



*Ministero dell'Istruzione
dell'Università e della Ricerca*



Università degli Studi di Palermo

**DOTTORATO DI RICERCA IN “AGRONOMIA AMBIENTALE”
XXII CICLO**

Anni Accademici 2007/2008, 08/09, 09/10

*Sede Amministrativa
Università degli Studi di Palermo*

*Sede Consorzata
Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria*

Settore scientifico disciplinare AGR/04

Dissertazione finale dal titolo:

La coltura in vitro per la conservazione del germoplasma vegetale

DOTTORANDO
Giuseppe Barraco

TUTOR
Ch.mo Prof. Giovanni Iapichino

COORDINATORE
Ch.mo Prof. Claudio Leto

**DOTTORATO DI RICERCA IN “AGRONOMIA AMBIENTALE”
XXII CICLO**

Anni Accademici 2007/2008, 08/09, 09/10

*Sede Amministrativa
Università degli Studi di Palermo*

*Sede Consorzata
Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria*

Settore scientifico disciplinare AGR/04

Dissertazione finale dal titolo:

**La coltura in vitro per la conservazione del
germoplasma vegetale**

**DOTTORANDO
Giuseppe Barraco**

TUTOR

Ch.mo Prof. Giovanni Iapichino

COORDINATORE

Ch.mo Prof. Claudio Leto

RINGRAZIAMENTI

Numerose sono le persone che meritano di essere ringraziate per l'essermi state accanto e l'avermi sostenuto nello svolgimento del mio dottorato di ricerca e della tesi ad esso correlata.

Ci tengo a ringraziare il professore Giovanni Iapichino, mio tutor, per l'aiuto fornitomi nell'organizzazione dell'attività di ricerca, nel suo svolgimento e nella stesura della tesi. Un ringraziamento va a tutti i professori del Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali che hanno contribuito al mio lavoro dispensando degli utili quanto indispensabili consigli. La mia riconoscenza va anche ai colleghi, oltre che amici, del dipartimento con i quali ho condiviso piacevolmente e proficuamente tale esperienza formativa e numerosi altri momenti.

Un sentito ringraziamento va a Florent Engelmann e Isabelle Sylvestre che mi hanno accolto calorosamente presso l'IRD di Montpellier, mi sono stati fraternamente vicini, si sono prodigati per sviluppare e valorizzare la mia attività di ricerca ed hanno reso il mio soggiorno all'estero indimenticabile sia dal punto di vista formativo che da quello personale.

La mia riconoscenza va anche a Jean-Luc Verdeil ed ai suoi collaboratori che mi hanno permesso di utilizzare le attrezzature del laboratorio di microscopia del CIRAD di Montpellier e che mi hanno consigliato nel corso delle ricerche inerenti l'istologia.

Ringrazio sentitamente anche Zvezdana Markovic e Philippe Chatelet per l'affetto dimostratomi, l'aiuto fornitomi e per le interessanti discussioni e i bei momenti vissuti insieme durante il mio stage a Montpellier.

Tengo a ringraziare calorosamente anche la mia famiglia, Nelli ed i miei amici che mi sono stati accanto durante il mio lavoro sopportandomi e supportandomi in ogni modo.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| CAPITOLO 1 La biodiversità vegetale | 3 |
| 1.1 Introduzione | 3 |
| 1.2 L'importanza della biodiversità vegetale..... | 4 |
| 1.3 Gli elementi della biodiversità..... | 6 |
| 1.4 La distribuzione della biodiversità vegetale | 10 |
| 1.5 Le minacce alla biodiversità | 13 |
| | |
| CAPITOLO 2 La conservazione della biodiversità vegetale | 17 |
| 2.1 Introduzione | 17 |
| 2.2 Le tecniche di conservazione della biodiversità | 18 |
| 2.3 La conservazione <i>in situ</i> | 19 |
| 2.4 La conservazione <i>ex situ</i> | 20 |
| 2.4.1 La conservazione di semi | 21 |
| 2.4.2 La conservazione in banche del germoplasma in coltura..... | 21 |
| 2.4.3 La conservazione nei giardini botanici..... | 22 |
| 2.4.4 La conservazione di polline e DNA..... | 23 |
| 2.4.5 La conservazione in vitro | 24 |
| 2.5 Stato della conservazione in Italia..... | 24 |
| | |
| CAPITOLO 3 La conservazione delle risorse genetiche vegetali mediante micropropagazione..... | 27 |
| 3.1 La micropropagazione | 27 |
| 3.2 La conservazione in condizioni di crescita controllata (<i>slow growth</i>)..... | 30 |
| | |
| CAPITOLO 4 La crioconservazione delle risorse genetiche vegetali..... | 32 |
| 4.1 La crioconservazione..... | 32 |
| 4.2 Basi biologiche e fisiche dalla crioconservazione | 32 |
| 4.3 Le tecniche di crioconservazione..... | 34 |
| 4.3.1 Crioconservazione mediante Controlled rate cooling | 35 |
| 4.3.2 Crioconservazione basata sulla vitrificazione in assenza di ghiaccio extracellulare | 37 |
| 4.4 La stabilità genetica del materiale crioconservato | 45 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 4.5 | Crioterapia | 46 |
| CAPITOLO 5 La diversità vegetale nel Bacino del mediterraneo | | 49 |
| 5.1 | Il Bacino del Mediterraneo | 49 |
| 5.2 | La vegetazione naturale nel Bacino del Mediterraneo | 53 |
| 5.3 | Stato della biodiversità e conservazione del germoplasma in ambiente mediterraneo..... | 59 |
| CAPITOLO 6 Scopi delle ricerche | | 61 |
| CAPITOLO 7 La micropropagazione di <i>Erica multiflora</i> | | 63 |
| 7.1 | Introduzione | 63 |
| 7.2 | Materiali e metodi | 65 |
| 7.2.1 | Sterilizzazione degli espianti ed avvio della coltura in vitro..... | 65 |
| 7.2.2 | Definizione del protocollo di moltiplicazione | 66 |
| 7.2.3 | Definizione del protocollo di radicazione | 66 |
| 7.2.4 | Acclimatazione delle piante prodotte in vitro..... | 67 |
| 7.3 | Risultati..... | 68 |
| 7.4 | Discussione..... | 72 |
| CAPITOLO 8 Definizione di un protocollo di crioconservazione di apici vegetativi di <i>Limonium serotinum</i> mediante la tecnica di vitrificazione in goccia | | 73 |
| 8.1 | Introduzione | 73 |
| 8.2 | Materiali e metodi | 75 |
| 8.2.1 | Materiale vegetale | 75 |
| 8.2.2 | Crioconservazione..... | 76 |
| 8.2.3 | Valutazione sopravvivenza e ricrescita | 78 |
| 8.3 | Risultati..... | 79 |
| 8.4 | Discussione..... | 89 |
| CAPITOLO 9 Definizione di un protocollo di crioconservazione di apici vegetativi di <i>Lithodora rosmarinifolia</i> mediante la tecnica di vitrificazione in goccia | | 90 |
| 9.1 | Introduzione | 90 |
| 9.2 | Materiali e metodi | 92 |

