



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

Dipartimento DEMETRA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
“SISTEMI ARBOREI AGRARI E FORESTALI”

XXIII CICLO

COORDINATORE  
Chiar.mo Prof. Tiziano CARUSO

Settore Scientifico Disciplinare AGR/03

**CONSERVAZIONE IN VITRO IN CRESCITA  
RALLENTATA DI ACCESSIONI DI SUSINO DEL  
GERMOPLASMA SICILIANO**

Dissertazione finale

TESI DI

Dott. Sergio GIANNI'

DOCENTE TUTOR

Prof. Francesco SOTTILE



Borsa di dottorato di ricerca finanziata  
dall'Assessorato Risorse Agricole e Alimentari della Regione Siciliana

Dipartimento Interventi Infrastrutturali

Progetto "Vitroexcel" - Caratterizzazione qualitativa e conservazione in vitro delle produzioni frutticole di eccellenza

## **BIODIVERSITÀ: DA RISORSA DA TUTELARE A OPPORTUNITÀ DA VALORIZZARE**

A Edward O. Wilson (Birmingham, 1929) si deve per primo l'uso del termine "biodiversità", come concetto che fonde insieme i termini di "diversità biologica" (biological diversity). Wilson, entomologo di fama mondiale, studiava i piccoli dettagli che componevano il grande mondo della 'diversità della vita' (termine che dà il titolo ad una delle sue più famose opere) e mostrava con ogni enfasi possibile la sua irritazione di fronte all'uomo che non si rendeva conto che dietro la biodiversità degli organismi viventi, e dei vegetali in particolare, si nasconde un mondo di poteri nutrizionali e nutraceutici, un'infinità di opportunità che amava definire i "servizi dell'ecosistema".

Per biodiversità si intende la "variabilità tra gli organismi viventi appartenenti a ecosistemi terrestri, marini e acquatici e i complessi ecologici di cui questi sono parte, (...) ciò comprende la diversità all'interno delle specie, tra le specie e tra gli ecosistemi" (Convention on Biological Diversity CBD – art. 2). Un'altra definizione della biodiversità si riferisce alla "...varietà della vita e dei suoi processi. Essa include tutte le forme di vita, dalla singola cellula ai complessi organismi e processi, ai percorsi e ai cicli che collegano gli organismi viventi alle popolazioni, agli ecosistemi e ai paesaggi" (Commissione UE, 2001). Tutte le definizioni, comunque, fanno diretto riferimento a quanto discusso ed approfondito a partire dalla conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente e sullo sviluppo, tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992, che ne sottolineò l'importanza introducendo il concetto di diversità su diversi livelli, genetico, di specie e di ecosistema.

La diversità genetica definisce la differenza dei geni all'interno di una determinata specie; la diversità di specie comprende la ricchezza di specie, sia come numero che frequenza delle stesse specie presenti in una determinata zona. La diversità di ecosistema definisce il numero e l'abbondanza degli habitat, delle comunità viventi e degli ecosistemi all'interno dei quali i diversi organismi vivono.

La perdita di biodiversità, a causa delle attività umane, ha assunto proporzioni non più sottovalutabili, le cui ricadute saranno sempre più evidenti sugli equilibri naturali e sull'uomo sotto molteplici aspetti: aumento dei disastri naturali, come inondazioni o tempeste tropicali, riduzione della disponibilità e della qualità delle

risorse idriche, impatti pesanti sull'economia e sulle società, riducendo la disponibilità di risorse alimentari, energetiche e medicinali. Attualmente il mercato mondiale dei farmaci che vale diverse centinaia di miliardi di dollari, si basa fundamentalmente su principi attivi estratti, direttamente o indirettamente, dai regni vegetale e animale. Ciò dimostra che il ruolo della biodiversità vegetale ed il valore che può assumere non si limita solo ad una questione alimentare e biologica ma può senza dubbio toccare settori e comparti di grande rilevanza economica.

Aspetto significativo, non meno importante, è l'impoverimento delle tradizioni culturali: l'agrobiodiversità o germoplasma che rappresenta un sottoinsieme della diversità biologica ha stabilito per secoli un forte legame con la cultura e le tradizioni agroalimentari di un paese. Le risorse genetiche hanno peraltro giocato un ruolo incisivo anche nel miglioramento genetico delle specie coltivate e, tenuto conto dei più recenti orientamenti del settore, continueranno a svolgere in futuro questa loro funzione. Infatti tale variabilità si concretizza in un consistente contenitore di informazioni genetiche e di caratteristiche agronomiche utili nell'attività mirata ad ottenere nuove varietà vegetali da coltivare o animali da allevare in grado, meglio di altri individui, di adattarsi a specifiche condizioni climatiche e ambientali.

L'Italia è tra i Paesi europei più ricchi di biodiversità (Pignatti, 2000). La varietà di condizioni bio-geografiche, geo-morfologiche e climatiche che caratterizza il suo territorio fa di essa una straordinaria "oasi" sia di specie, sia di *habitat*. Il Bacino del Mediterraneo rappresenta una regione *hot-spot* ovvero "ad alta densità" di biodiversità di importanza mondiale. In tutto il mondo sono stati censiti ben 34 luoghi altamente sensibili, un numero superiore rispetto al 2000 anno in cui Myers et al. ne avevano censiti 25. In seguito, il numero di *hot-spot* è stato aggiornato e rivisitato da circa 400 specialisti (da <http://www.fondazione.systemanaturae.org>). L'Italia, con le isole tirreniche, le Alpi Marittime e Liguri, la catena appenninica, è caratterizzata da un elevato numero di specie endemiche (Blasi et al., 2005). In particolare, essa ospita circa la metà delle specie vegetali e circa un terzo di tutte le specie animali attualmente presenti in Europa. Tutto questo rispecchia il cosiddetto *gradiente latitudinale* della ricchezza di specie, secondo il quale la diversità diminuisce all'aumentare della latitudine, cioè spostandosi dall'equatore verso i poli (Zullini, 1999). Per quanto

riguarda la biodiversità del mondo vegetale, la flora vascolare italiana comprende quasi 7.000 specie, di cui il 16% sono specie endemiche (dati ISPRA). Tuttavia, l'antropizzazione di molte aree e la distruzione, a scopo di lucro, di diversi ambienti naturali, minacciano seriamente la biodiversità italiana.

Su scala mondiale, i principali fattori di perdita di biodiversità animale e vegetale sono la distruzione, la degradazione e la frammentazione degli habitat, a loro volta causate da calamità naturali ma anche dai profondi cambiamenti del territorio spesso prodotti dall'uomo. Molte aree selvatiche sono state oggetto di indiscriminati prelievi di piante o parti di piante per le industrie farmaceutica o cosmetica; anche nei paesi ricchi e più industrializzati continua la perdita di biodiversità per via della distruzione di *habitat* naturali o semi-naturali, per la costruzione di infrastrutture a spese della campagna, del bosco, dell'area umida, della prateria.

L'alterazione del clima, sia su scala globale che locale, ha già prodotto significativi effetti sulla biodiversità, in termini di distribuzione delle specie e di mutamento dei cicli biologici; alcune specie sono talmente legate alle condizioni climatiche che piccole variazioni di temperatura, o di qualunque altro parametro climatico, possono aumentare la loro vulnerabilità e comprometterne l'esistenza. L'evidenza degli impatti dei cambiamenti climatici sulla biodiversità e sugli ecosistemi terrestri, acquatici e montani è particolarmente avvertita anche in Italia (Piccini, 2010).

L'inquinamento, causato dalle attività umane ha alterato profondamente i cicli vitali di specie vegetali, animali e dei microorganismi che, ad esempio, vivono nel suolo. L'introduzione in un territorio di specie alloctone, cioè originarie di altre aree geografiche, può rappresentare un ulteriore consistente azione di disturbo. È stato valutato che circa il 20% dei casi di estinzione di uccelli e mammiferi è da attribuirsi all'azione diretta di animali introdotti dall'uomo. Ciò può essere dovuto a diverse cause: alla competizione per risorse limitate, alla predazione da parte della specie introdotta e alla diffusione di nuove malattie.

La grande ricchezza di specie di un paese è determinata dalla evoluzione *in situ* del germoplasma locale, dall'apporto derivante da altre aree, dalle millenarie attività antropiche di domesticazione e di miglioramento genetico, dalle testimonianze storiche che rimandano alle culture del passato (Fideghelli e Engel, 2011).

L'interazione tra fattori ambientali e antropici è sempre stata presente così come la pressione selettiva esercitata dall'uomo nel corso dei secoli, che ha portato alla selezione di numerose varietà vegetali e razze animali localmente idonee ai caratteri ambientali, alle esigenze colturali e alla necessità delle economie di sussistenza o di mercato. La agrobiodiversità è divenuta in tal modo un grande patrimonio in quanto ha consentito di disporre di genotipi idonei all'ambiente colturale, resistente agli stress ambientali e con una maggiore tolleranza alle fitopatie.

Da anni ormai si rileva un costante processo di perdita di biodiversità intraspecifica che richiama la comunità scientifica a prestare sempre maggiore attenzione ai fenomeni di "erosione genetica" che sottopongono a rischio di estinzione tanto specie vegetali quanto razze animali di interesse agrario. A titolo indicativo, per le risorse agrarie vegetali, la FAO nel 1993 ha stimato una perdita già accumulata di circa il 75% del patrimonio disponibile all'inizio del secolo scorso dimostrando la concretizzazione del grido di allarme lanciato in merito al declino e/o estinzione delle specie, e alla conseguente restrizione del "pool" genico della stessa, già un ventennio prima (Scarascia Mugnozza, 1974). Non c'è dubbio che la moderna agricoltura intensiva, basata sull'allevamento di un limitato numero di specie e varietà, ha giocato un ruolo non indifferente sulla diminuzione della diversità negli agro-ecosistemi. Per tale ragione, la conservazione della biodiversità finalizzata all'uso sostenibile delle sue componenti e all'equa ripartizione dei benefici che derivano dall'utilizzo delle risorse genetiche, ha posto particolare fiducia su quanto operato attraverso la salvaguardia dell'agrobiodiversità, dalla quale dipende la sicurezza alimentare e la stabilità ambientale, soprattutto in certe aree del mondo.

Come è noto, la variazione fenotipica, ovvero la variazione fra individui all'interno di una popolazione, è la risultante dell'azione congiunta di una componente ambientale e di una genetica (Johannsen, 1926). L'uomo, nei millenni, ha sfruttato la variabilità genetica in un primo tempo inconsapevolmente, in seguito attraverso l'applicazione di principi di selezione. In questo modo ha ottenuto diversi risultati: incremento quantitativo delle produzioni agricole, difesa delle colture attraverso lo sfruttamento delle resistenze genetiche a fattori biotici e abiotici, etc. Ciò evidenzia come il miglioramento della specie oggetto di selezione sia strettamente in relazione alle

differenze genetiche tra individui (variabilità genetica) ma nello stesso tempo indica quanto sia vulnerabile in caso di restrizione o perdita se va incontro ad erosione genetica (Ricciardi e Filippetti, 2000). Dal punto di vista evolucionistico il declino e l'estinzione di una specie possono essere considerati fenomeni biologici normali. Ma la preoccupazione maggiore è l'intensità della frequenza con cui questo si sta verificando. La storia dell'umanità è disseminata di esempi che rendono molto l'idea di cosa significhi la perdita della biodiversità. La carestia che ha colpito l'Irlanda e il resto d'Europa nel 1845, causando la morte di oltre 2 milioni di persone, fu causata da *Phytophthora infestans* parassita fungino della patata. A quel tempo, la patata coltivata apparteneva ad un ristretto "pool" genico originario del Sud America che essendo particolarmente suscettibile al parassita fu letteralmente distrutta (Andrison, 1996). Altri esempi potrebbero essere ricordati, quali la distruzione di piantagioni di caffè, la comparsa in Italia della peronospora del tabacco negli anni '60, gli attacchi sul mais da una razza fisiologica particolarmente aggressiva di *Helminthosporium maydis* negli anni '70 in America (Goidànich, 1994).

Per le risorse genetiche frutticole la letteratura specializzata riporta numerosi esempi che sottolineano una grande perdita di biodiversità in un settore produttivo che pur annovera in Italia oltre 3.065 cultivar/accessioni ancora conservate presso diverse istituzioni (dati Mi.P.A.A.F. 2002).

Per l'area mediterranea si attendono maggiori rischi di estinzione per diverse specie terrestri; specialmente nel Meridione d'Italia e in aree montane le specie endemiche mediterranee affronteranno le minacce maggiori, a causa della prevista riduzione delle precipitazioni e nello stesso tempo l'aumento di fenomeni estremi alluvionali, della maggiore intensità degli incendi, dell'aumento dei fenomeni erosivi. Le pratiche agronomiche razionali, ma anche il mantenimento di aree colturali a frutto in collina e montagna, assumono oggi un ruolo preminente nella protezione dell'ambiente e nella gestione sostenibile di ecosistemi misti agro-silvo-pastorali, concorrendo a migliorare, mediante opportune sistemazioni idrauliche e inerbimenti controllati, la regimazione delle acque in eccesso, la lisciviazione dei nutrienti e l'erosione. Se nel recente passato la linea di tendenza adottata è stata quella di sostituire le vecchie varietà, in gran parte ormai obsolete sotto il profilo agronomico e produttivo,

con materiale genetico di più moderna concezione, da qualche tempo si sta assistendo ad un rinnovato interesse, teso alla rivalutazione e valorizzazione della “frutta antica” (Neri e Virgili, 2002).

Cultivar dai nomi e dai sapori quasi dimenticati, ma soprattutto contraddistinte da particolari caratteristiche organolettiche, dotate di estrema rusticità e resistenti alle più diffuse avversità, rappresentano un patrimonio genetico di interesse ineguagliabile, in grado di concorrere ad assecondare la crescente esigenza di maggiore ‘naturalità’ delle produzioni.

Il comparto agricolo siciliano, per le condizioni climatiche favorevoli di cui beneficia il territorio regionale, è caratterizzato da produzioni ortofrutticole di ottima qualità, concorrenziali rispetto alle altre produzioni nazionali ed estere, che, anche grazie alle peculiarità climatiche dell’Isola, coprono un calendario di offerta molto ampio. Oltre alle produzioni “ordinarie”, la Sicilia si caratterizza per la presenza di uno straordinario patrimonio di produzioni ortofrutticole di eccellenza che godono della certificazione di qualità e tutela (DOP, IGP, STG, PTN, Presìdi Slow Food). I livelli di riconoscimento che l’Unione Europea ha stabilito (DOP, IGP, STG) rappresentano una valida strategia che mira alla valorizzazione non solo delle produzioni agroalimentari ma anche del territorio in cui sono prodotte. La tutela è diretta verso quelle produzioni che possono o meno vivere una condizione di criticità (rischio di estinzione reale o potenziale) ovvero semplicemente perché legati alla memoria e all’identità storica – culturale di un territorio nel quale manifestano peculiarità ampiamente riconoscibili: si tratta di varietà o ecotipi autoctoni che sono tradizionalmente coltivate da molto tempo in aree delimitate (in quantità limitata, con pratiche tradizionali, da aziende di piccole dimensioni) e con caratteristiche qualitative (organolettiche soprattutto) peculiari, dovute allo stretto legame ambientale con uno specifico territorio ai quali si legano specifiche trasformazioni che, molto spesso, creano anche un indotto economico ristretto ma di eccellenza. Pertanto, in un mercato con sempre maggiore competizione, i prodotti di qualità certificata possono rappresentare un punto di forza per lo sviluppo dei sistemi agroalimentari locali.

## CENNI DI LEGISLAZIONE LEGATA ALLA TUTELA DELLA BIODIVERSITÀ VEGETALE

Il percorso legislativo per la conservazione e la tutela della biodiversità è piuttosto recente ma anche ricco di tappe.

A partire dagli anni '70, soprattutto a seguito delle ripetute crisi energetiche legate molto spesso alla costante riduzione di fonti petrolifere, è cresciuta sempre più l'attenzione del mondo politico e dell'opinione pubblica verso i concetti di sviluppo sostenibile, con l'obiettivo di un atteggiamento civile basato sull'uso razionale delle risorse naturali esistenti per non comprometterne la disponibilità, ovvero un'attenzione sempre maggiore allo sfruttamento di risorse realmente rinnovabili.

Storicamente, le Convenzioni internazionali per la conservazione della natura si sono mosse primariamente verso la protezione di mari e coste dall'inquinamento da petrolio e della flora e della fauna di specifici contesti geografici regionali; successivamente hanno posto l'attenzione sulla conservazione delle risorse naturali (anni '70 del secolo scorso), per giungere, infine, ai principi dettati dalla Conferenza di Rio de Janeiro (1992) che ha segnato la svolta decisiva.

Appare dunque evidente che solo a partire dagli anni '70 si può parlare effettivamente di politiche mirate alla tutela della biodiversità e una delle prime tappe di tale importante percorso è segnato dalla **Conferenza ONU “Human Environment” di Stoccolma**, tenutasi il 16 giugno del 1972 con la partecipazione dei rappresentanti di 110 Paesi. Per la prima volta, si prende coscienza del fatto che la risoluzione delle questioni ambientali richiede lo sforzo congiunto di tutti i Paesi a livello mondiale. La dichiarazione di Stoccolma ha il grande merito, nel percorso politico, di aver portato al riconoscimento del valore delle risorse naturali; nei suoi 26 principi si afferma la necessità di salvaguardare le risorse ambientali per il bene dell'uomo e delle generazioni future, conferendo piena responsabilità, in tale azione di tutela, alle istituzioni nazionali per il controllo delle risorse presenti nei propri territori. È, inoltre, riconosciuto il ruolo fondamentale della ricerca scientifica e tecnologica nell'identificazione, controllo e risoluzione dei pericoli ecologici. Ulteriore merito è stato quello di aver portato alla costituzione, nel 1974, dell'*International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR)*,

in seguito divenuto *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), e dal 2006 rinominato Bioversity International (BI)

Anche la **Convenzione di Berna** ha rivestito un ruolo importante per la conservazione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa; sottoscritta nel 1979, pone l'accento sulla necessità che gli Stati aderenti avviino una cooperazione finalizzata a politiche per la protezione e la conservazione della flora e della fauna, in particolar modo delle specie in via di estinzione e dei loro habitat naturali.

Il concetto di diversità genetica compare per la prima volta nella **IUCN - Strategia mondiale per la conservazione** sottoscritta nel 1980, con la quale si evidenzia per la prima volta la stretta relazione esistente tra conservazione e sviluppo. Nello stesso anno si assiste alla costituzione dell'*European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources* (ECPGR) ovvero di un programma di collaborazione tra Paesi della Comunità Europea con l'obiettivo di contribuire alla conservazione, alla gestione e all'utilizzo delle Risorse Genetiche Vegetali (RGV) *ex situ* e *in situ*.

Nel 1983, in occasione della Conferenza FAO, è stato stipulato il primo accordo internazionale sulle risorse genetiche vegetali per l'agricoltura e l'alimentazione (RGVAA), costituendo l'*Inter-Governmental Commission on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, ovvero la stessa Commissione che, in seguito, ha negoziato il **Trattato internazionale sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura (2001)**.

E' la **Conferenza di Rio de Janeiro**, la **United Nations Conference of Environment and Development**, tenutasi nel 1992 e conosciuta come **Earth summit**, che inequivocabilmente segna una tappa decisiva nel cammino politico verso la conservazione della biodiversità. E' da essa, infatti, che prende vita tutta la legislazione nazionale ed internazionale finalizzata alla salvaguardia e conservazione delle risorse genetiche molto più articolata e mirata rispetto a quella precedente. Dalla Conferenza di Rio, alla quale prendono parte i rappresentanti di 178 Paesi e più di mille organizzazioni non governative, scaturiscono due convenzioni e tre dichiarazioni di principi che hanno come obiettivi comuni "la conservazione della diversità biologica, l'uso sostenibile e la giusta ed equa condivisione dei benefici derivanti dall'uso delle risorse genetiche...".

Tra queste, **Agenda 21** rappresenta uno dei più importanti documenti e la base di partenza per tutti gli atti politici che seguiranno alla Conferenza.

A partire dal 1992, l'Europa elabora accordi internazionali tra i membri della Comunità Europea per realizzare gli obiettivi fissati dalla Conferenza di Rio. Contestualmente, per rendere operativi gli accordi firmati a Rio de Janeiro, l'UE approva, sempre nel '92, il **5° Piano di azione ambientale** col quale si auspica un coinvolgimento di tutti i settori della società. L'impegno della Comunità europea finalizzato a raggiungere gli obiettivi fissati alla Conferenza di Rio si concretizza anche nell'emanazione della **Direttiva 92/43/CEE**, conosciuta come **Direttiva Habitat**, con la quale si riconosce l'interesse e la responsabilità comunitaria delle specie in pericolo. Viene inoltre istituita la **Rete Natura 2000**, una rete ecologica europea di zone speciali di conservazione e, sempre in linea coi principi dettati durante la Conferenza di Rio, si riconosce un ruolo fondamentale alla ricerca e alle attività scientifiche al fine di perseguire gli obiettivi della direttiva. Gli obiettivi di Agenda 21 vanno ovviamente focalizzati anche su base nazionale e a tal fine l'ONU prescrive ad ogni nazione aderente alla Convenzione di dotarsi di un proprio piano di azione entro il 31 dicembre 1993. Così, l'Italia adotta nel 1993 il **Piano Nazionale per lo sviluppo sostenibile in Italia** che rappresenta il primo intervento italiano sull'ambiente con carattere interministeriale prevedendo azioni in diversi settori: industria, agricoltura, turismo, energia, trasporti, rifiuti. Tale piano, sulla base dei settori chiave indicati dalla Comunità Europea nel 5° Piano di azione ambientale, individua gli obiettivi e le azioni più idonei alla situazione ambientale e alle caratteristiche socio-economiche del Paese. Il problema della conservazione delle risorse naturali e della biodiversità è diventata oggetto importante di discussione delle politiche comunitarie e attraverso il **Regolamento CE 1257/99** vengono previsti aiuti comunitari ricavati dal FEOGA per tutte quelle forme di conduzione delle aziende agricole improntate alla tutela dell'ambiente e alla conservazione della diversità genetica. A livello nazionale, la promulgazione della **legge n° 394 del 6 dicembre 1991**, con l'istituzione e la gestione delle aree protette, mette in luce anche un concetto fino a quel momento non considerato: la salvaguardia dei valori antropologici, storici e tradizionali, conferendo così alle risorse naturali nuove valenze che si vanno ad aggiungere a quella puramente ecologica.

Nel corso della **4<sup>a</sup> Conferenza tecnica internazionale sulle risorse genetiche vegetali** a Leipzig (1996), i rappresentanti di 150 Paesi danno vita ad un vero e proprio piano di azione internazionale per la conservazione della biodiversità, il **Global Plan of action for the conservation and sustainable use of plant genetic resources for food and agriculture**, che focalizza l'attenzione sull'importanza delle risorse genetiche vegetali per la sicurezza alimentare mondiale. Contestualmente, è riconosciuta anche l'importanza di rafforzare e sostenere le collezioni *ex situ* e gli habitat *in situ* auspicando una collaborazione tra il settore della ricerca e gli agricoltori. Il *Global plan of action*, fornendo la base per le attività di conservazione *in situ* ed *ex situ* e per l'uso sostenibile delle risorse genetiche, rappresenta un importante elemento del **FAO Global system for conservation and utilization of plant genetic resources**. Esso pone l'accento sulla necessità di promuovere una condivisione dei benefici provenienti dall'uso delle risorse genetiche vegetali e dall'uso di conoscenze tradizionali, nonché dall'uso di innovazioni, riconoscendo i diritti degli agricoltori all'accesso al germoplasma, alle tecnologie, alle risorse finanziarie e ai sistemi di ricerca necessari per continuare a gestire le risorse genetiche. Viene affermato il concetto della necessità di un legame tra conservazione ed uso, riconoscendo così alle risorse genetiche un ruolo vitale nell'economia agricola mettendo in evidenza l'importanza del metodo di conservazione *on farm*. Vengono fornite a tal punto istruzioni sia per la conservazione *in situ* sia per quella *ex situ*, la necessità di un inventario delle risorse, di incentivare conseguentemente le attività di conservazione mediante finanziamenti agli agricoltori che continuano a coltivare e propagare materiale appartenente al germoplasma locale. Alla base di tutto è ritenuto fondamentale, il monitoraggio e il mantenimento del materiale già conservato *ex situ* e la valutazione dello stato di conservazione.

A livello comunitario la presa di coscienza nei riguardi dei temi ambientali si esplicita pienamente nel momento in cui, con la sottoscrizione del **Trattato di Amsterdam**, nel 1997, la tutela ambientale diviene principio costituzionale dell'Unione Europea e la politica comunitaria a tutela dell'ambiente viene posta sullo stesso piano delle altre politiche dell'UE.

In seguito, con il **Trattato Internazionale sulle Risorse Genetiche Vegetali per l'Alimentazione e l'Agricoltura** del 2001, divenuto operativo nel 2004, è stato

firmato un accordo internazionale legalmente vincolante che disciplina la conservazione, l'uso sostenibile e la condivisione dei benefici delle specie vegetali utilizzate in agricoltura. Di grande rilievo è la costituzione del **Sistema Multilaterale** che, nell'allegato I del Trattato, ha individuato 64 specie vegetali coltivate, essenziali per l'alimentazione umana, rendendo accessibili le informazioni relative a queste accessioni.

Nel 2003, in occasione della **Sesta Conferenza Internazionale delle Nazioni**, con la firma della **Convenzione sulla Diversità Biologica**, 123 governi hanno assunto l'impegno politico di ridurre significativamente la perdita di biodiversità a livello nazionale e regionale, con interventi sia di tipo indiretto che diretto. Gli interventi indiretti sono quelli che si pongono l'obiettivo di ridurre le influenze negative esercitate dai fattori di perdita della biodiversità: il controllo delle emissioni di sostanze inquinanti, la tutela della qualità delle acque, la diminuzione dei consumi e degli sprechi, la ricerca di fonti energetiche "alternative" ed ecologiche, la limitazione nella produzione e nell'uso di materiali sintetici che non riescono ad essere smaltiti dall'ambiente. Gli interventi diretti sono invece quelli che mirano alla conservazione delle specie e degli ecosistemi attraverso leggi e norme, continuamente rafforzate ed aggiornate alla luce di sempre nuove problematiche che possono manifestarsi.

L'esempio forse più significativo di questo tipo di interventi è la creazione di *aree naturali protette*, il cui scopo principale è quello di preservare paesaggi, formazioni geologiche, flora, fauna, ambienti marini, ma soprattutto di sperimentare e promuovere modi diversi e più sostenibili di utilizzare le risorse naturali.

Nel 2007, la UE ha posto un limite temporale entro cui arrestare la perdita della biodiversità, inizialmente nel 2010; in seguito al fallimento dell'obiettivo è stata definita una nuova strategia da realizzare entro il 2020 con l'obiettivo di proteggere, valorizzare la biodiversità e gli ecosistemi entro il 2050 (Fideghelli e Engel, 2011).

Nell'ambito dell'ECPGR, l'Italia, da sempre fortemente coinvolta, è presente nella quasi totalità dei gruppi di lavoro tra i quali si citano i gruppi *Brassica*, *Prunus*, *Specie da fibra* e *On farm*. Per ciascun gruppo e per ciascuna specie esiste un *database* europeo con tutte le informazioni disponibili per tutte le accessioni. Tra questi si riportano quello sui fruttiferi minori (dipartimento DISPA – Università di Firenze) e

quello sulla canapa gestito da CRA-CIN di Bologna. L'Italia ha ratificato la Convenzione sulla Biodiversità con la legge n.124 del 1994 attraverso lo sviluppo di strategie, piani e programmi per la conservazione *in situ* ed *ex situ* della biodiversità. Le competenze ministeriali appartengono al Ministero dell'Ambiente sulle strategie indicate dalla Convenzione sulla Diversità Biologica e al Ministero delle Politiche Agricole relativamente alle risorse genetiche di interesse agricolo (Fideghelli e Engel, 2011).

La politica di Sviluppo Rurale della UE, rappresenta con oltre il 40% del complessivo bilancio dell'Unione, il "secondo pilastro" della **Politica Agricola Comune** (PAC), fondamentale opportunità per il miglioramento ambientale nelle aree rurali, per l'aiuto alla conversione dei sistemi agricoli verso pratiche più sostenibili e per la formazione di agricoltori più responsabili. I Programmi di Sviluppo Rurale 2000-2006 e 2007-2013 hanno messo a disposizione delle regioni e Province autonome somme importanti al fine di attivare le necessarie strategie di recupero e conservazione della biodiversità. Inoltre sono concessi aiuti agli agricoltori che si impegnano a coltivare le varietà autoctone iscritte negli appositi Registri regionali.

L'analisi dei PSR italiani rileva un panorama complesso, con estreme disparità tra Regioni. Se alcune Regioni italiane possono probabilmente vantare una posizione vicina al *top* della "classifica Europea", altre purtroppo sono veri e propri fanalini di coda. Fondi sono stati stanziati per il completamento dei piani di gestione della **Rete Natura 2000** e molte misure positive sono state introdotte. Particolarmente incoraggiante è l'esclusione dai nuovi piani di molti finanziamenti che in passato hanno incentivato attivamente la distruzione di importanti habitat (come era il caso degli imboschimenti, lo spietramento dei pascoli). Alcuni degli ambienti agricoli più importanti e più minacciati d'Italia, in particolare le aree steppiche e i pascoli estensivi aridi, non ricevono pressoché nessun sostegno. Ciò lascia essenzialmente indifese molte specie vegetali e animali preziose.

