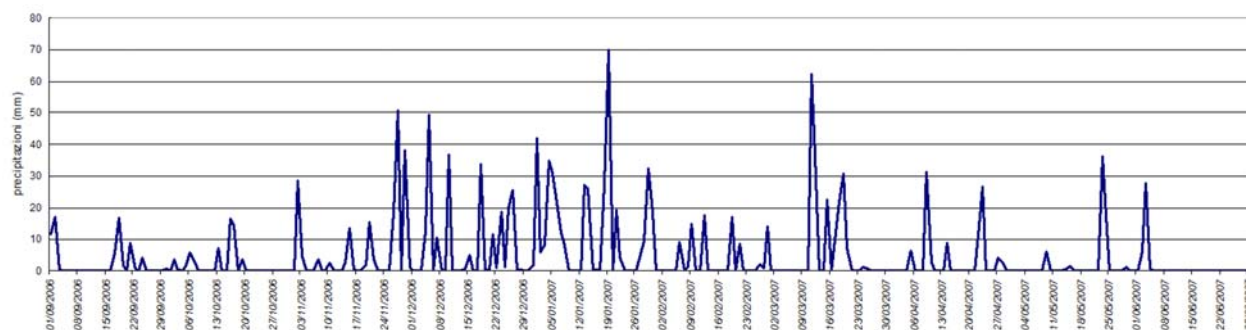
**Fig. 16.** Sviluppo fenologico dei cv. 'Mundo Novo' IAC 388-17 (A), 'Catuai Vermelho' IAC 144 (B) e IAC 'Obatã' (C) nell'anno 2001-2002 a Campinas (SP, Brasile); sull'asse delle ordinate sono stati messi i numeri che corrispondono agli stadi fenologici descritti nel par. 3.2 (Pezzopane *et al.*, 2003).

## 4 – RISULTATI

### 4.1 – DATI CLIMATICI

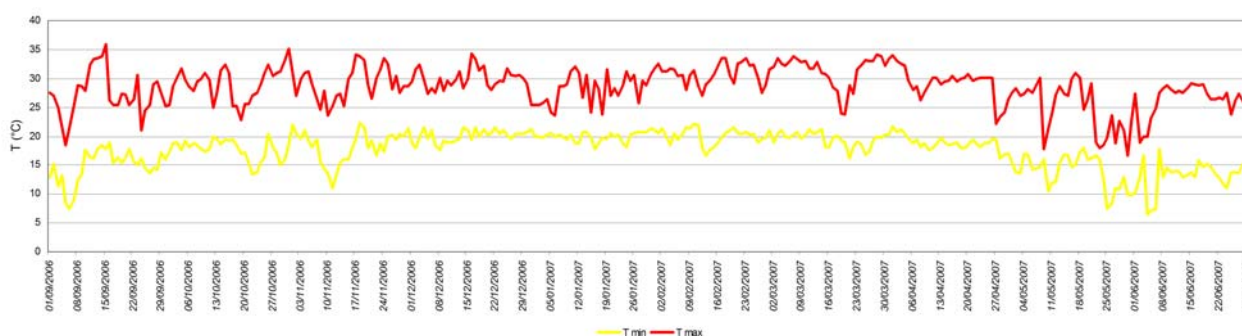
È noto che la fioritura è fortemente influenzata dalla distribuzione delle precipitazioni: nelle regioni equatoriali in cui sono uniformi e non esiste una netta distinzione fra stagione secca e stagione delle piogge, la fioritura è continua e la raccolta del caffè si effettua sostanzialmente durante l'intero corso dell'anno. La maturazione però non avviene in modo regolare ed è rappresentata da una curva con due massimi e due minimi, con valori disuguali. Allontanandosi dall'equatore la fioritura e la raccolta tendono a scaglionarsi in periodi sempre più brevi e definiti. La maturazione di arabica coltivato nelle regioni tropicali, comincia generalmente poco tempo dopo l'inizio della stagione secca e il periodo di raccolta dura due o tre mesi. Il caffè inoltre, sopporta male la stagione secca molto lunga; essa non dovrebbe infatti superare i quattro mesi. Tutte le specie di *Coffea* di fatto sono arbusti sempreverdi a traspirazione continua ed essendo originariamente delle piante da sottobosco non sono dotate di un meccanismo per limitare le perdite d'acqua, che devono essere perciò compensate da quelle assorbite dal terreno con le precipitazioni (Pallotti P., 2000).

In questo studio la nostra coltivazione di riferimento ha subito una stagione estiva molto secca e di conseguenza le piante ne hanno sofferto molto; ciò si è tradotto in una fioritura principale scarsa, occorsa il 10 settembre 2006, nonostante le prime piogge siano state abbondanti. Il periodo invernale invece, è stato caratterizzato da un clima abbastanza piovoso, raggiungendo il valore massimo di precipitazioni (70 mm) a gennaio (fig. 17), che ha favorito una crescita ottimale delle drupe, rientrando nei valori della scala fenologica descritta da Pezzopane *et al.* (2003).



**Fig. 17.** Precipitazioni (mm) registrate a Campinas nel periodo da settembre 2006 a giugno 2007.

Per quanto riguarda la temperatura, è noto che il caffè è particolarmente sensibile al freddo e lunghi periodi a 15°C possono debilitare la pianta, mentre le brinate e le temperature intorno ai 5°C danneggiano i fiori, le gemme e le foglie, compromettendo anche la produzione dell'anno successivo. Invece, a temperature troppo elevate la fotosintesi viene bloccata con possibili danni anche significativi alla pianta, quando le alte temperature sono accompagnate da forti escursioni diurne. Si ricorda che arabica trova infatti le condizioni ottimali nella fascia intertropicale a un'altitudine che va dai 600 ai 1800 m con temperature tra i 17 e i 24°C (Pallotti P., 2000). L'andamento delle temperature durante il periodo di sviluppo del Mundo Novo non ha segnalato nessun picco importante, ma i valori hanno seguito normalmente il loro corso stagionale (fig. 18). Nel periodo invernale (settembre e ottobre 2006) subito dopo le prime precipitazioni, si sono verificati alcuni episodi di basse temperature, sotto i 10°C, che potrebbero aver danneggiato in parte la prima fioritura di alcune piante. In ogni caso, ciò non sembra essersi verificato, visto che queste condizioni climatiche non si sono protratte per lungo tempo.



**Fig. 18.** Temperature minime (giallo) e massime (rosso) (°C) registrate a Campinas nel periodo da settembre 2006 a giugno 2007.

#### 4.2 – ANALISI DIMENSIONALE DELLE DRUPE E DEI SEMI

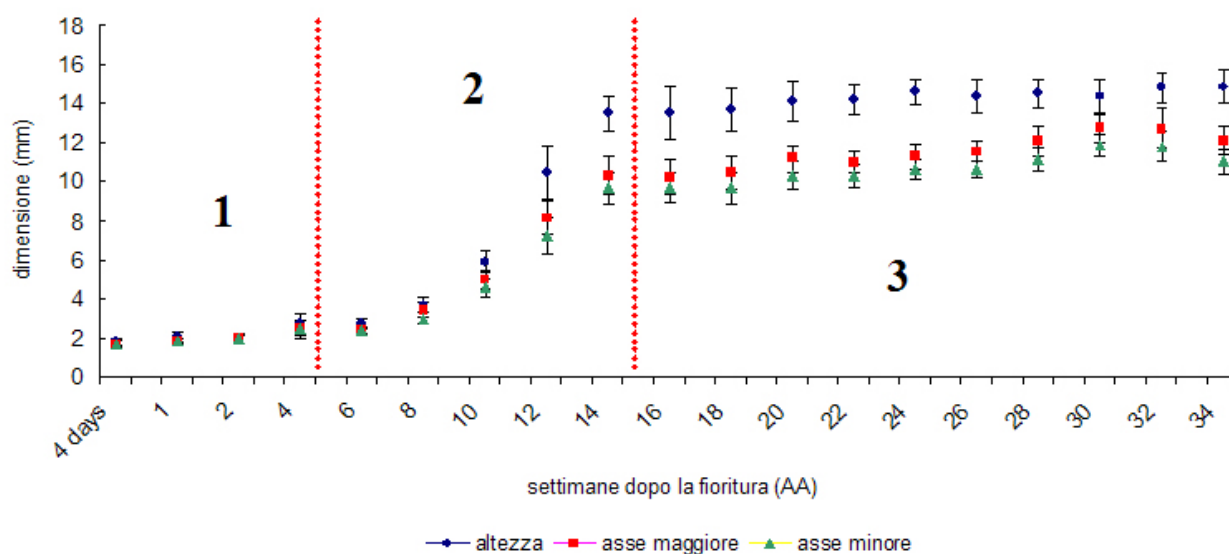
Dall'analisi dimensionale delle drupe sono stati identificati tre periodi di sviluppo principali (fig. 20): il primo periodo detto 'a crescita lenta', fino alla 4<sup>a</sup> settimana dopo la fioritura (AA); il secondo, detto 'di rapido sviluppo', dalla 6<sup>a</sup> alla 14<sup>a</sup> settimana AA e il terzo periodo cosiddetto 'di maturazione', dalla 16<sup>a</sup> settimana in poi.

La crescita delle drupe ha seguito un andamento alquanto regolare: dopo la fioritura infatti, non ci sono stati forti cambiamenti nella loro dimensione, trovandosi ancora nei primi stadi fenologici raggiungendo al massimo la fase di 'chumbihno' (Pezzopane *et al.*, 2003), in pratica un ovario ben sviluppato che ha perso la corolla e che si è leggermente ingrossato,

mantenendo una forma ancora sferoidale:  $2,7 \pm 0,5$  mm in altezza,  $2,5 \pm 0,5$  mm sia per l'asse maggiore che per l'asse minore, misurati alla 4<sup>a</sup> settimana dopo la fioritura (AA).



**Fig. 19.** Esempio di crescita delle drupe dal bocciolo fino al 12° stadio di sviluppo che corrisponde in questo studio alla 20<sup>a</sup> settimana AA.



**Fig. 20.** Analisi dimensionale delle drupe lungo tre misure arbitrarie (altezza, asse maggiore e asse minore); evidenziati tre periodi principali: 1. crescita lenta; 2. rapido sviluppo; 3. maturazione.

Il secondo periodo è stato condizionato dalle variazioni climatiche e in particolare dalla frequenza delle precipitazioni, abbondanti perlopiù nel periodo tra novembre e gennaio (fig. 17), favorendo così la crescita esponenziale delle drupe. Dalla 6<sup>a</sup> settimana infatti inizia a delinearsi quella che sarà la linea di sviluppo principale, ovvero maggiore in altezza che nelle altre due misure dimensionali, per raggiungere la forma ovoidale tipica delle drupe mature.