| | | |
|--|---|------------|
| 9.2.1 | Materiale vegetale | 92 |
| 9.2.2 | Crioconservazione..... | 93 |
| 9.2.3 | Valutazione sopravvivenza e ricrescita | 95 |
| 9.3 | Risultati..... | 96 |
| 9.4 | Discussione | 104 |
| | | |
| CAPITOLO 10 Comparazione delle tecniche di crioconservazione di canna da zucchero (<i>Saccharum spp.</i>) mediante incapsulamento-disidratazione e vitrificazione in goccia | | 106 |
| 10.1 | Introduzione | 106 |
| 10.2 | Materiali e metodi | 107 |
| 10.2.1 | Materiale vegetale | 107 |
| 10.2.2 | Crioconservazione..... | 108 |
| 10.2.3 | Valutazione sopravvivenza e ricrescita | 111 |
| 10.3 | Risultati..... | 112 |
| 10.4 | Discussione | 120 |
| | | |
| CAPITOLO 11.....Analisi istologica di apici vegetativi di <i>Dioscorea alata</i> sottoposti a crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione..... | | 122 |
| 11.1 | Introduzione | 122 |
| 11.2 | Materiali e metodi | 124 |
| 11.2.1 | Materiale vegetale | 124 |
| 11.2.2 | Crioconservazione..... | 124 |
| 11.2.3 | Analisi istologica..... | 126 |
| 11.2.4 | Ottenimento dati quantitativi e loro elaborazione..... | 128 |
| 11.3 | Risultati..... | 129 |
| 11.3.1 | Cambiamenti cito-istologici durante l'applicazione del protocollo di crioconservazione | 129 |
| 11.3.2 | Caratteri cito-istologici caratterizzanti le fasi post applicazione del protocollo di crioconservazione | 139 |
| 11.4 | Discussione | 143 |
| | | |
| CAPITOLO 12 Conclusioni | | 146 |
| CAPITOLO 13 Bibliografia..... | | 147 |

INTRODUZIONE

La biodiversità presente sul nostro pianeta rappresenta un elemento fondamentale per la sopravvivenza dell'uomo, il quale ad essa attinge per il soddisfacimento dei suoi bisogni sia fondamentali che non. Le attività antropiche hanno però comportato uno sfruttamento sempre maggiore dell'ambiente, una sua modifica sempre più incisiva e, conseguentemente, la degradazione o la scomparsa di molte popolazioni vegetali ed animali, fenomeno noto come perdita della biodiversità. L'attività antropica ha una tale incisività da essere ritenuta in grado di causare la prima estinzione di massa determinata dall'azione di una singola specie vivente sulla terra, la specie umana. Vista l'importanza rivestita dalla biodiversità vegetale per l'uomo e per la stabilità ambientale, nel corso degli ultimi decenni si sono moltiplicati gli sforzi per una sua conservazione *in situ* o *ex situ*, dove le minacce antropiche sono talmente incisive da rendere difficile un approccio di conservazione nell'habitat naturale.

Un'importante opportunità per la conservazione della biodiversità è rappresentata dalle tecniche di coltura *in vitro*, le quali hanno costituito l'oggetto delle ricerche trattate nella presente tesi di dottorato di ricerca. Le tecniche di conservazione *in vitro* consentono di far fronte ai due principali inconvenienti legati alla tradizionale conservazione in campo della biodiversità vegetale, ovvero gli elevati costi di mantenimento ed il rischio di perdita di materiale a causa di avversità biotiche o abiotiche.

La presente attività di ricerca ha riguardato lo studio della micropropagazione, vista come metodologia di conservazione a breve e medio termine, e della crioconservazione, tecnica di conservazione *in vitro* in grado di consentire uno stoccaggio per lassi di tempo praticamente indeterminati ed in condizioni di stabilità genetica e sanitaria.

L'applicazione della micropropagazione è stata studiata con riferimento a *Erica multiflora*, una specie mediterranea con notevole valore ornamentale sempre più minacciata dalla riduzione di habitat, portando alla definizione di un protocollo utilizzabile per la conservazione della specie oltre che per la sua moltiplicazione, presupposto per la sua valorizzazione in ambito floricolo.

L'applicazione della crioconservazione ha riguardato le specie mediterranee *Limonium serotinum* e *Lithodora rosmarinifolia* che risentono della notevole pressione antropica e sono, purtroppo, relegate in aree sempre più circoscritte, caratterizzate dalla presenza, nelle situazioni più difficili, di popolazioni ridotte e frazionate tra loro che talvolta presentano un

esiguo numero di individui. Infine la crioconservazione è stata applicata anche a due specie tropicali quali la canna da zucchero (*Saccharum spp.*) e *Dioscorea alata*.

Con riferimento a *Dioscorea alata* è stato attuato uno studio di carattere cito-istologico, mediante le tecniche di microscopia ottica, che ha consentito una comprensione più ampia dei processi legati alla sopravvivenza del materiale vegetale in seguito alla conservazione alle temperature ultrabasse dell'azoto liquido (-196 °C). Le ricerche relative alle altre specie hanno mirato alla definizione dei rispettivi protocolli di crioconservazione. Relativamente alla canna da zucchero sono stati comparati i due protocolli di incapsulamento-disidratazione e vitrificazione in goccia, mostrando per tale specie la superiorità del primo protocollo. Le ricerche attuate sulle due specie mediterranee *Limonium serotinum* e *Lithodora rosmarinifolia*, invece, hanno consentito di dimostrare la crioconservabilità delle due specie e di definire uno specifico protocollo di crioconservazione mediante vitrificazione in goccia. Tali ricerche hanno mostrato, inoltre, l'importanza di un'oculata scelta della soluzione da utilizzare per la disidratazione osmotica degli espianti e dei tempi di esposizione ad essa.