Il Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale (**FEASR**) rappresenta circa il 23% delle risorse totali che l'Unione Europea assegna alla Politica Agricola Comune per il periodo 2007-2013. Le risorse destinate all'asse 2 dovrebbero contribuire alla biodiversità, alla preservazione e allo sviluppo dell'attività agricola, di sistemi forestali

ad elevato valore naturale e dei paesaggi agrari tradizionali, come stabilito dagli orientamenti strategici comunitari per lo sviluppo rurale (Decisione del Consiglio dell'Unione Europea 2006/144/CE).

Tutte le misure che i **Piani di Sviluppo Rurale** inseriscono nell'Asse 2 devono possedere obiettivi chiari e misurabili che vanno approvati dalla Commissione Europea e che devono essere coerenti con il Piano Strategico Nazionale per lo Sviluppo Rurale (PSN).

La programmazione Regionale nell'ambito dello Sviluppo Rurale 2007-2013 prevede, all'interno della *misura 214 Pagamenti Agroambientali*, specifiche azioni per la conservazione della biodiversità animale e vegetale.

Le più importanti iniziative a livello regionale sul tema della tutela della biodiversità agraria vegetale e animale sono state sostenute e attuate attraverso il **Piano di Sviluppo Rurale 2000-2006** e attualmente attraverso la **programmazione 2007-2013**. La scorsa programmazione, per quanto riguarda la **biodiversità vegetale**, prevedeva aiuti per quegli agricoltori che assumevano un impegno quinquennale per coltivare in azienda varietà locali iscritte nell'elenco del PSR regionale di "*Coltivazione di varietà locali autoctone in via di estinzione*". L'azione prevede aiuti a favore: degli imprenditori che si impegnano "*in situ*" a coltivare e conservare gli ecotipi locali elencati nel PSR o a moltiplicare le varietà locali secondo un apposito disciplinare. Nella programmazione 2007-2013, il Piano Strategico Nazionale (**PSN**) individua in modo chiaro gli ambiti di intervento considerati più significativi per la strategia nazionale ed assegna oltre il 40% delle risorse disponibili a interventi direttamente riconducibili al settore ambientale e alla protezione della biodiversità con il duplice obiettivo di:

1. Sostenere la coltivazione di almeno una delle varietà vegetali autoctone a rischio di erosione genetica;
2. Sostenere Enti ed agenzie pubbliche per la conservazione delle risorse genetiche vegetali, secondo l'art. 39 par. 5 del Reg. (CE) 1698/05.

L'azione o sottoazione a sostegno della conservazione delle risorse genetiche i cui beneficiari sono Enti ed agenzie pubbliche, Istituti di ricerca, Regione e Agenzie

regionali, prevede, sia nel caso di razze animali che di varietà vegetali, una serie di attività, fra le quali:

- Il censimento, la catalogazione e la caratterizzazione delle risorse genetiche,
- la conservazione *ex situ* attraverso la realizzazione di banche del seme o campi catalogo,
- l'informazione, la divulgazione e la consulenza che coinvolgono le aziende agricole, le organizzazioni non governative, gli altri enti pubblici territoriali, corsi di formazione e redazione di rapporti tecnici,
- l'agevolazione della conservazione *in situ*, nell'azienda agricola ed *ex situ* degli ecotipi locali a rischio di estinzione.

Alcune Regioni introducono come beneficiari degli interventi due specifiche figure: l'*Agricoltore custode* (Sicilia, Veneto) e l'*Allevatore custode* (Veneto). Questi sono agricoltori e allevatori, che esercitano la pratica agricola nell'ambito del territorio regionale e che svolgono il ruolo di custodi della biodiversità, attraverso l'impiego e la conservazione di risorse genetiche locali. In Sicilia, all'agricoltore custode è assegnato più specificamente il ruolo di attore principale nella conservazione della biodiversità *ex situ*; attraverso la misura 214/2 az. B, infatti, l'agricoltore mette a disposizione una superficie agricola e realizza, in piena sinergia con l'istituzione pubblica, un campo di conservazione di specie, cultivar ed ecotipi a più forte rischio di estinzione.

L'agricoltura rappresenta, pertanto, uno dei settori più impegnati nel conseguimento dell'obiettivo di "Arrestare il declino della biodiversità" sancito nel Consiglio Europeo di Goteborg e ribadito come ambizioso obiettivo per il 2020 dal Consiglio Europeo del 2010, nonché dal piano di implementazione della Convenzione Internazionale sulla Diversità Biologica definito dalle risoluzioni della decima Conferenza delle Parti (CBD, 2010).

Il processo di Health Check e l'ultima riforma della PAC del 2009 hanno rinvigorito il sostegno a favore delle misure ambientali, compresa la relativa dimensione finanziaria. La politica agricola comunitaria, rappresenta, pertanto, una notevole opportunità per la conservazione della biodiversità, non solo per il consistente aiuto finanziario che può fornire, ma anche per le azioni di sensibilizzazione degli operatori

sui temi della biodiversità, per l'incremento dell'interazione tra soggetti istituzionali diversi, per la diffusione delle informazioni e lo sviluppo di sinergie.

## I METODI DI CONSERVAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ VEGETALE: CONSERVAZIONE *IN SITU* ED *EX SITU* – CONSERVAZIONE *IN VIVO* E *IN VITRO*

La salvaguardia del germoplasma rappresenta, quindi, un punto cardine nel mantenimento dell'agrobiodiversità e nella riduzione dei suoi ritmi di erosione genetica. Queste risorse possono essere conservate con due metodologie differenti: conservazione *in situ* ed *ex situ* (Ledig, 1986; Finkeldey e Gregorius, 1994). La conservazione "*in situ*" focalizza l'attenzione sulla conservazione di geni, specie ed ecosistemi nel loro ambiente di naturale sintesi e diversificazione, attraverso la creazione, ad esempio, di aree protette, la riabilitazione degli ecosistemi degradati e l'applicazione di quanto previsto dalla legislazione di tutela delle specie minacciate; la conservazione "*ex situ*" comprende i giardini zoologici, i giardini botanici e le banche genetiche per la tutela delle specie nonché tutto quanto realizzato con tale metodologia da diverse istituzioni di ricerca (Università, CNR, ENTECRA). La conservazione delle varietà locali, sia arboree che erbacee, avviene utilizzando strategie complementari fra di loro. La conservazione *on farm* delle diverse varietà, attuata dalle popolazioni residenti, rappresenta la forma più opportuna perché vengono mantenute così anche le tradizioni culturali delle stesse. A questo metodo si affianca la conservazione *ex situ* presso banche del germoplasma o del seme, le collezioni *in vitro* e la conservazione *in vivo* presso campi collezione o campi catalogo.

Le linee guida attualmente messe in atto mirano essenzialmente al monitoraggio, inventario e caratterizzazione delle risorse genetiche attraverso le attività di conservazione sopramenzionate e la programmazione di banche dati. Un più diffuso utilizzo delle biotecnologie nel campo della conservazione del germoplasma non può che rappresentare un valido aiuto al conseguimento di tali obiettivi. Per diverse specie arboree del bacino mediterraneo come quelle afferenti ai generi *Malus* e *Pyrus*, nonché diverse specie di *Prunus*, *Olea*, *Citrus* e *Vitis*, l'intervento conservativo ha portato all'allestimento di interessanti collezioni presso numerose istituzioni scientifiche. Inoltre, grazie al sempre maggiore interesse per specie minori come fico, ficodindia, melograno, giuggiolo, gelso, corbezzolo etc. si sta attuando una serie di azioni di tutela e salvaguardia (Russo e Potenza, 2009).

Le strategie conservative devono adattarsi alle caratteristiche biologiche delle specie. La conservazione di specie a propagazione gamica e con semi “ortodossi”, con contenuto di umidità intorno al 4-6%, non presenta grandi difficoltà qualora mantenuti a temperature variabili tra i -20°C (lunga conservazione) e 0-4°C (breve periodo). Altre specie, definite “recalcitranti”, non tollerando la disidratazione, richiedono accorgimenti e metodiche particolari (Russo e Potenza, 2009). Per tali specie è preferibile la conservazione allo stadio vegetativo *ex situ* attraverso le colture *in vitro* che necessitano di poco spazio, consentono di disporre tutto l’anno di materiale vegetale, consentono in alcuni specifici casi il risanamento da malattie a partire da espianti meristematici, e hanno, in definitiva, un minore costo di gestione. La coltura *in vitro* può essere fatta a normali condizioni di temperatura per brevi periodi ma la necessità di periodiche subcolture potrebbe rendere difficoltoso il mantenimento della stabilità genetica. Nel medio e lungo periodo possono essere adottate altre metodiche *in vitro* quali, rispettivamente, la crescita rallentata e la crioconservazione che hanno il vantaggio, tra gli altri, di una maggiore copertura contro una eventuale variabilità somaclonale attraverso la riduzione del numero delle subcolture per anno (De Carlo *et al.*, 2009).

In tale contesto e con questi presupposti, va sottolineato che la realizzazione di una banca del germoplasma in ambiente asettico necessita di una serie di presupposti quali la conoscenza di appropriati protocolli di coltura *in vitro* per la successiva conservazione delle varietà locali e/o ecotipi locali di particolare interesse agrario e ornamentale, il risanamento fitosanitario del materiale selezionato, lo sviluppo dei protocolli di ambientamento e per l’acclimatamento *in vivo*.

L’individuazione degli ecotipi di importanza agraria da conservare può essere effettuata facendo riferimento alle liste di specie e varietà locali riportate nei Piani di Sviluppo Rurale che comprendono anche le specie e gli ecotipi previsti dal piano agroambientale della Regione di appartenenza per l’attuazione del Reg. UE n. 2078/92. L’individuazione delle specie floristiche rare è invece attuabile facendo riferimento all’elenco regionale delle specie vulnerabili riportate nella Lista Rossa dell’ IUCN, al “*Red list delle piante d’Italia*”. La successiva moltiplicazione *in vitro* dovrebbe essere finalizzata al mantenimento o alla radicazione e successivo acclimatamento con il trasferimento nell’ambiente esterno.

Un aspetto particolarmente importante è l'isolamento, la caratterizzazione e il mantenimento di batteri e funghi presenti sull'espianto proveniente dal materiale vegetale selezionato per la collezione. Infatti durante le fase di adattamento *in vitro* dell'espianto, sarebbe opportuno isolare, caratterizzare e mantenere i batteri ed i funghi che si sono sviluppati, in opportuni terreni di coltura. Tali microrganismi sono di fondamentale importanza sia nella fase di acclimatemento in serra che nella fase di reintroduzione in ambiente naturale. La possibilità di poter colonizzare l'ambiente con i microrganismi naturalmente presenti sulla pianta madre e nel suolo di origine, potrebbe limitare lo sviluppo di microrganismi patogeni (Garbeva et al., 2004). L'associazione naturale microrganismo-pianta, ricreata durante l'acclimatemento in serra, potrebbe favorire lo sviluppo in ambiente naturale e rappresenta ancora oggi un obiettivo ad alta significatività naturalistica ed ambientale il cui raggiungimento è ampiamente suggerito dalle proposizioni internazionali.

La conservazione *in vivo* rappresenta un altro approccio per la tutela della biodiversità che può anche racchiudere in sé un valore altamente educativo: la realizzazione di campi dimostrativi-didattici di varietà locali (arborei, erbacei etc.) collezionate. La conservazione *on farm* rappresenta una collezione *in vivo* di essenze vegetali (arbustive, arboree ed erbacee) di particolare interesse alla coltivazione per le quali il ruolo agronomico riesce a fungere anche da azione significativa per la conservazione. Tale attività si configura anche con la predisposizione di un catalogo varietale e di un *database* aggiornato ed aggiornabile. La creazione e la gestione di una banca dati elettronica e di un catalogo delle specie e degli ecotipi presenti in collezione deve porsi in collegamento con istituzioni internazionali quali *Bioversity International* (BI), l'istituto afferente alla rete del CGIAR (*Consultative Group of International Agricultural Research*), specializzato nelle risorse genetiche delle specie vegetali, soprattutto in quelle di interesse agrario; ma anche con reti nazionali ed internazionali quali il *Seed and Plant Genetic Resources Service* (AGPS) della FAO, con l'*International network of ex situ collections* ed il *Global Biodiversity Information Facility-GBIF* che garantisce il libero accesso ai dati relativi alla biodiversità del pianeta. Tutto ciò mette in significativa evidenza la necessità di una rete che colleghi tra loro le conoscenze e le competenze al fine di evitare inutili e costose ripetizioni, anche

su scala internazionale, e di mettere a disposizione di tutti le conoscenze specifiche che risultino di utilità al raggiungimento di obiettivi ambiziosi ma inderogabili.

Le attività di raccolta del germoplasma frutticolo finalizzate alla salvaguardia e valorizzazione delle Risorse Genetiche Vegetali per l’Alimentazione e l’Agricoltura (RGVAA) hanno trovato applicazione nella realizzazione, nel 2001, del Centro Nazionale del Germoplasma Frutticolo (CNGF), presso l’azienda del CRA-FRU di Roma che con un’area di 30 ha è destinata ad accogliere circa 12.000 accessioni appartenenti a più di 40 specie frutticole presenti in Italia provenienti da climi temperati e in alcuni casi subtropicali. Il Centro colleziona oggi anche accessioni di origine nazionale ed estera con particolare attenzione alle vecchie varietà autoctone, molto utili in quanto rappresentano un prezioso serbatoio di caratteri potenzialmente utili in programmi di miglioramento genetico e rappresentare possono concretizzarsi anche nella base per un rilancio di quelle produzioni locali ancora molto apprezzate (De Salvador *et al.*, 2011).

La Sicilia ha da sempre rappresentato uno dei più importanti e antichi centri di sviluppo e diffusione di molte specie e varietà di interesse agrario. La grande variabilità degli ambienti isolani (ambienti costieri, collinari, montani) ha consentito la grande diffusione di numerose specie agrarie, introdotte nel corso dei millenni, negli areali più idonei dove selezionarsi e adattarsi. Ciò ha comportato un incremento notevole della biodiversità in tutto il territorio siciliano.

Al fine di tutelare tale biodiversità, per la sua utilità alimentare, economico-sociale e scientifica, oltre a numerosissime iniziative che sono state concretizzate negli anni da parte delle Istituzioni scientifiche che operano sull’Isola, da alcuni anni è in corso il progetto “*Risorse Genetiche Vegetali – Sicilia*” che rappresenta un esempio esplicativo di azioni sinergiche fra varie istituzioni mirate a obiettivi comuni; vi partecipano i Distretti Periferici del Dipartimento Interventi Infrastrutturali dell’Assessorato Risorse Agricole e Alimentari della Regione Siciliana, e le seguenti Istituzioni Scientifiche: Dipartimento DEMETRA dell’Università degli Studi di Palermo, il Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA) dell’Università degli Studi di Catania; CRA-PAV di Roma; l’Istituto di Genetica Vegetale (CNR) di Palermo; il Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA)

dell'Università degli Studi di Palermo. L'obiettivo generale del progetto è quello di individuare, reperire e conservare, su tutto il territorio regionale, le risorse genetiche autoctone prevalentemente frutticole, soprattutto se minacciate da erosione genetica, oltre quello della loro valorizzazione con interventi atti a determinare ricadute positive per i produttori agricoli e per le piccole e medie imprese di trasformazione.

L'attività ha previsto e prevede tuttora un'approfondita indagine conoscitiva per l'individuazione e caratterizzazione del patrimonio vegetale autoctono, lo stato sanitario delle piante e la valutazione degli aspetti relativi alla conservazione *in vivo* ed *in vitro*. Gli areali risultati più ricchi in termini di accessioni presenti sono quelli meno soggetti ad una agricoltura intensiva che caratterizzano le zone ad orografia irregolare, i parchi e le riserve (Sottile *et al.*, 2007). E' stata utilizzata una scheda di rilevazione su cui sono state riportate, per ogni accessione rilevata, numerose informazioni tra le quali la denominazione locale, l'età della pianta, il suo stato sanitario (valutazione visiva) e le coordinate geografiche utili per la loro individuazione nel tempo sul territorio. Fino ad oggi, su tutto il territorio siciliano, sono state censite più di 2000 accessioni di fruttiferi, la maggior parte delle quali afferenti ai generi *Prunus*, *Malus* e *Pyrus*. Per molte di queste segnalazioni non è ancora stata completata una caratterizzazione biometrica per cui bisogna tenere conto che ci si troverà di fronte a possibili casi di omonimie e/o sinonimie che ne ridurranno la consistenza. Una dimostrazione degli sforzi compiuti con lo scopo di conservare *ex situ* la biodiversità cerasicola siciliana reperita è la creazione di un campo collezione in collaborazione con la Regione Siciliana all'interno della banca del germoplasma vegetale del Parco dell'Etna. A tal proposito è stato istituito un consorzio tra il Parco e l'Università degli studi di Catania denominato CEVASABI (Centro per la valorizzazione e la salvaguardia della biodiversità della Sicilia Orientale) con lo scopo di individuare, collezionare, caratterizzare e tutelare il grande patrimonio delle risorse genetiche vegetali presenti in Sicilia orientale in tutti i suoi ambienti naturali agrari e forestali (Continella *et al.*, 2011).

Il vasto numero di segnalazioni di fruttiferi censiti comprende pure quelle afferenti alle specie "minori" o a bassa diffusione, presenti spesso come esemplari unici in aree marginali o giardini privati, i cui frutti si contraddistinguono per particolari caratteristiche organolettiche e che, specialmente in passato, rappresentarono fonte

importante di alimentazione e di integrazione del reddito a livello locale. Il censimento delle accessioni di specie minori è risultato più difficoltoso a causa della inesistenza, per esse, di impianti specializzati. Le specie riconducibili a tale gruppo sono: carrubo, pistacchio, melograno, kaki, azzeruolo, corbezzolo, fico, ficodindia, gelso bianco e nero, giuggiolo, sorbo domestico, cotogno, castagno, noce, nocciolo, nespolo d'inverno, mirto e frassino. Da dati pervenuti, in seguito ai censimenti effettuati a tappeto, si è visto che vi è larga presenza di queste specie su tutto il territorio siciliano e dall'istituzione del progetto RGV – Sicilia, sono state censite circa 700 accessioni.

In definitiva, attraverso il progetto RGV e in generale attraverso le metodiche di conservazione, gli obiettivi che si intende raggiungere sono molteplici e così distinti:

- consolidamento e valorizzazione della conservazione *on farm* delle varietà locali ancora coltivate, anche attraverso la strutturazione di apposite filiere di prodotto;
- salvaguardia e valorizzazione delle produzioni tipiche locali;
- propagazione di materiale vegetale autoctono di importanza agraria e forestale a forte rischio di estinzione per la sua conservazione *ex situ*;
- creazione delle premesse per un'attività vivaistica volta alla propagazione di varietà locali destinate a soddisfare la domanda di materiale vegetale adattato all'ambiente;
- divulgazione della “cultura” della biodiversità;
- formazione di una rete di comunicazione e di scambio relative alle collezioni regionali, nazionali ed internazionali.

I risultati attesi dal punto di vista tecnico sono i seguenti:

- miglioramento della conservazione della biodiversità vegetale in Italia e in particolare in Sicilia;
- messa a punto di metodi e tecnologie per la conservazione, la propagazione (*in vitro* ed *in vivo*) e la gestione di varietà locali di potenziale importanza economica;
- creazione e potenziamento di banche del germoplasma *in vivo* e *in vitro*;
- ottenimento di protocolli per il risanamento fitosanitario del materiale vegetale in collezione;

- avvio di progetti di miglioramento genetico.

## **METODOLOGIE DI CONSERVAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ ATTRAVERSO BIOTECNOLOGIE: CRIOCONSERVAZIONE, INCAPSULAMENTO, SEME SINTETICO E CRESCITA RALLENTATA**

Dalle biotecnologie giunge oggi un ampio *range* di nuove possibilità con metodologie di conservazione *ex situ* affidate alle colture di tessuti e alla conservazione del DNA. Come già accennato, una valida alternativa per la conservazione a lungo termine è offerta oggi dalla conservazione *in vitro*, un'applicazione della micropropagazione che, sfruttando la totipotenza delle cellule vegetali, consiste nella moltiplicazione vegetativa di piante attraverso la coltura di loro espianti (organi, tessuti o cellule), in condizioni di sterilità, ricorrendo a substrati nutritivi di composizione nota ed usufruendo di condizioni ambientali controllate dal punto di vista termico e luminoso.

Ricorrendo all'applicazione di questa tecnica allo stadio vegetativo delle piante, possono essere efficacemente conservate le risorse genetiche di quelle specie che non producono frutti o semi oppure che hanno semi "recalcitranti". Infatti, non tutte le specie sono di facile conservazione: alcune producono semi recalcitranti che perdono facilmente la vitalità, o che non sopravvivono alle metodologie di conservazione come la disidratazione; altre specie possono risultare sterili o produrre pochi semi, o produrre semi altamente eterozigoti in casi in cui si tenga al mantenimento incondizionato del genoma. In questo caso, quindi, risulta più idonea una propagazione clonale.

Diverse specie tropicali e subtropicali si comportano in questo modo, vanificando le strategie convenzionali di conservazione (Roberts, 1973). Utilizzando espianti di tessuti, questa tecnica possiede anche il vantaggio non trascurabile di permettere la conservazione di una grande quantità di materiale in poco spazio e di non esporre le risorse genetiche ai pericoli ambientali. Negli ultimi tre decenni, la ricerca ha quindi svolto un importantissimo ruolo nella conservazione delle risorse genetiche vegetali. In generale gli approcci biotecnologici che hanno trovato larga applicazione nella conservazione della biodiversità si identificano in due diverse categorie:

- la conservazione a lungo termine, mediante *crioconservazione* in azoto liquido;
- la conservazione a breve-medio termine, come la *conservazione in crescita rallentata* (*slow growth storage*).

Queste metodologie innovative sono ormai una realtà nella pratica operativa e non solo, quindi, nel contesto dei laboratori sperimentali. Si stima che circa l'1% delle accessioni siano già conservate in questo modo (Lambardi e De Carlo, 2009).

L'applicazione della criogenia alla conservazione di materiale vegetale è stata introdotta nel 1968, diventando nell'arco di 40 anni una realtà estesa non solo alle colture cellulari ma anche agli organi e ai tessuti differenziati. Con questa tecnica gli organi e i tessuti (precedentemente disidratati), provenienti da coltura *in vitro*, sono stoccati alla temperatura di -196° propria dell'azoto liquido. La disidratazione si rende necessaria per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari mantenendo, quindi, inalterata l'integrità e la vitalità degli organi e dei tessuti. A queste temperature, i processi cellulari e metabolici rimangono sospesi e il materiale è conservato per lungo tempo, teoricamente illimitato. Eseguendo opportune tecniche preparatorie, la vitalità del materiale non risulta compromesso, riassumendo la sua piena funzionalità al ripristino delle condizioni standard di coltura. Questa tecnica ha già prodotto importanti risultati sperimentali ed applicativi, dimostrandosi anche utile nell'indurre il risanamento delle piante da virus, micoplasmi e batteri. Tra i suoi vantaggi si ricordano:

- gli spazi molto contenuti per la conservazione rispetto ai metodi tradizionali;
- bassi costi di conservazione (solo quelli necessari al mantenimento delle criobanche e all'acquisto dell'azoto liquido, peraltro di basso costo);
- possibilità di conservare diverse tipologie di organi e tessuti (apici da coltura *in vitro*, semi ed embrioni, polline);
- assoluta sicurezza di mantenimento delle condizioni genetico - sanitarie di partenza.

Fino al 1990, l'unica tecnica utilizzata nella crioconservazione era basata sul raffreddamento graduale dei campioni fino a -35 / -40°C, seguito dall'immersione in azoto liquido. In seguito, due differenti studi dimostrarono la possibilità di immergere direttamente gli espianti in azoto, passando nell'arco di pochi secondi da una temperatura ambiente a quella di -196°C senza compromettere la vitalità e la capacità di ricrescita (Sakai *et al.*, 1990; Fabre e Dereuddre, 1990). Ad oggi sono state sviluppate diverse metodologie e alcune varianti procedurali che si differenziano sulla modalità di esecuzione dell'ultra-raffreddamento dei campioni: a due fasi o raffreddamento

controllato (da temperatura ambiente o 0°C a -35 / -40 °C e poi a -196°C), o ad immersione diretta (da temperatura ambiente o 0°C a -196°C). Questa ultima procedura, sebbene presupponga una necessaria fase preparatoria dei campioni, presenta il vantaggio dei costi contenuti. La necessaria fase preparatoria deriva dal fatto che le cellule, sottoposte a raffreddamento rapido, possono subire danni irreversibili a causa della formazione di cristalli di ghiaccio extra ed intra-cellulare. In particolare questi ultimi, accrescendosi, indeboliscono la membrana cellulare causandone la rottura e la morte delle cellule stesse. Per prevenirne la formazione, è necessario disidratare gradualmente le cellule in modo tale che le molecole di acqua residue non siano più in grado di innescare la formazione di ghiaccio per “nucleazione”. Questa condizione permette anche di raggiungere la fase della “vitrificazione cellulare” termine che si riferisce alla solidificazione di un liquido senza cristallizzazione prevenendo la formazione di insidiosi cristalli di ghiaccio intra-cellulari. Questo stato fisico, caratterizzato da un’alta viscosità e da una consistenza amorfa e “vetrosa” della soluzione citoplasmatica e innescato dal raffreddamento e dalla maggiore concentrazione della soluzione, può essere attuato attraverso tre modalità:

1. *Ultra-raffreddamento a due fasi*, che determina una criodisidratazione cellulare (*slow cooling* o *slow freezing*). Se la disidratazione non oltrepassa il limite di tolleranza della cellula, la vitalità delle cellule risulta garantita dopo la immersione in azoto liquido. Il raffreddamento controllato è condotto generalmente con una velocità di -0.5°C / -2°C al minuto con successiva immersione in azoto liquido (Engelmann, 2004). I tassi di raffreddamento possono spingersi a valori molto più bassi (anche -0.1°C al minuto) come evidenziato in prove sperimentali condotte su *Mentha* spp. da Uchendu e Reed (2007). A tal fine, sono disponibili sofisticati congelatori programmabili (collegati ad un software) che funzionano mediante azoto liquido circolante. Altri strumenti sono particolari provette come i *cryovials* parzialmente riempite con isopropanolo che garantisce una velocità di raffreddamento di circa -1°C al minuto. Attraverso questa modalità a due fasi, ad oggi sono conservate oltre 5000 linee embriogeniche di conifere al British Columbia in Canada (Engelmann, 2004), callo embriogenico di *Musa* (Panis e Thinh, 2001) presso l’Università Cattolica di Leuven (Belgio). Sebbene questa tecnica sia ancora oggi utilizzata, è da rilevare la presenza di alcuni limiti applicativi, primo fra

tutti la necessità di munirsi di costose e sofisticate attrezzature (criorefrigeratori a decremento termico controllato) e la scarsa ripetibilità dei risultati quando si vogliono conservare organi più complessi come le gemme (Kartha and Engelmann, 1994).

2. *Osmodisidratazione indotta dall'utilizzo di crioprotettivi.* I crioprotettivi sono sostanze che applicate agli espianti proteggono le cellule dall'ultraraffreddamento rapido secondo modalità di azione differenti e legate essenzialmente alle loro caratteristiche fisico-chimiche. Glicerolo e dimetilsolfossido (DMSO) esplicano un'azione in grado di "permeare" le pareti e le membrane cellulari ma anche una azione *scavenger* dei radicali liberi che possono formarsi a causa dello shock termico; altre sostanze, come il PEG e il PVP definite "non permeanti" agiscono abbassando la temperatura di congelamento della soluzione (attraverso le loro proprietà colligative), aumentando la viscosità necessaria per la successiva vitrificazione in azoto liquido. Il DMSO è largamente utilizzato nell'ultra-raffreddamento controllato anche in combinazione con altre sostanze crioprotettive (glicerolo, saccarosio, PEG, sorbitolo), sia come pre-trattamento degli espianti che come crioprotettivo durante la procedura di conservazione (Reed e Uchendu, 2008; Lambardi e De Carlo, 2009).

3. *Disidratazione evaporativa delle cellule* ottenuta mediante esposizione degli espianti ad un flusso di aria sterile o su gel di silice. In questo caso, l'esito favorevole è raggiunto con l'individuazione dell'opportuno tempo di esposizione al trattamento disidratante. Questa procedura è la più semplice poiché gli espianti, una volta disidratati, sono raffreddati rapidamente per immersione diretta in azoto liquido. E' applicata, prevalentemente, a embrioni somatici o assi embrionali estratti dai semi appartenenti ad un vasto numero di specie recalcitranti ed intermedie. La sopravvivenza ottimale è generalmente ottenuta quando il contenuto di acqua degli espianti crioconservati è compreso tra il 10% e il 20% in peso fresco (Engelmann, 2009).

I trattamenti crioconservativi sono applicati a diversi tipi di espianto che variano in base alla specie. In genere il trattamento più utilizzato è quello della soluzione vitrificante degli apici vegetativi. La soluzione vitrificante più utilizzata è PVS2 (*Plant vitrification Solution n°2*) proposta da Sakai et al. nel 1990 per prove sperimentali condotte su cellule nucellari di *Citrus sinensis* var. *brasiliensis*. Questa soluzione è ad alta molarità ed è costituita da glicerolo, etilenglicole e DMSO

rispettivamente in percentuali (v/v) di 30%, 15% e 15% in substrato basale di coltura, in genere MS (Murashige and Skoog, 1962). Nel tempo sono state elaborate numerose varianti, tra queste la PVS3 costituita da glicerolo e saccarosio al 40%. L'uso delle soluzioni vitrificanti è effettuato anche in combinazione con altre tecniche quali il congelamento a goccia e l'incapsulamento-vitrificazione.