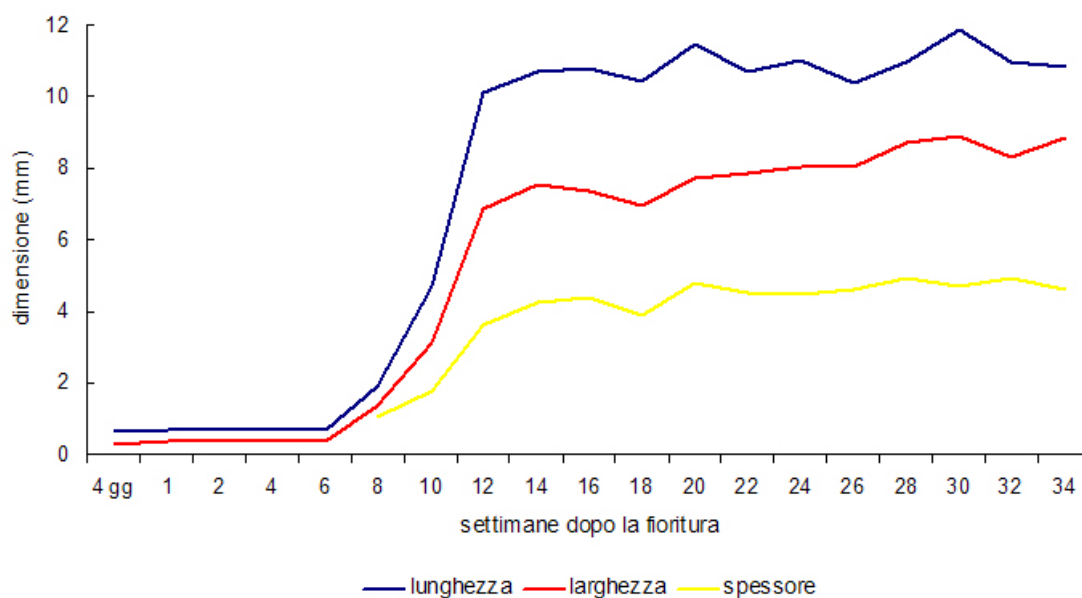
Già alla 10<sup>a</sup> settimana AA il frutto raggiunge la dimensione in altezza pari a  $5,9 \pm 0,5$  mm, l'asse maggiore pari a  $5 \pm 0,5$  mm e l'asse minore pari a  $4,5 \pm 0,4$  mm, praticamente quasi la metà della sua dimensione effettiva a maturazione. Dopo appena due settimane (12<sup>a</sup> settimana AA), la drupa pressappoco raddoppia il suo volume, raggiungendo il valore in altezza di  $10,5 \pm 1,4$  mm,  $8,1 \pm 0,9$  mm per l'asse maggiore e  $7,2 \pm 0,9$  mm per l'asse minore. La 14<sup>a</sup> settimana AA chiude questo periodo di crescita rapida permettendo alla drupa di raggiungere la sua dimensione quasi definitiva, con  $13,5 \pm 0,9$  mm in altezza,  $10,3 \pm 0,9$  mm per l'asse maggiore e  $9,7 \pm 0,8$  mm per l'asse minore.

Inizia quindi il periodo di maturazione in cui le drupe tendono a mantenere la dimensione raggiunta tra la 14<sup>a</sup> e la 16<sup>a</sup> settimana AA, con oscillazioni dovute anche alla casualità nella scelta dei campioni da misurare, ricordando che esistono variazioni notevoli in dimensione anche all'interno dello stesso raggruppamento di frutti, cresciuto nello stesso periodo e sullo stesso ramo. La dimensione finale massima raggiunta allo stadio maturo (34<sup>a</sup> settimana AA) è di  $14,9 \pm 0,9$  mm in altezza,  $12,1 \pm 0,8$  mm per l'asse maggiore e  $11 \pm 0,6$  mm per l'asse minore. Negli ultimi stadi si è notato che il mesocarpo di alcune drupe era già molto molle, indice di una maturazione già avanzata del frutto ed una conseguente difficoltà nella misurazione di questi campioni. Il terzo periodo è quindi caratterizzato da modificazioni non più dimensionali ma più che altro chimico-morfologiche all'interno di ciascun tessuto, che portano le drupe alla maturazione e a volte allo stadio di sovra-maturazione, prima di essere raccolte.

È interessante confrontare il grafico delle drupe (fig. 20) con quello dei semi (fig. 21). Si nota immediatamente che l'andamento della crescita riscontrato è lo stesso in entrambi i casi e quindi anche qui si sono potuti individuare i tre periodi di sviluppo messi in evidenza precedentemente, anche se le misure sono state effettuate su un pool di campioni più basso. La differenza fra le tre misure dimensionali in questo caso è ovviamente più accentuata rispetto a quella delle drupe, vista la tipica forma assunta dai semi fin dai primi stadi di sviluppo.

Nel periodo di rapida espansione si può notare come in poche settimane il seme è in grado di raggiungere la sua dimensione pressoché definitiva: 10,1 mm in lunghezza, 6,9 mm in larghezza e 3,6 mm in spessore (12<sup>a</sup> settimana AA). Proprio in questo periodo la consistenza dei semi risulta particolarmente morbida, difficile da trattare con le resine utilizzate. Il periodo più critico per la manipolazione dei campioni è stato quello compreso tra la 12<sup>a</sup> e la 18<sup>a</sup> settimana. Esso corrisponde ad alcune variazioni nella tipologia tissutale, ovvero il passaggio

dal perisperma all'endosperma come tessuto di riserva, di notevole importanza all'interno del seme. Anche nel periodo di maturazione si notano delle variazioni nella dimensione dei semi, ma di poca importanza. Durante gli ultimi stadi di sviluppo (30<sup>a</sup>-34<sup>a</sup> settimana AA) i chicchi raggiungono il valore massimo di 11,8 mm in lunghezza, 8,9 in larghezza e 4,9 mm in spessore.



**Fig. 21.** Analisi dimensionale dei semi lungo tre misure arbitrarie (lunghezza, larghezza e spessore); si evidenzia lo stesso andamento riscontrato per le drupe (cfr. fig. 20).



**Fig. 22.** Confronto visivo tra i semi e i frutti durante tutto lo sviluppo dalla 10<sup>a</sup> settimana AA a maturazione completata (34<sup>a</sup> settimana AA); la barra corrisponde a 1 cm.

#### 4.3 – GENOTIPIZZAZIONE DEL CV. MUNDO NOVO IAC 501-5

Un'analisi di tipo genetico è stata condotta sul cultivar Mundo Novo IAC 501-5, al fine di stabilire un riferimento certo della varietà ed eventuali relazioni di somiglianza con i campioni già presenti nella banca dati del laboratorio di Genetica dell'Università di Trieste

([www.coffeedna.org](http://www.coffeedna.org)). Quest'ultima è stata ottenuta tramite l'analisi di 137 piante, derivanti in gran parte dalla Serra del Dipartimento di Scienze della Vita e da differenti collezioni di germoplasmi o piantagioni situati nei paesi maggiori produttori di caffè quali America, Africa e India, mediante l'utilizzo dei microsatelliti come marcatori molecolari. Questi ultimi hanno permesso di ottenere un totale di 111 alleli nelle piante considerate, che sono stati utilizzati per calcolare le distanze genetiche tra i diversi campioni, secondo il metodo descritto da Bruvo *et al.* (2004) e confermato attraverso l'uso del programma MICROSATELLITE ANALYSER (MSA) (Dieringer e Schlötterer, 2003).

I rapporti di somiglianza tra le varie popolazioni sono stati analizzati e visualizzati tramite il disegno di un albero fenetico basato sul calcolo delle distanze genetiche tra gli individui. L'albero fenetico radicato (*rooted*) viene visualizzato tramite un grafo diretto, una struttura ad albero che si dipana a partire da un unico nodo, che è in grado di fornire informazioni sulla correlazione genetica esistente tra gli organismi presenti sulle sue ramificazioni, ma non sui rapporti evolutivi che intercorrono tra gli stessi. Il metodo più comune per realizzarlo è confrontare i membri dell'albero con un membro esterno (*outgroup*), che deve essere sufficientemente simile agli elementi interni così da permettere il confronto tra gli alleli, ma deve anche essere allo stesso tempo meno imparentato ad essi di quanto questi stessi non lo siano tra di loro. In questo caso è stata scelta una varietà di *Coffea canephora*, Robusta purpurascens.

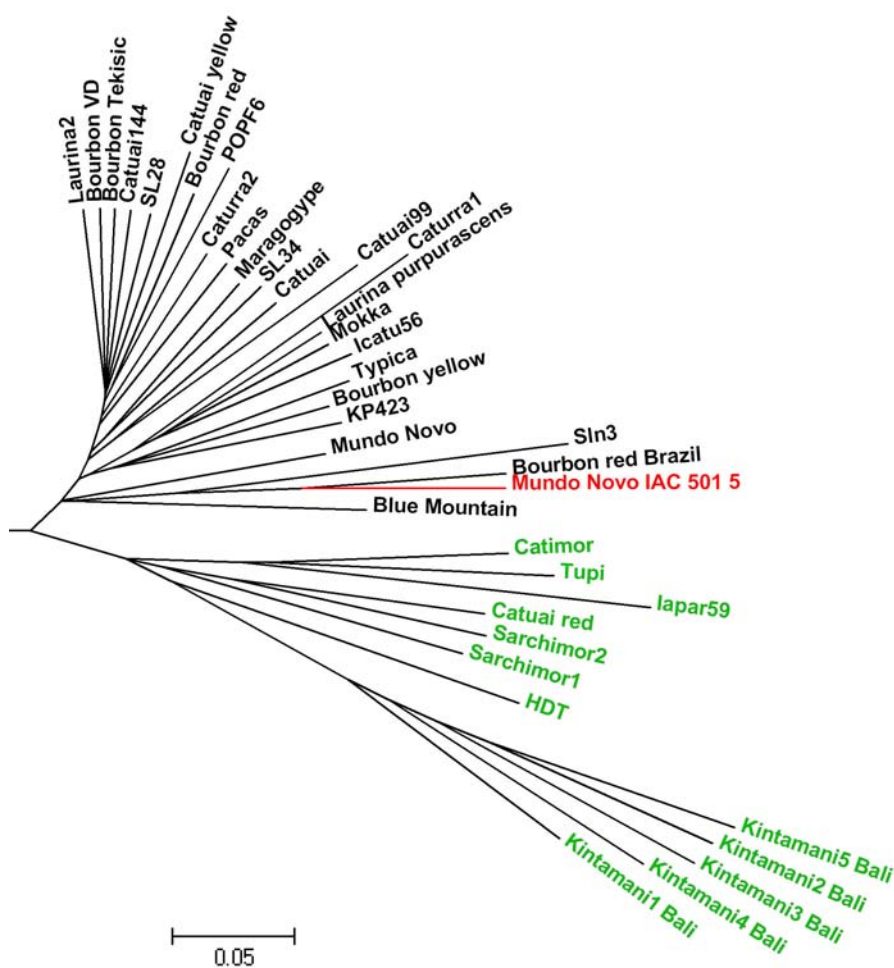
L'albero fenetico risultante da questo studio (ivi non riportato, vedi Tornincasa P., 2008), derivato da un'analisi di tipo statistico, raggruppa in modo sorprendente le varietà analizzate in accordo con la loro origine geografica e il loro pedigree. In questa sede è stata riportata soltanto la porzione dell'albero in cui si è posizionato il cultivar Mundo Novo IAC 501-5 di nostro interesse (fig. 23). Questo ramo rappresenta il raggruppamento di tutte le varietà commerciali, le cui caratteristiche sono descritte in Tab. 1.