CAPITOLO 1 La biodiversità vegetale

1.1 Introduzione

Le piante costituiscono un elemento di importanza cruciale per la vita in quanto esse contribuiscono al soddisfacimento dei bisogni essenziali dell'uomo e rappresentano una componente essenziale della biosfera, indispensabile per il mantenimento della vita sul pianeta Terra. I vegetali sono riusciti a colonizzare gran parte della superficie terrestre e sono stati plasmati e selezionati dai processi evolutivi determinati dalle caratteristiche locali dei vari habitat. L'azione di tali processi selettivi ha determinato la differenziazione dell'enorme mole di specie attualmente vivente sulla terra; le specie descritte fino a questo momento oscillano tra 320.000 e 410.000, ma molti biologi sostengono che gran parte delle specie vegetali non sia stata descritta (Callmander *et Al.*, 2005). Gli organismi vegetali, così come quelli animali, sono caratterizzati da un'ampia varietà di forme; per descrivere tale ampia variabilità, nel 1980, fu coniato il termine scientifico di *biodiversità* (o *diversità biologica*). Il concetto di diversità biologica nel corso degli anni è stato descritto ricorrendo a numerose definizioni ma tra queste quella più esplicativa e largamente accettata è quella adottata nel 1992 durante la conferenza delle Nazioni Unite di Rio de Janeiro e contenuta nell'articolo 2 della Convention of Biological Diversity. Secondo tale definizione:

la biodiversità biologica rappresenta la variabilità presente all'interno degli organismi viventi di tutte le provenienze includenti, tra l'altro, gli ecosistemi terrestri, marini ed acquatici ed i complessi ecologici di cui essi fanno parte; essa include la diversità all'interno di specie, tra specie e dell'ecosistema (Hens e Bonn, 2003; Gaston e Spicer, 2004).

La biodiversità vegetale, riferita al solo regno *Plantae* è scindibile in differenti gruppi in funzione della loro utilizzazione o meno da parte dell'uomo. E' possibile distinguere:

- risorse genetiche selvatiche, comprendenti le specie selvatiche, specie selvatiche utilizzate dall'uomo, specie imparentate con le colture agrarie, specie imparentate con specie selvatiche utilizzate dall'uomo;
- risorse genetiche per la produzione di cibo in agricoltura, includenti ecotipi locali, cultivar obsolete, cultivar moderne e linee utilizzate per l'attività di miglioramento genetico;

- risorse genetiche per utilizzazione non relativa alla produzione di cibo, includenti le specie utilizzate per finalità medicinali, ornamentali, industriali (materiali da costruzione, combustibili, materiale cartaceo, ecc.) e ricreazionali (Maxted *et Al.*, 2008).

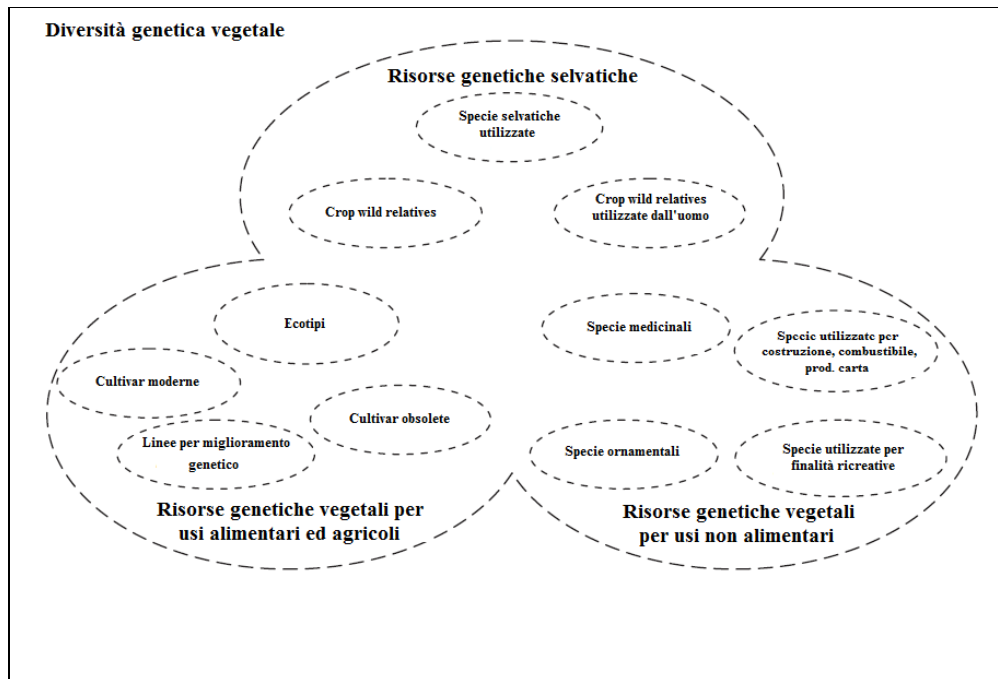


Figura 1-1: Suddivisione delle risorse genetiche vegetali in funzione dell'utilizzazione antropica (Maxted *et Al.*, 2008)

1.2 L'importanza della biodiversità vegetale

Le piante e la biodiversità vegetale presenti sulla terra risultano di fondamentale importanza per l'uomo e per l'ambiente. Le risorse genetiche vegetali sono passibili di un'utilizzazione diretta o indiretta da parte dell'uomo. L'utilizzazione diretta consiste nel consumo o nello sfruttamento delle risorse naturali per la produzione di beni e servizi essenziali o accessori per l'uomo come ad esempio:

- produzione di cibo o sua raccolta, le piante sono alla base del soddisfacimento del fabbisogno nutrizionale della specie umana; dalle specie selvatiche, mediante un processo di domesticazione e miglioramento genetico sono state selezionate le attuali colture agrarie dalle quali dipende la sopravvivenza dell'uomo. Sebbene l'uomo tragga il 95% delle calorie vegetali facenti parte della propria dieta dallo sfruttamento di appena 30 specie, circa 75.000 piante presentano parti edibili e circa 3.000 sono utilizzate per la produzione di cibo.

- utilizzazione con finalità medicinali, in quanto molte sostanze naturali possono essere utilizzate direttamente, nel caso della medicina tradizionale, o indirettamente, mediante estrazione da parte dell'industria farmaceutica, per la cura di patologie;
- sfruttamento dei vegetali o di prodotti da essi estratti per il controllo biologico dei patogeni in agricoltura;
- utilizzazione industriale delle risorse genetiche vegetali per la produzione di materiali da costruzione, fibre, resine, colle, oli, cere, prodotti chimici, profumi ecc. oppure come modello per la fabbricazione di composti di sintesi.;
- sfruttamento delle risorse biologiche per fini ricreazionali (Henry, 2005; Jaramillo e Baena, 2007).