La procedura standard del trattamento degli apici vegetativi con soluzione vitrificante PVS2 prevede le seguenti fasi (Sakai *et al.*, 2008):

- Prelievo mediante stereomicroscopio in condizioni asettiche di apici vegetativi da gemme ascellari o apicali di germogli coltivati *in vitro* lasciando 3-4 primordi fogliari interni.
- Pre-coltura in saccarosio (fino a 0.3 M) per alcuni giorni alla temperatura di 4°C.
- Immersione in soluzione osmoprotettiva costituita da saccarosio (0.4 M) e glicerolo (0.2 M) per un tempo di 20-30 minuti alla temperatura di 25°C.
- Trattamento con soluzione PVS2 in cryovials. I tempi di permanenza e la temperatura della soluzione sono fattori importanti, preparatori alla vitrificazione. Secondo alcune prove condotte da diversi Autori su diverse specie la migliore combinazione temperatura/tempo è quella di 0 °C e 20-90 min (Matsumoto *et al.*, 1994; Lambardi, 2002; Sakai *et al.* 2008).
- Raffreddamento ultrarapido a -196°C dopo trattamento con nuova soluzione PVS2. Il tasso di raffreddamento è di 300°C al minuto.
- Scongelo rapido per immersione dei *cryovials* in bagno termostato a 40°C per 50 – 60 secondi. Lavaggio degli espianti con soluzione MS e saccarosio per 20 minuti. La rapidità dello scongelamento è particolarmente importante per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio intra-cellulari e extra-cellulari per il fenomeno definito “*ricristallizzazione migratoria*” ad opera delle prime molecole di acqua che formandosi fanno da nuclei di condensazione. In generale, lo scongelamento di qualsiasi espianto o dei semi sintetici sottoposti a crioconservazione deve essere effettuato velocemente.
- Trasferimento in substrato di crescita. La reintroduzione in coltura *in vitro* deve avvenire su substrati capaci di favorire una pronta ripresa degli espianti. In tal senso, si fa ricorso a concentrazioni elevate di citochinine o nel caso di recupero

di linee embriogeniche si fa ricorso a combinazioni di citochinine e auxine. La germinazione di semi ed assi embrionali non richiede l'utilizzo di PGRs.

Altre applicazioni della crioconservazione sono **l'incapsulamento-disidratazione** e **l'incapsulamento-vitrificazione**. Queste procedure si avvalgono della tecnologia dei semi sintetici (*synthetic seeds*). In generale, l'espianto, immerso in una soluzione di alginato di sodio (in genere al 3%), in substrato nutritivo con o senza PGRs, in condizioni di sterilità, viene rilasciato, mediante micropipetta, goccia a goccia (ciascuna con un espianto e un'aliquota di soluzione) in una soluzione di cloruro di calcio per un tempo di 20-30 minuti durante i quali le gocce solidificano per scambio cationico  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  formando delle capsule sferiche. In seguito a lavaggio i semi sintetici sono posti in conservazione. Una variante prevede la fase di disidratazione in flusso d'aria o per contatto con il gel di silice che segue il pre-trattamento in substrati con alte concentrazioni di saccarosio (0.3M-1.5M) per promuovere la vitrificazione durante il raffreddamento ultra-rapido o come proposto da Sakai (2000) la disidratazione è ottenuta con un trattamento in soluzione vitrificante PVS2 (Incapsulazione-vitrificazione). Queste procedure che garantiscono generalmente alta sopravvivenza e rapida ricrescita del materiale conservato senza formazione di callo sono state applicate ad apici vegetativi di numerose specie (di origine tropicale e non), a sospensioni cellulari ed embrioni somatici di molte specie (Sakai and Engelmann, 2007; Gonzales-Arnao and Engelmann, 2006; Standardi e Micheli, 2007).

La crioconservazione è stata sviluppata su diverse specie da frutto con efficienti protocolli sperimentali. Infatti, per le specie a propagazione vegetativa, la crioconservazione ha mostrato nel tempo ampia applicabilità su specie ornamentali, da frutto, orticole etc. I risultati altamente positivi possono essere spiegati attraverso diverse ragioni. Ad esempio, i tessuti meristemati come gli apici vegetativi sono costituiti da piccole cellule in attiva divisione cellulare caratterizzati da piccoli vacuoli e da un alto rapporto nucleo-citoplasma. Queste caratteristiche biologiche rendono tali tessuti molto meno suscettibili alla formazione di ghiaccio durante le procedure crioconservative e anche maggiormente predisposte a sopportare la disidratazione rispetto a cellule molto vacuolate e differenziate (Engelmann, 2009). Un'altra ragione potrebbe essere che la maggior parte delle specie crioconservate sono ampiamente

coltivate e stabilizzate *in vitro* per la loro importanza commerciale e le conoscenze sperimentali acquisite attraverso idonei protocolli di micropropagazione rende l'approccio crioconservativo molto più semplice. Un diverso approccio è, invece, riservato alle specie a semi recalcitranti. In questo ambito la ricerca è abbastanza recente e quindi un numero limitato di specie recalcitranti sono state e sono tuttora oggetto di studio. Il concetto della "recalcitranza" è abbastanza dinamico in quanto racchiude in sé sia la biologia della specie che l'attuazione di idonee procedure *in vitro* di moltiplicazione. Infatti molte specie classificate in passato come recalcitranti sono ora considerate come specie "intermedie" o "sub-ortodosse" e conservate secondo diverse procedure (Engelmann, 2000). Alla base di tutto c'è al momento una scarsa conoscenza della loro biologia, del comportamento *in vitro* di molte di queste specie, spesso selvatiche o, in ogni caso, di marginale interesse vivaistico. Pertanto i risultati conseguiti sono molto variabili e non pienamente confrontabili a causa del basso numero di accessioni saggiate.

In assoluto, la tecnica più utilizzata prevede l'uso della soluzione vitrificante (prevalentemente PVS2) su apici vegetativi con alte percentuali di sopravvivenza e ricrescita. La tecnica è stata saggiata con successo anche su callo embriogenico di olivo (Lambardi *et al.* 2002), embrioni somatici di *Citrus* spp (Gonzales-Arnao *et al.*; 2003), assi embrionali di *Citrus madurensis* (Cho *et al.*; 2002a), assi embrionali ed embrioni somatici di *Castanea sativa* (Corredoira *et al.* 2004). Di recente, è stata dimostrata la possibilità di crioconservare gemme di melo prelevandole direttamente in campo durante il periodo invernale e sottoponendole ad un processo di "raffreddamento controllato" prima dell'esposizione ai vapori di azoto liquido a -160°C (Towill *et al.*, 2004).

Specificamente sul genere *Prunus*, gli apici vegetativi rappresentano l'espianto maggiormente utilizzato, in particolare su *Prunus domestica* (De Carlo *et al.* 2000) e *Prunus dulcis* (Al- Ababneh, 2003; Shatnawi *et al.*, 1999). Durante le prove sperimentali, le percentuali di ricrescita in *Prunus* sono state abbastanza alte variando dal 57% al 100%. Su susino (*Prunus domestica* L.) cv Regina Claudia, condotto da De Carlo *et al.*, (2000), sono state confrontate diverse metodiche criogeniche su apici vegetativi provenienti da colture *cold-hardened* a 4°C per due giorni su substrato QL

(Quoirin e Lepoivre, 1977) addizionato con saccarosio 0.09M. La migliore sopravvivenza (57%) è stata ottenuta con la procedura *vitrification/one step cooling* da espianti trattati per 30 minuti con un crioprotettivo (glicerolo 2M e saccarosio 0.4M), incubati in PVS2 a 0°C per 90 minuti e immersione in N<sub>2</sub> liquido. Gli apici sono stati saggiati anche con altre procedure quali *slow cooling* (-0.5°C/min fino a -45°C) e *two steps cooling* (-160°C per 25 min, dopo a -196°C) ma hanno evidenziato basse percentuali di sopravvivenza. Il 47.5% di ricrescita è stato, invece, ottenuto con la procedura *encapsulation-vitrification* mentre insoddisfacente è stata la performance del metodo *encapsulation-dehydration*.

La conservazione a breve-medio termine è attuabile mediante una tecnica che prende il nome di *Slow Growth Storage* o *Cold Storage at minimal Growth*. La conservazione di colture di germogli in crescita rallentata rappresenta una parte importante della filiera produttiva dei laboratori commerciali di micropropagazione. Ciò è effettuato in condizioni controllate con temperature che variano in funzione della specie da 1°C a 20°C e, comunque, tali da rallentarne l'accrescimento consentendo una più lunga permanenza nello stesso substrato e una minore frequenza di subculture. Per le specie tropicali il *range* termico utilizzato è tra i 15 e 20 °C, a causa della loro scarsa tolleranza al freddo. Il mantenimento dei vasi a bassa temperatura (in genere 4 °C) e in oscurità è di gran lunga l'approccio più utilizzato per indurre un significativo rallentamento del metabolismo cellulare (Lambardi e De Carlo, 2003) soprattutto con specie dei climi temperati. L'obiettivo principale di questa tecnica è il prolungamento dei tempi subcolturali dalle normali 2-4 settimane ad intervalli di tempo molto più distanziati (da 3 a 12 e anche più mesi). Da ciò si evince l'importanza che questa tecnica riveste nei laboratori commerciali in cui la crescita deve essere ritardata per esigenze di produzione (Aitken-Christie & Singh, 1987). Inoltre, la conservazione del materiale vegetale, attuata con l'impiego di questa tecnologia, viene definita "a medio termine" in quanto i tempi di stoccaggio sono mediamente compresi tra i 7 e i 12 mesi. Esempi, reperibili in letteratura, di conservazione assai più lunga (28 mesi per *Malus* spp. in Wilkins *et al.*, 1988; 30 mesi per *Corylus* spp. in Reed, 1999; 60 mesi per *Populus* spp. in Son *et al.*, 1991) appaiono comunque episodici e da considerare con estrema cautela nella pratica di laboratorio. Non va sottovalutato mai, ad esempio, il ruolo fondamentale

del materiale di partenza (come tipologia, età e stato fisiologico generale della pianta madre) nel determinarne il tempo massimo di conservazione a bassa temperatura. La durata della conservazione è influenzata da vari fattori come la scelta del tipo di espianto come suggerito da Roxas *et al.* (1985) per il crisantemo, con un risultato migliore partendo da segmenti nodali rispetto a gemme apicali. In generale la presenza di un apparato radicale migliora la vitalità della coltura durante la conservazione come osservato da Kartha *et al.* (1981).

La stabilità genetica del materiale vegetale di partenza (attraverso collaudati protocolli di moltiplicazione *in vitro*) e il mantenimento della stessa in post-conservazione sono rispettivamente pre-requisiti e obiettivi fondamentali per l'avvio di strategie di conservazione. Un elevato numero dei cicli di moltiplicazione può, infatti, portare a variazioni nei caratteri di giovanilità/maturità, radicazione e fioritura (Moncousin & Ducreux, 1984; Kinet & Parmentier, 1989; Zimmerman, 1991).

Il successo dell'uso delle basse temperature per la conservazione a crescita ridotta è stato conseguito per diverse specie arboree quali, fra gli altri, i *Prunus* (Dorion *et al.* 1991; Marino *et al.* 1985; Sauer, 1985), i *Malus* (Orlikowska, 1992) e i *Pyrus* (Oka e Niino, 1997). E' da notare, peraltro, che in questo *range* assai ristretto (2-4°C) si collocano gran parte delle prove sperimentali reperibili in letteratura. Sebbene la temperatura sia il fattore che più incide sul rallentamento del metabolismo cellulare, il tempo massimo di stoccaggio e le caratteristiche di ricrescita delle colture possono essere influenzate da altre condizioni di conservazione, quali la qualità delle colture *stock*, il fotoperiodo e l'intensità luminosa (assenza o bassa intensità), il tipo di contenitori, i substrati di mantenimento e di ricrescita dei germogli (Reed, 1999). La tipologia e il volume dei contenitori nonché il dispositivo di chiusura sono fattori tutt'altro che trascurabili: per esempio l'aumento delle dimensioni dei contenitori aumentava il tempo di conservazione (Roca *et al.*, 1984).

Le modificazioni della composizione dei substrati di crescita e l'uso di composti osmoticamente attivi rappresentano valide strategie di prolungamento dei tempi di stoccaggio insieme all'uso di ritardanti di crescita (come ad esempio Alar o B-9), acido abscisico (ABA) e le basse concentrazioni di ormoni di crescita (le citochinine in particolare). Le basse temperature di conservazione rappresentano una delle tecniche

maggiormente utilizzate. La temperatura ottimale di conservazione è compresa in un *range* compreso tra 2 e 5 °C, molto più frequentemente 4°C. In queste condizioni, l'accumulo di lipidi insaturi nelle membrane cellulari causerebbe un suo ispessimento con conseguente rallentamento delle divisioni cellulari e dell'allungamento dei germogli (Engelmann, 1997). La tolleranza alle basse temperature dipende da fattori ecologici e dall'origine geografica delle specie, nonché dal genotipo (Ashmore, 1997; Ford-Lloyd & Jackson, 1986; Bertrand-Desbrunais *et al.* 1992; Reed, 1993). Le specie evidenziano anche una differente esigenza di luce durante la conservazione *in vitro*; molti protocolli, infatti, sono condotti sia in assenza di luce che in condizioni di diversa intensità luminosa. Secondo diversi studi, la luce può condizionare negativamente la qualità dei germogli frigoconservati, determinando nelle colture ingiallimenti e necrosi a carico delle foglie, degli apici e dell'asse del germoglio, con marcate perdite del materiale vegetale (Romano *et al.*, 1999). Al contrario, sempre secondo gli stessi autori, prove sperimentali condotte in oscurità avevano favorito in *Quercus suber* una sopravvivenza dei germogli fino al 50%. Ciò è confermato da studi condotti su colture *in vitro* di *Malus* e *Prunus* che hanno dato ottimi risultati in completa oscurità (Orlikowska, 1992; Perez-Tornero *et al.*, 1999). Da rilevare, però, che bassi livelli di intensità luminosa sono stati saggiati con successo in *Prunus avium*, *Quercus petraea* e *Q. robur* (Janeiro *et al.*, 1995). In olivo (*Olea europaea* L.) è stato riscontrato, ad esempio, che lo stoccaggio a 4 °C in condizioni di totale oscurità hanno permesso di protrarre i tempi di conservazione delle cultivar 'Frantoio' e 'Leccino' fino ad 8 mesi, con elevate percentuali di sopravvivenza (100% e 90%, rispettivamente) e con un rapido recupero dell'attività proliferativa dei germogli. Al contrario, in condizioni di fotoperiodo breve (8h, con 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di intensità luminosa) i tempi di conservazione si sono dimezzati. Protraendo la conservazione fino a 12 mesi sono state registrate percentuali di sopravvivenza ancora accettabili (oltre il 60% nel caso del 'Frantoio'), ma la ripresa della crescita, dopo trasferimento in condizioni standard di coltura (23°C e fotoperiodo 16h), ha subito un sensibile ritardo (Lambardi *et al.*, 2000). In Negri *et al.* (2000) è stato sviluppato un protocollo di micropropagazione e conservazione in crescita lenta su una *landrace* ("Moscatella") e una cultivar commerciale ("Sharkspur Red") di *Malus pumila* utilizzando espianti uninodali. Sono stati saggiati 4 differenti media MS (Murashige and

Skoog, 1962) a 4 °C in assenza di luce. La vitalità delle colture è stata valutata dopo 6, 8, 12, 18 mesi di conservazione. I media differivano per la concentrazione e tipologia ormonale (BA, ABA, IBA). Osservazioni sono state condotte sulla assenza/presenza di germogli laterali, sulla capacità di ripresa a fine conservazione, assenza/presenza di iperidricità, presenza di callo, crescita espressa come peso secco dopo 48 ore a 105°C. I risultati sono stati incoraggianti soprattutto per la cultivar commerciale che ha conservato una vitalità accettabile finanche dopo 18 mesi.

Gli agenti osmotici sono composti che riducono il potenziale d'acqua nelle cellule e, se addizionati al mezzo colturale, possono rallentare la crescita e aumentare i tempi di conservazione di molte specie (Shibli, 1991; Wilson *et al.*, 2000). Mannitolo, saccarosio, sorbitolo, Phosphon D (tributyl-2,4 dichlorbenzylphosphonium chloride) hanno dato risultati contrastanti in prove sperimentali di crescita rallentata in diverse specie (Dodds and Roberts, 1985; Shibli *et al.*, 1992; Lambardi *et al.* 2006b). Indagini sulla conservazione a medio termine sono stati effettuati sulla cultivar di fragola "Camarosa" (*Fragaria x ananassa*) da Hassan and Bekheet (2008) con particolare attenzione sugli effetti dei regolatori osmotici nel mezzo come il mannitolo e il sorbitolo a diverse concentrazioni (0.1, 0.2, e 0.4 M). Le colture sono state incubate a 4°C e assenza di luce. La sopravvivenza (%), il numero di germogli e di radici/espianto sono stati registrati a 4, 6, 10, 14 e 15 mesi di conservazione. Dai risultati è emerso che i substrati con sorbitolo e mannitolo garantivano la migliore sopravvivenza. Il saccarosio è il componente più utilizzato nei mezzi colturali come fonte di carbonio/energia per questo tipo di coltura ma è anche utilizzato come agente osmotico. La crescita dei germogli è strettamente dipendente dalla sua concentrazione come evidenziato da diversi studi condotti su patata, pero, tabacco (Brown *et al.*, 1979; Sarkar & Naik 1998; Tahtamouni & Shibli, 1999). Shibli *et al.* (1999) riporta che elevate concentrazioni di saccarosio, sorbitolo o mannitolo hanno ridotto significativamente la crescita in colture di *Prunus dulcis* estendendo a quattro mesi gli intervalli subcolturali in prove condotte a temperatura ambiente. Esperimenti condotti presso CNR-IVALSA su diverse specie ortive e arboree da frutto (radicchio, carciofo, olivo, kiwi e portinesti di fruttiferi) hanno saggiato fattori quali l'illuminazione, il contenuto di carboidrati nel substrato di conservazione, lo scambio gassoso dei contenitori di coltura (Lambardi *et al.*, 2006).

Nella prova, condotta su portinnesti di melo (M26) e di pero (clone A74), sono stati valutati gli effetti delle basse temperature e della luminosità, dell'uso di sostanze osmoticamente attive quali fonti di carbonio e l'utilizzo di contenitori a diversa intensità di scambi gassosi. Il mannitolo ha inficiato notevolmente la conservazione nel melo rispetto allo stoccaggio a 4 °C e oscurità; lo stesso risultato negativo è stato osservato nei primi tre mesi di conservazione in contenitori gas-permeabili StarPack™ mentre il 30% delle perdite è stato ottenuto in contenitori di vetro a causa della forte ossidazione dei germogli. Al contrario, sia in melo che in pero, non si sono manifestate perdite consistenti fino a 9 mesi di conservazione a 4°C e in oscurità. In un ulteriore lavoro, condotto a 4 °C e in oscurità da Roncasaglia *et al.*, (2009) su portinnesti fruttiferi di *Prunus* ( GF 677, Gisela® 5 e Mirabolano 29C) e su una cultivar di kiwi (cv Hayward) è stato valutato il rallentamento della crescita, la capacità di recupero e l'attività proliferativa al ripristino delle condizioni di coltura ordinaria. Le osservazioni si sono protratte fino a 21 mesi di conservazione su substrati contenenti diverse concentrazioni di saccarosio (30, 45 e 60 g/l) e una combinazione di saccarosio (30 g/l) e mannitolo (15 g/l). La combinazione saccarosio-mannitolo non ha prodotto risultati soddisfacenti nei portinnesti probabilmente a causa di un eccessivo blocco del metabolismo cellulare. Al contrario è stato dimostrato che la riduzione della concentrazione di saccarosio rispetto ai canonici 30 g/l produceva un abbassamento dei tempi di conservazione e della qualità dei germogli. Prove condotte da Dradi *et al.* (2011) su ciliegio (portinnesto Gisela® 5) hanno dimostrato, infatti, come l'incremento della concentrazione di saccarosio migliori sensibilmente la conservabilità delle colture. La differente risposta al tempo massimo di conservazione può rivelarsi strettamente connessa alla specie, variando da pochi mesi a qualche anno o più come evidenziato da diversi autori (Hausman *et al.*, 1994; Reed, 1999) mentre differenze significative possono manifestarsi anche all'interno della stessa specie (Kovalchuk *et al.*, 2009). Infatti, il portinnesto GF 677 ha mostrato una positiva conservabilità alle diverse concentrazioni di saccarosio senza differenze significative fino a 16 mesi, con un recupero della capacità proliferativa. Al contrario, Mirabolano 29C e Gisela® 5 (come dimostrato anche da Dradi *et al.* 2011) hanno mostrato di rispondere positivamente all'aumento della concentrazione di saccarosio: il portinnesto dell'albicocco ha tratto il massimo beneficio a 45 g/l di saccarosio dopo 12 mesi e ha

mantenuto lo stesso andamento fino a 18 mesi. Il portainnesto di ciliegio, ha mostrato ottimi risultati sia a 45 che a 60 g/l di saccarosio fino a 16 mesi di conservazione. Attraverso prove sperimentali, effettuate sulla cultivar Helena di albicocco (*Prunus armeniaca* L.) da Pérez-Tornero *et al.* (1999), è stata saggiata la sopravvivenza dei germogli a tre differenti livelli termici di conservazione (3°C, 7°C e 14°C) in condizione di oscurità. La maggiore sopravvivenza è stata ottenuta a 3°C mentre a 14°C i germogli hanno manifestato severi sintomi di sofferenza con significative evidenze di processi di ossidazione a carico dei germogli. Un effettivo rallentamento della crescita a bassi valori termici è stata registrata a 3 °C con un aumento del tasso di crescita all'aumentare della temperatura. Anche Marino *et al.* (1985) hanno condotto con successo prove di conservazione su tre cloni di *Prunus* (D.1869, GF677 e CAB 11E) a tre temperature diverse (-3°C, +4°C e + 8°C) mettendo in relazione la sopravvivenza con la temperatura di conservazione e la luce. Dal punto di vista termico, la sopravvivenza maggiore è stata registrata a -3°C e a 4°C rispettivamente per un periodo massimo di conservazione di 200 e 170 giorni. L'assenza di luce durante la prova ha fornito i migliori risultati rispetto al fotoperiodo di 16 h con ben 10 mesi di conservazione.

## SCOPO DEL LAVORO

Il presente studio ha rivolto l'attenzione sulla conservazione *in vitro* di alcune varietà del germoplasma siciliano di susino che, dopo una storia secolare, vanta ancora oggi una significativa diffusione in coltura.

Le antiche origini di questo germoplasma sono testimoniate da fonti letterarie del XVII e XVIII secolo che fanno riferimento a diverse varietà, in parte ancora presenti. Testimonianze sulle accessioni del germoplasma siciliano sono descritte alla fine del '600 nell'“*Hortus catholicus*” del Cupani e nella prima metà del '700 ne “*Il potere fruttifero e dilettevole*” del Nicosia (Cupani, 1696; Nicosia, 1735), dai quali emerge la grande ricchezza varietale presente a quell'epoca nel territorio siciliano accompagnata da una molteplicità di specie frutticole ed ortive che caratterizzavano i ‘giardini’ agricoli dell'Isola; in particolare, il Nicosia evidenzia due principali areali di coltivazione e, probabilmente, di diversificazione del susino: uno nel palermitano, territorio in cui il Cupani indica peraltro la presenza in coltura di 21 diverse varietà e dove tutt'oggi permane un importante serbatoio di germoplasma locale; un secondo areale viene individuato nella provincia di Trapani.

Una minima parte di questo germoplasma in Sicilia è ancora oggi facilmente reperibile e, per le sue caratteristiche organolettiche, è destinato a mercati locali e di nicchia; molte altre accessioni autoctone sono, invece, oggetto di una fortissima erosione genetica e sopravvivono soltanto grazie all'opera degli agricoltori locali.

Il germoplasma susinico siciliano vanta una ricchezza genetica notevole, incrementata dalle caratteristiche biologiche della specie, prevalentemente autoincompatibile, e dall'uso molto diffuso in passato fra gli agricoltori di praticarne la propagazione per seme, contribuendo all'arricchimento della variabilità intra ed interspecifica. Tutto ciò ha portato, nel tempo, ad un vasto panorama varietale che si è presentato piuttosto ricco fino a pochi decenni fa ma che oggi è fortemente penalizzato per le conseguenze della diffusione di un'agricoltura sempre più specializzata che ha abbandonato le varietà tradizionali autoctone per focalizzare l'attenzione su quelle più produttive e meglio rispondenti alle richieste di un mercato globalizzato. L'ampia diversità ancora oggi reperibile sul territorio regionale è stata recentemente oggetto di

studio ed approfondimento sia dal punto di vista biometrico, finalizzato ad una caratterizzazione sul piano morfologico, sia dal punto di vista qualitativo e nutraceutico (Impallari *et al.*, 2010). Queste valutazioni hanno confermato la reale diversità genetica del materiale vegetale in esame e hanno messo in evidenza ulteriori spunti di interesse sul piano nutrizionale e nutraceutico.

La maggior parte del materiale vegetale individuato e censito è ancora oggi sottoposto a sistemi di conservazione *in situ* e la loro preservazione da forme di erosione e/o estinzione è assicurata dall'attività di singoli agricoltori che conservano tale patrimonio attraverso il suo uso per scopi agricoli. Il recente interesse per forme di incentivazione finalizzate alla diffusione in coltura di specie, cultivar/accessioni di origine autoctona, anche su base finanziaria comunitaria, ha indotto le amministrazioni regionali a cercare fonti innovative in grado di assicurare il mantenimento di questo patrimonio senza dover necessariamente mettere in campo sistemi di conservazione *ex situ* e *in vivo* che si caratterizzano, come detto, per alti costi di realizzazione e di mantenimento e lunghi tempi di ottenimento.

La tecnica della micropropagazione, come già evidenziato, offre un valido aiuto nel recupero e nella conservazione delle risorse genetiche vegetali. Negli ultimi decenni in Italia, questa tecnica si è andata sempre più affermando e specializzando nella produzione vivaistica di portinnesti e specie da frutto. Un censimento, condotto alcuni anni fa, ha stimato in quasi 25 milioni le piante prodotte mediante micropropagazione (Damiano *et al.*, 2009). Oltre il 70% di questa produzione è relativa al comparto frutticolo, facendo dell'Italia un valido partner in Europa in termini sia di quantità, sia di qualità delle piante prodotte.

La recente programmazione comunitaria, come accennato, ha reso evidente la necessità di disporre di materiale vegetale utile alla costituzione di piante madri dalle quali attingere per il prelievo, in sicurezza, di porzioni vegetative per la propagazione agamica. Se da un lato il comparto vivaistico vive una fase di sofferenza ormai datata in Sicilia, soprattutto per le specie da frutto, da un altro lato l'amministrazione regionale non può oggi esimersi dalle responsabilità oggettive in termini di attivazione e gestione di misure agro-ambientali comunitarie in cui è prevista la distribuzione di materiale da propagazione a singoli agricoltori che fungono da custodi nel senso e nella misura di

quanto precedentemente sottolineato. Da qui la necessità di disporre di sistemi in grado di realizzare rapidamente banche di germoplasma *ex situ* approfittando delle possibilità offerte dalla coltura *in vitro* e, contestualmente, l'opportunità di verificare possibili sistemi di mantenimento del germoplasma in banche aettiche per tempi mediamente lunghi.

Con il presente studio è stato, quindi, valutato e messo a punto un protocollo sperimentale con l'obiettivo di saggiare l'adattamento alla conservazione in crescita rallentata *in vitro* di quattro cultivar di susino del germoplasma siciliano, individuando il protocollo più idoneo a sostenere la conservazione a basse temperature e a saggiarne una eventuale risposta genotipo-dipendente.

Le cultivar oggetto di studio sono state: "Sanacore", "Ariddu di Core", "Rapparino", e "Marabolo". Tra queste "Sanacore", "Ariddu di Core" sono del tipo 'europeo' (*Prunus domestica* L.) che provengono dall'areale di origine di Monreale, provincia di Palermo. "Marabolo" e Rapparino afferiscono al gruppo dei mirabolani a frutto edule (*Prunus cerasifera* Ehsh), il primo diffuso alle medie altitudini dei Monti Peloritani (provincia di Messina), il secondo sempre dal monrealese.

"Sanacore" ed "Ariddu di Core", riportate dal Nicosia (1752) come '*pruna di cori janchi*' godono da alcuni anni dell'attenzione di Slow Food<sup>®</sup>, che li tutela attraverso la denominazione di "*Susine Bianche di Monreale Presidio Slow Food<sup>®</sup>*". Per queste cultivar e per i produttori aderenti esiste in tal senso un definito e rigoroso disciplinare di produzione che regolano sia il prodotto fresco che i trasformati che ne derivano. Anche "Rapparino" è una varietà del monrealese, molto apprezzata a livello locale ma non protetta da alcun marchio. "Marabolo" è particolarmente interessante per le sue caratteristiche qualitative seppure non di ampia riconoscibilità poiché delimitata a mercati locali sia pure di eccellenza.