Si può notare come il dominio in nero includa la maggior parte delle varietà commerciali di origine americana, assieme alle varietà commerciali africane provenienti da Kenya (SL28 and SL34) e Tanzania (KP423 and POP F6). Infatti, sia SL28 sia SL34 si sono originate dalla varietà Bourbon, mentre KP 423 è una selezione della varietà Kent, sviluppata originariamente in India e selezionata per l'elevata produttività e la resistenza alla ruggine.

La maggior parte delle varietà analizzate derivano dal Bourbon attraverso procedimenti di selezione, incroci o mutazioni. E' quindi possibile che alcuni alleli specifici del Bourbon prevalgano ancora in queste varietà, causandone il comune raggruppamento. Anche il Mundo



Novo IAC 501-5, di derivazione brasiliana, si colloca giustamente in questo cluster, essendo un incrocio naturale fra le varietà Sumatra (Typica-type) e Bourbon red (Bourbon-type). Questo gruppo comprende tutte le varietà il cui prodotto è utilizzato per preparare la bevanda del caffè, incluse quelle più pregiate. I marcatori molecolari utilizzati per la genotipizzazione sono in grado di distinguerle, anche se la ristretta base genetica da cui derivano fa sì che le varietà più strettamente correlate siano geneticamente omogenee.



**Fig. 23.** Porzione di interesse dell'albero fenetico. Mundo Novo IAC 501-5 in rosso; varietà legate all'Ibrido di Timor in verde; varietà commerciali di origine americana in nero.

La maggioranza delle varietà americane che coinvolgono l'Ibrido di Timor (HDT) e le varietà che derivano da esso (Catimor, Sarchimor, IAPAR 59 e Tupi) formano un gruppo a parte (in verde). L'HDT deriva da un incrocio spontaneo tra *C. arabica* e *C. canephora*, e le quattro varietà che ne derivano sono state sviluppate presso il CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) in Portogallo. La differenza tra queste piante è che Catimor deriva da un incrocio Caturra x HDT, mentre Sarchimor, Tupi (F5 cultivar di Sarchimor) e IAPAR

59 (F4 cultivar di Sarchimor) sono state ottenute dall'incrocio Villa Sarchi x HDT. Assieme a quest'ultime, si unisce anche la varietà indonesiana, Kintamani, proveniente dall'isola di Giava, che è invece un incrocio fra Caturra e HDT. L'importanza di questi incroci risiede soprattutto nel fatto che l'HDT conferisce loro la resistenza alla malattia della ruggine (*Hemileia vastatrix*), mentre le varietà di arabica con cui viene incrociato, trasmettono caratteristiche importanti dal punto di vista agronomico (bassa statura, alta produttività, ecc) e della qualità della bevanda.

**Tab. 1.** Genealogia e provenienza delle principali varietà commerciali di *C. arabica* facenti parte della banca dati dell'Università di Trieste; le varietà Bourbon-type, in nero; le varietà legate all'ibrido di Timor (HDT) in verde; la varietà analizzata, in rosso.

Pianta	Genealogia	Provenienza
Typica	Varietà di <i>C. arabica</i>	Costa Rica, CATIE
Bourbon red	Varietà di <i>C. arabica</i>	Guatemala
Bourbon red	Varietà di <i>C. arabica</i>	Brazil, Patrocinio
Bourbon VD	Mutante di Bourbon	Brazil, Patrocinio
Caturra 2	Mutante di Bourbon	Brazil, Patrocinio
Laurina 2	Variante somaclonale di Bourbon	Brazil, Minas Gerais Sao Sebastiao Paraiso
Laurina purpurascens	Somaclone di Laurina	Brazil, Patrocinio
Bourbon Tekisic	Mutante di Bourbon	Guatemala
Caturra 1	Mutante di Bourbon	Costa Rica, CATIE
Mokka (Kona)	Mutante di Bourbon	Hawaii
Maragogype	Mutante di Typica	Brazil, Patrocinio
Blue Mountain	Mutante di Typica	Jamaica
Pacas	Mutante naturale di San Ramon Bourbon	Brazil, Patrocinio
SL 34	Selezione di French Mission	Kenya, Mchana Estate Ruiru
KP 423	Selezione di Kent	Tanzania, Mufindi Estate
SL 28	Selezione di Tanganyika resistente alla siccità	Kenya, Mchana Estate Ruiru
POP F6	Varietà di <i>C. arabica</i>	Tanzania, Mufindi Estate
Mundo Novo	Ibrido naturale Typica x Bourbon	Brazil, Patrocinio
Mundo Novo IAC 501-5	Ibrido naturale Sumatra (Typica type) x Bourbon red (Bourbon type)	Brazil, Campinas
Catuai 99	Mundo Novo x Caturra	Brazil, Patrocinio
Catuai 144	Mundo Novo x Caturra	Brazil, Patrocinio
Catuai	Mundo Novo x Caturra	Brazil
Catuai yellow	Mundo Novo x Caturra	Guatemala
Bourbon Yellow	Varietà (Bourbon x Amarelo de Botucatu)	Brazil, Campinas, IAC
Catuai red	Varietà (Mundo Novo x Caturra)	Costa Rica, CATIE
Kintamani 1-5	Caturra x HDT	Indonesia, Bali
Hibrido de Timor (HDT)	<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>	Costa Rica, CATIE
Catimor	Caturra x HDT	Brazil, Londrina, Paraná
Sarchimor 1	Villa sarchi x HDT	Costa Rica, CATIE
Sarchimor 2	Villa sarchi x HDT	France, Montpellier, IRD
Iapar 59	Varietà F4 di Sarchimor	Brazil, Londrina, Paraná
Tupi	Varietà F5 di Sarchimor	Brazil, Patrocinio
Icatu-56	Somaclone della F4 di Icatu (Bourbon x <i>C. canephora</i> retroincrociato x Mundo Novo)	Brazil, Patrocinio
Sln.3 (S795)	S288 x Kent	India, Karnataka Chikmagalur

#### 4.4 – LE FASI DI SVILUPPO DEL MUNDO NOVO: CARATTERISTICHE MORFO-ANATOMICHE

In questo paragrafo è stato brevemente riassunto ciò che è stato descritto nell'atlante allegato a questa tesi (vedi 'Atlante morfo-anatomico dello sviluppo del seme in *C. arabica* cv. Mundo Novo').

Dalle analisi dimensionali si distinguono tre fasi principali di crescita dei frutti (fig. 20):

1. fase di crescita lenta fino a 4 settimane dopo la fioritura ('after anthesis', AA);
2. fase centrale di sviluppo rapido (da 6 a 14 settimane AA);
3. fase di maturazione (da 16 settimane AA in poi).

La fase 2 è strettamente correlata alle condizioni climatiche del periodo, in particolare all'aumento della frequenza delle piogge (fig. 17).

##### 4.4.1 – Fase di quiescenza

L'ovario osservato in sezione longitudinale presenta la tipica struttura della drupa del caffè con due logge ovariche che ospitano un ovulo anatropo ciascuna. L'ovulo è composto da un funicolo, da un unico tegumento proveniente dal tessuto materno e da una zona di pochi micron occupata dal sacco embrionale non ancora sviluppato. E' presente anche l'otturatore che, in *Coffea*, è di derivazione funicolare, formato da cellule parenchimatiche, ha la funzione di condurre il tubetto pollinico al micropilo dell'ovulo.

Dopo circa un mese (4-6 settimane dopo la fioritura) non si evidenzia ancora una crescita dimensionale del seme degna di nota.

##### 4.4.2 – Fase centrale di sviluppo rapido

Il mesocarpo si accresce fino ad uno spessore di 0,6 mm.

*8 settimane AA*

Il seme ha 2 mm e il sacco embrionale fecondato ha iniziato il suo sviluppo con l'accrescimento dell'endosperma. Nella sezione a massimo ingrandimento (100 x) si possono contare alcuni nuclei dell'endosperma, messi in evidenza nel sacco embrionale (dimensioni: 150 x 100 µm) dalla colorazione in TBO.

*10 settimane AA*

Il seme ha 3 mm. Il sacco embrionale è più grande (0,2 mm) ed è formato da circa una ventina di cellule dell'endosperma.

*12 settimane AA*

Il seme ha 10 mm. L'endosperma continua la sua crescita e pian piano inizia a sostituire il perisperma materno, spingendolo fisicamente verso l'esterno. Si intravede già la formazione di alcune cellule sclerenchimatiche che andranno a formare in seguito la pellicola argentea.

*14 settimane AA*

La pellicola argentea ha ancora alcune cellule vive e nucleate, e il pergamino si sta formando grazie ad alcune modificazioni dell'endocarpo della drupa. Il seme ha quasi raggiunto la sua dimensione definitiva.

**4.4.3. Fase di maturazione**

La crescita dimensionale non è più così degna di nota, mentre si osservano fenomeni di cambiamento chimico e strutturale.

*16 settimane AA*

Caratterizzata dalla quasi completa formazione della pellicola argentea, anche all'interno del solco. Molte cellule dell'endosperma sono in attività mitotica continua.

*18 settimane AA*

Il pergamino è completamente formato dalle caratteristiche fibre fusiformi a pareti spesse.

*20 settimane AA in poi*

Il tessuto dell'endosperma ormai formato ha ancora le cellule a pareti sottili (3  $\mu\text{m}$ ). In questa fase delicata il materiale ha caratteristiche intermedie, né duro né molle; il contenuto vacuolare delle cellule endospermiche si arricchisce di corpi proteici e strutture zuccherine, evidenziate con diverse colorazioni. L'embrione è formato e anche le sue cellule sono ricche di corpi proteici, evidenziati con UV-Schiff e l'osservazione in fluorescenza.

*26 settimane AA*

Il contenuto vacuolare è ancora ricco di proteine e le pareti diventano più spesse (4-6  $\mu\text{m}$ ). Si osserva la formazione di alcune nodosità tipiche delle pareti cellulari dell'endosperma, soprattutto vicino alla cavità embrionale. Lo sviluppo del seme completo viene raggiunto alla 30<sup>a</sup> settimana AA, stadio in cui anche l'embrione sembra aver concluso la propria maturazione. Le pareti cellulari hanno raggiunto il loro spessore definitivo (da 6 a 10  $\mu\text{m}$ ).