Tabella 1-1: utilizzazioni antropiche delle piante superiori (Henry, 2005)

| Tipologia di utilizzazione | Esempi di utilizzazione |
|-----------------------------|--|
| Cibo | Cereali, leguminose, fruttiferi, oli vegetali e zuccheri |
| Bevande | Vino, birra, the, caffè |
| Alimenti per animali | Pascolo, foraggio, semi |
| Fibra | Cotone, canapa, carta |
| Combustibile | Legna |
| Costruzione | Materiale da costruzione e arredamento in legno |
| Medicina | Prodotti farmaceutici, medicina tradizionale |
| Ornamento | Fiori recisi, piante in vaso e da giardino, tappeti erbosi |
| Industria | Etanolo combustibile, elettricità |
| Ambiente | Ripristino ambientale, sequestro gas serra |
| Altri usi | Cosmetici e profumi |

Relativamente all'utilizzazione indiretta della diversità vegetale, essa è riferibile alle numerose funzioni svolte dai vegetali per l'uomo e non legate al loro utilizzo per la produzione di beni e servizi. Le piante, infatti, svolgono numerose funzioni nell'ambiente; esse sono implicate nei processi relativi al flusso di energia e materia nell'ambiente. Le piante influenzano produzione di energia degli ecosistemi, livelli di ossigeno e anidride carbonica nell'atmosfera, ciclo dell'acqua e dei nutrienti, fenomeni erosivi, sviluppo patogeni. Dai vegetali dipende la sopravvivenza di numerose altre specie che da essi

traggono direttamente o indirettamente il nutrimento o delle quali costituiscono l'habitat (Jaramillo e Baena, 2007).

Le risorse genetiche vegetali, così come gli altri organismi viventi, oltre a possedere un valore legato alla loro utilizzabilità da parte dell'uomo, possiedono un valore cosiddetto di non uso; tale valore può essere ripartito in:

- valore di opzione, attribuibile ai vegetali, così come agli altri organismi viventi, in funzione della loro possibile utilizzazione futura da parte dell'uomo;
- valore d'eredità, ovvero l'ammontare con il quale l'attuale generazione dovrebbe compensare le future per la sua responsabilità relativa alla perdita di ricchezza, di produzione o di servizi attribuibili agli ecosistemi;
- valore di esistenza, costituito dall'importo che si sarebbe disposti a pagare per consentire la sopravvivenza di una specie, indifferentemente dalla loro utilizzabilità;
- valore intrinseco, rappresentato dal valore proprio di ciascuna risorsa biologica indifferentemente dall'importanza ad essa attribuita da parte dell'uomo (Gaston e Spicer, 2004).

1.3 Gli elementi della biodiversità

La biodiversità è costituita dalla varietà della vita sulla terra in tutti i suoi livelli, dai geni agli ecosistemi, e i processi ecologici e evolutivisti che la sostengono (Laverly *et Al.*, 2008). Per evidenziare le correlazioni presenti tra i differenti livelli e la loro grandezza relativa si può scomporre la diversità degli organismi viventi, così come la biodiversità vegetale, secondo una scala gerarchica, rappresentando i vari livelli mediante un diagramma a nido.

Il livello inferiore di questa scala gerarchica, occupante il centro del diagramma, è costituito dalla diversità genetica, la quale può essere considerata come il livello elementare, responsabile della variabilità presente all'interno di individui, popolazioni, specie, ecosistemi. Il livello successivo di tale gerarchia è rappresentato dalla diversità specifica, la quale risulta essere la maggiormente considerata dalle politiche di conservazione della natura. Le interazioni reciproche tra individui e popolazioni differenti e le loro relazioni con l'ambiente sono all'origine dei livelli successivi di biodiversità, ovvero la diversità di comunità e quella ecosistemica. Il livelli più ampi della scala gerarchica sono costituiti dal paesaggio, ovvero l'insieme degli ecosistemi caratterizzanti una determinata area, e dalle eco regioni (Laverly *et Al.*, 2008).

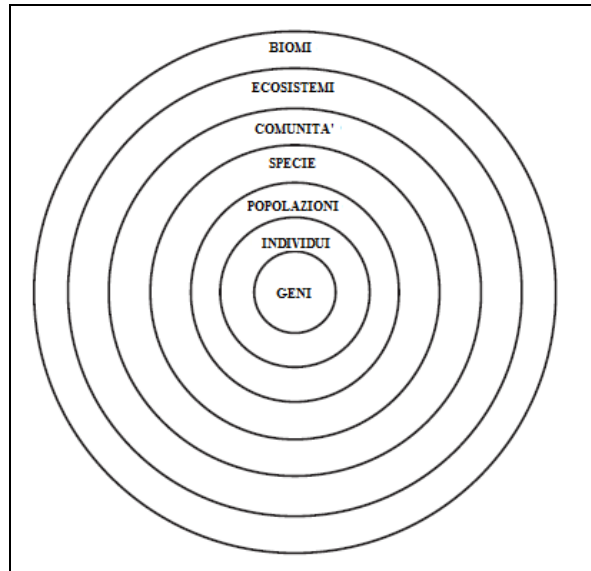


Figura 1-2: Rappresentazione gerarchica della biodiversità (Lavery *et Al.*, 2008)

Per la descrizione della biodiversità e la programmazione delle azioni relative alla sua salvaguardia normalmente si fa riferimento a tre livelli di tale scala gerarchica:

- diversità genetica;
- diversità specifica;
- diversità ecosistemica.

La *diversità genetica* si riferisce alla variabilità di nucleotidi, geni, cromosomi e genomi interi di organismi; essa può essere ritenuta come l'unità fondamentale della biodiversità in quanto tutte le altre forme di diversità biologica dipenderanno dalla sua espressione (Ferrari, 2001). La diversità genetica globale presente nei vari biomi risulta enorme, infatti sono presenti circa 10^9 geni dai quali si possono ottenere infinite combinazioni genetiche (Hens e Bonn, 2003). Tale livello di biodiversità può essere analizzato facendo riferimento a:

- un singolo organismo;
- individui della medesima popolazione;
- individui appartenenti a differenti popolazioni della medesima specie (diversità di popolazione) (Ferrari, 2001; Lavery *et Al.*, 2008).

La diversità genetica può essere analizzata mediante analisi di tipo fenotipico, osservando i caratteri correlati a specifici geni, oppure mediante l'analisi del DNA eseguita mediante tecnologie molecolari (Hens e Bonn, 2003).