La prova sperimentale di conservazione in crescita rallentata è stata preceduta dalla messa a punto di un idoneo protocollo di moltiplicazione *in vitro* che potesse rappresentare utile confronto alle tesi di conservazione e rigenerazione. L'attività di ricerca è stata così articolata:

1. introduzione *in vitro* delle seguenti varietà siciliane di Susino: "Ariddu di Core", "Sanacore", "Rapparino", e "Marabolo";

2. ottimizzazione del protocollo di moltiplicazione fino a stabilizzazione delle colture;
3. ottimizzazione del protocollo di radicazione *in vitro* e trasferimento in ambiente esterno;
4. avvio della prova sperimentale di conservazione in crescita rallentata e valutazione della risposta dei genotipi con diverse tesi.

Le problematiche che, generalmente, si presentano durante le operazioni di coltura *in vitro* condotte su fruttiferi, su varietà autoctone e soprattutto su materiale prelevato da piante lasciate in stato di abbandono agronomico sono essenzialmente la recalcitranza all'adattamento *in vitro* e la forte presenza di patogeni anche di natura endogena. Per le cultivar "Ariddu di Core", "Sanacore", "Marabolo" e "Rapparino", il cui materiale è stato raccolto su piante coltivate secondo le buone pratiche agronomiche, non sono stati evidenziati elementi di criticità durante le fasi di introduzione, moltiplicazione e radicazione *in vitro* nell'impostazione di un protocollo di carattere generale che fungesse da controllo in ciascuna delle specifiche fasi. Questo ha permesso di procedere con la prova di conservazione in crescita rallentata, una volta raggiunta la stabilizzazione *in vitro*.

Lo studio finalizzato alla conservazione in crescita rallentata ha valutato la capacità di adattamento delle colture di germogli delle accessioni di susino siciliano a 4 °C e in oscurità (di gran lunga l'approccio più utilizzato per le specie temperate) su substrati contenenti differenti combinazioni e concentrazioni di saccarosio e ormoni di crescita. Durante le varie fasi dell'esperimento (frigoconservazione, subcolture e radicazione) sono state condotte osservazioni e valutazioni circa l'effettivo rallentamento della crescita come l'assenza o bassa proliferazione durante la permanenza a 4°C e la capacità di ripresa al ripristino delle condizioni ordinarie di crescita (24 °C ± 2 e luce con fotoperiodo di 16 ore).

## MATERIALI E METODI

Il materiale vegetale, appartenente alle cultivar “Arido di Core”, “Rapparino” e “Sanacore”, è stato raccolto in agro di Monreale (PA), mentre i germogli della cultivar “Marabolo” sono stati prelevati nel comune di San Pier Niceto in provincia di Messina. I germogli semi-erbacei sono stati prelevati da piante adulte nel mese di maggio, sono stati defogliati e sottoposti al protocollo di sterilizzazione necessario per l’introduzione *in vitro*. Il protocollo è stato eseguito nel seguente modo:

- Lavaggio abbondante in acqua corrente.
- Lavaggio in acqua bidistillata addizionata con detergente Tween<sup>®</sup> 20 allo 0.1% (v/v) su agitatore magnetico. Risciacqui abbondanti.
- Immersione in soluzione al 2% (v/v) di PPM<sup>®</sup> per 2 ore.
- Immersione in soluzione di etanolo al 70% (v/v) per 3’ e in seguito in candeggina commerciale al 70% (v/v) per 20 min.
- Risciacquo abbondante sotto cappa a flusso laminare con acqua sterile bidistillata.

I germogli sono stati suddivisi, asetticamente, in segmenti uninodali e introdotti *in vitro* secondo il protocollo suggerito da De Rogatis *et al.* (2009) in substrato MS con vitamine (Murashige and Skoog, 1962) con l’aggiunta di 30 g/l di saccarosio, 6 g/l di agar (Plant Agar - Duchefa Biochemie B.V. – Haarlem, The Netherlands). Il pH è stato corretto al valore 5.7. Al substrato è stato aggiunto il preservante biocida PPM<sup>®</sup> (Plant Preservative Mixture<sup>®</sup>) alla concentrazione di 0.2% (v/v) al fine di contenere eventuali contaminazioni endogene e/o ambientali durante le operazioni *in vitro*. Il mezzo è stato autoclavato per 20 minuti alla temperatura di 121°C prima dell’aggiunta degli ormoni di crescita. I fitoregolatori addizionati sono stati: BAP (6.65 µM) e IBA (0.49 µM). Dopo il germogliamento, avvenuto dopo circa due settimane dall’introduzione *in vitro*, i germogli sono stati trasferiti per 30 giorni in un substrato simile al precedente con una concentrazione inferiore di BAP (3.85 µM). In seguito i germogli prodotti sono stati separati e subcolturali ogni 30 giorni in contenitori ECO2<sup>®</sup> Box (con 60 ml di substrato) nel seguente mezzo: sali MS con vitamine, 30 g/l di saccarosio, 8 g/l di Plant Agar, 0.2% (v/v) di PPM<sup>®</sup>, BAP (2.2 µM) e IBA (0.49 µM) che rappresenta, in definitiva, il

substrato di moltiplicazione e stabilizzazione delle colture delle accessioni di susino saggiate. Le condizioni di temperatura e di fotoperiodo durante le operazioni di introduzione, proliferazione e stabilizzazione sono state:  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  e 16 ore di luce a  $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . I valori ottenuti con tale protocollo (numero medio dei germogli proliferati e lunghezza media) sono stati utilizzati quali parametri di riferimento per la valutazione dei risultati derivanti dalla prova di conservazione in crescita rallentata.

I germogli stabilizzati, che avevano raggiunto la lunghezza di almeno 1.5 cm, sono stati posti in substrato di radicazione in vasi Magenta™ B-cap con 60 ml di substrato. Il protocollo di radicazione è stato eseguito confrontando inizialmente due diverse concentrazioni di IBA (2.95  $\mu\text{M}$  e 4.9  $\mu\text{M}$ ) al fine di verificare la concentrazione più rispondente al genotipo. Le accessioni “Ariddu di Core” e “Sanacore” hanno risposto positivamente alla concentrazione auxinica di 2.95  $\mu\text{M}$ , “Marabolo” e “Rapparino” alla concentrazione di 4.9  $\mu\text{M}$ . Le due diverse concentrazioni auxiniche saggiate per genotipo sono state valutate statisticamente con il confronto tra le medie attraverso il Test t. per  $P \leq 0.05$ . La composizione del substrato è stata la seguente: MS con vitamine, 30 g/l di saccarosio, 3 g/l di Gelrite™ (Duchefa Biochemie B.V. – Haarlem, The Netherlands), 0.2% (v/v) di PPM®, e pH di 5.7. I germogli introdotti in mezzo di radicazione sono stati mantenuti in assenza di luce per sette giorni e successivamente posti in cella climatica a  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  e 16 ore di luce a  $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . I dati relativi al numero e alla lunghezza delle radici sono stati rilevati dopo 40 giorni e utilizzati come valori di riferimento della fase di radicazione durante la prova sperimentale di conservazione.

Per quanto concerne la fase di passaggio dalle condizioni di *vitro* al *vivo* e di ambientamento, è stata applicata una procedura che si è concretizzata in una serie di passaggi come di seguito riportato:

1. trasferimento in condizioni di assoluta sterilità della pianta in Jiffy® pot (sterilizzato in autoclave per 1 minuto) imbibito con acqua bidistillata sterile all'interno di vasi Magenta® GA7 e posto in camera di crescita alle stesse condizioni termiche e di luce della fase *in vitro* fino alla emissione di radici al di fuori del Jiffy®;

2. trasferimento della pianta con Jiffy<sup>®</sup> in vaso con terriccio umido misto torba/agriperlite (v/v) e chiuso all'interno di un sacchetto di plastica trasparente integro per 4 settimane in ombraio;
3. foratura del sacchetto e permanenza nello stesso per altre quattro settimane in ombraio;
4. definitivo ambientamento in ombraio fuori dal sacchetto.

La prova sperimentale di crescita rallentata *in vitro* è stata condotta su “Sanacore”, “Arido di Core”, “Marabolo” e “Rapparino”. Da colture stabilizzate sono stati prelevati espianti lunghi 1.5 cm e trasferiti in contenitori ECO2<sup>®</sup> Box alla temperatura di 4°C e in oscurità su 60 ml di substrato MS con vitamine e con diversa concentrazione di saccarosio e di ormoni secondo il seguente schema:

- **TESI 1:** MS con vitamine, 20 g/l Saccarosio, 8 g/l di Agar, PPM<sup>®</sup> 2 ml/l (v/v), IBA 0.49 µM e BAP 2.2 µM
- **TESI 2:** MS con vitamine, 20 g/l Saccarosio, 8 g/l di Agar, PPM<sup>®</sup> 2 ml/l (v/v), senza ormoni di crescita
- **TESI 3:** MS con vitamine, 30 g/l Saccarosio, 8 g/l di Agar, PPM<sup>®</sup> 2 ml/l (v/v), IBA 0.49 µM e BAP 2.2 µM
- **TESI 4:** MS con vitamine, 30 g/l Saccarosio, 8 g/l di Agar, PPM<sup>®</sup> 2 ml/l (v/v), senza ormoni di crescita.

La rappresentazione schematica delle diverse tesi in prova è riportata nella tabella 1.

La prova sperimentale è stata impostata usando 8 contenitori per genotipo (due contenitori per tesi contenenti ciascuno 8 espianti) secondo un disegno completamente randomizzato (4 genotipi x 4 substrati differenti x 4 periodi di conservazione). Il protocollo ha previsto, ad intervalli di tempo regolari (90, 180, 270 e 360 giorni), la valutazione della qualità del materiale vegetale frigo conservato, per verificarne il mantenimento della vitalità durante la conservazione, la ripresa dell'attività di proliferazione e la capacità rizogena quando periodicamente era riportato nelle condizioni ordinarie di crescita *in vitro*. Ad ogni passaggio di conservazione, per ciascuna tesi, sono stati saggiati 4 espianti frigoconservati appartenenti a ciascuna accessione per due cicli subcolturali di 30 giorni ciascuno. I rilievi hanno riguardato il

tasso di proliferazione sui germogli per espianto vitale e la misurazione della lunghezza dei germogli proliferati. I dati ottenuti sono stati valutati mettendoli in relazione con i valori del protocollo di confronto (coltura ordinaria di controllo). Le osservazioni hanno riguardato anche la valutazione morfologica e la qualità dei germogli durante la frigoconservazione e alla fine di ciascun ciclo subcolturale. Inoltre, al fine di evidenziare la reale efficacia della frigoconservazione, indipendentemente dalla successiva rigenerazione, è stato osservato l'effettivo rallentamento della crescita dei germogli durante la permanenza a basse temperature, la presenza/assenza di proliferazione sia durante la frigoconservazione che al ripristino delle condizioni ordinarie di temperatura e di fotoperiodo, la mortalità, la presenza/assenza di marcescenza e/o imbrunimenti, gli ingiallimenti fogliari, l'iperidricità nonché le eventuali contaminazioni.

Alla fine della seconda subcoltura, i germogli con lunghezza pari o superiore a 1.5 cm sono stati posti in radicazione. I dati sono stati rilevati dopo 40 giorni e hanno riguardato le percentuali di radicazione e di iperidricità (determinate sul totale dei germogli messi a radicare), il numero e la lunghezza delle radici per germoglio radicato. I valori medi (numero e lunghezza delle radici) sono stati calcolati sulla base dei germogli radicati per espianto vitale. I germogli radicati sono stati posti in Jiffy<sup>®</sup> pot precedentemente sterilizzati e l'attecchimento è stato considerato quando le radici hanno forato la parete laterale del Jiffy<sup>®</sup>.

### **Analisi dei dati.**

Tutti i dati, laddove possibile per tipologia e per numerosità, sono stati sottoposti ad Analisi della Varianza, attraverso l'uso del software SPSS, con test di Duncan a controllo multiplo per  $P \leq 0,05$ . I confronti tra due medie sono stati realizzati, attraverso medesimo software, con Test di Tukey per  $P \leq 0,01$ .

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **FRIGOCONSERVAZIONE**

Le prove condotte sul susino hanno mostrato diversa sensibilità del genotipo in risposta alle condizioni sperimentali di conservazione in crescita rallentata *in vitro* (4 °C e assenza di luce). La Tabella 2 mostra le percentuali di espianti vitali durante la frigoconservazione nelle quattro cultivar saggiate. I valori percentuali sono riferiti a ciascun periodo di osservazione. In “Ariddu di Core”, nonostante siano stati osservati a 180 giorni alcuni ingiallimenti delle foglie basali, la conservabilità del materiale vegetale è stata compromessa prevalentemente nella parte finale dell’ultimo trimestre con la comparsa di segni di marcescenza e necrosi dell’espianto: sono state registrate percentuali variabili tra il 87.5% di germogli vitali nella tesi 4 a 270 giorni e il 75% nelle tesi 3 e 4 a 360 giorni indipendentemente dalla composizione del substrato. In considerazione, invece, dei diversi substrati, la tesi 1 (con 20 g/l di saccarosio e presenza di ormoni di crescita) ha permesso di evidenziare una vitalità del 100% durante tutto il periodo di conservazione. Marcescenza e soprattutto segni necrotici dell’apice e/o del fusticino dell’espianto si sono manifestati marcatamente in “Marabolo” e “Rapparino” con evidenze che hanno praticamente posto fine a 180 giorni alla prova sperimentale. In posizione intermedia si è posta la cultivar “Sanacore” che ha raggiunto 270 giorni di conservazione.

Durante il periodo di frigoconservazione tutte le cultivar hanno comunque mostrato assenza di proliferazione e radicazione, segnale di un effettivo rallentamento del metabolismo cellulare dovuto alle basse temperature ed all’oscurità che hanno di fatto interrotto qualsiasi attività di crescita pur consentendo il mantenimento delle condizioni di vitalità dei tessuti. Dal secondo trimestre di conservazione, alcuni espianti frigoconservati si presentavano in parte moderatamente allungati ed eziolati. Questo non ha compromesso la prova sperimentale e non ha rappresentato un aspetto negativo. La conservazione a basse temperature ha, infatti, come obiettivo il rallentamento del metabolismo cellulare e non la sua definitiva interruzione. I germogli filati ed eziolati, sezionati come segmenti mediani ed apicali, possono, infatti, fornire ulteriore materiale utilizzabile per riavviare la coltura in condizioni standard (Roncasaglia *et al.* 2009). Non

si sono osservati sintomi di iperidricità durante la frigoconservazione.

Come evidenziato da diversi studi e dalla presente indagine sul susino, le specie reagiscono diversamente all'esposizione alle basse temperature. Infatti in *Vitis*, temperature comprese fra 9 °C e 12 °C risultano essere tollerate in misura maggiore rispetto a temperature di 2-7°C (Monette, 1988). Sempre secondo lo stesso autore (1986), la temperatura di 8 °C rispetto a 4 °C non comprometteva la sopravvivenza e la proliferazione dei germogli vitroconservati in *Actinidia* così come la temperatura di 4 °C risultava essere maggiormente tollerata dalla cultivar di melo "Golden Delicious" rispetto ad una temperatura di 1 °C (Lundergan & Janick, 1979), come peraltro evidenziato dal presente studio. Sebbene con alcune differenze fra una specie e l'altra, molti autori concordano che il metodo più semplice ed efficiente per rallentare la crescita *in vitro* sia rappresentata dall'abbassamento della temperatura in coltura (Wanas *et al.*, 1986; Wilkins *et al.*, 1988; Druart, 1985). Oltre al fattore temperatura, anche la luce gioca un ruolo importante. Secondo diversi studi, la conservazione in crescita rallentata in oscurità ha prodotto migliori risultati in prove condotte su *Prunus* (Marino *et al.*, 1985), portainnesti di melo P2 e M.9 (Orlikowska, 1992), *Populus* (Hausman *et al.*, 1994) e *Quercus suber* (Romano *et al.*, 1999) rispetto a prove condotte in presenza di luce. L'influenza della intensità luminosa durante la conservazione a 4°C è stata studiata su diverse specie. Secondo tali studi, la luce aveva condizionato negativamente la qualità dei germogli frigoconservati, determinando nelle colture ingiallimenti e necrosi a carico delle foglie, degli apici e dell'asse del germoglio, con marcate perdite del materiale vegetale (Romano *et al.*, 1999). Al contrario, sempre secondo gli stessi autori, prove sperimentali condotte in oscurità avevano favorito in *Quercus suber* una sopravvivenza dei germogli fino al 50%. Tuttavia è certamente evidente che l'adattamento a basse temperature e l'interazione con il fattore luce (presenza/assenza) siano anche strettamente dipendenti dal genotipo, sia a livello interspecifico che intraspecifico, influenzando i tempi di conservazione da alcuni mesi fino a periodi di un anno e oltre (Reed, 1999). Prove di conservazione condotte sul melo da Kovalchuk *et al.* (2009), hanno evidenziato differenze significative a 4 °C con fotoperiodo di 10 h e a bassa intensità luminosa, con risultati soddisfacenti in 10 tra i 16 genotipi saggiati.

Nella prova oggetto del presente studio, la sensibilità alla frigoconservazione evidenziata dai genotipi afferenti al *Prunus cerasifera* è senza dubbio evidente ed è testimoniata dalla perdita repentina di vitalità degli espianti di Marabolo e Rapparino che non hanno potuto proseguire la prova oltre i 180 giorni rispetto ai due genotipi di susino europeo. La già documentata dipendenza dell'efficienza del sistema dal genotipo diventa in questo caso molto più evidentemente legato alla specie.

## PRIMA E SECONDA SUBCULTURA

La capacità proliferativa degli espianti dopo differenti periodi di conservazione a basse temperature è stata valutata dopo 30 giorni di coltivazione nelle ordinarie condizioni termiche e di luce. Le osservazioni sono state condotte per due subcolture consecutive.

La prima subcoltura offre informazioni molto importanti sulla capacità di ripresa del genotipo al ripristino delle condizioni ordinarie di crescita *in vitro* immediatamente dopo il trattamento a basse temperature. Una prima informazione è rappresentata dal mantenimento della vitalità dei germogli durante i trenta giorni del ciclo di proliferazione e quindi in postconservazione (Tabella 3). I germogli dei quattro genotipi hanno percentuali di sopravvivenza fino al 100% in funzione della cultivar, del differente substrato (tesi 1, 2, 3 e 4) e del diverso periodo di conservazione (90, 180, 270 e 360 giorni). In tutte le cultivar è stata registrata un'elevata percentuale di sopravvivenza a fine subcoltura (tra il 75% e il 100%) dopo 90 giorni di conservazione a 4°C. La capacità di rigenerazione dopo il primo trimestre di conservazione ha confermato quanto riportato da diversi autori (Vegis, 1964; Mullin and Schlegel, 1976; Druat, 1985; Pérez-Tornero *et al.*, 1999; Pruski *et al.* 2000) secondo i quali, su diverse specie arboree tra cui *Malus domestica* e *Prunus* spp, l'esposizione alle basse temperature per un tempo variabile tra 6 e 12 settimane potrebbe aver ridotto e superato la dormienza con benefici effetti anche sulla ricrescita delle colture in postconservazione. Inoltre, analogamente a quanto evidenziato sul susino nel presente studio e a quanto riportato da Pruski *et al.* (2000) su colture conservate *in vitro* di *Prunus virginiana* L., la presenza di ingiallimenti nelle foglie basali è verosimilmente indotta dalla presenza di saccarosio nel substrato ma non ha compromesso la vitalità e la capacità di ricrescita dopo 12 settimane di frigoconservazione. Infatti la presenza di saccarosio nel substrato quale fonte esogena di carboidrati, sembra limitare la fotosintesi e lo sviluppo di un appropriato apparato fotosintetico (Kock, 1996). La teoria è stata provata da diversi studi condotti anche su diverse specie (Hdider e Desjardins, 1994; Van Huylenbroeck e Debergh, 1996; Tichà *et al.*, 1998; Rybczynski *et al.* 2007).

In “Ariddu di Core” e “Sanacore” sono stati registrati valori di sopravvivenza in postconservazione al di sopra del 50% e del 75% (rispettivamente) per tutto il periodo saggiato (Tabella 3) fatto salvo quanto rilevato in termini di vitalità al termine della frigoconservazione. Ciò vuol dire che per “Ariddu di Core” la durata è stata di 360 giorni, per “Sanacore” di 270. Al contrario, in “Marabolo” e “Rapparino” sono stati osservati diversi casi di mortalità: infatti nel secondo trimestre (fino a 180 giorni) le prove sperimentali sono state pesantemente compromesse durante la frigoconservazione indipendentemente dalla composizione del substrato (20/30 g/l di saccarosio e presenza/assenza di ormoni di crescita). Questo potrebbe aver influito negativamente anche su quegli espianti apparentemente vitali ma che una volta posti in subcoltura hanno mostrato evidenti segni di stress fisiologico. Le tesi 1 e 4 sono state quelle maggiormente penalizzate per entrambe le cultivar di *P. cerasifera* con espianti che hanno perso totalmente la vitalità passando dal primo al secondo livello di conservazione. Nelle tesi 2 e 3, al contrario, le colture hanno mantenuto in “Marabolo” il 100% di sopravvivenza per l'intero periodo di conservazione. In “Rapparino” i germogli provenienti dalla tesi 3 hanno presentato il 100% di sopravvivenza sia a 90 che a 180 giorni. Le tesi 1 e 2 hanno mostrato a 90 giorni la piena vitalità degli espianti per poi perderla totalmente (tesi 1) o parzialmente (tesi 2) a 180 giorni. Gli espianti nella tesi 4 hanno mostrato vitalità solo nel primo trimestre (75%). Dai dati si evince che, eccetto per le tesi 1 e 4, l'elevata vitalità dei germogli a 90 giorni è risultata confermata anche a 180 giorni solo per le tesi 2 e 3 (Tabella 3).

Gli espianti di “Ariddu di Core”, durante i 360 giorni di conservazione, hanno mostrato una sopravvivenza prolungata e comunque compresa tra il 50% (solo la tesi 4 a 180 giorni) e il 100%. La massima percentuale è stata raggiunta in diverse tesi nei vari periodi di osservazione. Nello specifico dei parametri valutati durante l'esperimento, come mostrato nella fig. 1a e in tab. 6a tra le quattro tesi, la capacità di proliferazione è risultata migliore nelle tesi 1 e 3, dotate di ormoni e con diversa concentrazione di saccarosio, sebbene in parte al di sotto del controllo ( $4,90 \pm 0,27$ ). Il maggiore incremento del numero medio di germogli è stato riscontrato, in entrambe le tesi, solo a 270 giorni di conservazione mentre oltre i 270 giorni hanno presentato un vistoso calo della *performance* proliferativa, maggiormente nella tesi 1 con la concentrazione più

bassa di saccarosio. Le tesi 2 e 4, senza ormoni di crescita, hanno mostrato una capacità proliferativa piuttosto bassa sia rispetto al controllo che alle tesi 1 e 3 particolarmente evidente negli ultimi due trimestri di osservazione. E' da rilevare il decremento costante della loro capacità proliferativa, praticamente sovrapponibile. Nella [fig. 1a](#) è mostrata la lunghezza media dei germogli proliferati durante la prima subcoltura. Con esclusione della tesi 1, le altre tesi hanno mostrato a 90 giorni una lunghezza media dei germogli superiore al controllo ( $0,50 \pm 0,03$ ). Nel complesso, i germogli delle tesi 3 e 4 hanno mantenuto, per tutto il periodo di conservazione, una soddisfacente lunghezza media sia rispetto al valore di riferimento che rispetto alle altre tesi. Nella tesi 4 la capacità proliferativa ha presentato un vistoso calo a 180 giorni ( $0,54 \pm 0,10$ ) mantenendosi dopo su valori appena sopra il controllo negli ultimi due trimestri di conservazione. La tesi 2 ha avuto un andamento positivo a 90 giorni, mentre nei successivi trimestri si è mantenuta su valori appena al di sotto del controllo. La tesi 1 ha mostrato un recupero fino a 360 giorni. Per la tesi 1 si potrebbe supporre un effetto positivo degli ormoni di crescita; la loro presenza e la maggiore concentrazione di saccarosio (30 g/l) sembrano, invece, aver condotto la tesi 3 su valori più positivi e costanti.

“Sanacore” ha conservato un’alta percentuale di germogli vitali fino a 270 giorni con valori variabili tra il 75% e il 100%. Come evidenziato in [fig. 2a](#) e [tab. 6b](#), la tesi 1 ha mostrato la migliore *performance* nei primi 180 giorni con un numero medio dei germogli ( $6,75 \pm 2,32$ ) superiore al controllo ( $5,26 \pm 0,33$ ). Inoltre a 270 giorni il valore potrebbe considerarsi altrettanto positivo ( $4,50 \pm 0,96$ ) anche se di poco inferiore al controllo stesso. Tuttavia la lunghezza media dei germogli non ha raggiunto valori altrettanto soddisfacenti. Nella tesi 2 (senza ormoni di crescita ma con la stessa concentrazione di saccarosio della tesi 1) gli espianti hanno presentato solo a 90 giorni un numero medio di germogli proliferati soddisfacente ( $6,33 \pm 1,86$ ) e superiore al controllo; tuttavia il *trend*, negli intervalli successivi è stato abbondantemente al di sotto del valore di riferimento. Relativamente alla lunghezza dei germogli, la tesi 2 ha presentato un andamento costante solo fino a 180 giorni di conservazione ma al di sotto del controllo e una flessione nel terzo trimestre. La tesi 3, caratterizzata dalla massima concentrazione di saccarosio utilizzato e addizionato con ormoni di crescita, ha

mostrato un *trend* crescente fino a 270 giorni nel numero dei germogli ( $5,50 \pm 1,04$ ), mentre è stato registrato il valore massimo a 180 giorni per la lunghezza media ( $0,81 \pm 0,09$ ). Nella fig. 2a la tesi 3 ha mostrato la performance migliore fino al secondo trimestre rispetto alle tesi 1, 2 e 4 ma si è evidenziato a 270 giorni una decisa contrazione della lunghezza media. Sintomi di iperidricità si sono osservati solo a 270 giorni con una percentuale media del 25% in tutte le tesi.

In “Marabolo” i germogli nella tesi 3, rispetto alle altre tesi, hanno conservato la capacità proliferativa fino a 180 giorni. Il numero medio dei germogli ha mostrato un trend negativo da 90 a 180 giorni con valori al di sotto del controllo ( $5,05 \pm 0,38$ ) maggiormente evidente nel secondo trimestre, mentre la loro lunghezza media ha avuto un *trend* positivo dal primo al secondo trimestre con valori molto vicini o appena superiori a quelli del riferimento ( $0,76 \pm 0,04$ ). Le colture appartenenti alla tesi 2 si sono conservate fino a 180 giorni ma il numero e la lunghezza media dei germogli proliferati hanno registrato un peggioramento dal primo al secondo trimestre. Le tesi 1 e 4 hanno mostrato capacità di indurre proliferazione solo nei primi 90 giorni, peraltro al di sotto del valore di riferimento (fig. 3a; tab. 6c).

In “Rapparino”, il numero dei germogli proliferati nella tesi 3 ha raggiunto valori soddisfacenti, superiori al controllo ( $4,50 \pm 0,29$ ) a 90 giorni ma con una marcata riduzione a 180 giorni, rispettivamente con valori di  $5,75 \pm 0,48$  e  $3,50 \pm 0,29$ . Al contrario la lunghezza media dei germogli, superiori al riferimento ( $0,62 \pm 0,04$ ) sia a 90 che a 180 giorni, ha denotato un incremento dal primo ( $0,71 \pm 0,08$ ) al secondo trimestre,  $1,01 \pm 0,15$  (fig. 4a; tab. 6d). Le altre tesi hanno avuto una *performance* piuttosto insoddisfacente per il numero dei germogli; la tesi 2 ha invece mostrato un incremento della lunghezza media dei germogli dal primo al secondo trimestre, da  $0,47 \pm 0,08$  a  $0,93 \pm 0,18$ .

Nel complesso, quanto evidenziato dai dati sui quattro genotipi posti in crescita rallentata, i migliori risultati sono stati prevalentemente conseguiti dai germogli frigoconservati in tesi addizionate con regolatori di crescita (tesi 1 e 3). Ciò è in accordo con quanto rilevato da Ahmed *et al.* (2011) su esperimenti condotti su 9 genotipi di pero. Inoltre la diversa risposta genotipica potrebbe essere messa in relazione alla diversa esigenza di livelli di ormoni di crescita esogeni necessari per la crescita delle

culture, richiedendo quindi un livello ottimale differente da genotipo a genotipo. Stesse considerazioni sono state riportate da Wilkins *et al.* (1988), secondo cui bassi livelli di citochinine (BAP) rallentano i processi di senescenza migliorando la vitalità e la rigenerazione degli espianti. Nel presente studio la concentrazione di BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) potrebbe essere risultata ottimale e sufficientemente bassa da garantire alti livelli di sopravvivenza degli espianti. Di contro, quando cresciuti su substrati privi di ormoni (tesi 2 e 4) hanno prodotto risultati in larga parte meno soddisfacenti.

Il materiale frigoconservato è stato saggiato anche in un secondo ciclo di proliferazione e i dati sono stati raccolti dopo 30 giorni. La seconda subcoltura è stata utile per verificare il mantenimento della capacità proliferativa e per il raggiungimento della lunghezza necessaria ( $\geq 1.5$  cm) per l'introduzione in substrato di radicazione.