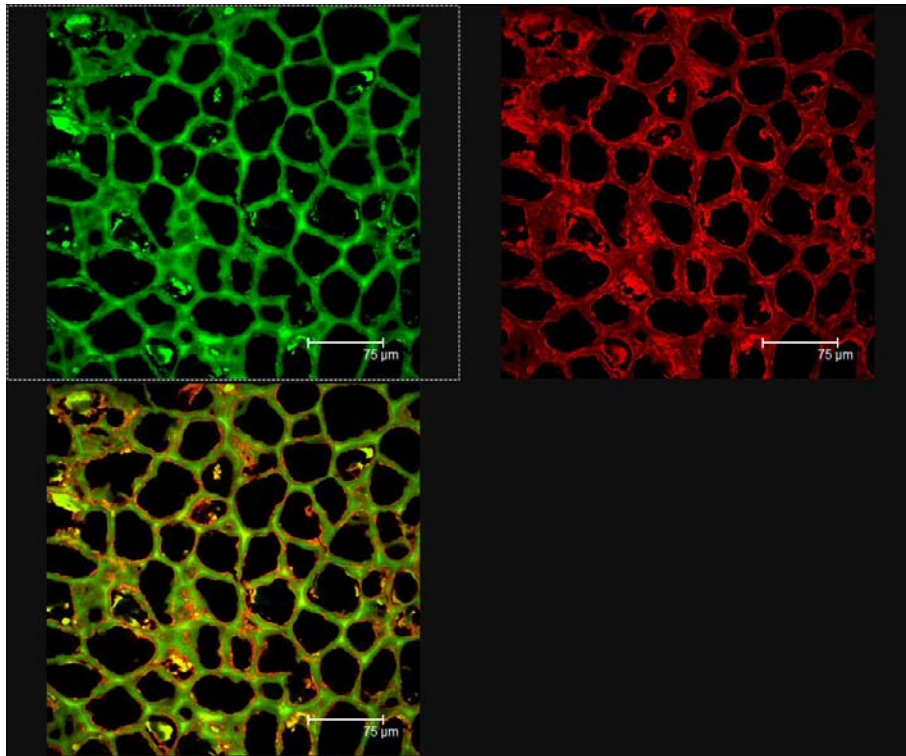
### 34 settimane AA (ultimo stadio)

Le cellule presentano un aspetto leggermente differente, sembrano infatti più svuotate in quanto difficilmente si riescono ad osservare i componenti visti fino ad ora. La maggior parte delle pareti cellulari presentano nodosità. Questo comunque è stato considerato già uno stadio di sovra-maturazione della drupa.

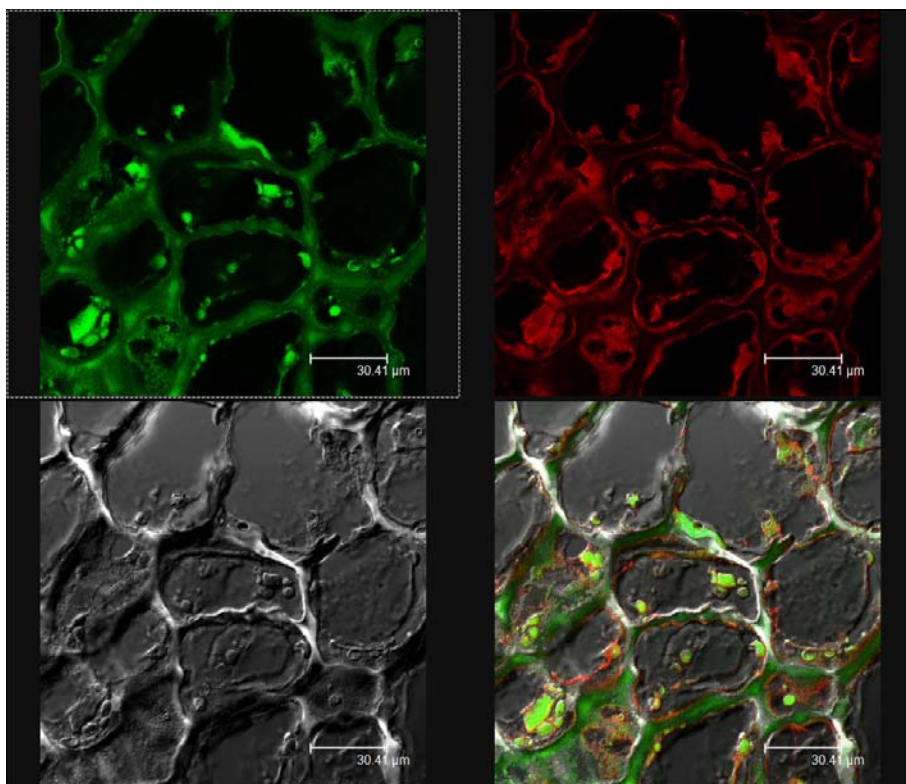
## 4.5 – IMMAGINI AL MICROSCOPIO CONFOCALE

Alcune prove di immagini sono state effettuate anche al microscopio confocale (*microscopio confocale* a fluorescenza, TCS-NT/SP2, *Leica*), per osservare le cellule dell'endosperma da un punto di vista ancora diverso rispetto alle tecniche più standard usate in questo studio. Tale microscopio consente di osservare in successione strati (piani xy, così come xz o yz) del campione oggetto di studio ed effettuare il cosiddetto sezionamento ottico. L'innovazione sta proprio nella possibilità di visualizzare ogni singolo strato eliminando le componenti di luce emessa al di sopra e al di sotto del piano focale in analisi. Muovendosi lungo l'asse ottico è possibile variare il piano focale; dall'unione di tutte le sezioni è poi possibile ricostruire la struttura tridimensionale del campione. Questo permette di ottenere immagine notevolmente più nitide e con un miglior contrasto segnale-rumore. I campioni utilizzati consistevano in sezioni di 10  $\mu\text{m}$  di seme maturo non trattato e sono state scansionate con tre linee laser (488, 543, 633 nm, cioè verde, rosso e blu), il cui risultato si può osservare in fig. 24.

È stata effettuata anche una prova per ottenere immagini tridimensionali il cui risultato si può vedere in fig. 25. Anche in queste foto ciò che è stato messo in evidenza è sicuramente la struttura parietale delle cellule e una parte dei corpi proteici in esse contenuti, che si osservano ancora meglio in fig. 26. In fig. 27 sono state messe in evidenza le pareti cellulari nodose, tipiche dell'endosperma maturo.

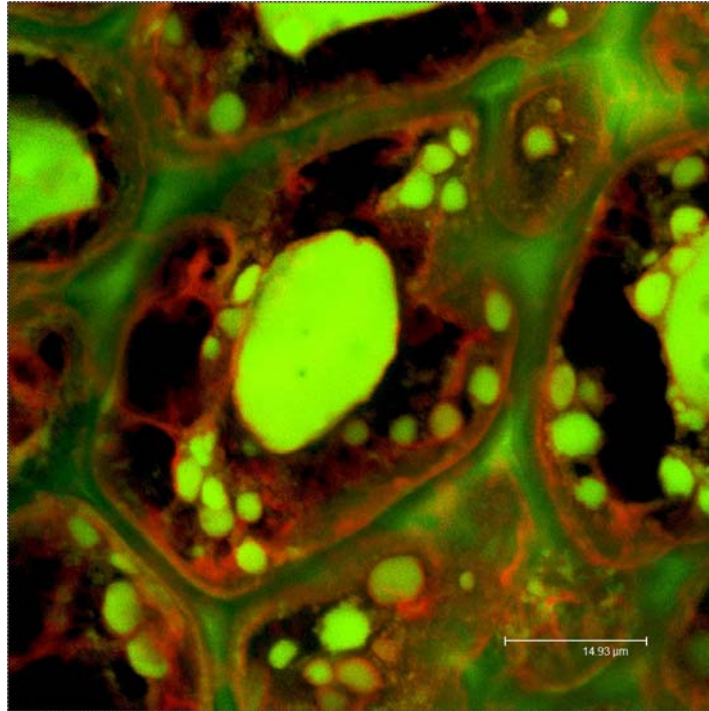


**Fig. 24.** La stessa porzione di immagine ripropone la rete di cellule dell'endosperma del seme osservata con tre diverse linee laser (488, 543, 633 nm) (Biolab, Illycaffè)

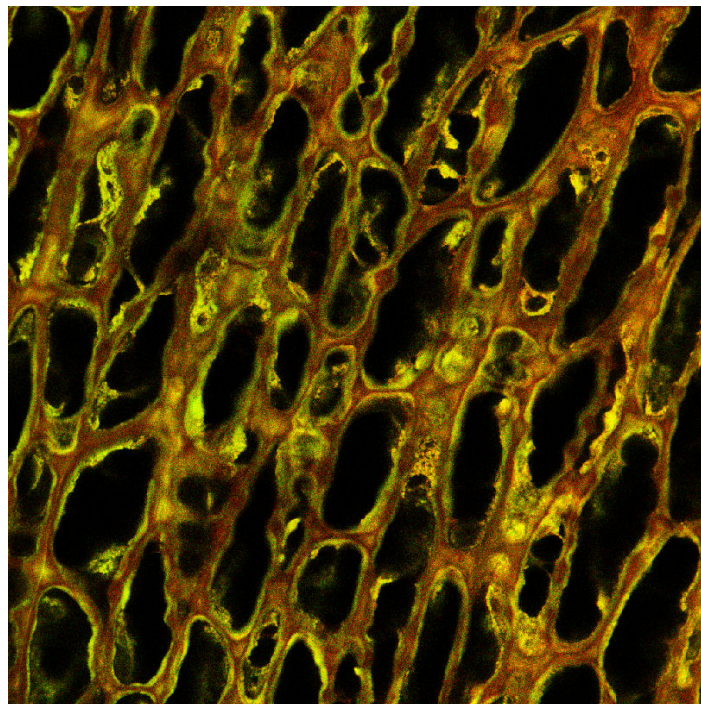


**Fig. 25.** Cellule dell'endosperma osservate in tridimensione; in basso a destra la foto tridimensionale che mette in evidenza solo le pareti in verde, alcuni copri proteici in verde chiaro e parte del film lipidico in rosso (Biolab, Illycaffè).





**Fig. 26.** Cellula dell'endosperma: corpi proteici in verde chiaro, immersi in un film lipidico in rosso e pareti cellulari in verde scuro con la lamella mediana più chiara (Biolab, Illycaffè).



**Fig. 27.** Cellule dell'endosperma con pareti cellulari nodose in evidenza (Biolab, Illycaffè).





## 5 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### 5.1 – PROBLEMATICHE AFFRONTATE NEL CORSO DELLO STUDIO

#### 5.1.1 – Il campionamento

Lo studio dello sviluppo del seme comprende l'analisi e l'osservazione dell'intero processo che porta alla maturazione dell'embrione e dell'endosperma, il suo tessuto di riserva. Come descritto in precedenza, tale processo ha inizio da alcuni eventi che precedono l'impollinazione del fiore, come la formazione del sacco embrionale, fino alla fecondazione del fiore stesso e quindi alla completa maturazione del seme.