La variabilità dei geni costituisce un carattere fondamentale nel determinare l'adattabilità di una specie o di una popolazione al variare delle condizioni dell'ambiente circostante. I meccanismi riproduttivi dei vegetali sono alla base di tale variabilità e ne influenzano i livelli presenti nelle differenti specie. Nelle specie caratterizzate da riproduzione agamica normalmente sono riscontrabili minori livelli di diversità genetica, la quale può essere originata esclusivamente ad opera di mutazioni. Nelle specie propagabili gamicamente, invece, numerosi meccanismi sono alla base dell'origine della variabilità genetica, la quale ovviamente risulterà maggiore nelle specie con meccanismo di fecondazione allogamo piuttosto che autogamo. Alcune specie vegetali, inoltre, sono in grado di combinare i differenti meccanismi riproduttivi (Henry, 2005)

Le ridotte dimensioni di una popolazione, causate ad esempio dalla distruzione del suo habitat o dalla sua utilizzazione indiscriminata, possono comportare una sua ridotta variabilità genetica che può facilitare la scomparsa di detta popolazione a causa della sua incapacità di adattarsi a condizioni ambientali variate. I fenomeni che possono portare alla scomparsa di una popolazione di ridotte dimensioni sono:

- le fluttuazioni repentine di natalità o mortalità causate da stress;
- inbreeding, ovvero riproduzione tra individui strettamente imparentati e caratterizzati da corredo cromosomico pressoché identico, che comporta la riduzione della variabilità genetica all'interno della popolazione e quindi una minore capacità di adattamento a condizioni diversificate;
- depressione da inbreeding, dovuta all'espressione di caratteri svantaggiosi o letali che vengono portati in condizioni di omozigosi a causa della riproduzione tra individui geneticamente imparentati (Blasi *et Al.*, 2005; Lavery *et Al.*, 2008).

La perdita di una popolazione costituisce un evento particolarmente grave per la specie alla quale essa appartiene in quanto comporta una perdita irreversibile di informazione genetica. La presenza di ridotta diversità genetica riguarda molte specie vegetali a rischio di estinzione, pertanto la salvaguardia di tale variabilità costituisce una componente chiave nelle politiche conservative (Lavery *et Al.*, 2008).

Nonostante si affermi l'importanza di conservare la diversità biologica a tutti i livelli in pratica si riserva minore attenzione alla diversità genetica, la quale costituisce la forma principale di biodiversità in aree con ridotto numero di specie come ad esempio quelle temperato-fredde o a maggiori latitudini; in tale aree la maggior parte delle biodiversità è quella intraspecifica (Ferrari, 2001).

La *diversità specifica* è rappresentata dal numero di specie presenti in una determinata area e dalle loro proporzioni reciproche. Il ricorso alla specie come gruppo sistematico per l'analisi della diversità presente tra gli organismi viventi in un determinato ambiente risulta particolarmente appropriato in quanto essa è ben definita tassonomicamente e, inoltre, costituendo il risultato dei processi evolutivi presenti riflette le caratteristiche ambientali dell'area in esame (Padovani *et Al.*, 2009).

La diversità specifica può essere analizzata prendendo in considerazione due parametri:

- la ricchezza di specie, ovvero il numero di specie presenti nella comunità vegetale in esame;
- l'abbondanza specifica, ovvero il numero di individui appartenenti a ciascuna specie della comunità vegetale. Nella comunità vegetale è possibile riscontrare differenti livelli di abbondanza specifica, ad esempio si possono avere delle situazioni in cui nella comunità vegetale abbiamo una o poche specie dominanti e le altre caratterizzate da un numero esiguo di individui oppure altre nelle quali si hanno specie comprendenti numeri simili di individui (Henry, 2005; Laverty *et Al.*, 2008; Padovani *et Al.*, 2009).

Una valutazione della diversità specifica può essere effettuata anche facendo riferimento alla cosiddetta diversità tassonomica o filogenetica, ovvero tenendo in considerazione le relazioni evolutive presenti tra le differenti specie. Tale analisi può essere effettuata mediante il ricorso ad una classificazione gerarchica ad albero, la quale permette di evidenziare le specie provenienti da medesimi progenitori e quindi valutare la lontananza in termini evolutivi e tassonomici delle specie presenti nell'area studiata (Laverty *et Al.*, 2008; Padovani *et Al.*, 2009). Ovviamente un ambiente con specie appartenenti a più generi o famiglie presenterà maggiore biodiversità rispetto ad uno le cui specie appartengono tutte al medesimo gruppo tassonomico (Hens e Bonn, 2003). L'analisi della diversità specifica costituisce spesso il principale fattore sulla quale vengono basate le politiche di conservazione della biodiversità (Padovani *et Al.*, 2009).

Altro importante livello normalmente analizzato per la descrizione della biodiversità è quello relativo alla *diversità ecosistemica*, la quale rappresenta la variabilità presente tra i differenti ecosistemi. Tale diversità è correlata alle differenze di habitat e di processi biologici presenti all'interno degli ecosistemi (Padovani *et Al.*, 2009).

La diversità ecosistemica dipende dalle caratteristiche ambientali, dalle specie presenti e dalle interazioni di queste con l'ambiente (Laverty *et Al.*, 2008). L'analisi della diversità ecosistemica si presta ad un'interpretazione maggiormente dinamica rispetto agli altri tipi

di diversità biologica in quanto il concetto stesso di ecosistema può essere valutato in maniera differente in funzione del criterio adottato per la sua definizione e della scala di analisi utilizzata. Relativamente al criterio adottato per la definizione di un ecosistema ci si può riferire, ad esempio, al tipo di ambiente dominante, alla tipologia di specie dominanti, al clima presente nell'area in esame. Relativamente alla scala utilizzata per la definizione della diversità ecosistemica, invece, ci si può riferire ad una scala più ampia, mondiale, nel qual caso ci si soffermerà ad analizzare zone biogeografiche, biomi, eco-regioni, o ad una scala di ampiezza minore, riferendosi a paesaggi, ecosistemi o comunità (Laverty *et Al.*, 2008; Padovani *et Al.*, 2009). Quale che sia la scala di analisi presa in esame o i criteri adottati per la definizione dell'ecosistema di riferimento la diversità ecosistemica dipenderà da :

- caratteristiche fisiche dell'ambiente, ovvero regime termico, precipitazioni, topografia dell'area;
- specie presenti nell'ecosistema in esame, le quali possono influenzare la diversità ecosistemica modificando le caratteristiche dell'ambiente nel quale vivono (microclima, pedologia);
- interazioni delle specie presenti con l'ambiente, in quanto l'azione dei differenti parametri ambientali può influenzare la tipologia e la ricchezza di specie presenti e conseguentemente la diversità dell'ecosistema in esame (Laverty *et Al.*, 2008).

Nonostante la molteplicità di analisi alle quali si presta la diversità ecosistemica il suo studio risulta di fondamentale importanza per l'elaborazione di politiche di salvaguardia delle specie vegetali e della biodiversità in generale grazie alla ricchezza di informazioni da esso fornite (Henry, 2005; Padovani *et Al.*, 2009).