Nella fig. 1b e in tab. 6a, in “Ariddu di Core”, rispetto alla prima subcoltura, è confermata una generale flessione del numero medio di germogli negli ultimi due trimestri, particolarmente evidente nelle tesi 1, 2 e 4. Al contrario, rispetto alla prima subcoltura, il numero dei germogli delle tesi sono risultati nei primi 90 giorni sensibilmente migliorati. La tesi 1, ha mostrato complessivamente una *performance* di proliferazione pari al valore di riferimento nei primi due trimestri (rispettivamente  $5,00 \pm 0,49$  e  $5,00 \pm 0,58$ ) e un calo negli ultimi due passaggi di conservazione (rispettivamente  $4,25 \pm 0,63$  e  $2,83 \pm 0,63$ ). Come evidenziato in fig. 1b e tab. 6a, la lunghezza media dei germogli è risultata essere superiore al controllo ( $0,50 \pm 0,03$ ) in tutte le tesi in esame nei primi 180 giorni con un generale decremento nei mesi successivi, particolarmente evidente nelle tesi 1 ( $0,35 \pm 0,04$ ) e 2 ( $0,31 \pm 0,02$ ) nel terzo trimestre, in leggera ripresa a 360 giorni. Le tesi 3 e 4 hanno conservato un valore superiore al controllo a 270 giorni e al di sotto dello stesso nell'ultimo trimestre. Un elevato valore della lunghezza media dei germogli ottenuto a 180 giorni, ha fornito il maggior numero di germogli idonei al trasferimento in substrato di radicazione. A 270 giorni solo la tesi 3 ha permesso di ottenere germogli da porre in radicazione. Le altre tesi hanno prodotto germogli con lunghezza media insufficiente. Il declino della capacità proliferativa a 360 giorni ha pregiudicato la fase di radicazione in quanto nessun germoglio ha raggiunto la lunghezza necessaria. Tanto nella prima subcoltura che nella seconda sono stati osservati alcuni sintomi di iperidricità, con una incidenza

maggiore a 360 giorni rispetto ai precedenti trimestri con valori compresi tra il 16% (tesi 1) e il 40% (tesi 4).

In “Sanacore” (fig. 2b; tab. 6b), la tesi 1 presenta un numero medio di germogli in leggero decremento fino a 270 giorni, appena al di sotto del valore di riferimento. La tesi 3 mostra il maggiore valore a 270 giorni ( $6,67 \pm 0,88$ ) al di sopra del valore del controllo e di tutte le tesi saggiate. Le tesi 2 e 4, con andamento simile tra loro, presentano i valori più bassi, rispettivamente  $3,67 \pm 1,45$  e  $4,43 \pm 1,13$ . Per la lunghezza dei germogli proliferati (fig. 2b; tab. 6b), i migliori risultati si sono avuti in tutte le tesi fino al secondo trimestre in cui è stato raggiunto il massimo della loro *performance*. A 270 giorni è stata evidente la riduzione della capacità di proliferazione di tutte le tesi pregiudicando in seguito la disponibilità di materiale per la fase di radicazione, in particolare nelle tesi 3 e 4, meno evidente nelle tesi 1 e 2. Come per la prima subcoltura, sintomi di iperidricità si sono osservati solo a 270 giorni con valori percentuali dal 14% al 50% in tutte le tesi.

Durante la seconda subcoltura, come rilevato in “Marabolo” in fig. 3b e tab. 6c, il migliore comportamento è evidente nella tesi 2 rispetto alle altre tesi, in particolare nel numero dei germogli proliferati sebbene il valore sia stato più basso rispetto a quello del controllo. Per la lunghezza dei germogli, tutte le tesi hanno mostrato valori soddisfacenti a 90 giorni, ma solo le colture delle tesi 2 e 3 si sono conservate fino a 180 giorni.

In “Rapparino”, per il numero medio dei germogli la tesi 3 ha mostrato valori molto soddisfacenti a 90 giorni ( $5,5 \pm 0,43$ ) anche se con una marcata riduzione a 180 giorni ( $3,86 \pm 1,14$ ). La lunghezza dei germogli di tutte le tesi è stata positiva a 90 ma solo la tesi 3, con lavorabilità dei germogli fino a 180 giorni, ha mostrato valori soddisfacenti (fig. 4b; tab. 6d). Non sono stati osservati sintomi di iperidricità né in “Marabolo” né in “Rapparino”.

## RADICAZIONE

I dati relativi al numero delle radici e alla loro lunghezza sono stati rilevati dopo 40 giorni e confrontati con i valori di riferimento. La percentuale di radicazione è stata determinata sul totale dei germogli posti a radicare e i dati sono esposti in Tabella 4. I risultati sono stati fortemente penalizzati dall'iperidricità che ha compromesso la radicazione di un gran numero di germogli. La forte incidenza di iperidricità durante la fase di radicazione in postconservazione si potrebbe mettere in relazione sia al genotipo che all'uso di Gelrite™ come agente gelificante del substrato di radicazione mentre non sembrerebbe essere legato agli effetti della frigoconservazione. Infatti non sono stati evidenziati germogli affetti da iperidricità durante la conservazione a 4°C. Al contrario i genotipi saggiati hanno mostrato segni di iperidricità in postconservazione anche durante i cicli subcolturali analogamente a quanto evidenziato dalle colture di controllo (non sottoposte, quindi, alle basse temperature). Il medesimo comportamento porterebbe ad ipotizzare una stretta connessione con la diversa sensibilità genotipica piuttosto che agli effetti diretti della frigoconservazione. Inoltre, l'iperidricità si è anche evidenziata maggiormente in colture di “Ariddu di Core” e “Sanacore” (sporadicamente in “Marabolo” e “Rapparino”), ovvero in quelle cultivar che più a lungo hanno tollerato il periodo di conservazione (Tabella 5). Questo potrebbe ulteriormente avvalorare l'ipotesi sopramenzionata. In diversi studi sulla iperidricità, molta importanza è stata data anche agli effetti dell'agente gelificante usato in coltura *in vitro*. Un incremento della percentuale di agar si traduce in una maggiore forza gelificante e in una minore disponibilità di acqua verso la coltura in crescita *in vitro* e questo potrebbe tradursi in una ridotta incidenza dello stress fisiologico (Debergh *et al.* 1992, Mills and Tal, 2004, Whitehouse *et al.* 2002). E' stato dimostrato anche, in diversi studi, che l'uso di Gelrite™, rispetto all'agar, produce con maggiore incidenza iperidricità sebbene i meccanismi fisiologici siano tuttora poco conosciuti (Franck *et al.* 2004, Ivanova and Van Staden, 2011). L'accumulo di una eccessiva quantità di acqua nei tessuti iperidrici sia negli spazi intercellulari che all'interno dell'apoplasto è oggetto di diversi studi (van den Dries *et al.* 2011). Questa condizione, definita *waterlogging*, causa ipossia e di conseguenza stress ossidativo. Un'altra ipotesi potrebbe essere

quella secondo cui i chelati secretati dalla coltura possano dissolvere il Gelrite™ in prossimità del germoglio (Rojas–Martínez *et al.*, 2010), contribuendo alla maggiore quantità di acqua assorbibile dall’espianto.

In “Ariddu di Core”, la tesi 3 presenta la maggiore percentuale di germogli radicati dal primo al terzo trimestre di conservazione. I germogli appartenenti alla tesi 4, senza ormoni di crescita, non hanno radicato per tutto il periodo di conservazione. I valori relativi alla radicazione sono riferiti solo fino a 270 giorni oltre i quali nessun germoglio proliferato risultava avere lunghezza sufficiente per essere inserito in substrato di radicazione. Pertanto a 360 giorni il valore è pari a zero. Gli espianti frigoconservati nella tesi 4 presentano la peggiore *performance* con nessun germoglio radicato. Come evidenziato nella [fig. 1c](#) la migliore performance è rappresentata dalla tesi 3 (particolarmente per il numero delle radici) a 180 giorni ( $4,0 \pm 1,0$ ) e 270 giorni ( $4,33 \pm 0,88$ ). La lunghezza media delle radici dei germogli appartenenti alla tesi 3 ha presentato un andamento al di sotto del controllo ( $3,96 \pm 0,24$ ) maggiormente a 180 giorni ( $3,20 \pm 0,35$ ), con valori migliori registrati a 90 giorni ( $3,79 \pm 0,54$ ) e 270 giorni ( $3,80 \pm 0,29$ ). La tesi 1 ha avuto un andamento costante fino a 180 giorni per il numero di radici e un *trend* leggermente in declino per la loro lunghezza. In riferimento alla tesi 2, i germogli radicano solo a 180 giorni con una percentuale del 100% ma con valori inferiori al controllo. La fase di radicazione a 90 giorni si è mostrata particolarmente problematica a causa della frequente insorgenza di sintomi di iperidricità con percentuali variabili tra il 30% e il 100%. Le maggiori percentuali si sono manifestate a carico delle tesi 2 e 4 rispettivamente.

Per la fase di acclimatazione ed ambientamento, nella tesi di conservazione a 90 giorni la sopravvivenza in Jiffy® è stata del 100% per le plantule provenienti dalla tesi 1 e del 75% per quelle provenienti dalla tesi 3. A 270 giorni la sopravvivenza è stata del 50% per le plantule provenienti dalla tesi 3.

In “Sanacore”, invece, la tesi 3 ha presentato la maggiore percentuale di germogli radicati nel secondo intervallo di tempo di conservazione. Superata la soglia dei 180 giorni di conservazione non ha radicato nessun germoglio. La fase di radicazione è stata soggetta al fenomeno della iperidricità, con maggiore frequenza a 270 giorni con valori dal 50% (tesi 2 e 4) fino al 100% (tesi 1). Nel primo trimestre, le

percentuali di iperidricità sono state comprese tra il 25% e il 40% su tutte le tesi saggiate (Tabella 5). Come evidenziato dalla fig. 2c, nel secondo intervallo di tempo di conservazione le colture frigoconservate nelle tesi 1 e 4 hanno fatto registrare il maggiore numero di radici per germoglio radicato rispetto alle tesi 2 e 3 che si sono mantenute su valori appena al di sotto del valore di riferimento ( $2,65 \pm 0,36$ ). Per la lunghezza delle radici tutte le tesi hanno mostrato valori al di sotto del valore del controllo ( $4,4 \pm 0,2$ ). Aspetto importante da sottolineare è il diverso andamento mostrato dalle tesi nei primi due trimestri di conservazione: per il numero medio delle radici per germoglio radicato tutte le tesi hanno manifestato un andamento positivo, maggiormente evidente nelle tesi 1 e 4. Per la lunghezza delle radici solo le colture provenienti dalle tesi 3 e 4 hanno mostrato un andamento positivo. Nessun germoglio ha radicato da 270 giorni in poi.

In Jiffy<sup>®</sup>, a 90 giorni la sopravvivenza dei germogli radicati è stata soddisfacente e pari al 100% per quelli provenienti dalla tesi 3 e al 50% per quelli provenienti dalle tesi 1 e 4 (dati non riportati). Le plantule provenienti dalla tesi 2 non hanno mostrato capacità di sopravvivenza.

In “Marabolo”, la percentuale di radicazione è risultata essere soddisfacente nei primi 90 giorni di conservazione, in particolare nella tesi 1 con il 100% dei germogli radicati. Nelle tesi 3 e 4 i germogli radicati sono stati rispettivamente il 66,6% e il 75%. Al di sotto del 50% la tesi 2 che, diversamente dalle altre tesi, è stata l’unica tesi in cui i germogli hanno radicato anche a 180 giorni di conservazione con una percentuale del 25%. Relativamente al primo trimestre, il maggior numero di radici è mostrato nella tesi 1 ( $4,75 \pm 1,11$ ) ma appena al di sotto del valore del controllo ( $5,06 \pm 0,53$ ), la maggiore lunghezza delle radici nelle tesi 2 ( $4,20 \pm 0,33$ ) e 4 ( $4,73 \pm 0,31$ ), marcatamente al di sopra del valore di riferimento ( $2,64 \pm 0,01$ ). I valori registrati nella tesi 2 a 180 giorni (l’unica tesi a radicare fino a 180 giorni) sono abbondantemente al di sotto del valore di riferimento (fig. 3c) e in deciso calo rispetto al trimestre precedente.

In Jiffy<sup>®</sup> la sopravvivenza, per le plantule della prova del primo trimestre, è stata del 50% per le plantule provenienti dalle tesi 1 e 2. Per le tesi 3 e 4 i valori raggiunti sono stati rispettivamente del 100% e del 33.3%. Nel secondo trimestre, solo

le plantule provenienti dalla tesi 2 sono state poste in Jiffy® ma è stata rilevata una mortalità del 100%.

In “Rapparino”, la tesi 3 è stata l’unica a presentare germogli radicati fino a 180 giorni. La percentuale di radicazione è risultata essere per lo più soddisfacente nei primi 90 giorni di conservazione solo per le tesi 1, 2 e 3. La tesi 4 non ha mai mostrato germogli radicati. Solo nella tesi 3, con un valore del 50%, i germogli hanno radicato fino a 180 giorni (fig. 4c). A 90 giorni il numero medio delle radici delle tesi 1 e 2 sono state al di sopra del controllo, per la tesi 3 sono stati registrati valori al di sotto del valore di riferimento ma con un incremento a 180 giorni. La lunghezza delle radici non raggiunge valori accettabili. Non sono stati osservati sintomi di iperidricità.

Per quanto attiene all’acclimatazione ed all’ambientamento delle plantule radicate, a 90 giorni la sopravvivenza è stata nulla per il materiale proveniente dalle tesi 1 e 2 e del 12.5 % per quello proveniente dalla tesi 3. A 180 giorni le plantule provenienti dalla tesi 3 hanno evidenziato una sopravvivenza del 50%.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le possibilità offerte dalle colture di tessuti vegetali e dalle modifiche imposte ai loro ritmi di accrescimento si confermano sempre di vasto interesse. I sistemi di rallentamento della crescita, già sviluppati da diversi anni, giocano ancora oggi un ruolo di indubbio interesse nel vivaismo ordinario; attraverso questo sistema, infatti, è possibile mantenere una grande quantità di materiale in poco spazio e renderlo disponibile al momento della necessità in funzione dei flussi di domanda di piante da avviare alla vendita.

Questi vantaggi sono prevalentemente evidenti nel comparto dei portinnesti in cui oggi, soprattutto per alcuni genotipi per i quali la propagazione *in vitro* è prassi consolidata, attraverso queste tecniche di conservazione in crescita rallentata si è raggiunto un livello elevato di gestione ‘calibrata’ della produzione.

L’approccio sviluppato in questa prova è stata, invece, focalizzata su cultivar del germoplasma autoctono di susino per una finalità che nasce dalle esigenze di conservazione della biodiversità con metodologie che rendano possibile una rapida diffusione della stessa. Tuttavia, apparirebbe poco significativa l’applicazione di queste tecnologie alle cultivar che, una volta acclimatate, si troverebbero disponibili all’impianto ma risulterebbero franche di piede e, quindi, di ridotto interesse agronomico. In realtà, l’ipotesi di ricerca ha preso spunto da una specifica esigenza tecnica delle amministrazioni regionali che, di fronte ad una vasta ricchezza di germoplasma e alla possibilità di ampliarne la conservazione attraverso l’applicazione di specifiche misure del PSR 2007-2013, si è ritrovata nell’indisponibilità di materiale di propagazione e nella presenza di una rete di conservazione prevalentemente basata su sistemi *in situ*. In tal senso, la crescita rallentata e la conservazione con metodologie *in vitro* consentirebbero di operare un’intensa attività di raccolta *ex situ* in poco spazio, gestita in modo più agevole grazie a tempi più lunghi, e, nel contempo, poter disporre di una rapida fase di acclimatazione e di rigenerazione del materiale vegetale per costituire campi di piante madri in substrato controllato, in contenitore, dalle quali attingere per la distribuzione di nuovo materiale di propagazione.

Con queste premesse e con questi specifici obiettivi, focalizzando l'attenzione sul susino, in questo lavoro è stata saggiata la conservazione *in vitro* in crescita rallentata alla temperatura di 4 °C e in oscurità di quattro genotipi del germoplasma di susino siciliano, due di *Prunus domestica* L. (cv. Ariddu di Core, e Sanacore) e due di *Prunus cerasifera* Ehrh. (Marabolo e Rapparino). I risultati descritti evidenziano, in linea generale, una diversificata conservabilità *in vitro* dipendente dalla diversa risposta genotipica alle condizioni sperimentali descritte così come mostrato da diversi autori in prove sperimentali condotte sia in *Prunus* spp. che in altre specie. Più specificamente, appare interessante evidenziare una risposta nettamente diversa tra le due specie con una maggiore conservabilità in crescita rallentata manifestata dal *P. domestica* rispetto al *P. cerasifera*. Ad integrazione, quindi, di quanto riportato da diversi Autori, la risposta alla metodologia applicata potrebbe essere specie-specifica oltre che dipendente dal singolo genotipo.

In particolare, dalla diversa tolleranza delle varietà durante la loro permanenza a 4 °C è emerso che in “Marabolo” e “Rapparino”, le necrosi e gli imbrunimenti dei germogli hanno, di fatto, inficiato la conservazione delle colture restringendola a non oltre 180 giorni; al contrario, gli espianti di “Ariddu di Core” hanno mostrato una maggiore tolleranza alle basse temperature, raggiungendo un tempo massimo di conservazione di 360 giorni con ottime capacità di rigenerazione. In posizione intermedia si è posto il genotipo “Sanacore” (con una conservabilità massima di 270 giorni) che ha manifestato alcuni imbrunimenti, ingiallimenti limitati e alcune perdite più che altro a causa di contaminazioni fungine, senza le quali la sua *performance* avrebbe potuto essere sullo stesso livello di “Ariddu di Core”.

Nel complesso si può affermare che per le cultivar saggiate, il tempo ottimale di conservazione è stato di 6 mesi che rappresenta il tempo medio di conservazione secondo questa metodologia. Durante la frigoconservazione, è stato osservato un effettivo rallentamento della crescita e del metabolismo cellulare attraverso la totale assenza di proliferazione e di radicazione mentre la capacità di proliferazione ha mantenuto livelli significativi nonostante abbia mostrato generalmente un decremento all'aumentare del periodo di conservazione. La presenza degli ormoni di crescita e/o la maggiore concentrazione di saccarosio hanno dato, nel complesso, i migliori risultati nel

tempo. Dai dati sulla radicazione non è possibile trarre conclusioni certe e inequivocabili sulla relazione esistente tra le condizioni sperimentali di frigoconservazione e la capacità di radicazione. Il motivo sta nella forte incidenza del fenomeno della iperidricità osservata durante la fase di radicazione che, di fatto, ha indotto una forte riduzione del numero di espianti vitali da valutare in tale fase. Lo squilibrio fisiologico dell'iperidricità, sebbene i meccanismi non siano ampiamente conosciuti, sembra essere dovuto alla diversa sensibilità genotipica e all'uso di Gelrite™ come agente gelificante del substrato piuttosto che agli effetti della frigoconservazione stessa, dal momento che durante la permanenza alle basse temperature non si è avuto alcun caso di tale fisiopatia. Non sono state evidenziate differenze durante il trasferimento in Jiffy® rispetto alle prove condotte con germogli radicati non frigoconservati e quindi l'acclimatazione non è stata in alcun modo influenzata.

A conclusione di tale attività sperimentale, si può affermare che la conservazione a 4 °C e in oscurità nel susino ha determinato un effettivo rallentamento nella crescita dei germogli, mantenendo un buono standard qualitativo dei germogli frigoconservati e una buona capacità di rigenerazione al ripristino delle condizioni standard di coltura. Ampi margini di miglioramento sono da ricercare nella fase di radicazione, al fine di superare i fenomeni di iperidricità, nonché in termini di tempo massimo di stoccaggio. Alcuni possibili interventi correttivi sono individuabili nella composizione del substrato di conservazione presumibilmente aumentando la concentrazione di saccarosio e utilizzando un diverso agente gelificante durante la fase di radicazione. Tali obiettivi possono essere raggiunti senza particolari investimenti e costi aggiuntivi. Infatti, la metodologia qui esposta si è confermata quale valida strategia di conservazione che consente importanti ricadute nella filiera produttiva dei laboratori commerciali di micropropagazione soprattutto quando finalizzati alla conservazione della biodiversità e alla produzione di materiale per la costituzione di campi di piante madri fuori suolo.

L'obiettivo di favorire la rapida costituzione di centri di conservazione della biodiversità *ex situ* ed *in vitro* è stato ampiamente raggiunto e molti sono i margini di intervento con queste tecniche a vantaggio del recupero di biodiversità anche a rischio

di estinzione. La possibilità di dilazionare gli interventi e di diminuire la frequenza di subcolture, con minore rischio di variabilità somaclonale, ha fatto sì che la tecnica di crescita rallentata possa risultare anche di ausilio in questo comparto e con queste finalità, al di là di qualsiasi opportunità di tipo economico. Ciò, in definitiva, consente di acquisire ulteriori elementi tecnici e metodologici a servizio dell'attività di tutela e conservazione della biodiversità.

## Bibliografia

Abdul-Aziz M. Al-Bahrany, - 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*, 95, 285–295.

Ahmed M., Anjum M.A., Ahmed M.J., Sjid G.M., Yoqub A. and Shafqat M. – 2011. Role of plant growth regulators in preservation of *Prunus* germplasm *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10 (64), 14029-14037.

Ahmed M., Anjum M.A., Ahmed M.J., Shah A.H. and Hamid A. – 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. *Pak. J. Bot.*, 42 (3), 1639-1650.

Aitken-Christie J & Singh A.P. – 1987. Cold storage of tissue culture. In: Bonga J.M. & Durzan D.J. (eds) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, vol. 2, 285\_304. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.

Al-Ababneh S.S., Shibli R.A., Karam N.S. Shat Nawi M.A. – 2003. Cryopreservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.) shoot tips by encapsulation-dehydration and vitrification. *Adv. Hortic. Sci.*, 17, 15-20

Andreu P., Marin J.A., - 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock “Adesoto 101” (*P.insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106, 258-267.

Andrivon D. – 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*, 45, 1027-1035.

Ashmore S.- 1997 Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. In F. Engelmann (ed). *International Plant Genetic Resource Institute*, Rome.

Bekheet S.A. – 2000. *In vitro* preservation of *Asparagus officinalis*. *Biologia Plantarum*, 43(2), 179 – 183.

Bekheet S.A. – 2007. *In vitro* preservation of globe artichoke germplasm. *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, 17, 1-9.

Berjak P., Mycock D., Wesley-Smith J., Dumet D. & Watt M.P. -1996. Strategies of *in vitro* conservation of hydrated germplasm. In: *International Workshop on in vitro Conservation of Plant Genetic Resources*. University Kebangsaan Malaysia and IPGRI,

Kuala Lumpur, Malaysia.

Bertrand-Desbrunais A., Noirot M. & Charrier A. – 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Influence of reduced concentrations of sucrose and low temperature. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 105-110.

Blasi C., Boitani L., La Posta S., Manes F., Marchetti M.- 2005. Stato della biodiversità in Italia - Contributo alla strategia nazionale per la biodiversità. Palombi editori

Brown D.C.W., Leung D.W.M. and Thorpe T.A. – 1979. Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus. *Phys. Planta.*, 46, 36-41.

Cassana F.F., Falqueto A.R., Braga E.J.B., Peters J.A. and Bacarin M.A.- 2010. Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. *J. Braz Plant Physiol.*, 22(3), 167-170.

Channuntapipat C., Sedgley M., Collins G., - 2003. Micropropagation of almond cultivars “Nonpareil” and “Ne Plus Ultra” and the hybrid rootstock “Titan x Nemaguard”. *Scientia Horticulturae*, 98, 473- 484.

Cho E.G., Hor Y.L., Rao V. R., Engelmann F. – 2002. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 23, 309-316.

Commission of the European communities. - 2001. “Communication from the commission to the council and the European parliament. Biodiversity action plan for economic and development co-operation” - Brussels.

Commission of the European communities, - 2006. “Communication from the commission halting the loss of biodiversity by 2010 and beyond Sustaining ecosystem services for human well-being” – Brussels.

Conference of the parties to the convention on biological diversity serving as the meeting of the parties to the Cartagena protocol on biosafety, - 2008. “Report of the fourth meeting of the Conference of the parties to the convention on biological diversity serving as the meeting of the parties to the Cartagena protocol on biosafety” – Fourth meeting Bonn, 12-16 May.

Consiglio delle Comunità Europee – 1992. “Direttiva 92/43/CEE del Consiglio del 21 maggio 1992 relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche”.

Continella A., Cicala A., Bonfanti C., Continella G., - 2011. Reperimento, conservazione e valorizzazione del germoplasma cerasicolo etneo. Convegno nazionale del ciliegio – Vignola (Mo).

“Convenzione relativa alla conservazione della vita selvatica e dell’ambiente naturale in Europa”. Berna, 19 settembre 1979.

Corredoira E., San Josè M.C., Ballester A., Vieitez A.M. – 2004. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of european chestnut. *CryoLetters*, 25, 33-34.

Cupani F. – 1696. “Hortus catholicus”.

Damiano C., Delia G., Frattarelli A., Farina L. and Buccheri M. - 2009. *In vitro* Multiplication, Rooting, Acclimatization and related Protein Profiles of Rootstock “Citation” (*Prunus Salicina* x *P. persica*). *Acta Hort.*, 812.

Damiano C. – 2009. La micropropagazione in Italia: laboratori e produzioni. *Italus Hortus*, vol 16 n.2, 295.

De Almeida W.A.B., De A.A. Mourão Filho F, Mendesb M.J. and Rodriguez A.P.M.,- 2006. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia. Plantarum*, 50 (3), 321- 325.

Debergh P., Aitken-Christie J., Cohen D., Grout B., Von Arnold S., Zimmerman R., Ziv M. – 1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and organ Culture*, 30, 135-140.

Debabrata S. and Prakash S. Naik Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* vol 102 number 2 275-280

De Carlo A., Benelli C. and Lambardi M. – 2000. Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters*, 21, 215-222.

De Carlo A., Benelli C. and Lambardi M. – 2009. La micropropagazione per la salvaguardia della biodiversità vegetale: esperienze condotte presso CNR\_IVALSA. *Italus Hortus* 16 (2), 175-179.

De Rogatis A., Ducci F., Guerri S., Vedele S. – 2009. Colture *in vitro* in *Prunus avium* L.. *Italus Hortus* 16 (2), 116-119.

De Salvador F.R., Engel P., Fideghelli C. – 2011. La collezione di ciliegio presso il Centro Nazionale di Germoplasma Frutticolo del CRA-FRU di Roma: caratterizzazione, ricerca e valorizzazione di varietà autoctone. Convegno nazionale del ciliegio. Vignola(Mo).

Dobrąnszki J.,Teixeira Da Silva J.A. – 2010. Micropropagation of apple - A review.

Biotechnology Advances, 28, 462-488.

Dodds J.H. and Roberts L.W. – 1985. Experiments in plant tissue culture. 2<sup>nd</sup> ed, Cambridge University Press, 172-179.

Dorion N., Kadri M. and C. Bigot – 1991. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. Acta Hort. 298, 335-340.

Dradi G., Roncasaglia R., Ozudogru E.A., Lambardi M.- 2011. Conservazione *in vitro* in crescita rallentata del portainnesto di ciliegio Gisela® 5. Convegno nazionale del ciliegio-Vignola (Mo).

Dries van den N., Krens F.A., Gianni S. and de Klerk GJ. – 2011. *Hyperhydricity in Arabidopsis seedlings cultured in vitro*. Proceeding in 7<sup>th</sup> International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding Biotechnological advances in In Vitro Horticultural Breeding. Ghent, September 18 – 22, 2011

Druart P., - 1985. *In vitro* germplasm preservation techniques for fruits trees. In: A. Schäfer-Menuhr (ed), *In vitro* techniques – Propagation and long-term storage, Nijhoff / Junk for CEC, Dordrecht., 167-171.

Durkovic J, - 2006. Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum* 50(4), 733-736.

Dussert S., Chabrillange N., Anthony F., Engelmann F, Recalt C. and Hamon S.. Variability in storage response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. *Plant cell reports* vol 16 number 5 344-348.

Engelmann F. – 1997. *In vitro* conservation method. In: Ford-Lloyd B.V., Newbury J.H. and Callow (eds). *Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and Use*. CABI, Wellingford., 119-162.

Engelmann F. – 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: F. Engelmann and H Takagi (eds), *cryopreservation of tropical plant germplasm – Current research progress and applications JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome*, 8-20.

Engelmann F. – 2004. Plant cryopreservation: progress and prospect. *In vitro Cell, Dev. Biol.-Plant*, 40, 427-433.

Engelmann F. – 2009. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. In: Proc.IIIrd IS on Acclim. And Establ. Of Micropropagated Plants. Acta hort.,812, ISHS.

Fabre J., Dereuddre J. – 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to

cryopreservation of potato shoot-tips. *CryoLetters* 11, 413-426.

FAO, - 1996 The State of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, Italy.

Fideghelli C., Engel P. – 2011. L'attività di raccolta, caratterizzazione, valorizzazione e conservazione della biodiversità vegetale di interesse agricolo in Italia con particolare riguardo alle risorse genetiche frutticole. *Review n.15. Italus Hortus* 18 (3), 33-45.

Finkeldey, R., Gregorius, H.F. 1994. Genetic resources: selection criteria and design. In: Z.S. &H.H. Hattemer (Eds.), *Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry*, Kwang Moon Kag, Seoul, pp. 322-347

Flecher, P.J. – 1994. *In vitro* long-term storage of asparagus: *New Zeal. J. Crop. Hort. Sci.*, 22: 351-359.