Originariamente si sarebbero dovuti utilizzare campioni provenienti dalla collezione della serra dell'Università di Trieste. La serra però ha condizioni ovviamente artificiali e non ha permesso un campionamento su larga scala. È stato quindi necessario avere campioni provenienti dai paesi produttori pianificando quindi il campionamento del materiale direttamente *in situ*. È stato scelto il Brasile, grazie alla collaborazione già esistente tra Illycaffè e l'Istituto Agrônomico de Campinas (IAC). Ciò ha garantito la raccolta e la spedizione a scadenza temporale del materiale, dopo una attenta organizzazione in loco delle prime fasi di campionamento da parte della scrivente.

Per questioni logistiche e di organizzazione, non è stato possibile ottenere i campioni nella fase antecedente all'apertura dei fiori né quelli nella fase di apertura fiorale vera e propria.

#### 5.1.2 – Il trattamento del materiale

Un'altra delle problematiche che si è dovuta affrontare all'inizio di questo lavoro è stata senz'altro quella legata alla tipologia del materiale. I tessuti seminali del caffè, soprattutto allo stadio maturo, sono considerati molto duri. Studi precedenti del seme in sviluppo a livello microscopico e ultrastrutturale (Dentan, 1977, 1985 a, b), hanno evidenziato più volte la difficoltà a trattare questo tipo di materiale. Lo spessore delle pareti cellulari e la particolare modalità di raccolta delle sostanze di riserva all'interno del citoplasma, non permettono una facile fissazione, inclusione e sezionamento dei tessuti.

La difficoltà maggiore è stata senz'altro quella di adattare il protocollo già studiato in precedenza su semi maturi (Dentan, 1985 b), su tutti gli stadi di sviluppo del seme, a partire dal fragile ovario del fiore appena fecondato. Per quanto riguarda il passo iniziale di fissazione, ho deciso di mantenere in fissativo per uno o due giorni il materiale più delicato

appena raccolto, per poi conservarlo in etanolo al 70%, diversamente dal seme maturo che può restare nella soluzione fissativa anche un mese senza esserne danneggiato. Questo protocollo è stato ripreso da studi di anatomia florale effettuati su altre specie vegetali (Caporali, 2006) studiate all'Università di Genova.

L'inclusione in resina Technovit 7100<sup>®</sup>, scelta per il suo forte potere di penetrazione, ha avuto successo fino a quando i semi hanno raggiunto la loro dimensione definitiva, cioè intorno alla 20<sup>a</sup> settimana dopo la fecondazione. Dopo questo stadio di sviluppo è stato impossibile includere bene il materiale, probabilmente per la comparsa dello strato ceroso formato dalle cellule epidermiche dell'endosperma, che ha impedito la penetrazione della resina. Ho dovuto quindi ricorrere al congelamento dei semi e al taglio al criostato. Questa metodica però ha cambiato il modo di osservare i preparati: lo spessore delle sezioni era più grande (si passava infatti dai 6-8  $\mu\text{m}$  del microtomo ai 10-12  $\mu\text{m}$  del criostato) e c'è sempre stata perdita di materiale cellulare; le pareti si spezzavano più facilmente, soprattutto dalla 20<sup>a</sup> alla 26<sup>a</sup> settimana, quando erano ancora in accrescimento. Le osservazioni quindi in questo periodo hanno dato forse meno informazioni di quelle che potenzialmente si potevano avere se il materiale fosse stato incluso in resina, ma hanno dato comunque risultati soddisfacenti.

Una particolare difficoltà nel trattamento del materiale è stata riscontrata tra la 12<sup>a</sup> e la 18<sup>a</sup> settimana. In questo periodo i semi, seppur formati, avevano una consistenza molle, perciò sono stati effettuati diversi tentativi per includerli in resina, a volte con un risultato poco apprezzabile. Le cellule, essendo particolarmente fragili, hanno risentito della fase di disidratazione alcolica, seppur molto breve, che si effettua prima dell'inclusione. I preparati così osservati hanno mostrato pareti cellulari danneggiate.

Si è verificato anche un ulteriore problema con i campioni della 16<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> settimana: sono arrivati quasi tutti danneggiati dalla fase di spedizione dal paese d'origine. Solo alcuni sono stati analizzati e mancano perciò alcune considerazioni riguardanti queste due fasi.

Infine, per quanto riguarda le colorazioni istochimiche utilizzate, tre di esse non si sono rivelate utili ai fini dello studio, l'Oil Red O, il Black Sudan B e l'Ematossilina ed Eosina. Sono state utilizzate infatti solo durante le fasi preliminari dello studio, in cui si testavano tutti i trattamenti prescelti, ma poi sono state scartate, in quanto poco informative per i tessuti studiati.

### 5.1.3 – L’embriogenesi

Non è stato possibile studiare l’embriogenesi in *Coffea arabica*. Per studiare i primi stadi embrionali si sarebbe dovuto effettuare uno studio ad hoc, in quanto l’osservazione di queste strutture è davvero molto complessa in un materiale così difficile da trattare. Uno studio di questo tipo avrebbe dovuto prevedere forse un campionamento effettuato in modo diverso ed un differente trattamento dei campioni, più specifico. Una delle difficoltà maggiori è stata senz’altro quella dell’orientazione degli ovuli all’interno delle camere ovariche. Essi possono trovarsi in posizioni differenti e quindi il taglio al microtomo può essere arduo. Oltre a ciò, per un unico campione, devono essere effettuati numerosi tagli, almeno un centinaio, per osservare una struttura così piccola come l’embrione in crescita. Lo zigote inizia a dividersi appena due mesi dopo la fecondazione del sacco embrionale (Mendes, 1941), quindi alla 8<sup>a</sup> o 10<sup>a</sup> settimana. In questo periodo il perisperma si è accresciuto e la struttura seminale è ormai troppo grande per individuare lo zigote all’interno del sacco o anche nelle fasi successive, in cui l’endosperma è già formato da quaranta o cento cellule. L’embrione sviluppato ha comunque un volume molto ristretto rispetto a tutto il resto del seme, ne occupa infatti una minima parte (Martin, 1946), mentre è l’endosperma il tessuto dominante. Sicuramente l’isolamento dell’embrione in coltura, come ad esempio nel caso degli studi di embriogenesi somatica (Afreen et al., 2002; Van Hengel et al., 2002), potrebbe essere un buon compromesso per studiare gli stadi di sviluppo embrionali a livello microscopico. Si è consapevoli quindi che in questo lavoro si è studiato in maniera più approfondita lo sviluppo dell’endosperma del seme, con qualche accenno anche allo sviluppo embrionale, quando questo è stato possibile.

### 5.2 – LO SVILUPPO DEL CV. MUNDO NOVO

Le fasi di sviluppo dei semi del Mundo novo hanno seguito lo stesso andamento di altre varietà di *Coffea arabica* studiate precedentemente (Mendes, 1941; Wormer, 1966; Keller et al., 1971; Dentan, 1985 a, b; Wintgens, 2004; de Castro 2006). Le fasi principali stabilite in questo lavoro danno la possibilità di individuare le differenze temporali con altre varietà. Confrontando i risultati con gli altri cultivar, in tutti i casi, sono state sempre riscontrate una prima fase di quiescenza, poi una fase di rapida crescita, seguita dalla maturazione dei tessuti. Nel Mundo Novo, la prima fase inizia dalla settimana 0, cioè dal momento dell’apertura dei fiori (‘anthesis’) fino all’8<sup>a</sup> settimana; la seconda fase si protrae fino alla 18<sup>a</sup>-20<sup>a</sup> settimana in cui il seme raggiunge la sua dimensione definitiva, poi inizia l’ultima fase fino alla 32<sup>a</sup>

settimana in cui il seme è considerato maturo. I campioni alla 34<sup>a</sup> settimana sono stati considerati oramai nello stadio di sovra-maturazione delle drupe. Le variazioni temporali segnalate differiscono di poco: si tratta di una o due settimane di differenza per ciascun stadio di sviluppo, e ciò potrebbe essere dovuto alle diverse condizioni climatiche a cui le varietà sono sottoposte nell'arco dell'anno fenologico in cui sono state studiate.

La crescita dei frutti a suo tempo fu descritta attraverso cinque fasi principali (Rena & Maestri, 1986): il primo periodo senza alcun accrescimento visibile corrispondente alla fase di 'chumbinho'; il secondo di rapida espansione, fino alla completa formazione del pergamino; il terzo caratterizzato dalla formazione dell'endosperma, durante la fase finale di espansione dei frutti; a seguire, l'indurimento dell'endosperma e infine la maturazione vera e propria. Queste fasi corrispondono esattamente a quelle studiate in questo lavoro, anche se in realtà la formazione dell'endosperma ha coinciso con la fase di rapida crescita, mentre il suo indurimento con quella di maturazione dei frutti, e non sono state considerate fasi distinte. Dall'apertura dei fiori al frutto di colore verde in cui il seme raggiunge le sue dimensioni definitive, sono passati all'incirca quattro-cinque mesi o poco più; la fase di maturazione si è protratta invece per un paio di mesi. Bisogna sempre tenere presente che queste tempistiche possono variare a seconda delle condizioni ecologiche e del tipo di cultivar (Sondhal & Sharp, 1979). La fase iniziale di quiescenza nel Mundo Novo è durata invece circa sei settimane. I semi, dopo l'indurimento dell'endocarpo (18<sup>a</sup> settimana), non sono più cresciuti in dimensione, a causa della costrizione meccanica imposta dal pergamino ormai formato (Leon & Fournier, 1962); ciò significa che la dimensione iniziale dei loculi o camere ovariche è in grado di determinare la dimensione potenziale dei chicchi (Wormer, 1966).

Secondo alcuni autori (Wormer, 1964; Cannell, 1971 a, b) la dimensione finale delle drupe è strettamente dipendente dalle precipitazioni che si sono registrate durante la fase di rapida crescita, ovvero dalla 8<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> alla 18<sup>a</sup> settimana. In effetti, proprio in questo intervallo di tempo, nel corso dell'anno fenologico 2006-2007, si sono registrati i valori massimi di precipitazione (fig. 17), corrispondenti al periodo novembre-gennaio, in cui si colloca la fase di rapido sviluppo delle drupe e dei semi del Mundo Novo. L'accrescimento che definisce la dimensione dei semi e che caratterizza questa fase, può essere molto sensibile alla deficienza idrica (Mendes, 1941).

La concentrazione ormonale nelle drupe è sicuramente un altro dei fattori che maggiormente influenzano le diverse fasi di sviluppo. Nella fase di quiescenza infatti si riscontrano solitamente bassi livelli di gibberelline e citochinine (Kumar, 1979), fitoregolatori

ad azione stimolante. In seguito, aumenta la concentrazione di entrambe fino alla fine della fase di rapido sviluppo, per poi decrescere negli ultimi stadi. Un leggero aumento si registra raggiunta la maturazione dei frutti (Rena & Maestri, 1986).