1.4 La distribuzione della biodiversità vegetale

Nonostante gli organismi viventi abbiano colonizzato praticamente tutti gli ambienti presenti sul pianeta Terra, anche quelli più estremi, la loro distribuzione non è uniforme in quanto dipendente da numerosi fattori fra i quali:

- latitudine;
- altitudine;
- clima;
- disponibilità di nutrienti (Padovani *et Al.*, 2009).

Relativamente alla distribuzione geografica si registra un maggiore livello di biodiversità specifica ai tropici con una tendenza alla riduzione spostandosi verso le latitudini maggiori.

Le aree tropicali, oltre a presentare un maggior numero di specie, sono caratterizzate anche da una maggiore ricchezza in termini di gruppi tassonomici più elevati quali famiglie e generi. Anche l'altitudine influenza la distribuzione della biodiversità, con maggior numero di specie alle quote intermedie e tendenza alla riduzione spostandosi verso le maggiori altitudini. Tale gradiente di distribuzione risulta dovuto principalmente alle condizioni climatiche più difficili presenti alle maggiori altitudini e latitudini. Una distribuzione differenziata della biodiversità interessa anche gli ambienti marini, con tendenza alla riduzione allontanandosi dalle coste ed alle maggiori profondità (Singh, 2002; Laverty *et Al.*, 2008).

Relativamente all'importanza per la biodiversità e alla necessità di protezione la *Conservation International's* ha identificato delle aree critiche, definite come *hotspot*, le quali presentano una particolare ricchezza in specie endemiche ma risultano ampiamente minacciate dall'attività antropica. Caratteristiche di tali aree sono il possesso di almeno 1.500 specie vegetali endemiche (lo 0,5% delle 300.000 specie vegetali presenti sulla Terra) e l'aver perduto almeno il 70% della loro vegetazione primaria. Secondo tale criterio sono stati individuati venticinque hotspot terrestri nei quali, nonostante essi interessino appena l'1,4% della superficie terrestre, vivono circa il 44% delle specie vascolari ed il 35% di quelle di vertebrati. Dei venticinque hotspot 15 interessano aree di foresta tropicale mentre cinque interessano ambienti mediterranei (Myers *et Al.*, 2000; Singh, 2002; Laverty *et Al.*, 2008).

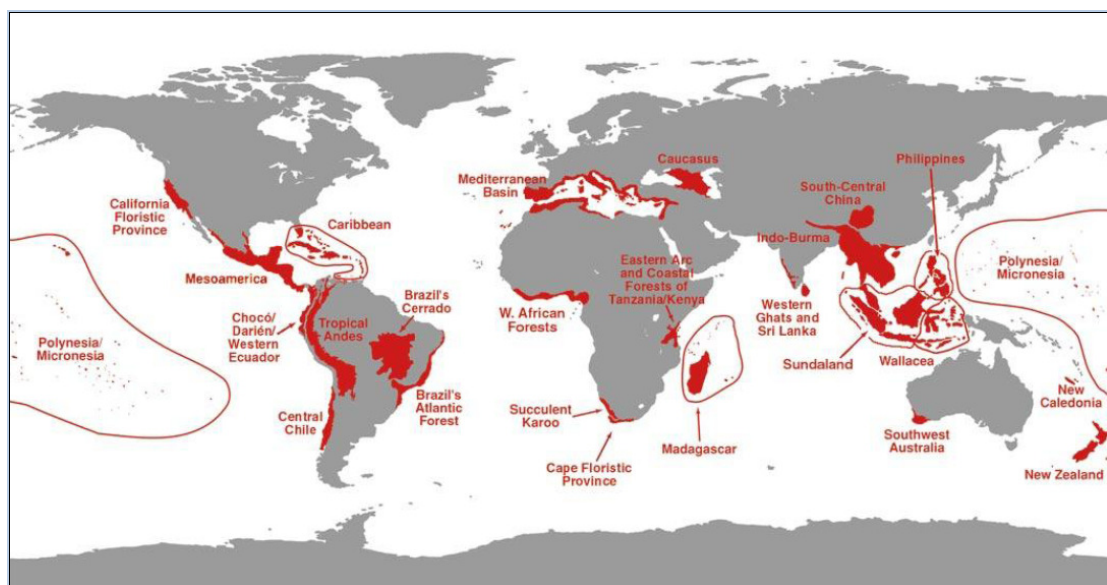


Figura 1-3: I 25 hotspot della biodiversità (Myers *et Al.*, 2000).

Tabella 1-2: Caratteristiche dei 25 hotspot della biodiversità (Myers *et Al.*, 2000)

| Hotspot | Estensione originaria vegetazione primaria (km ²) | Vegetazione primaria restante (km ²) (% est. originaria) | Specie vegetali | Specie vegetali endemiche (% delle specie vegetali terrestri, 300.000) |
|---|---|--|-----------------|--|
| Ande tropicali | 1.258.000 | 314.500 (25,0%) | 45.000 | 20.000 (6,7%) |
| America Centrale | 1.155.000 | 231.000 (20,0%) | 24.000 | 5.000 (1,7%) |
| Caraibi | 263.500 | 29.840 (11,3%) | 12.000 | 7.000 (2,3%) |
| Foresta atlantica Brasiliana | 1.227.600 | 91.930 (7,5%) | 20.000 | 8.000 (2,7%) |
| Chocò/Darien/Ovest Ecuador | 260.600 | 63.000 (24,2%) | 9.000 | 2.250 (0,8%) |
| Regione del Cerrado (Brasile) | 1.783.200 | 356.630 (20,0%) | 10.000 | 4.400 (1,5%) |
| Cile Centrale | 300.000 | 90.000 (10,2%) | 3.429 | 1.605 (0,5%) |
| California | 324.000 | 80.000 (39,3%) | 4.426 | 2.125 (0,7%) |
| Madagascar | 594.150 | 59.038 (9,9%) | 12.000 | 9.704 (3,2%) |
| Foresta costiera e dell'arco orientale della Tanzania /Kenia | 30.000 | 2.000 (6,7%) | 4.000 | 1.500 (0,5%) |
| Foreste Africa Occidentale | 1.265.000 | 126.500 (10,0%) | 9.000 | 2.250 (0,8%) |
| Provincia floristica del Capo | 74.000 | 18.000 (24,3%) | 8.200 | 5.682 (1,9%) |
| Karoo | 112.000 | 30.000 (26,8%) | 4.849 | 1.940 (0,6%) |
| Bacino del Mediterraneo | 2.362.000 | 110.000 (4,7%) | 25.000 | 13.000 (4,3%) |
| Caucaso | 500.000 | 50.000 (10,0%) | 6.300 | 1.600 (0,5%) |
| Sundaland | 1.600.000 | 125.000 (7,8%) | 25.000 | 15.000 (5,0%) |
| Wallacea | 347.000 | 52.020 (15,0%) | 10.000 | 1.500 (0,5%) |
| Filippine | 300.800 | 9.023 (3,0%) | 7.620 | 5.832 (1,9%) |
| Indo-Burma | 2.060.000 | 100.000 (4,9%) | 13.500 | 7.000 (2,3%) |
| Cina Centro-Meridionale | 800.000 | 64.000 (8,0%) | 12.000 | 3.500 (1,2%) |
| Ghati occidentale/Sri Lanka | 182.500 | 12.450 (6,8%) | 4.780 | 2.180 (0,7%) |
| Australia Sud-Occidentale | 309.850 | 33.336 (10,8%) | 5.469 | 4.331 (1,4%) |
| Nuova Caledonia | 18.600 | 5.200 (28,0%) | 3.332 | 2.551 (0,9%) |
| Nuova Zelanda | 270.500 | 59.400 (22,0%) | 2.300 | 1.865 (0,6%) |
| Polinesia/Micronesia | 46.000 | 10.024 (21,8%) | 6.557 | 3.334 (1,1%) |
| TOTALE | 17.444.300 | 2.122.891 (12,2%) | --- | 133.149 (44%) |