Ford-Lloyd B. and Jackson M. – 1996. *Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use*, Edward Arnold Ltd., London.

Franck, T., Kevers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Deby, C., Greimers, R., Serteyn, D. and Deby-Dupont, G. – 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on Gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 519-527.

Garbeva P., Van Veen Ja. and Van Elsas J.D. – 2004. Microbial diversity in soil: Selection of Microbial populations by plant and Soil type and implications for disease suppressiveness. *Ann. Rev Phytopathol.*, 42, 247-270.

Goidànich G. – 1994. *Manuale di Patologia Vegetale*. Vol 2. Ed. Agr. Bologna

Gonzales-Arno M.T. and Engelmann F. – 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27, 155-168.

Gonzales-Arno M.T., Juarez J., Ortega C., Navarro L., Duran-Vila N. – 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of Citrus using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*, 24, 85-94.

Gürel S. Gülsen Y, - 1998. The Effects of Different Sucrose, Agar and pH Levels on *In vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Tr. J. of Botany*, 22, 363-373 X.

Gutierrez Pesce P. & Rugini E.,- 2004. Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock "Colt" (*Prunus avium* P. pseudocerasus). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79, 223–232.

Hae Boong J., Ha Ssang Hee, Kang Kwang Yoon – 1996. *In vitro* preservation method of culturing shoot tip at low temperature in strawberry. RDA Journal of Agriculture Science Biotechnology, 38(1), 284-289.

Hassan N.A. and Bekheet S.A.- 2008. Mid-term storage and genetic stability Strawberry Tissue cultures. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4(5), 505-511.

Hausman J.F., Neys O., Kevers C. 6 Gaspar T. – 1994. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of poplar shoots. Plants Cell, Tissue Organ Culture, 38, 65-67.

Hdider C., Desjardins Y. – 1994. Effect of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. Plant Cell Tissue Organ Cult, 36, 27-33.

Hill J.P., Germino M.J. and Alongi D.A. – 2011. Carbon-use efficiency in green sinks is increased when a blend of apoplastic fructose and glucose is available for uptake. Journal of Experimental Botany, vol. 62, 2013-2022.

Impallari F.M., Monte M., Girgenti V., Del Signore M.B., Sottile F. - 2010 - Biodiversity of Sicilian Fruit Trees: Studies on Plum. Acta Horticulturae, n. 874, pp 37-43.

International Technical Conference on Plant Genetic Resources – 1996. “Global Plan of Action for the conservation and sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture and the Leipzig Declaration” – Leipzig, Germany 17-23 June.

Isikalan C., Akbas F. A., Namli S., Tilkat E. and Basaran D. - 2008. *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). African Journal of Biotechnology, 7(12), 1875-1880.

Ivanova M., Van Staden J. – 2011. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture(in press).

Jain N. & Babbar S.B., - 2003. Regeneration of “juvenile” plants of black plum, *Syzygium cuminii* Skeels, from nodal exp of mature trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73, 257-263.

Janeiro LV., Vieitez AM., & Ballester A. – 1995. Cold storage of *in vitro* cultures of wild cherry, chestnut and oak. Ann. Sci. For., 52, 287-293.

Joannsen W.L. – 1926 . Elemente der exacten Erblchkeitslehre. G. Fischer, Jena.

Kameswara Rao N. – 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use

through biotechnology. African Journal of Biotechnology, vol. 3(2), 136-145.

Kartha K.K., Mroginski N.L., Phal K. and Leung N.L. – 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea Arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Sci. Lett., 22, 301-307.

Kartha K.K. and Engelmann F. – 1994. Cryopreservation and germplasm storage. In Vasil I.K. and Thorpe T.A. (eds), Plant Cell, and Tissue culture. Cluwer, Dordrecht., 195-230.

Kinet JM. & Parmentier A. – 1989. The Flowering behavior of micropropagated strawberry plants cv. Gorella: the influence of the number of subcultures on the multiplication medium. Acta Hort., 265, 327-334.

Koch KE – 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol boil., 47, 509-540.

Kotsias D., Roussos P.A. 2001. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. Scientia Horticulturae, 89, 115-128.

Kovalchuk I., Lyudvikova Y., Volgina M., Reed B.M. – 2009. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. Plant Cell Tiss. Org.Cult..

Lambardi M., Fabbri A., Caccavale A. – 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tips. Plant Cell Rep. 19, 213-218.

Lambardi M. – 2002. Cryopreservation of Germplasm of Populus (Poplar) Species. In: L. Towill - Cryopreservation of Plant Germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 50. 269-286. Springer, Berlin Heidelberg.

Lambardi M., Benelli C., De Carlo A., Fabbri A., Grassi S., Lynch P.T. – 2002. Medium and long-term *in vitro* conservation of olive germplasm (*olea europaea* L.). Acta Hort. 586, 109-112.

Lambardi M., De Carlo A. – 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In S.M. Jain e K. Ishii (eds), Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, 815-840.

Lambardi M., Benelli C. - 2007. La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree. Frutticoltura n. 6.

Lambardi M., De Carlo A. – 2009. Tecniche ed applicazioni della criogenia alla

conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale. Review n.9. Italus Hortus, 16(1), 79-98.

Lambardi M., Ozudogru A.E., 2010. La propagazione “in vitro” dei portinnesti e delle specie da frutto. Frutticoltura 12: 18-25.

Ledig, F.T. 1986. Conservation strategies for forest gene resources. For Ecol Manage 14, 77-90.

Legge 6 dicembre 1991, n.394. Legge quadro sulle aree protette. Testo coordinato (Aggiornato al D.L. n. 262/2006). (GU n. 292 del 13.12.1991, S.O.).

Legge 14 febbraio 1994, n. 124 (GU n. 44 S.O. del 23.02.1994) “Ratifica ed esecuzione della Convenzione sulla biodiversità, con annessi - Rio de Janeiro il 5 giugno 1992”.

Lundergan C. & Janic J. – 1979. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. HortScience, 14, 514.

Marin J.A., Arbeloa A., Castillo M. and Andreu P., - 2009. Root Acclimatization of the Micropropagated Fruit Tree Rootstock “Adafuel” (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb x *P. persica* (L. Batsch). Acta Hort., 812.

Marin M.L. and Duran-Vila N. - 1991. Conservation of Citrus Germplasm *in vitro*. J.Amer. Soc.Hort.Sci., 116(4), 740 -746.

Marino G., Rosati P. and Sagrati F. – 1985. Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks. Plants Cell, Tissue Organ Culture, 5, 73-78.

Matsumoto T., Sakai A., Yamada K., - 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Rep., 13, 442-446.

Mills D., Tal M., - 2004. The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 78, 209-216.

Ministero dell’Ambiente – Commissione per l’ambiente globale, 1993 – “Piano nazionale per lo sviluppo sostenibile. In attuazione dell’agenda 21” – Approvato dal CIPE nella seduta del 28 dicembre.

Moncousin C & Ducreux G. – 1984. Activité peroxydasique et rhizogènese dans le cas de *Cynara scolymus* L.: Évolution au cours de repiquages successifs de bouture cultivées *in vitro*. Comparaison avec de jeunes plantes issues de grains. Agronomie 4, 105-111.

- Monette P.L. – 1986. Cold storage of kiwifruit shoot tips *in vitro*. *Hortscience*, 21, 1203-1205.
- Monette P.L. – 1988. Grapevine (*Vitis vinifera* L.) In: Bajaj YPS (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol.6 Crops II, 3-37. Springer Verlag.
- Mullin R.H. and Schlegel D.E. - 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *Ort. Sci.*, 11, 100-101.
- Muna AL-Sabbagh, Ahmad Abdul-Kader, Mahmoud Khoder & Abdul-Rahman Kalhout, - 1999. *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 203–208.
- Murashige T., Skoog F. – 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nazioni Unite, 1992 – “Convention on biological diversity” – Rio de Janeiro, 5 June.
- Negri V., Tosti N. & Standardi A. – 2000. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62, 159–162.
- Neri D. e Virgili S., 2002. *Progetto di recupero e valorizzazione del germoplasma melo nelle Marche*. Atti convegno Mela rosa e mele antiche. Montelparo
- Nicosia F. – 1735. “Il podere fruttifero e dilettevole”.
- Oka S. and Niino T. – 1997. Long term storage of pear (*Pyrus* sp.) shoot cultures *in vitro* by minimal growth method. *Jpn. Agr. Res. Quart.*, 31, 1-7.
- Orlikowska T. – 1992. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 1-7.
- Panis B., Thinh N.T., - 2001. Cryopreservation of Musa germplasm. INIBAP Technical Guideline 5. In: J.V. Escalant e S. Sharrock (eds) *International Network for the improvement of Banana and Plantain*. IPGRI, Montpellier, 1-45.
- Pérez-Molphe-Balch E. - 1997. *In vitro* Plant Regeneration of Mexican Lime and Mandarin by Direct Organogenesis. *HortScience*, vol. 32 (5), 931-934.
- Perez-Tornero O., Ortìn-Pàrraga F., Egea J. And Burgos L. – 1999. Medium-term storage of apricot shoot tips *in vitro* by minimal growth method. *HortScience*, 34 (7), 1277-1278.
- Piccini C. – 2010. La Biodiversità in Italia: stato, minacce, risposte. Il contributo dell’Annuario dei dati ambientali ISPRA. Seminario “Per una cultura della

Biodiversità". Roma, Villa Celimontana, 8 aprile 2010 Pignatti S. (a cura di) – 2000. *Ecologia vegetale* UTET

Pruski K., Kozai T., Lewis T., Astatkie T. & Nowak J. – 2000. Sucrose and light effects on *in vitro* cultures of potato, chokecherry and Saskatoon berry during low temperature storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 215–221.

Quoirin M., Lepoivre P. – 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de Prunus. *Acta Hort.*, 78, 437-442.

Reed B.M. – 1993. Improved survival of *in vitro* stored *Rubus* germplasm. *J. Am. Hort. Sci.*, 118, 890-895.

Reed B.M., Uchendu E. – 2008. Controlled rate cooling. In: B.M. Reed (ed) *Plant cryopreservation. A Practical Guide*. Springer, New York, 77-92.

Regolamento (CE) N° 1257/1999 del Consiglio del 17 maggio 1999 sul sostegno allo sviluppo rurale da parte del Fondo europeo agricolo di orientamento e di garanzia (FEAOG) e che modifica ed abroga taluni regolamenti.

Reidiboym-Talleux L., Diemer F., Sourdioux M., Chapelain K. & Grenier-De March G. - 1999. Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55, 199–209.

Ricciardi L., Filippetti A. – 2000. L'erosione genetica di specie agrarie in ambito mediterraneo: rilevanza del problema e strategie d'intervento. *Cahiers Options Méditerranéennes*, vol.53.

Robert H.F. – 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Sci. Technol.*, 1, 499-514.

Roca W.M., Reyes R. and Beltran J. – 1984. Effect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germplasm. *Proc. Sixth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*. Lima, Perù, 441-446.

Roncasaglia R., Benelli C., De Carlo A., Dradi G., Lambardi M., Ozudogru E.A. – 2009. Fattori che influiscono sulla conservazione in crescita rallentata di specie da frutto. *Italus Hortus* 16 (2), 234-238.

Rojas-Martinez L., Richard G.F. Visser and Geert-Jan de Klerk – 2010. The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 10, n° 4, 1-5.

Romano A. and Martins-Loução M.A. - 1999. *In vitro* cold storage of cork oak shoot cultures. *Plant cell, tissue and organ culture*, vol 59 number 2 155-157.

- Roxas N.J.L., Tashiro Y., Miyasaki S., Isshiki S. and Takeshita, A. – 1985. *In vitro* preservation of Higo chrysanthemum *Dendratema x grandiflorum* (Ramat.) Kitam.. J. Japan. Hortic. Soc., 63, 863- 870.
- Russo G., Russo P., Potenza M. e Laterza G. - 2009. Prove di micropropagazione di Citrus clementina Hort. Ex Tanaka, cv Comune. Italus Hortus, 16 (2), 9.
- Rybczyński JJ., Borkowska B., Fiuk A., Gawrońska H., Śliwińska E., Mikula A. – 2007. Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of *in vitro* cultures *Gentiana kuroo* (Royle) germlings. Acta Physiol. Plant, 29, 445-453.
- Sakai A., Kobayashi S. and Oiyama I. – 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification, Plant Cell, Rep. 9, 30-33.
- Sakai A. – 2000. In Cryopreservation of tropical plant germplasm, (eds) Engelmann F. & Takagi H. IPGRI, Rome, 1-7.
- Sakai A. and Engelmann F. – 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLetters, 28, 151-172.
- Sakai A., Hirai D., Niino T. – 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, 33-58.
- Sarkar D. and Naik P.S. – 1998. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro* Euphytic., 102, 275-280.
- Sauer A. – 1985. *In vitro* propagation of *Prunus avium* L. and storage of *in vitro* derived plantlets. Acta Hort., 169, 351.
- Scarascia Mugnozza G.T. – 1974. Le risorse genetiche vegetali. Principi, realtà, problemi. Giornale Botanico italiano, Vol.108- 5, 247-257.
- Shatnawi M.A., Engelmann F., Frattarelli A., Damiano C. – 1999. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.). CryoLetters, 20, 13-20.
- Shibli R.A. – 1991. *In vitro* acclimatization of chrysanthemum *morifolium* Ramat. After *in vitro* water stress. Plant Tiss Cult., 1, 97-100.
- Shibli R.A., Smith M.A.L. and Spomer L.A. – 1992. Osmotic adjustment and growth responses of three (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) cultivars to osmotic stress induced *in vitro* J. Plant Nutr., 15, 1373-1381.
- Shibli R.A., Shatnawi M.A., Ajlouni M.M., Jaradat A. and Adham Y. – 1999. Slow

growth *in vitro* conservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.). *Advances in Hort. Sci.*, 13, 133-134.

Shibli R.A., Shatnawi M.A., Subaih W.S. and Ajlouni M.M. – 2006. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(4), 373-382.

Singh S., Raj B.K., Bhattacharyya and Deka P.C. – 1994. *In vitro* Propagation of Citrus reticulate Blanco and Citrus limon Burm F.. *Hortscience*, 29(3), 214-216.

Singh S. and Rajam M.V. - 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15(1), January.

Son SH., Chun YW., Hall RB. – 1991. Cold storage of *in vitro* cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* x *P. grandidentata* Michx). *Plant Cell Tissue organ Cult.*, 27, 161-168.

Sottile F., Del Signore M.B., Spartà G., Restuccia S., 2007. La Sicilia ha deciso di salvare le varietà frutticole autoctone. *L'Informatore Agrario*, 39: 30-34.

Standardi A., Micheli M. – 2007. Biodiversità e propagazione. Atti della giornata di studio: La biodiversità nell'arboricoltura Italiana. Palumbo Ed.

Tabachnik L. and Kester D.E. - 1977. Shoot Culture for Almond and Almond-Peach Hybrid Clones *in vitro*. *Hortscience*, 12(6), 545-547.

Tahtamouni R.W. and Shibli R.A. – 1999. Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (*Pyrus Syriaca*). *Advances in Hort. Sci.*, 13, 156-160.

Thakura A., Kanwar – 2008. Micropropagation of 'Wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai I. Induction of Rooting. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 36(2), 104-111.

Tichá I., Čáp F. Pacovská D., Hofman P., Haisel D., Čapková V., Schäfer C. – 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Phyiol. Plant*, 102, 155-162.

Towill L.E., Forsline P.L., Walters C., Waddell J.W., Laufmann J. – 2004. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: Results from 1915 accessions. *Cryoleters Vol 25* (5), 323-334.

Uchendu E., Reed B.M. – 2007. A comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of mint (*Mentha* spp.). *Plant Physiol.*, 87, 201-205.

Ullah Khan Ehsan , Xing-Zheng Fu , Jing Wang, Qi-Jun Fan, Xiao-San Huang, Ge-Ning Zhang, Jie Shi, Ji- Hong Liu - 2008. Regeneration and characterization of plants

derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. *Scientia Horticulturæ*.

Van Huylenbroeck JM., Debergh PC. – 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Phisyol. Plant*, 96, 298-304.

Vegis A. (1964) Dormancy in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 15, 185-224.

Wanas W.H., Callow J.A., Withers L.A. – 1986. Growth limitation for the conservation of pear genotypes. In: Withers L.A., Alderson P.G. (eds) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Application*. London, Butterworths, 285-290.

Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D. & Blakeway F. - 2000. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 161–164.

Wilkins C.P., Dodds J.H. and Newburry H.J. – 1988. Tissue culture conservation of fruit trees. *FAO/International Board of Plant Genetic resources Newsletter*, 73/74, 9-20.

Wilson S.B., Rajapakse N.C. and Young R.E. – 2000. Media composition and light affect storability and post storage recovery of micropropagated hosta plantlets. *Hortscience*, 35, 1159-1162.

Whitehouse A.B., Marks T.R., Edwards G.A. – 2002. Control of hyperhydricity in eucalyptus axillary shoot culture grown in liquid medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 71, 245-252.

Zimmerman RH. – 1991. Micropropagation of temperate fruit and nut crops. In: Debergh PC. & Zimmerman RH: (eds) *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 231-246.

Zullini A.-1999. La biodiversità e il concetto di specie, in Vittorio Ingegnoli, Renato Massa (a cura di), *Biodiversità, estinzione, conservazione. Fondamenti di conservazione biologica*, UTET, Torino 1999, pagg. 50-73.

**TABELLE GRAFICI E FOTO**

TESI	Saccarosio	BAP	IBA
	g/l	µM	µM
<b>Tesi 1</b>	20	2,2	0,49
<b>Tesi 2</b>	20	/	/
<b>Tesi 3</b>	30	2,2	0,49
<b>Tesi 4</b>	30	/	/
<b>Controllo</b>	30	2,2	0,49

**Tab. 1:** composizione substrati di conservazione in crescita rallentata e stabilizzazione *in vitro*. I substrati colturali sono composti da: Sali MS con vitamine, 8 g/L di Agar, 2 ml/L di PPM®.

Cultivar	90 giorni				180 giorni				270 giorni				360 giorni			
	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Arido di Core	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	87,5	100	100	75	75
Sanacore	100	100	100	100	91,6	100	66,66	91,6	62,5	75	50	62,5	0	0	0	0
Marabolo	93,75	93,75	100	100	0	25	25	8,33	0	0	0	0	0	0	0	0
Rapparino	100	100	100	100	58,3	25	50	25	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 2.** Percentuale di espianti vitali durante frigoconservazione per ciascun periodo di osservazione.

Cultivar	90 giorni				180 giorni				270 giorni				360 giorni			
	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Arido di Core	100	100	100	100	100	75	100	50	100	75	100	100	75	67	100	100
Sanacore	100	75	100	75	100	75	75	100	100	100	100	100	/	/	/	/
Marabolo	75	100	100	75	0	100	100	0	/	/	/	/	/	/	/	/
Rapparino	100	100	100	75	0	66,6	100	0	/	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 3.** Percentuale di espianti vitali in post-conservazione alla fine della prima subcoltura.

Cultivar	90 giorni				180 giorni				270 giorni			
	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Arido di Core	25	0	40	0	100	100	100	0	0	0	75	0
Sanacore	20	25	20	20	14,3	33,33	100	28,6	0	0	0	0
Marabolo	100	44,4	66,6	75	0	25	0	0	/	/	/	/
Rapparino	50	66,66	90	0	0	0	50	0	/	/	/	/

**Tab. 4.** Percentuale di espianti radicati per ciascun periodo di osservazione.

Cultivar	90 giorni				180 giorni				270 giorni			
	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI	TESI
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Arido di Core	37,5	83,3	30	100	0	0	0	0	/	/	0	/
Sanacore	40	25	30	40	14,2	0	0	28,5	100	50	/	50
Marabolo	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/
Rapparino	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/

**Tab. 5.** Percentuale di espianti iperidrici durante la fase di radicazione per ciascun periodo di osservazione.

TESI	90 giorni				180 giorni				270 giorni				360 giorni			
	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.
	medio	medio	media	media	medio	medio.	media	media	medio	medio	media	media	medio	medio	media	media
	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.
1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	
		(cm)	(cm)			(cm)	(cm)			(cm)	(cm)			(cm)	(cm)	
1	3,75	5,00	0,29	0,68	4,00	5,00	0,39	0,90	4,75	4,25	0,51	0,35	2,00	2,83	0,58	0,45
	n.s	n.s	c	n.s.	a	a	n.s.	n.s.	a	a	n.s.	b	n.s.	b	b	n.s.
2	3,50	4,17	0,61	0,68	3,67	3,25	0,44	0,85	2,33	3,50	0,49	0,31	2,00	2,00	0,43	0,33
			b		ab	b			b	a		b		b	b	
3	3,75	4,20	0,71	0,60	3,25	3,25	0,54	0,87	5,25	4,38	0,62	0,63	2,67	4,33	0,81	0,42
			b		b	b			a	a		a		a	a	
4	3,50	4,86	0,94	0,65	3,50	4,50	0,54	0,79	2,50	2,50	0,56	0,51	2,33	2,33	0,51	0,37
			a		a	a			b	b		a		b	b	

**Tab. 6a. Ariddu di Core.** Numero e lunghezza (cm) dei germogli proliferati durante la prima e Seconda subcoltura.

Lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna mostrano differenze statisticamente significative per  $P \leq 0,05$  (Test di Duncan).

ns = non significativo.

TESI	90 giorni				180 giorni				270 giorni			
	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.
	medio	medio	media	media	medio	medio.	media	media	medio	medio	media	media
	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.
1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	
		(cm)	(cm)			(cm)	(cm)			(cm)	(cm)	
1	5,50	5,43	0,64	0,65	6,75	5,20	0,53	0,89	4,50	4,75	0,59	0,64
	a	n.s.	n.s.	n.s.	a	a	b	n.s.	ab	b	n.s.	n.s.
2	6,33	4,55	0,63	0,69	3,25	3,33	0,65	0,79	3,50	4,25	0,54	0,66
	a				c	c	b		b	b		
3	3,25	4,89	0,67	0,69	4,75	4,25	0,81	0,79	5,50	6,67	0,45	0,45
	c				b	b	a		a	a		
4	4,33	4,22	0,69	0,79	4,50	3,30	0,72	0,82	5,50	4,43	0,56	0,50
	b				b	c	ab		a	b		

**Tab. 6b. Sanacore.** Numero e lunghezza (cm) dei germogli proliferati durante la prima e seconda subcoltura.

Lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna mostrano differenze statisticamente significative per  $P \leq 0,05$  (Test di Duncan).

ns = non significativo.

TESI	90 giorni				180 giorni			
	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.
	medio	medio	media	media	medio	medio.	media	media
	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.
	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub
			(cm)	(cm)			(cm)	(cm)
1	4,33	2,80	0,29	0,79	-	-	-	-
	n.s.	n.s.	b	b				
2	3,50	3,80	0,68	1,21	2,00	3,00	0,55	0,86
			a	a				
3	4,75	3,00	0,74	1,31	3,67	1,33	0,79	0,75
			a	a				
4	3,33	3,25	0,67	1,08	-	-	-	-
			a	a	*	**	ns	ns

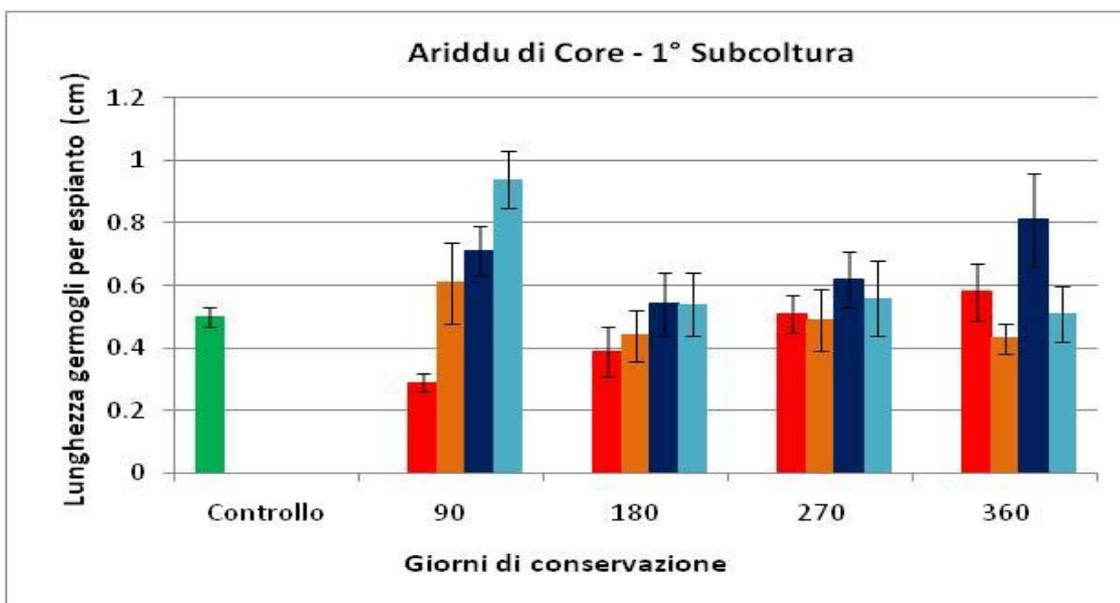
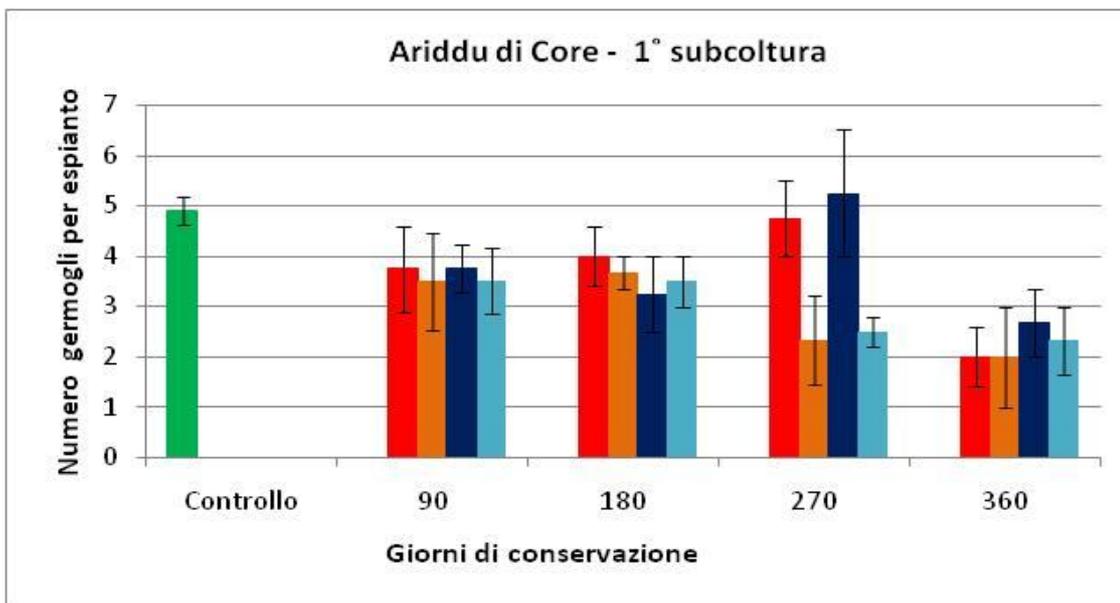
**Tab. 6c: Marabolo.** Numero e lunghezza (cm) dei germogli proliferati durante la prima e seconda subcoltura.  
Lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna mostrano differenze statisticamente significative per  $P \leq 0.05$  (Test di Duncan).

\*, \*\* Differenza tra medie analizzata tramite Test di Tukey per  $P \leq 0,05$  e per  $P \leq 0,01$   
ns = non significativo.