Le prime divisioni dell'endosperma sono state osservate alla fine della prima fase di quiescenza, in cui il sacco embrionale si è accresciuto e ciò coincide con lo sviluppo dei semi della varietà *Typica* (Mendes, 1941), anche se il *Mundo Novo* sembra essere un po' in ritardo rispetto ad essa. Un altro punto importante è senz'altro la sostituzione del tessuto del perisperma con il nuovo endosperma in formazione. Fin dai primi studi sull'argomento (Houk, 1938; Mendes, 1941) c'è sempre stato un problema nell'interpretazione dei tessuti osservati. Tutti gli autori seguaci di Houk erano d'accordo sul fatto che il tessuto nutritivo del seme di caffè era di origine materna. In effetti questa affermazione non è del tutto errata. La differenza è che fino ad un certo stadio di sviluppo si può parlare di perisperma, in quanto il seme è formato completamente dalla crescita del tessuto tegumentario, di origine appunto materna. Da un certo punto in poi però si osserva un netto cambiamento: all'interno del perisperma infatti si nota un notevole accrescimento del sacco embrionale, che sembra spingere fisicamente verso l'esterno il tessuto del perisperma che, a mano a mano, si degrada (vedi risultati, 14<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> settimana). Il seme a maturazione è quindi formato totalmente da endosperma, mentre il perisperma formerà soltanto uno strato sottile amorfo, la nota 'pellicola argentea'. Secondo De Castro & Marraccini (2006) l'endosperma può essere anche facilmente identificato e separato dal perisperma per il suo colore latteo dopo circa novanta giorni dalla fecondazione degli ovuli. Dopo questo stadio, le cellule sono caratterizzate da pareti sottili che iniziano a ingrossarsi, a causa del deposito continuo di polisaccaridi complessi come arabinogalattani e galattomannani (Dentan, 1985 b).

Prima della dimostrazione anatomica, alcuni autori (Krug & Carvalho, 1939; Carvalho & Monaco, 1962) hanno anche trovato il modo di dimostrare a livello genetico che si tratta di un endosperma 'vero', studiando dei mutanti di 'cera', semi di arabica che hanno un endosperma di color giallo. Quando gli ovuli di 'cera' venivano impollinati da polline di caffè con endosperma verde, davano origine a semi con endosperma verdastro secondo il fenomeno della xenia, fenomeno per cui l'ibrido tra due varietà di una stessa specie si manifesta già nell'endosperma o nei cotiledoni del seme prodotto dalla pianta madre. Ovuli invece impollinati con polline della propria pianta davano origine a semi con endosperma giallo. Ciò dimostrava che il tessuto di riserva dominante era endospermico e non perispermico, cioè materno e che il contributo di alcune caratteristiche fenotipiche dell'endosperma era senz'altro anche maschile. Gli stessi autori hanno inoltre studiato sulla stessa varietà la

percentuale di fecondazione incrociata naturale in arabica che è risultata essere del 10% (Carvalho & Krug, 1949). Arabica è infatti una specie autofertile ma nessun effetto negativo è stato osservato sul vigore e sulla produttività delle piante ottenute da autofecondazioni successive.

Alcune osservazioni citologiche hanno riportato l'esistenza di stretti contatti tra perisperma ed endosperma. Ciò spiegherebbe anche perché i polisaccaridi si trovavano in grosse quantità nel perisperma più esterno e invece non visibili in quello più interno, vicino alle cellule dell'endosperma (De Castro & Marraccini, 2006). Scambi e diffusione di metaboliti sono anche dimostrati dalla presenza di plasmodesmi nelle cellule parenchimatiche dell'endosperma (Ayres 1954, Dentan 1985 b) e dalla migrazioni di terpeni, composti fenolici e serotonina (5-idrossitriptamina) dall'endosperma interno verso la sua parte più periferica, negli ultimi stadi di maturazione del seme (Dentan, 1985 a, b).

Per quel che riguarda gli altri composti, come la caffeina, il maggior incremento si ha tra le 8-12 settimane e le 16 settimane dopo la fecondazione (Keller et al., 1972), che corrisponde al periodo di massima espansione dell'endosperma. Da quel momento in poi il contenuto di caffeina nel pericarpo resta costante suggerendo che la biosintesi si è fermata o che continua ma con un trasferimento attivo al seme (Baumann & Wanner, 1972). Gli acidi clorogenici (composti fenolici) hanno anch'essi un incremento sostanziale durante lo sviluppo dell'endosperma, mentre si nota un decremento alla fine dello sviluppo del seme (De Castro & Marraccini, 2006); anche gli zuccheri aumentano gradualmente nell'endosperma e diminuiscono invece nel perisperma (Rogers et al., 1999).

### **5.3 – LA MORFO-ANATOMIA DEL SEME E LE SUE POSSIBILI APPLICAZIONI**

La coltura mondiale si basa sui chicchi di caffè. Pertanto un buon seme è il primo fattore condizionante la produttività di una coltivazione. L'ottenimento di buone sementi inizia con la scelta della pianta madre e con una buona produzione di frutti. Semi che derivano da frutti formati in condizioni avverse, come ad esempio una forte e prolungata deficienza idrica, non solo germinano male ma danno origine a piante deboli. Semi piccoli possono produrre plantule con tassi di crescita minori rispetto a quelle ottenute da semi medi o grandi (Osorio & Castillo, 1969). La preparazione e la successiva conservazione dei semi sono i fattori più importanti per preservare il potere germinativo e l'ottenimento di piantine con uno sviluppo normale (Rena & Maestri, 1986).

Un fattore importante da ricordare infatti è che i semi del caffè non sono semi ortodossi, che subiscono cioè un'imponente perdita d'acqua (dal 70-80 % si arriva solitamente al 10-15%) e possono trascorrere lunghi periodi senza germinare restando vitali. Il caffè è considerato un seme recalcitrante, che mantiene cioè un'umidità relativamente elevata per restare vitale; la sua longevità in buone condizioni di conservazione (25°C, 92-98% RH) è di 10 mesi, con una percentuale di germinazione del 59% (Bewley & Black, 1994). L'umidità è però uno dei nemici per eccellenza quando si tratta di conservare il caffè verde sia durante la spedizione dai paesi produttori sia prima della torrefazione (non può contenere più del 13% in peso di acqua, DPR 470/73 Art. 3), cercando di evitare la crescita fungina o il danneggiamento di parte del raccolto. Sarebbe interessante quindi poter applicare tutte le tecniche di morfo-anatomia acquisite fino ad ora per studiare anche le fasi successive alla maturazione dei semi, nella fase di raccolta e di conservazione fino anche al momento della tostatura.

Oltre agli aspetti puramente morfo-anatomici, l'abilità di sezionare i tessuti seminali potrebbe essere di grande importanza per eventuali analisi biomolecolari di espressione genica, come già è stato in parte studiato recentemente (De Castro & Marraccini, 2006). Conoscere infatti gli stadi di sviluppo e i tessuti coinvolti in ciascuna fase, dà la possibilità di evitare errori grossolani di interpretazione dei risultati e di stabilire relazioni interessanti fra la parte genetica e le osservazioni in microscopia. L'uso di tecniche istochimiche è inoltre in grado di evidenziare particolari composti, localizzati soltanto in alcune parti del seme o, più in particolare, anche solo delle cellule dell'endosperma o dell'embrione, come in parte è già stato effettuato in questo lavoro e in studi precedenti (Dentan, 1977, 1985a, b). Sarebbe quindi interessante poter applicare i protocolli studiati fino ad ora su materiale proveniente da altre varietà o da altre specie di *Coffea*, o semi provenienti da diversi trattamenti post-raccolta. Si potrebbero inoltre approfondire alcuni stadi di sviluppo considerati più curiosi, come la fase di passaggio fra perisperma ed endosperma, studiando in parallelo la composizione chimica del seme e l'espressione genica di alcuni enzimi coinvolti nella biosintesi di composti fondamentali come ad esempio alcuni zuccheri, l'acido clorogenico, i terpeni o la serotonina.





## 6 – BIBLIOGRAFIA

- Afreen F., Zobayed S.M.A. & Kozai T., 2002.** Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* of somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Annals of Botany*, 90:11-19.
- Anderson W.R., 1973.** A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the *Rubiaceae*. *Taxon*, 22: 537-542.
- Ayres G.C.M., 1954.** A ocorrência de plasmodesmas no endosperma do *Coffea Arabica* L. var. *typica* Cramer. *Bragantia* 13: 281-285.
- Avallone S., Guyot B., Michaux-Ferriere N., Guiraud J.P., Olguin Palacios E. & Brillouet J.M., 1999.** Cell wall polysaccharides of coffee bean mucilage. Histological characterization during fermentation. *ASIC, 18e colloque, Helsinki, 1999*.
- Baumann T.W. & Wanner H., 1972.** Untersuchungen über den Transport von Kaffein in der Kaffeepflanze (*Coffea arabica*). *Planta* 108: 11-20.
- Bewley D. & Black M., 1994.** Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York, London, pp. 445.
- Boesewinkel F.D. & Bouman F., 1984.** The seed: structure. In: *Embryology of Angiosperms*. Johri B.M. (ed.), Springer-Verlach, Berlin.
- Bradbury A.G.W., 2001.** Chapter 1: Carbohydrates. In: *Coffee. Recent developments*. Clarke R.J. & Vitzthum O.G. (eds.), Blackwell Science.
- Brewbaker J.L., 1957.** Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity*, 48: 271-277.
- Bruvo R., Michiels N.K., D'Souza T.G. & Schulenburg H., 2004.** A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*, 13: 2101-2106
- Camargo A.P., 1985.** Florescimento e frutificação do café arábica nas diferentes regiões cafeiras do Brasil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasília, 20: 831-839.
- Camargo A.P. & Camargo M.B.P., 2001.** Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, 60: 65-68.

- Cannell M.G.R., 1971a.** Effects of fruiting , defoliation and ring-barking on the accumulation and distribution of dry matter in branches of *Coffea arabica* L. in Kenya. *Experimental Agriculture*, 7: 63-74.
- Cannell M.G.R., 1971b.** Production and distribution of dry matter in trees of *Coffea arabica* L. in Kenya as affected by seasonal climatic differences and the presence of fruits. *Annals of Applied Biology*, 67: 99-120.
- Caporali E., Spada A. & Marziani G., 2002.** Unisexual flower development: different strategies for the elimination of useless organs. *Research Report, Flowering Newsletter 33, May 2002*.
- Caporali E., Spada A., Marziani G., Failla O. & Scienza A., 2003.** The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*. *Sexual. Plant Reproduction*, 15: 291-300.
- Caporali E., Roccotiello E., Cornara L., Casazza G. & Minuto L., 2006.** An anatomical study on floral variation in *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. Related to sexual dimorphism. *Plant Biosystems*, 140: 123-131.
- Carvalho A. & Krug C.A., 1949.** Agentes da polinização da flor do cafeeiro (*Coffea Arabica*). *Bragantia*, 9: 11-24.
- Carvalho A., Krug C.A., Mendes J.E.T., Antunes filho H., Moraes H., Aloisi Sobrinho J., Moraes M.V. & Rocha T.R., 1952.** Melhoramento do cafeeiro. IV. Cafê Mundo Novo. *Bragantia*, 12: 97-129.
- Carvalho A. & Monaco L.C., 1962.** Natural cross pollination in *Coffea arabica*. In: *XVIIth Proceedings of International Horticultural Congress, Brussels*, 4: 447-449.
- Carvalho M.L.M., de Castro R.D., Estanislau W.T., Holhorst H., 2004.** Functional development and (pre-) maturation of coffee (*Coffea arabica*) fruits and seeds. In: 20<sup>th</sup> ASIC conference, 2004 Bangalore. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> ASIC Conference. Bangalore: ASIC, 2004*.
- Carvalho M.L.M., Medina Filho H.P., Fazuoli L.C., Guerreiro Filho O. & Lima M.M.A., 1991.** Aspectos genéticos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 135-183.
- Cevallos M., Sánchez I.S. & Montes S., 2002.** Caracterización histológica de la embriogénesis em *Coffea canephora* P. var. robusta. *Revista de Protección Vegetal.*, 1:14-19.