La *Conservation International's* ha inoltre individuato cinque regioni particolarmente importanti per la biodiversità visto il loro grado di integrità, tali aree sono: la Foresta Amazzonica, il Bacino del Congo, la Nuova Guinea, il Deserto del Nord America e il Sud Africa. A differenza degli hotspot tali aree possiedono almeno il 70% del territorio incontaminato e, quindi, ciascuno costituisce un'importante riserva della biodiversità terrestre (Laverty *et Al.*, 2008).

1.5 Le minacce alla biodiversità

I livelli di biodiversità presenti nelle differenti regioni della Terra sono stati e continuano ad essere caratterizzati da una continua variabilità dovuta all'azione di fenomeni naturali quali processi evolutivi e cambiamenti climatici a lungo o breve termine che, in alcuni casi, hanno determinato delle vere e proprie estinzioni di massa. Alle pressioni naturali sulla diversità biologica si è aggiunta, con impatto sempre maggiore, l'attività antropica che ad oggi costituisce la maggiore minaccia alla biodiversità e potrebbe condurre alla cosiddetta sesta estinzione di massa della storia, la prima causata dall'azione di una singola specie, l'uomo (Desonie, 2008).

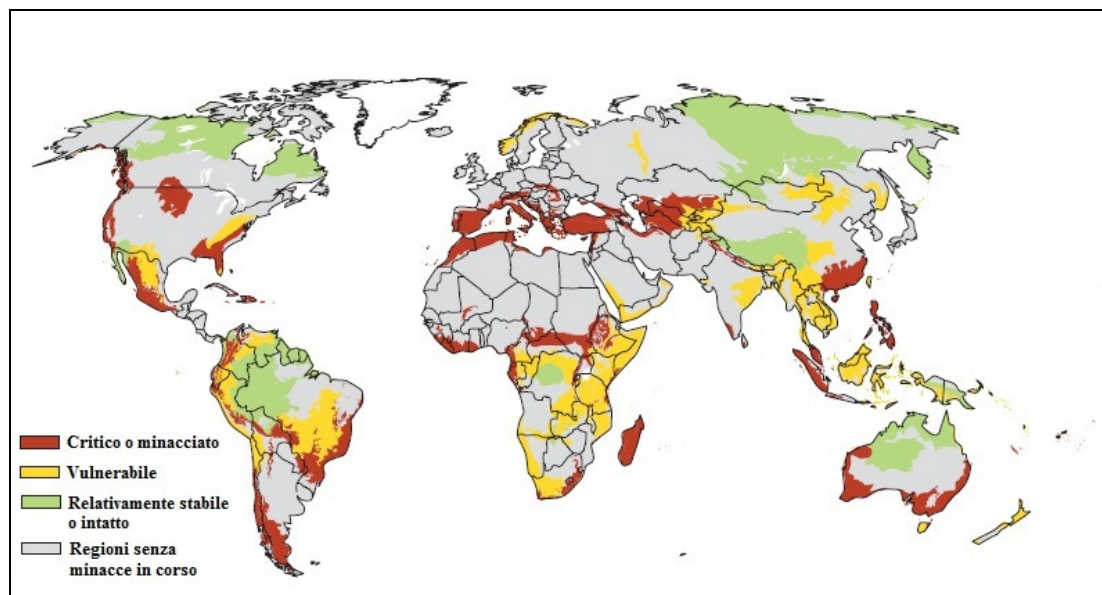


Figura 1-4: Stato delle differenti ecoregioni terrestri (UNEP, 2008)

L'attività umana costituisce una minaccia per la biodiversità a tutti i livelli di analisi:

- gli ecosistemi continuano ad essere modificati nonostante la loro importanza per i milioni di specie presenti sul pianeta e nonostante non si conoscano le implicazioni

legate a tali modifiche. L'attività umana ha modificato sia gli ecosistemi terrestri che quelli acquatici determinando la trasformazione di gran parte dei biomi terrestri in aree agricole. Gran parte degli ecosistemi fluviali sono modificati da opere di ingegnerizzazione.

- Le specie subiscono attualmente un tasso di estinzione che risulta circa cento volte superiore al normale. Il declino della diversità specifica interessa in maniera differenziata i vari biomi terrestri, con un maggiore impatto su foreste tropicali, pascoli montani e aree arbustive di ambienti secchi (UNEP, 2008).
- La diversità genetica è minacciata dalla riduzione delle popolazioni delle specie selvatiche; relativamente alle specie sottoposte ad osservazioni si è analizzata una riduzione delle popolazioni di circa il 40% (Padovani *et Al.*, 2009). In agricoltura la variabilità genetica ha subito una notevole riduzione a causa della specializzazione di tale attività e quindi della coltivazione o allevamento a livello mondiale di poche cultivar o razze migliorate; tale fenomeno, ovviamente, può avere delle notevoli implicazioni negative sulla sicurezza alimentare per la riduzione dell'adattabilità delle specie coltivate o allevate al variare delle caratteristiche ambientali (UNEP, 2008).