TESI	90 giorni				180 giorni			
	N°	N°	Lungh.	Lungh.	N°	N°	Lungh.	Lungh.
	medio	medio	media	media	medio	medio.	media	media
	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.	germ.
	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub	1 sub	2 sub
			(cm)	(cm)			(cm)	(cm)
1	3,00	4,50	0,52	0,96	-	-	-	-
	b	b	b	a				
2	2,25	3,80	0,47	1,01	1,50	2,00	0,93	0,52
	b	bc	bc	a				
3	5,75	5,50	0,71	1,14	3,50	3,90	1,01	0,95
	a	a	a	a				
4	2,33	2,00	0,40	0,73	-	-	-	-
	b	c	c	b	*	*	ns	ns

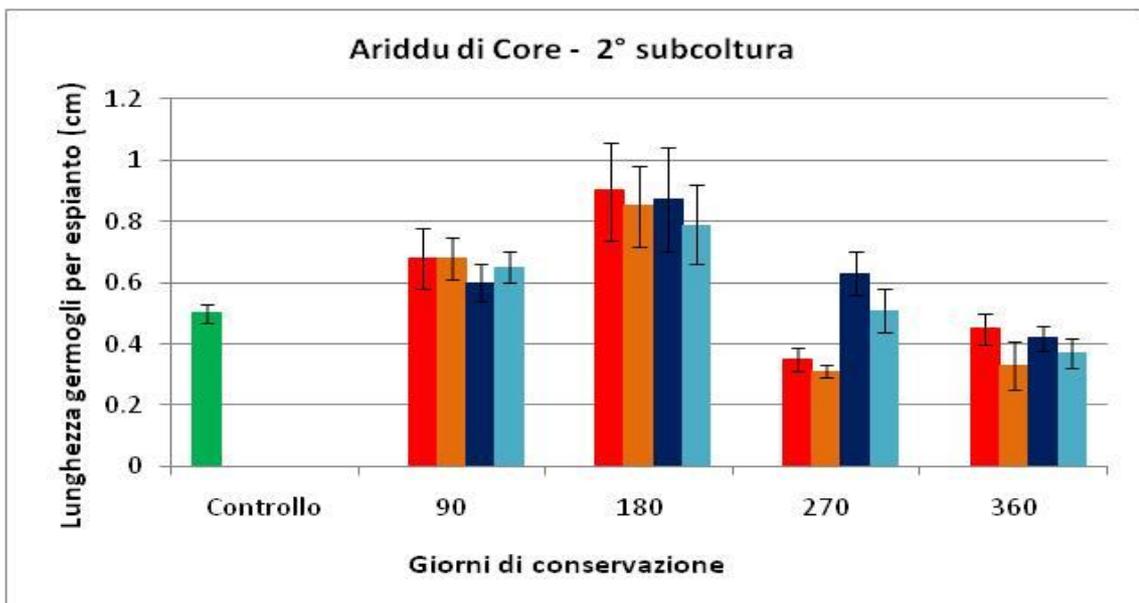
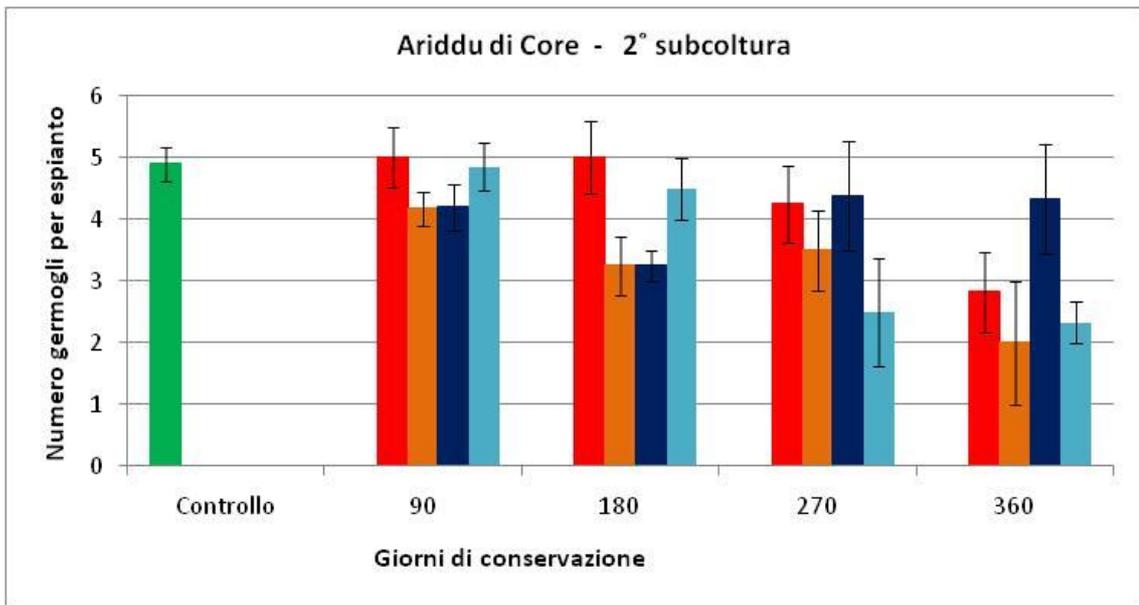
**Tab. 6d: Rapparino.** Numero e lunghezza (cm) dei germogli proliferati durante la prima e seconda subcoltura.  
Lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna mostrano differenze statisticamente significative per  $P \leq 0.05$  (Test di Duncan).

\*, \*\* Differenza tra medie analizzata tramite Test di Tukey per  $P \leq 0,05$  e per  $P \leq 0,01$   
ns = non significativo.



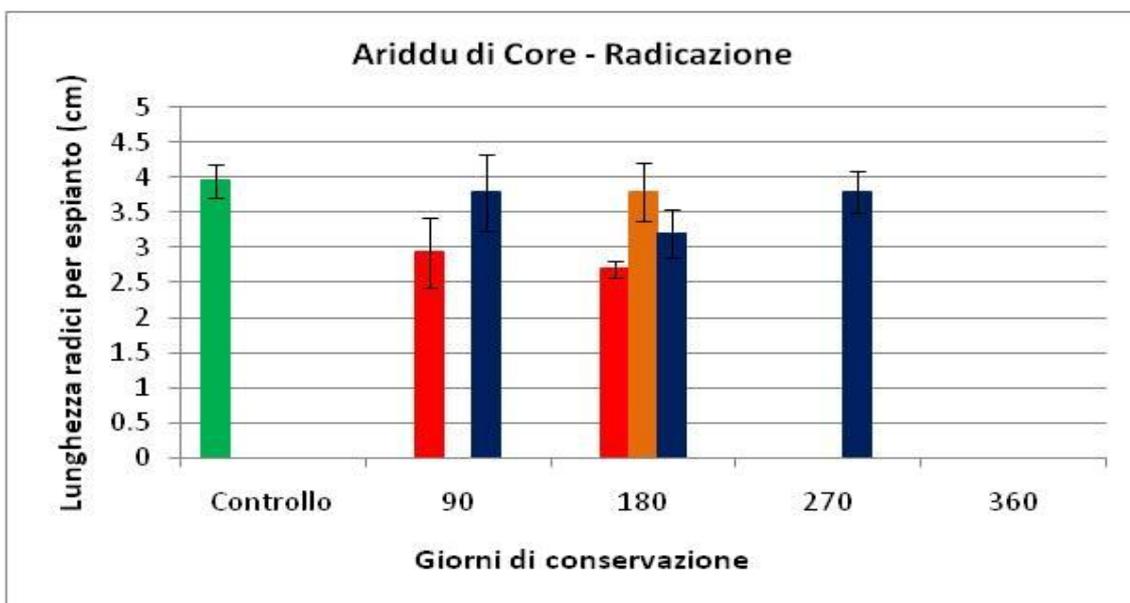
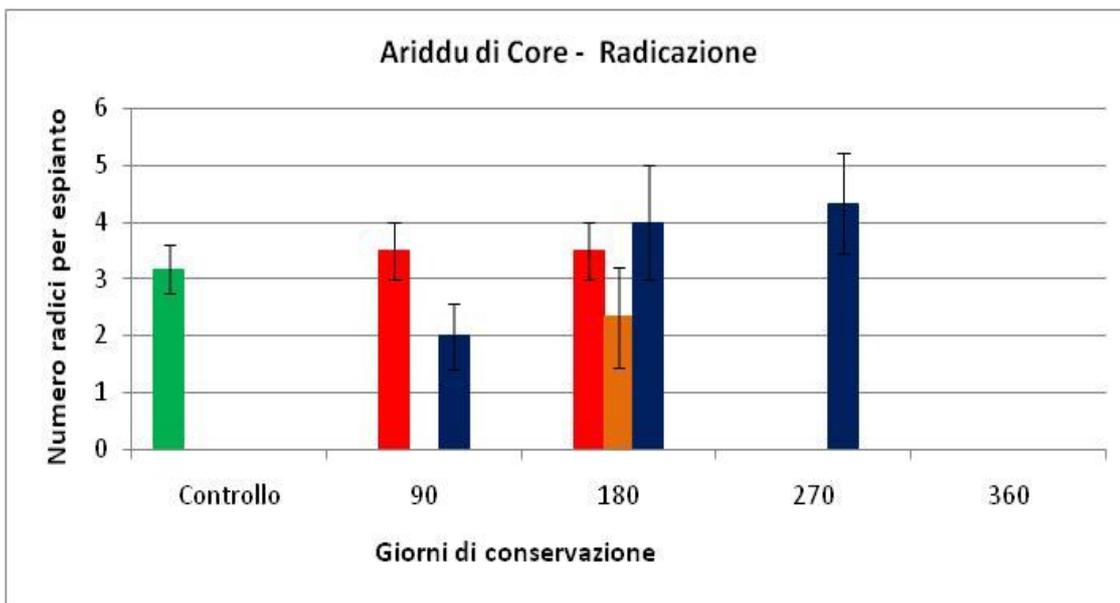
Legenda: Controllo  Tesi 1  Tesi 2  Tesi 3  Tesi 4 

**Fig. 1a.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) proliferati per espianto durante la prima subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s).



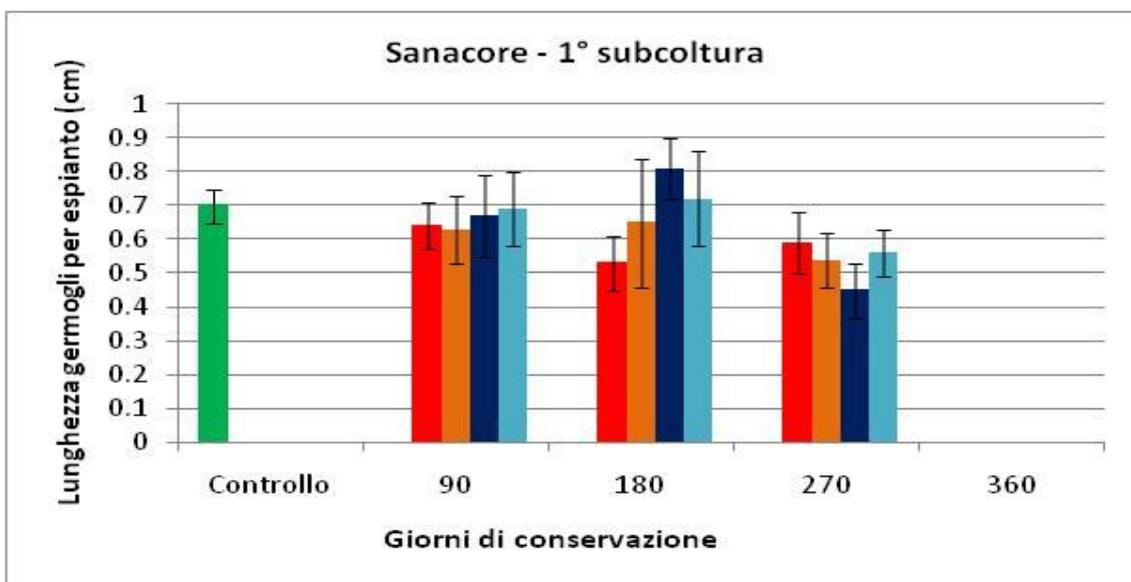
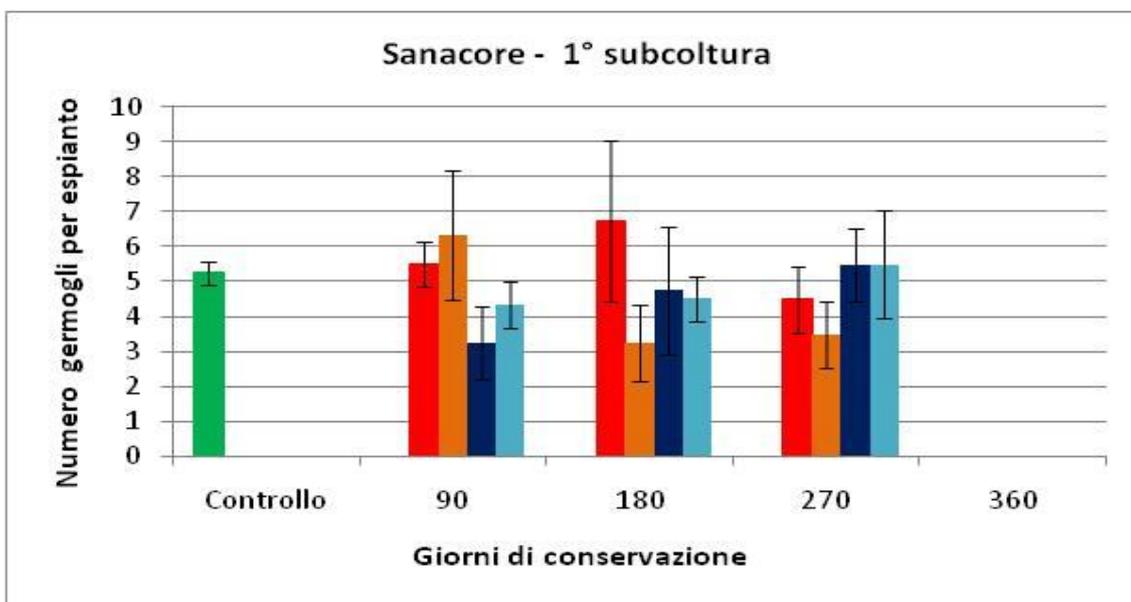
**Legenda:** Controllo ■ Tesi 1 ■ Tesi 2 ■ Tesi 3 ■ Tesi 4 ■

**Fig. 1b.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) proliferati per espianto durante la seconda subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media ± e.s.).



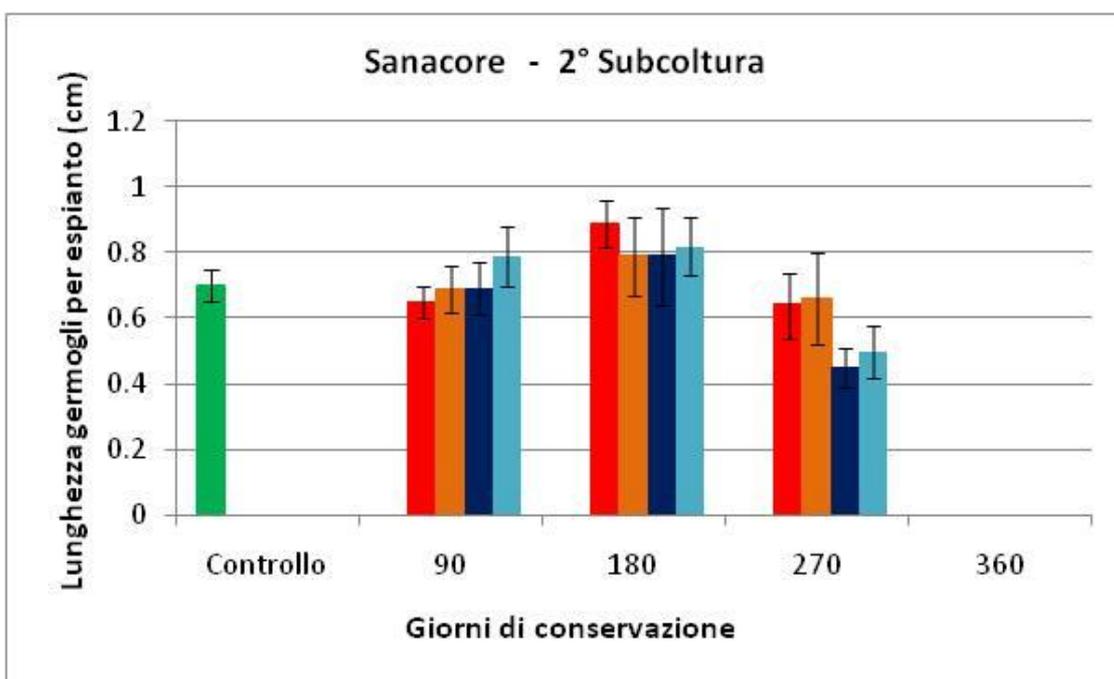
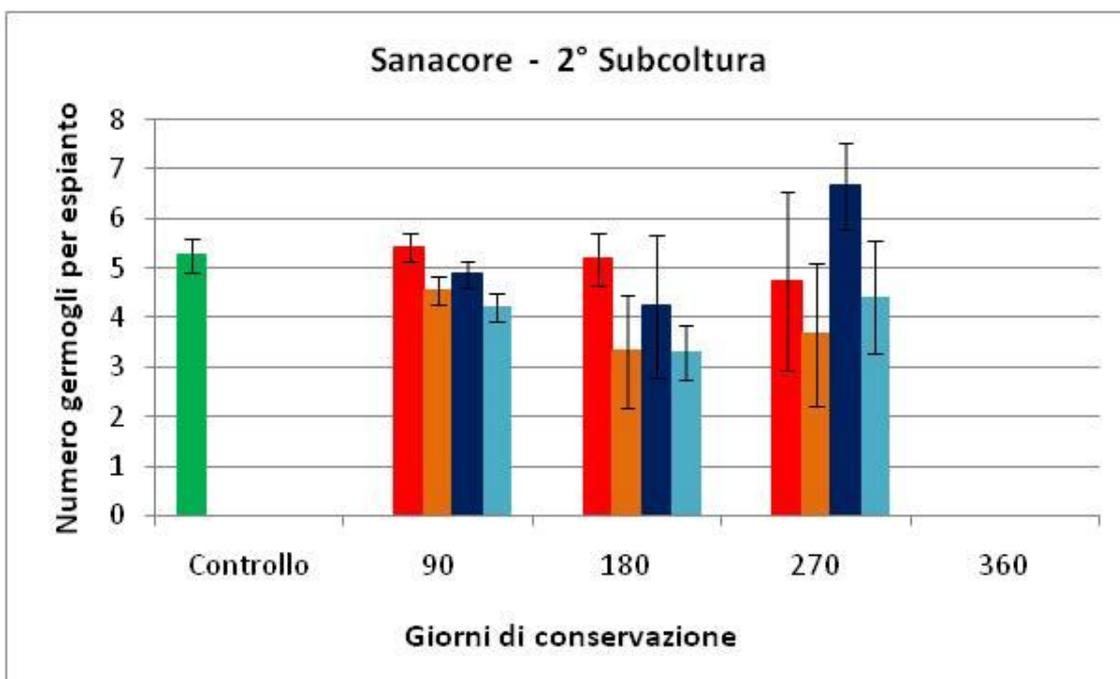
**Legenda:** Controllo ■ Tesi 1 ■ Tesi 2 ■ Tesi 3 ■ Tesi 4 ■

**Fig. 1c.** Numero e lunghezza delle radici (cm) per espianto per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media ± e.s.).



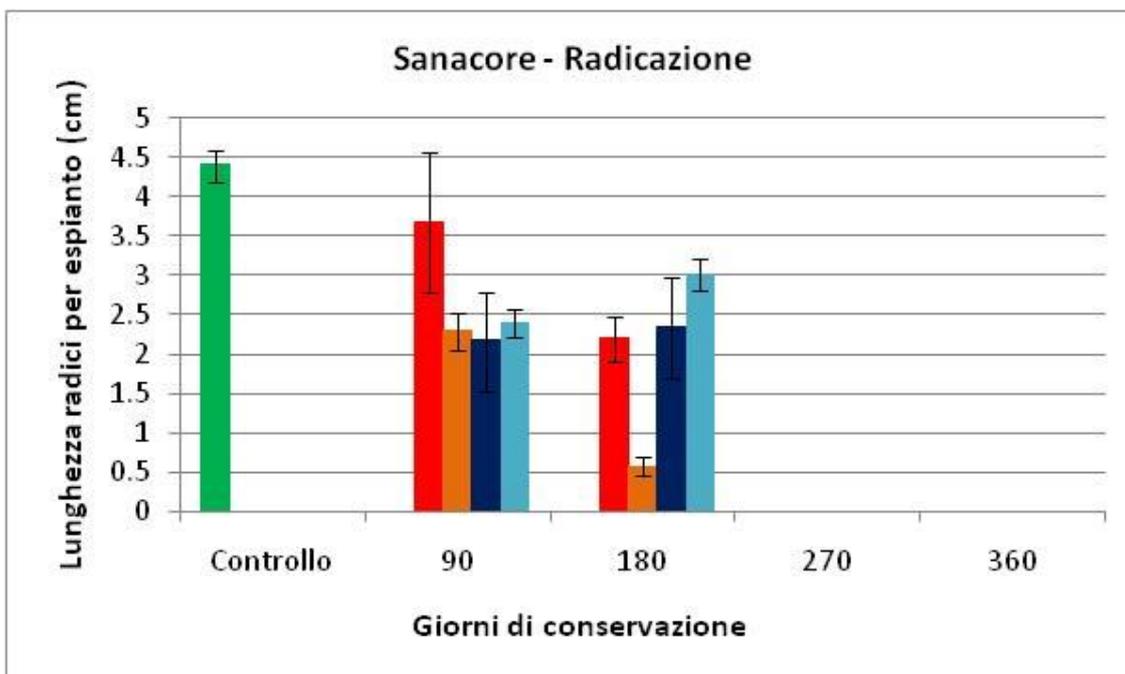
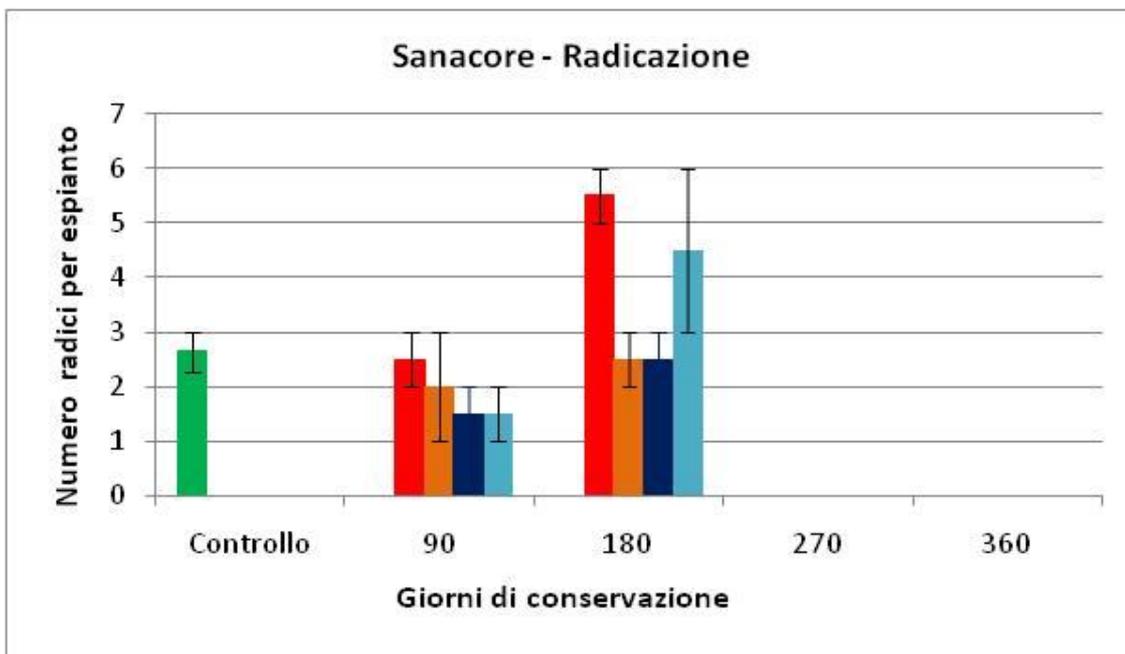
**Legenda:** Controllo  Tesi 1  Tesi 2  Tesi 3  Tesi 4 

**Fig. 2a.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) proliferati per espianto durante la prima subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s.).



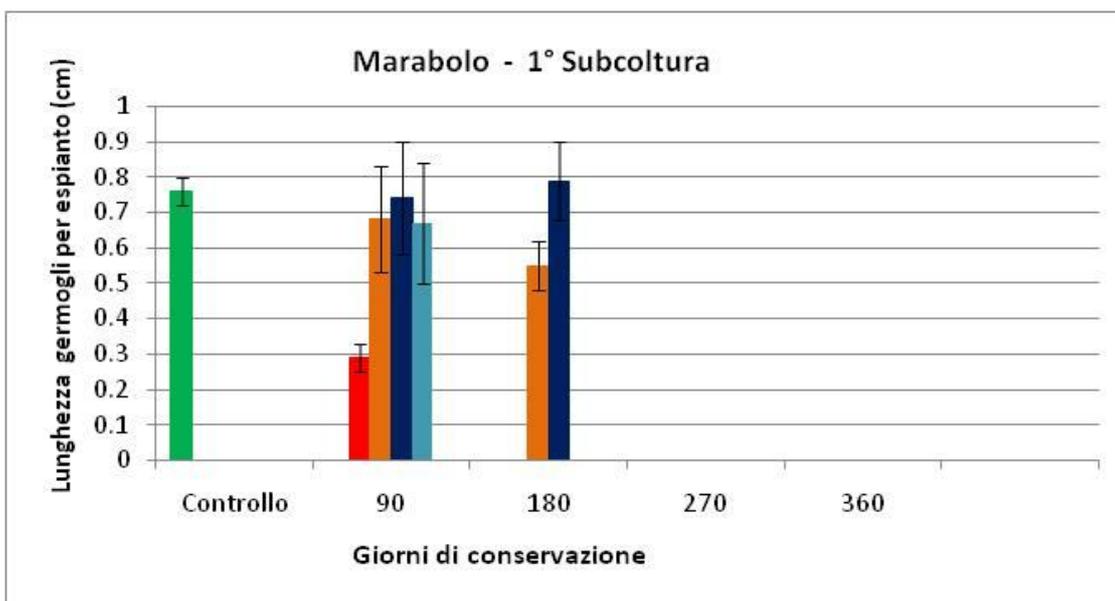
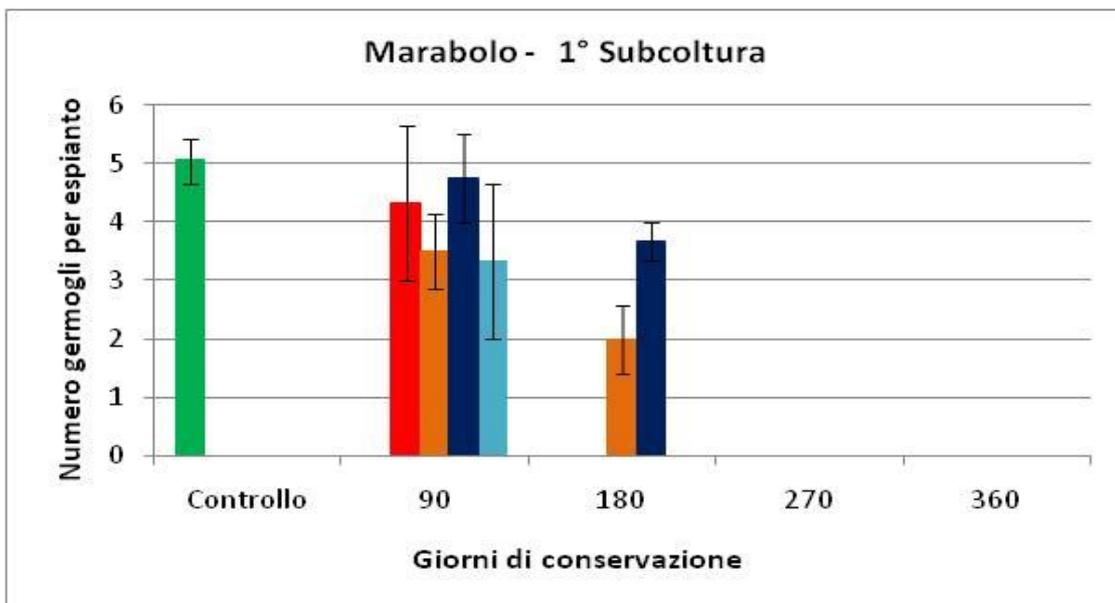
**Legenda:** Controllo ■ Tesi 1 ■ Tesi 2 ■ Tesi 3 ■ Tesi 4 ■

**Fig. 2b.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) proliferati per espianto durante la seconda subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media ± e.s.).