- Charrier A. & Bertaud J., 1985.** Botanical classification of coffee. In: *Coffe – Botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Clifford M.N. & Willson K.C. (eds.), American Edition.
- Chevalier A., 1929.** Les Caféiers du Globe. I. Généralité sur les caféiers. *Encyclopédie biologique*, Paris, 5: 1-196.
- Chevalier A., 1942.** Les Caféiers du Globe. II. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés. *Encyclopédie biologique*, Paris, 12: 1-36.
- Chevalier A., 1947.** Les Caféiers du Globe. III. Systematique des caféiers et faux-caféiers, maladies et insects nuisibles. *Encyclopédie biologique*, Paris, 28: 1-352.
- Clark G., 1997.** Staining procedures. 4<sup>a</sup> ed., Williams & Wilkins (eds.).
- Coolhaas C., de Fluiter H.J. & Dr. König H., 1960.** *Kaffee. Tropische Und Subtropische Weltwirtschaftspflanzen. Ihre Geschichte Und Volkswirtschaftliche Bedeutung. III. Genußpflanzen, 2. Band.* Ferdinand Enke, 2.
- Corner E.J.H., 1976.** The seeds of Dicotyledons. Vol. I, Cambridge University Press.
- Davis A. P., Govaerts R., Bridson D.M. & Stoffelen P., 2006.** An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical journal of the Linnean Society*, 152: 465-512.
- da Silva A., 2002.** Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation. *PhD thesis*.
- de Castro R.D., Estanislau W.T., de Mesquita P.R. & Hilhorst H.W.M., 2002.** A functional model of coffee (*Coffea arabica*) seed development. *Salamanca 2002 International Workshop on seeds*.
- de Castro R.D. & Marraccini P., 2006.** Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 175-199.
- De Block P., 1995.** Ovary, seed and fruit of *Rutidea* (Rubiaceae, Pavetteae). *Plant Systematics and Evolution* 196: 1-17.
- Dedecca DM, 1957.** Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. variedade Typica Cramer. *Bragantia*, 16: 315-366.
- Delevoryas T., 1970.** Le varietà delle forme vegetali. Zanichelli ed., Torino, 1970.
- Dentan E., 1977.** Structure fine du grain de caf vert. *ASIC, 8e Colloque, Abidjan, 1977*.

- Dentan E., 1985 a.** Etude microscopique du développement et de la maturation du grain de café. *ASIC, 11e Colloque, Lomé, 1985.*
- Dentan E., 1985 b.** The microscopic structure of the coffee bean. In: Clifford M.N. & Wilson K.C. (eds.). *Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage.* The AVI Publishing Company. Westport, Connecticut, pp. 284-304.
- De Toni K.L.G. & Mariath J.E.A., 2004.** Desenvolvimento do rudimento seminal em *Borreria verticillata* (L.)G. Mey. (*Rubiaceae* – *Rubioideae* - *Spermacoceae*). *Revista Brasileira de Botânica*, 27: 185-192.
- Dieringer D. & Schlötterer C., 2003.** Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3: 167-169
- Dublin P., 1960.** Biologie florale du *Coffea dewevreii* de Wild race *excelsa* A. Chevalier. Troisième Partie. Floraison. Pollinisation. Fécondation. *L'Agronomie tropicale*, extrait du n.2, mars-avril 1960.
- Earle F.R. & Jones Q., 1962.** Analyses of Seed Samples from 113 Plant Families. *New York Botanical Garden Press.*
- Esau K., 1958.** Plant Anatomy. Wiley & sons, Inc., New York, Chapman & Hall London.
- Esau K., 1960.** Anatomy of seed plants. Wiley ed.
- Fagerlind F, 1939.** Perisperm oder endosperm bei Coffea? *Svensk Botanisk Tidskr.*, 33: 303-309.
- Fazuoli L.C., 1977.** Avaliação de progênies de café Mundo Novo (*Coffea Arabica* L.). Piracicaba, pp. 146.
- Foster A.S. & Gifford E.M jr., 1974.** Comparative morphology of vascular plants. W.H. Freeman and Company ed., San Francisco.
- Franco C.M., 1939.** Sobre compostos fenólicos no café. *Journal of Agronomy*, 2: 131-138.
- Fulcher R.G., O'Brien T.P. & Lee J.W., 1972.** Studies on the aleurone layer. I. Conventional and fluorescence microscopy of the cell wall with emphasis on phenol-carbohydrate complexes in wheat. *Australian Journal of Biology Science*, 25: 23-34.
- Garcia Martins M.A. & Trombert Oliveira D.M., 2001.** Morfo-anatomia e ontogênese do fruto e da semente de *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Fabaceae: Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica*, 1:109-121.

- Gerola F., 1997.** Biologia vegetale. Sistematica filogenetica vol.2 – UTET
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Guerreiro S.M.C., Vieira L.G.E., Leroy T., Mazzafera P., Marraccini P., 2005.** Sugar metabolism during coffee fruit development. Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee, Bangalore, International Scientific Association on Coffee, Paris, 651-655.
- Gibson A., 1971.** Photochemical aspects of drying east african arabica coffees. I. – The importance of integument pigmentation II. – Raw bean colours produced from kahweol esters. ASIC, 5e colloque, Lisbonne, 1971.
- Graner E. A., 1936.** Megasporogenesis in *Coffea arabica* L. *Arquivos do Instituto de Biologia Vegetal*, Rio de Janeiro 3: 69.
- Graner E. A., 1939.** Embriogênese de *Coffea*. I. Desenvolvimento do ovulo em *Coffea arabica* L. In: *Proceedings of the Ia Reuniao Sul-Americana de Botanica, Rio de Janeiro, 1938*. Rio de Janeiro, Ministerio da Agricultura, 193-202.
- Homma S., 2001.** Chapter 2: Proteins and chlorogenic acids. In: *Coffee. Recent developments*. Clarke R.J. & Vitzthum O.G. (eds.), Blackwell Science.
- Horner H.T. jr. & Arnott H.J., 1965.** A histochemical and ultrastructural study of *Yucca* seed proteins. *American Journal of Botany*, 52: 1027-1038.
- Houk W. G., 1938.** Endosperm and Perisperm of Coffee with Notes on the Morphology of the Ovule and Seed Development. *American Journal of Botany*, 25: 56-61.
- Illy A. & Viani R., 2005.** Espresso coffee, The science of quality. Elsevier Academic Press.
- Jacobsen, 1984.** The seed: germination. In: *Embryology of Angiosperms*. Johri B.M. (ed.), Springer-Verlach, Berlin.
- Johri, B.M., 1970.** Symposium on comparative embryology of angiosperms. *Bullettin of the Indian National Sciences Academy* 41: 1-385.
- Johri, B. M., 1984.** Embryology of angiosperms. Springer-Verlag New York, 830 pp.
- Johri, B.M, Ambegaokar K.B. & Srivastava P.S, 1992.** Comparative embryology of Angiosperms. Springer ed.
- Joshi A.C., 1938.** A note on the morphology of the ovule of Rubiaceae with special reference to *Cinchona* and *Coffea*. *Current Science*, 7: 236-237.

- Keller H., Wanner H. & Baumann T.W., 1972.** Kaffeinsynthese in Fruchten und Gewebekulturen von *Coffea arabica*. *Planta*, 108: 339-350.
- Klein D.E., Gomes V.M., Da Silva-Neto S. J. & Da Cunha M., 2004.** The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 94: 733-740.
- Krochko J.E., Bantroch D.J., Greenwood J.S. & Bewley J.D., 1994.** Seed storage proteins in developing somatic embryos of alfalfa: defects in accumulation compared to zygotic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 45 (275): 699-708.
- Krug C.A. & Carvalho A., 1939.** Genetical proof of the existence of coffee endosperm. *Nature*, 144: 515.
- Krug C.A. & Carvalho A., 1946.** A. Genetica de *Coffea*. X. Hereditariedade da ocorrência de sépalas desenvolvidas in flores de *Coffea Arabica* L. var. goiaba Taschdjian. *Bragantia*, 6: 251-264.
- Kumar D., 1979.** Some aspects of the physiology of *Coffea Arabica* L. A review. *Kenya Coffee*, 44: 9-47.
- Lashermes P., Combes M.C., Robert J., Trouslot P., D'Hont A., Anthony F. & Charrier A., 1999.** Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*, 261: 259-266.
- Leliveld J. A., 1938.** Vruchtzetting bij Koffie. *Archief voor de Koffie cultuur in Nederlands-Indie*. 12/13, 127-64.
- Leon J., and Fournier L., 1962.** Crecimiento y desarrollo del fruto de *Coffea arabica* L. *Turrialba*, 12: 65-74.
- Leroy J.F., 1980.** Evolution et taxogenèse chez les caféiers. Hypothese sur leur origine. *Compte rendus de l'Academie des Sciences*, Paris, 291: 593-596.
- Lersten N. R., 1974.** Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psichotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 61: 973-981.
- Majerowicz N, 1984.** Estudo da diferenciação e crescimento de gemas florais de *Coffea arabica* L. Observações sobre antese e maturação de frutos. Campinas (SP, Brazil), Universidade Estadual de Campinas. MSc thesis.
- Majerowicz N. & Sondhal M.R., 2005.** Induction and differentiation of reproductive buds in *Coffea arabica* L.. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17: 247-254.