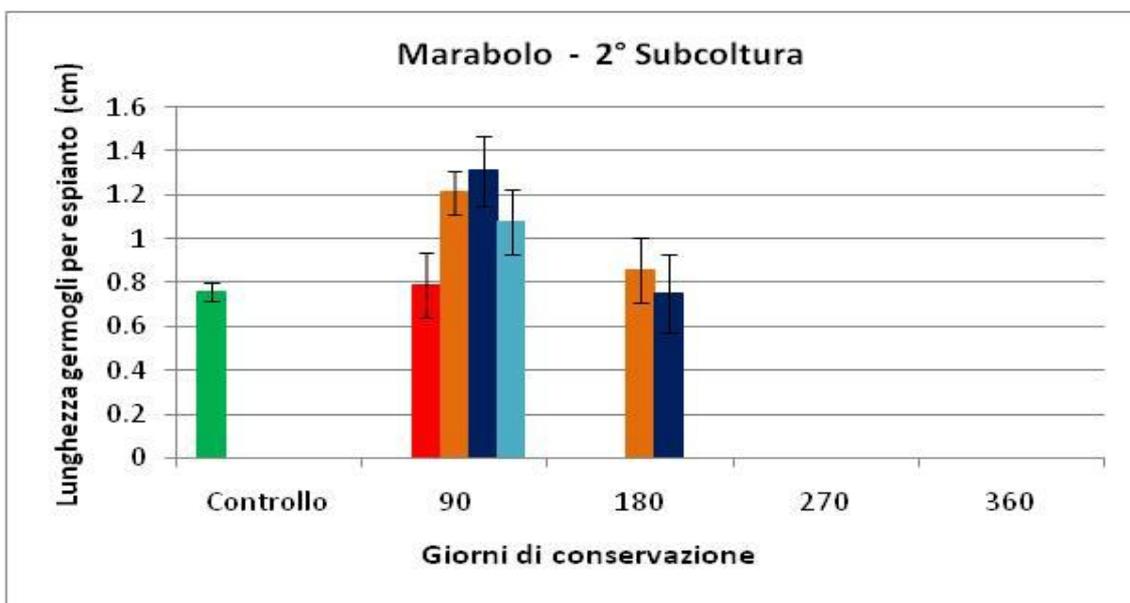
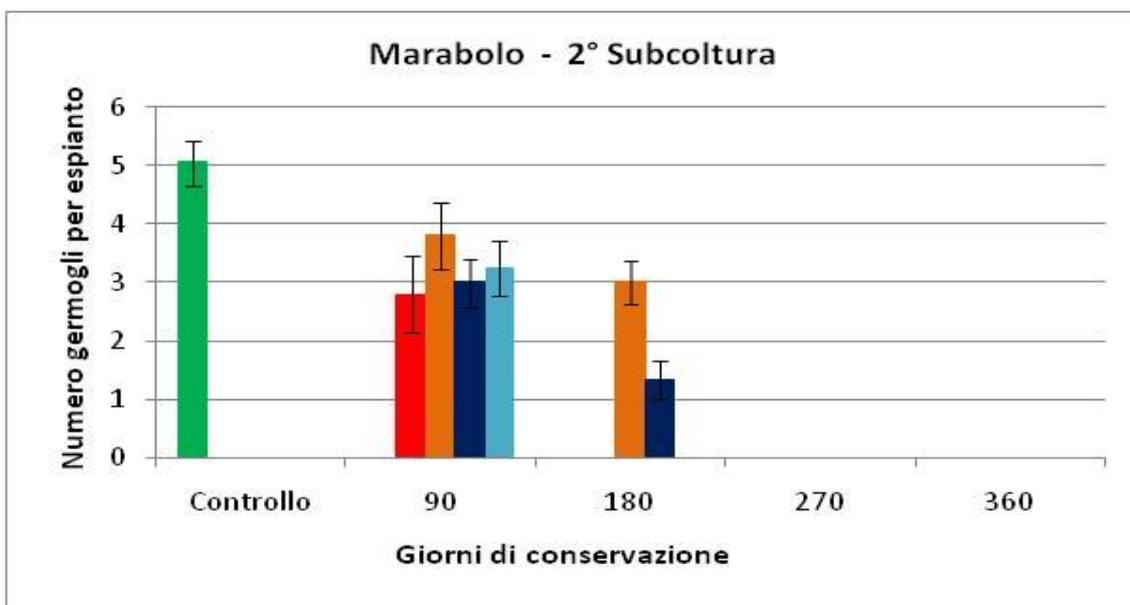
Legenda: Controllo  Tesi 1  Tesi 2  Tesi 3  Tesi 4 

Fig. 2c. Numero e lunghezza delle radici (cm) per espianto per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s.).



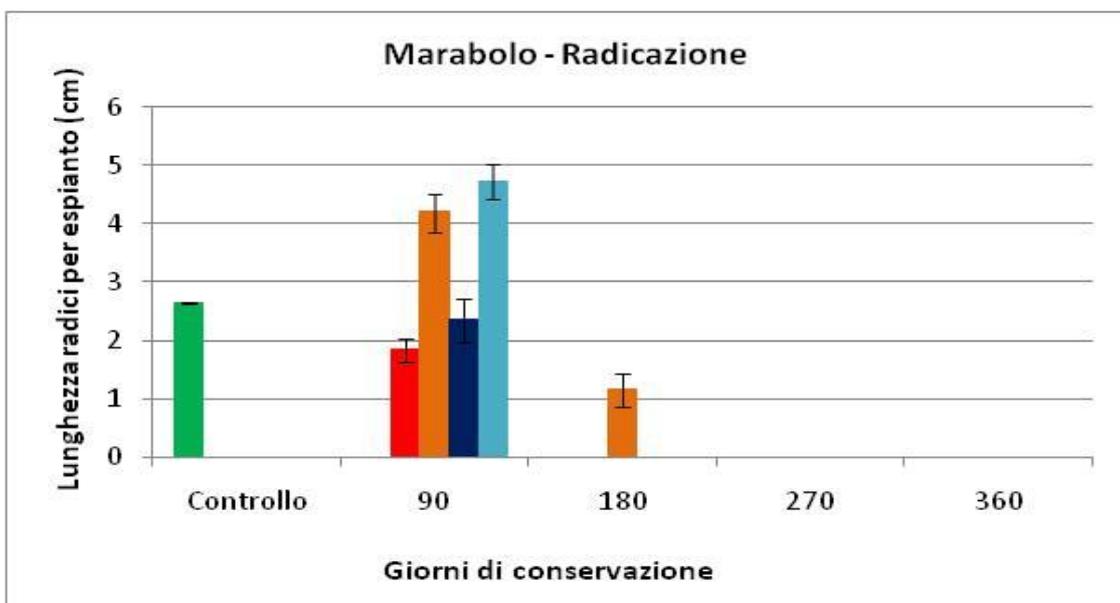
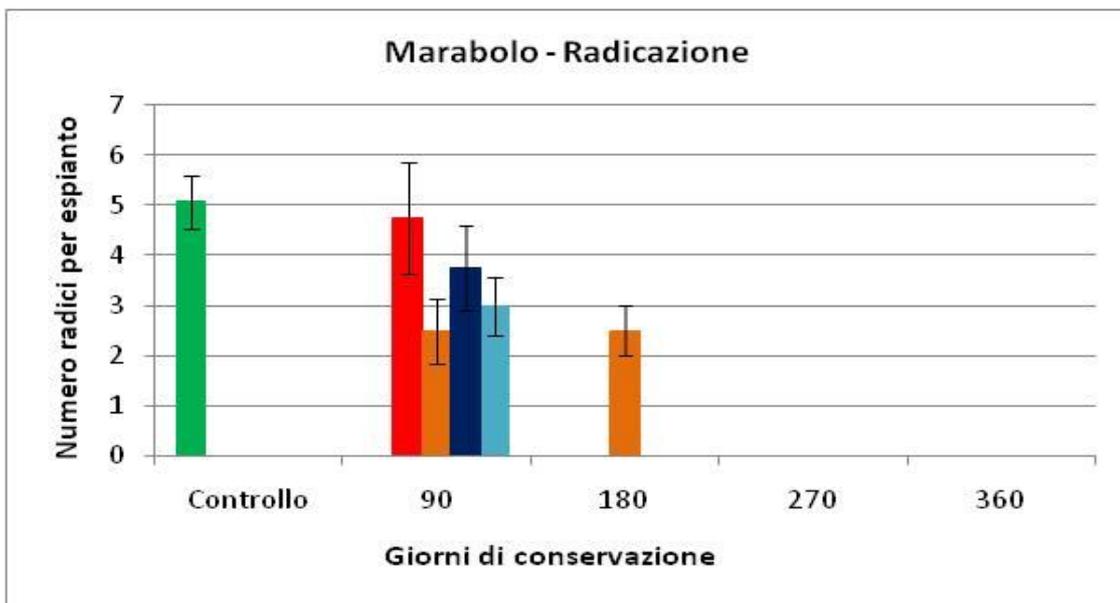
Legenda: Controllo ■ Tesi 1 ■ Tesi 2 ■ Tesi 3 ■ Tesi 4 ■

**Fig. 3a.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) per espianto durante la prima subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s.).



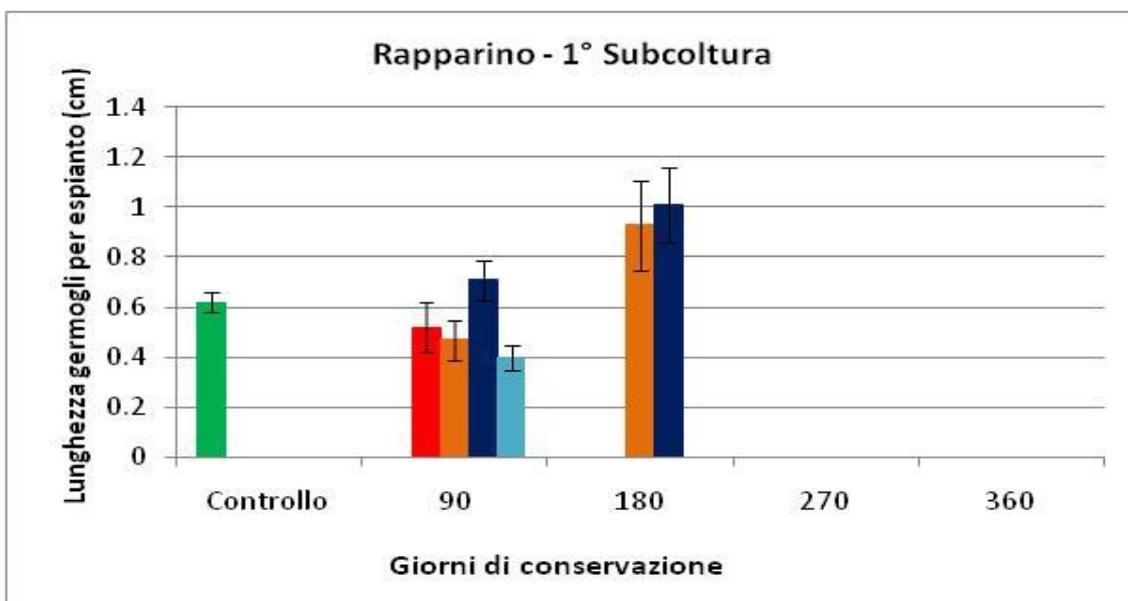
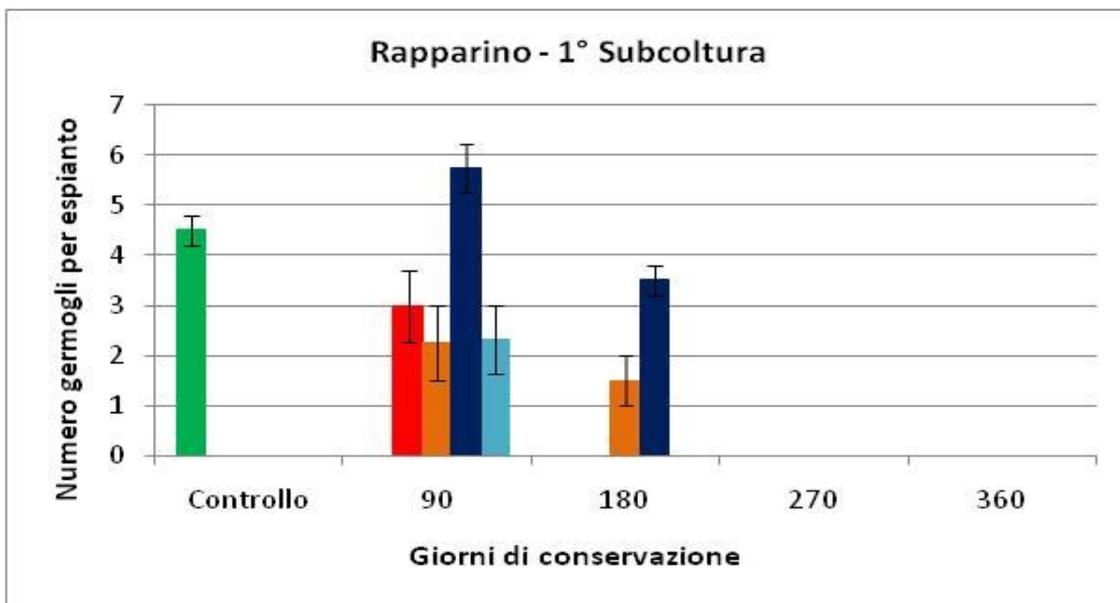
Legenda: Controllo  Tesi 1  Tesi 2  Tesi 3  Tesi 4 

**Fig. 3b.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) per espianto durante la seconda subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media ± e.s.).



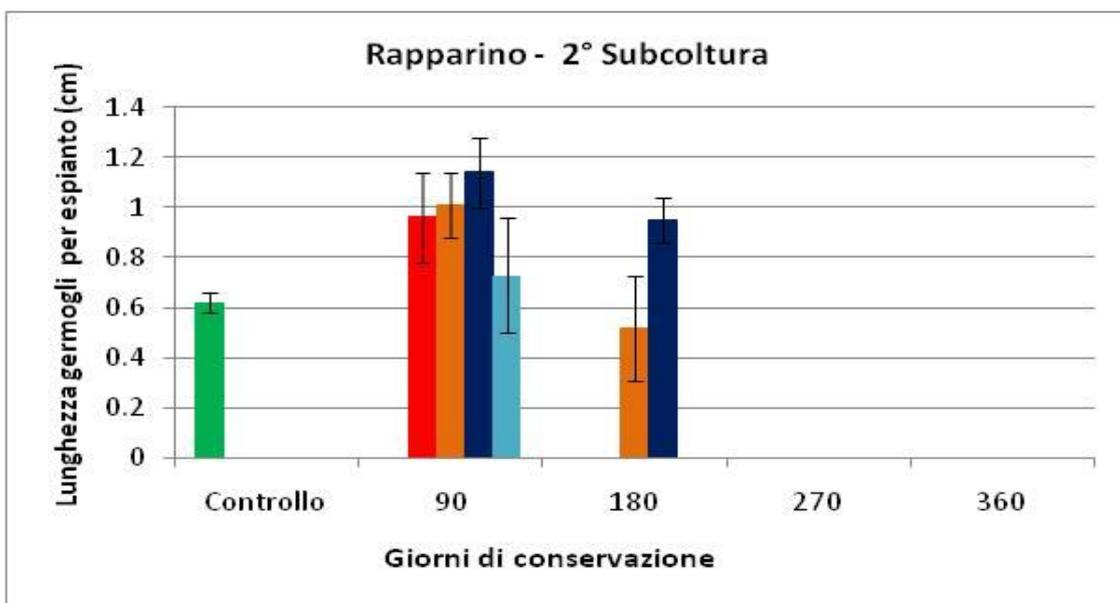
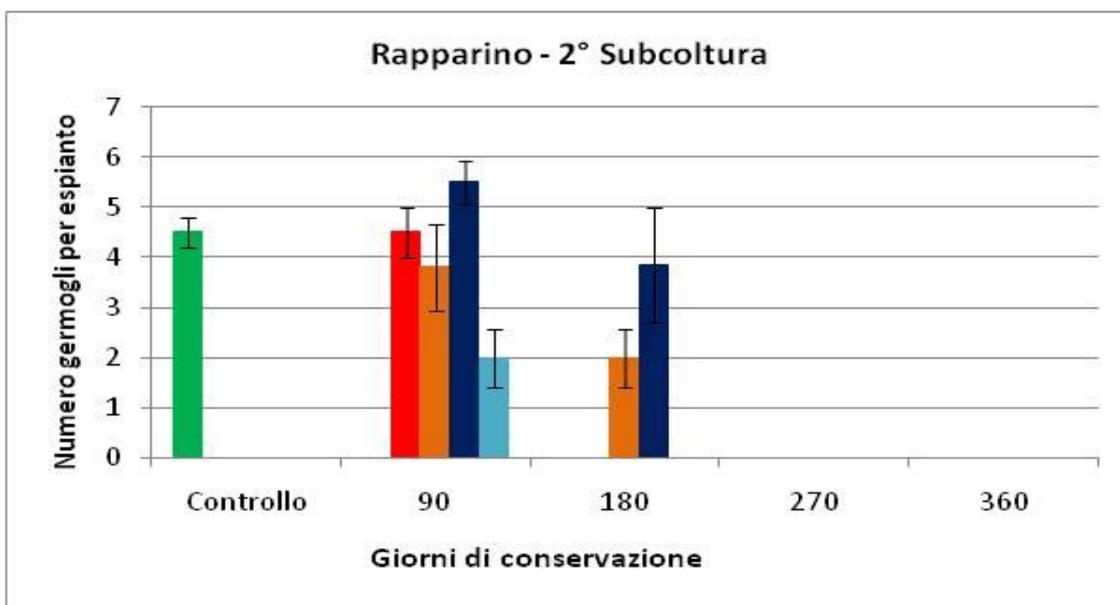
Legenda: Controllo ■ Tesi 1 ■ Tesi 2 ■ Tesi 3 ■ Tesi 4 ■

Fig. 3c. Numero e lunghezza delle radici (cm) per espianto per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s.).



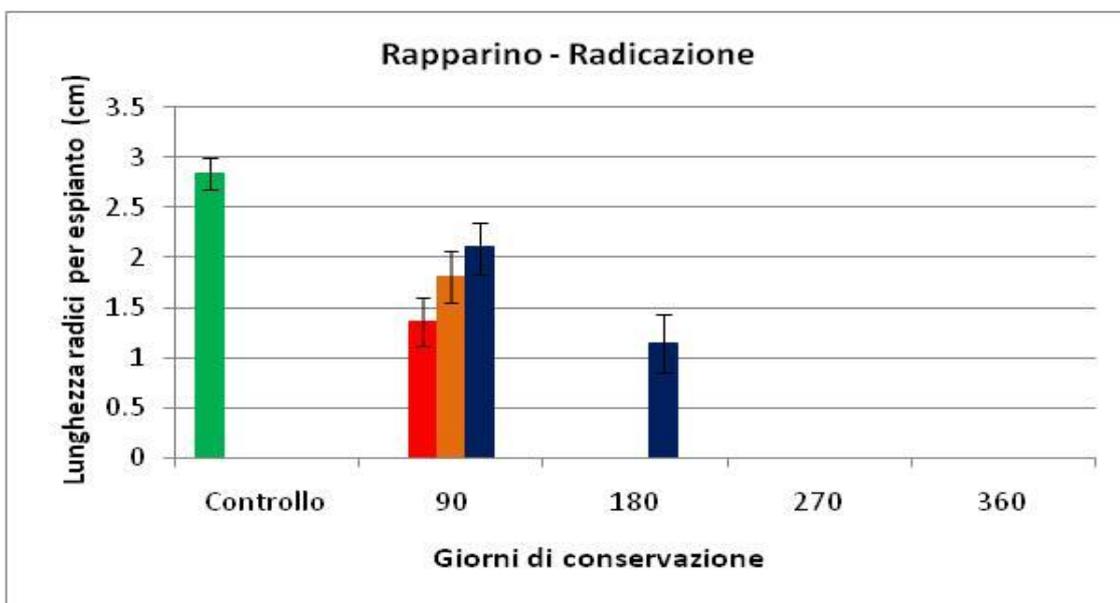
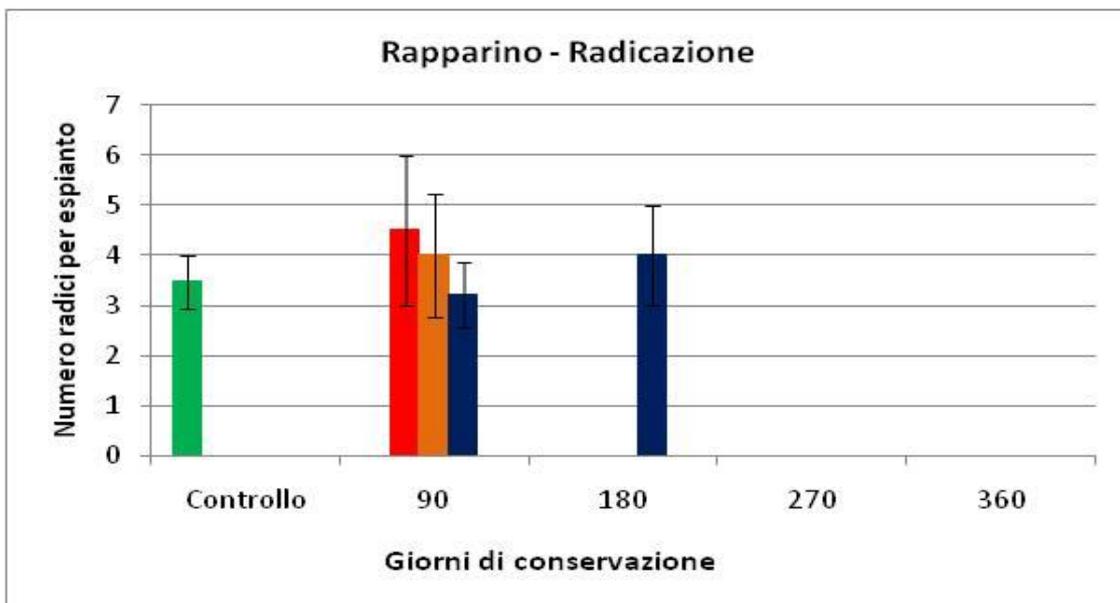
Legenda: Controllo  Tesi 1  Tesi 2  Tesi 3  Tesi 4 

**Fig. 4a.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) per espianto durante la prima subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s.).



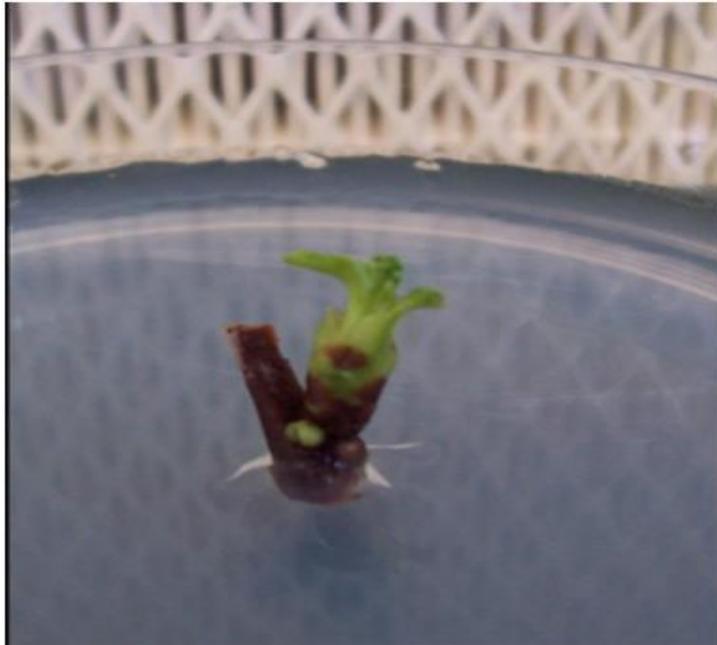
Legenda: Controllo  Tesi 1  Tesi 2  Tesi 3  Tesi 4 

**Fig. 4b.** Numero e lunghezza dei germogli (cm) per espianto durante la seconda subcoltura per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media  $\pm$  e.s.).



Legenda: Controllo ■ Tesi 1 ■ Tesi 2 ■ Tesi 3 ■ Tesi 4 ■

Fig. 4c. Numero e lunghezza delle radici (cm) per espianto per ciascun periodo di osservazione a confronto con valori di riferimento per la cultivar (Media ± e.s.).



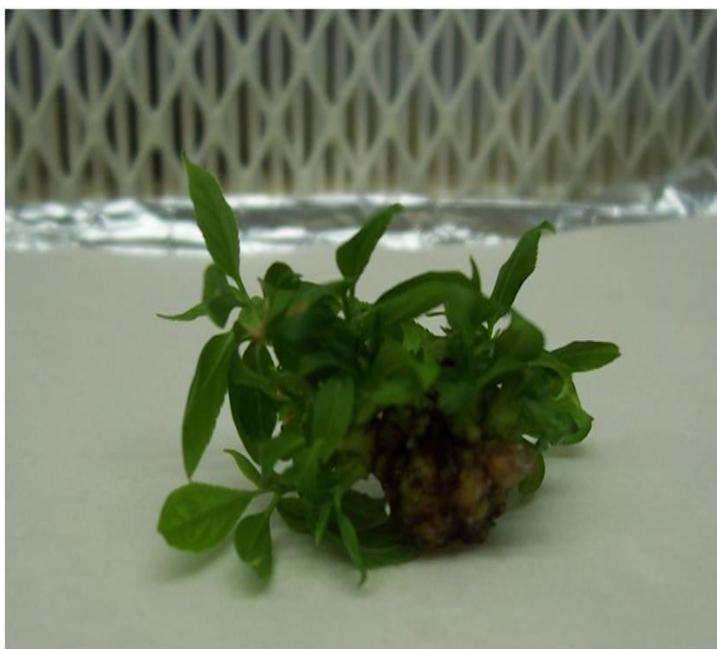
**Fig. 1.** Espianto uninodale in germogliamento su substrato di Introduzione.



**Fig. 2.** Arido di Core. Proliferazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 3. Marabolo.** Proliferazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 4. Sanacore.** Proliferazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 5. Marabolo.** Radicazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 6. Rapparino.** Radicazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 7. Ariddu di Core.** Radicazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 8. Sanacore.** Radicazione in condizioni ordinarie di crescita *in vitro*.



**Fig. 9. Ariddu di Core.** Espianti su tesi 4 dopo 90 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 10. Ariddu di Core.** Espianti su tesi 4 dopo 180 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 11. Ariddu di Core.** Espianti su tesi 4 dopo 270 giorni di frigoconservazione con moderato allungamento ed eziolamento dell'apice.



**Fig. 12. Ariddu di Core.** Espianti su tesi 4 dopo 360 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 13. Marabolo.** Espianti su tesi 2 dopo 90 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 14. Marabolo.** Espianto su tesi 2 dopo 180 giorni di frigoconservazione con diffusi imbrunimenti fogliari e dell'apice.



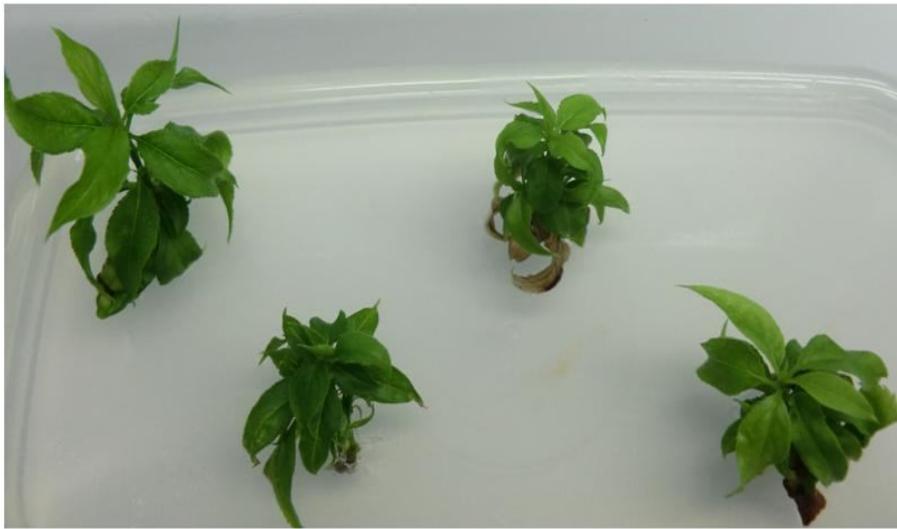
**Fig. 15. Marabolo.** Espianti su tesi 3 dopo 90 giorni di conservazione.



**Fig. 16. Marabolo.** Espianti su tesi 3 dopo 180 giorni di conservazione.



**Fig. 17. Rapparino.** Espianti su tesi 3 con germogli in proliferazione durante la prima subcoltura dopo 90 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 18. Marabolo.** Espianti su tesi 3 con germogli in proliferazione durante la prima subcoltura dopo 90 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 19. Ariddu di Core.** Espianto su tesi 3 con germogli in proliferazione durante la prima subcoltura dopo 90 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 20. Sanacore.** Espianto su tesi 3 con germogli in proliferazione durante la prima subcoltura dopo 90 giorni di frigoconservazione.



**Fig. 21. Sanacore.** Espianto in proliferazione durante la seconda subcoltura dopo 180 giorni di conservazione a basse temperature.



**Fig. 22. Marabolo.** Espianto in proliferazione su tesi 3 durante la seconda subcoltura dopo 180 giorni di conservazione a basse temperature.



**Fig. 23. Sanacore.** Espianto in proliferazione con evidenti segni di iperidricità



**Fig. 24. Ariddu di Core.** Espianto radicato dopo 180 giorni di conservazione a basse temperature su tesi 3.



**Fig. 25. Sanacore.** Espianto radicato dopo 180 giorni di conservazione a basse temperature su tesi 2.



**Fig. 26. Marabolo.** Espianto radicato dopo 180 giorni di conservazione a basse temperature su tesi 2.



**Fig. 27. Rapparino.** Espianto radicato dopo 180 giorni di conservazione a basse temperature su tesi 3.



**Fig. 28.** Pianta *in vivo* in Jiffy® dopo frigoconservazione.



**Fig. 29.** Piante provenienti da conservazione in crescita rallentata *in vitro* in fase di ambientamento *in vivo*.



**Fig. 30.** Pruno Rosa in fase di stabilizzazione in vitro con evidenti contaminazioni Batteriche.



**Fig. 31.** Frutti di Ariddu di Core in pieno campo.

## INDICE

Biodiversità: Da risorsa da tutelare a opportunità da valorizzare .....	pag. 1
Cenni di legislazione legata alla tutela della biodiversità vegetale .....	pag. 7
I metodi di conservazione della biodiversità vegetale: conservazione <i>in situ</i> ed <i>ex situ</i> - conservazione <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	pag. 16
Metodologie di conservazione della biodiversità attraverso biotecnologie: crioconservazione, incapsulamento, seme sintetico e crescita rallentata .....	pag. 23
Scopo del lavoro .....	pag. 36
Materiali e metodi .....	pag. 40
Risultati e discussione: Frigoconservazione .....	pag. 44
Risultati e discussione: Prima e seconda subcultura .....	pag. 47
Risultati e discussione: Radicazione .....	pag. 53
Considerazioni conclusive .....	pag. 57
Bibliografia .....	pag. 61
Tabelle, grafici e foto .....	pag. 74
Indice .....	pag. 107