- Mazzafera P., Guerreiro O. Filho, & Carvalho A., 1988.** A cor verde do endosperma do café. *Bragantia*, 47: 159-170.
- Mangalan S., Kurien K.P., John P. & Nair G.M., 1990.** Development, structure and cytochemistry of resin-secreting colleters of *Gardenia gummifera* (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 66: 123-132.
- Martin A.C., 1946.** The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, 36: 513-660.
- Marchand L., 1864.** Recherches organographiques et organogéniques sur le *Coffea arabica* L. Paris, Baillière J.B. et fils, Libraires de l'Académie impériale de Médecine.
- Medina D. M., 1964.** O endosperma do café como material para estudos citológicos. *Bragantia*, 23: 179-186.
- Mendes A.J.T., 1941.** Cytological Observations in *Coffea*. VI. Embryo and Endosperm Development in *Coffea arabica* L. *American Journal of Botany*, 28: 784-789.
- Mendes A.J.T., Medina, D.M. & Mendes Conagin C.H.T., 1954.** Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café 'Mundo Novo'. *Bragantia*, 13: 27-279.
- Metcalf C.R. & Chalk L., 1950.** Anatomy of the Dicotyledons. Vol. II. Oxford ed., 1950.
- Ohiokepai O., Brumen G. & Clifford M.N., 1982.** The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implication for beverage quality. ASIC, 10<sup>th</sup> International Colloquium on Coffee. Salvador. 177-186.
- Osorio B.J. & Castillo Z. J., 1969.** Influência del tamaño de la semilla en el crecimiento de las plantulas de café. *Cenicafé*, 20: 20-40.
- Pallotti P., 2000.** Il caffè. Produzione. Blu edizioni, Peveragno (CN).
- Paiva E.A.S. & Machado S.R., 2006.** Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). Ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology*, 66: 301-308.
- Patel J.D. & Zaveri N. (nee Shah), 1975.** Development of leaf and stipular glands in *Coffea arabica*. *Flora*, 164: 11-18.
- Pearse A.G.E., 1960.** Histochemistry. Theoretical and applied. Little, Brown & co., Boston.
- Petracco M., 2001.** Technology IV: Beverage preparation: brewing trends for the new millennium. In: *Coffee. Recent developments*. Clarke R.J. & Vitzthum O.G. (eds.), Blackwell Science.

- Pezzopane J.R.M., Pedro Jr. M.J, Thomaziello R.A. & de Camargo M.B.P., 2003.** Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. *Bragantia*, 62: 499-505.
- Pimienta E. & Polito V.S., 1983.** Embryo sac development in almond [*Prunus dulcis* (Will.) D. A. Webb.] as affected by cross-, self- and non-pollination. *Annals of Botany* 51: 469-479.
- Prakash N., 1979.** Embryological studies on economic plants. *New Zealand Journal of Botany*, 17: 525-534.
- Pupillo P., Cervone F., Cresti M. & Rascio N., 2003.** Biologia vegetale. Zanichelli ed.
- Redgwell R. & Fisher M., 2006.** Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 165-174.
- Rena & Maestri, 1986.** Fisiologia do cafeeiro. In: *Cultura do cafeeiro. Fatores que afetam a produtividade*. Rena A.B., Malavolta E., Rocha M., Yamada T. (eds.), Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato – Piracicaba- SP, pp. 447.
- Rogers W.J., Michaux S., Bastin M. & Bucheli P., 1999.** Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science* 149: 115-123.
- Roth I., 1977.** *Fruits of Angiosperms*. Universidad central de Venezuela, Caracas, Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Roth I. & Lindorf H., 1971 a, b.** Anatomia y desarrollo del fruto y de la semilla del café. *Acta Botanica Venezuelica*, 6: 197-238.
- Roth I. & Lindorf H., 1974.** La interpretación morfológica de la semilla de las Rubiaceae y en especial del café. *Acta Botanica Venezuelica*, 9: 141-147.
- Rothfos B., 1980.** Coffee production. Gordian-Max-Rieck GmbH, Hamburg.
- Salmona J, Dussert S., Descroix F., de Kochko A., Bertrand B. & Joet T., 2008.** Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. *Plant Molecular Biology*, 66: 105-124.
- Schenker S., Handschin S., Frey B., Perren R. & Escher F., 1999.** Structural properties of coffee beans as influenced by roasting conditions. *ASIC, 18e colloque, Helsinki, 1999*.



- Sondhal M.R. & Baumann T.W., 2001.** Agronomy II: Developmental and Cell Biology. In: *Coffee. Recent developments*, R. J. Clarke, O. G. Vitzthum (eds), Blackwell Science Ltd, pp. 202-223.
- Sondhal M.R. & Sharp W. R., 1979.** Research in *Coffea* spp. And applications of tissue culture methods. In: *Plant cell and tissue culture: principles and applications*, Paddock E.F. & Raghavan V. (eds.), Columbus: Ohio State University Press, pp. 527-584.
- Speer K. & Kölling-Speer I., 2001.** Chapter 1: Lipids. In: *Coffee. Recent developments*. Clarke R.J. & Vitzthum O.G. (eds.), Blackwell Science.
- Sutherland P.W., Hallett I.C., MacRae, Fischer M. & Redgewell R.J., 2004.** Cytochemistry and immunolocalisation of polysaccharides and proteoglycans in the endosperm of green Arabica coffee beans. *Protoplasma*, 223: 203-211.
- Thomas V., 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany*, 68: 287-305.
- Tornincasa P., 2008.** Marcatori genetici per l'analisi, la caratterizzazione e la tracciabilità del caffè e delle due specie vegetali *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora*. PhD Thesis in Genetica, Università degli Studi di Trieste.
- Tosoni da Eira Aguiar A., Guerreiro-Filho O., Perez Maluf M., Boller Gallo P. & Carlosfazuoli L., 2004.** Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. *Bragantia*, 2: 179-192.
- Ukers W.H., 1955.** All about coffee. New York, II edition, The Tea & Coffee Trade Journal Company, pp. 818.
- Van der Vossen H. A. M., 2001.** Agronomy I : Coffee Breeding Practices. In: *Coffee. Recent developments*. Clarke R.J. & Vitzthum O.G. (eds.), Blackwell Science.
- Van Hengel A.J., van Kammen A. & De Vries S.C., 2002.** A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114: 637-644.
- Viani R., 1988.** Physiologically active substance in coffee. In: *Coffee Vol. 3 Physiology*, R. J. Clarke & R. Macrae (eds.), Elsevier Applied Science, pp. 1-31.
- von Faber F.C., 1912.** Morphologisch-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea arabica*. *Annales du Jardin Botanique du Buitenzorg* 25: Java.

**Weber E. & Neumann D., 1980.** Protein bodies, storage organelles in plant seeds. *Biochememie und Physiologie der Pflanzen*, 175: 279-306.

**Wildeman E.DE., 1941.** Études sur le genre *Coffea* L.. Classification, caractères morphologiques, biologiques et chimiques, sélection et normalization. Bruxelles, Palais des Académies, pp. 496.

**Wintgens J.N., 2004.** Coffee: growing, processing, sustainable production. Wiley - VCH

**Wolfrom M.L., Laver M.L. & Patin D.L., 1961.** Carbohydrates of the coffee bean. II: Isolation and characterization of a mannan. *Journal of Organic Chemistry*, 26: 4533-4535.

**Wormer T.M., 1964.** The growth of the coffee berry. *Annals of Botany*, 28: 47-55.

**Wormer T.M., 1966.** Shape of bean in *Coffea Arabica* L. in Kenya. *Turrialba*, 16: 221-236.

### Sitografia

<http://www.fao.org>

<http://www.caffe.it>

<http://www.asscaffe.it>

<http://www.ciiagro.sp.gov.br/>

## Ringraziamenti

*In questi anni di dottorato sono molte le persone che ho incrociato in questa strada tortuosa verso la conoscenza del caffè e dei suoi segreti. Ho scoperto nuove amicizie, assaporato giorni felici e giorni amari, incontrato nuove culture e nuove realtà. Anche se spesso mi sono ritrovata sola ad affrontare alcune problematiche, altre volte sono stata affiancata da persone, conoscenti e non, che mi hanno aiutato e incoraggiato. Grazie a tutti.*

*Per primi, a tutti i colleghi del Laboratorio di Genetica dell'Università di Trieste in cui tutto è cominciato: Elisa, Patrizia, Martina, Barbara, Chiara e Lorenzo, per avermi sostenuto e compreso anche nei miei deliri botanici, per aver lavorato assieme sulla parte genetica dello studio e per alcuni favori 'dell'ultimo minuto'.*

*Al Prof. Graziosi per avermi dato la possibilità di entrare in questo nuovo mondo e al Prof. Pallavicini per l'amicizia e la disponibilità sempre presenti.*

*A tutti i colleghi della Illycaffè, Luciano, Gaia, Oriana, Laura, Massimo, Natasa, Barbara e Paola, sempre amichevoli e disponibili, ma primo fra tutti il mio Tutor, Fabio Silizio con cui ho condiviso gioie e dolori della ricerca sul caffè, che mi ha insegnato alcuni 'trucchi del mestiere', oltre che seguirmi in questi tre anni, assieme anche alla dott.ssa Dentan, che ho avuto il piacere di conoscere e con cui ho potuto confrontarmi. Vorrei inoltre ringraziare in modo particolare Anna Illy e Furio Suggi Liverani per la disponibilità e l'interesse dimostrato per la mia ricerca e per la mia persona.*

*Un ringraziamento speciale al dott. Ernesto Illy, di cui mi resterà sempre un ricordo piacevole, per le chiacchierate sul caffè e dintorni e per l'entusiasmo che riusciva a trasmettermi quando vedeva gli ultimi sviluppi della mia ricerca.*

*Al dott. Pacorini e ad Alberto Pipan del gruppo Pacorini di Trieste per avermi procurato il materiale per la fase preliminare dello studio.*

*Un doveroso ringraziamento ai colleghi brasiliani: a Julio César Mistro, Julia, dott. Fazuoli e Prof. Guerreiro di Campinas e a Marcio Reis di Patrocinio per il campionamento del materiale e per l'ospitalità ricevuta durante il mio viaggio in Brasile; nonché a Nelson Carvalhaes e Eliana Perez per aver seguito sempre attentamente le spedizioni del materiale da Santos (Brasile) all'Italia.*

*Particolare gratitudine al prof. Paolo Modenesi e al suo staff, soprattutto a Enrica e Simona, dell'Università di Genova, per avermi insegnato i primi approcci con questo tipo di materiale e per la loro disponibilità indiscussa.*

*Ai tecnici di microscopia dell'Università di Trieste, Fulvio Micali e Claudio Gamboz, per la preparazione dei campioni al TEM e per la loro disponibilità e aiuto, anche quando il tempo era poco.*

*Un ringraziamento affettuoso anche al Prof. Tretiach, mio consulente botanico preferito e sempre disponibile, alla Prof. Talarico per la necessaria consulenza nell'interpretazione delle foto al TEM e alla dott.ssa Kosovel per i suoi consigli.*

*A Federica Rupeno, 'e la fede', soprattutto per la sua amicizia, ma anche per i disegni dell'atlante e per la consulenza linguistica.*

*Per ultimi, ma non meno importanti, voglio ringraziare come sempre la mia 'vecchia' famiglia, per primi i miei genitori, ma soprattutto la mia 'nuova' famiglia. A Simeone per essermi vicino, sempre, in tanti modi, senza il quale non sarei mai riuscita a concludere la scrittura della tesi e al nostro 'pupetto' Nicolas, che ha creato grosso scompiglio nelle nostre vite e che ci sta regalando giorni indimenticabili.*