Dati sperimentali del 2004 della World Conservation Union (ICUN) stimano che l'attività antropica possa determinare nei prossimi cinquant'anni la scomparsa di circa un milione di specie; all'interno del regno vegetale si stima che si possa avere la scomparsa di circa il 50% delle specie (Desonie, 2008; Laverty *et Al.*, 2008; UNEP, 2008).

Tabella 1-3: Stato della biodiversità vegetale (Laverty *et Al.*, 2008)

| | |
|---|---------|
| Numero specie descritte | 297.326 |
| Numero specie valutate dal IUCN | 12.043 |
| Numero specie minacciate su totale specie descritte | 3% |
| Numero specie minacciate su quelle osservate dal IUCN | 70% |

Alla base della riduzione della biodiversità causata dall'uomo si trova il continuo incremento della popolazione mondiale che da circa sei milioni di individui presenti dieci mila anni fa, all'epoca dell'avvento dell'agricoltura, è passata a circa novecento milioni all'inizio del XIX secolo e a circa sei miliardi alla fine del XX secolo. L'incremento della

popolazione ha determinato un impatto sempre più incisivo sull'ambiente naturale per far fronte alle necessità umane di produzione di cibo, accesso all'acqua potabile, creazione di aree residenziali e industriali, smaltimento dei rifiuti.

La perdita di biodiversità su scala globale dipende principalmente dai seguenti fattori, denominati *drivers*:

- degradazione e perdita di habitat, ritenuta dai biologi la principale causa di perdita della biodiversità. Essa consiste nella distruzione di porzioni del paesaggio naturale per far spazio ad aree destinate alle attività antropiche. Una delle cause principali della degradazione degli habitat è l'incremento della popolazione mondiale che comporta la necessità di convertire aree naturali in zone agricole, residenziali, industriali o destinate ad altre attività antropiche. L'antropizzazione del territorio interessa gran parte della superficie terrestre ed in maniera sempre maggiore i paesi in via di sviluppo, soprattutto quelli dove si trovano ampie aree forestali; è prevista l'alterazione di oltre il 70% del paesaggio terrestre prima del 2032 (Desonie, 2008).
- Inquinamento, dovuto alla dispersione nell'ambiente di prodotti residui dell'attività antropica i quali alterano l'ambiente determinando conseguenti variazioni della biodiversità.
- Cambiamenti climatici determinati dall'attività antropica. Negli ultimi decenni la terra è interessata da un cambiamento climatico globale; principale fenomeno registrato è stato l'innalzamento delle temperature. Secondo i dati dell'*International Panel of Climate Change 2007 Report* negli anni 1906-2005 la temperatura terrestre ha subito un incremento di $0,74^{\circ}\text{C} \pm -0,18^{\circ}\text{C}$. La tendenza all'incremento della temperatura risulta essere quasi raddoppiata negli ultimi 50 anni e ciò, naturalmente, potrebbe esercitare un effetto notevole sulle piante presenti in natura (Lavery *et Al.*, 2008). L'innalzamento delle temperature ha interessato principalmente le temperature minime che hanno subito un tasso di incremento doppio rispetto alle massime; conseguenza principale di tale fenomeno è stata la diminuzione dei periodi con temperature inferiori a 0°C nelle regioni localizzate a latitudini medie e alte; tale evento ha portato a una riduzione della copertura nevosa e dell'estensione dei ghiacciai di circa il 10% (Blasi *et Al.*, 2005). L'incremento delle temperature è stato accompagnato anche da una modifica dell'alternarsi delle stagioni con presenza di primavere precoci ed autunni prolungati. Anche le precipitazioni hanno subito notevoli cambiamenti facendo registrare incrementi nelle regioni orientali di Nord e Sud America, nell'Europa

Settentrionale e nelle aree settentrionali e centrali dell'Asia e diminuzioni nei paesi sahariani, nel Mediterraneo, nell'Africa Meridionale e in alcune zone dell'Asia Meridionale. Essendo il clima un elemento caratterizzante la distribuzione mondiale delle specie vegetali la sua modifica potrebbe evidentemente comportare un'alterazione della composizione e del funzionamento degli ecosistemi (Lavery *et Al.*, 2008).

- Sfruttamento eccessivo delle risorse naturali che può minacciare la loro esistenza ma anche quella dell'ecosistema nel quale esse vivono e la sopravvivenza delle comunità e delle economie locali che sono profondamente legate ad esse (Lavery *et Al.*, 2008).
- Introduzione di specie animali e vegetali esotiche costituisce in molte regioni della terra la seconda causa di perdita della biodiversità dopo la distruzione di habitat (Lavery *et Al.*, 2008; Blasi *et Al.*, 2005). L'introduzione di specie da parte dell'uomo volutamente o accidentalmente può risultare estremamente dannosa in quanto comporta l'abbattimento delle barriere spaziali responsabili dell'evoluzione degli organismi ed dell'ambiente e, conseguentemente, può distruggere i processi evolutivi insistenti sull'area (Lavery *et Al.*, 2008). L'introduzione di specie aliene, iniziata già in epoca preistorica, è notevolmente aumentata con la recente globalizzazione dei trasporti e del commercio. Normalmente gli organismi introdotti non riescono a superare le barriere (riproduttive, ambientali) che si oppongono al loro adattamento nel nuovo ecosistema ma, in alcuni casi, essi riescono a stabilirsi nel nuovo ecosistema e a colonizzarlo a discapito delle specie autoctone che talvolta possono essere portate all'estinzione. (Blasi *et Al.*, 2005).

I cambiamenti con maggiore incidenza sulla biodiversità sono in primo luogo quelli relativi alla perdita di habitat e in secondo luogo i mutamenti climatici; gli altri driver presentano, invece, un'importanza variabile in funzione dell'ecosistema in esame (Blasi *et Al.*, 2005).

CAPITOLO 2 La conservazione della biodiversità vegetale

2.1 Introduzione

Vista l'ampia gamma di funzioni svolte dai vegetali per l'uomo e per l'ambiente, la loro conservazione risulta di cruciale importanza. La salvaguardia di specie non utilizzate in agricoltura è importante in quanto esse possono costituire la base per lo sviluppo di nuove colture mentre la tutela della variabilità genetica posseduta da popolazioni selvatiche o da ecotipi locali di specie coltivate è cruciale per il miglioramento genetico delle cultivar dato che tali popolazioni costituiscono una riserva di geni alla quale attingere per il miglioramento di produttività, qualità o resistenza alle avversità (Jaramillo e Baena, 2007).

Per la definizione delle azioni di conservazione della diversità vegetale è fondamentale un attento studio mirante all'individuazione delle specie minacciate e delle pressioni alle quali esse sono sottoposte. Tale considerazione ha portato all'attuazione di ricerche aventi come fine la compilazione di liste rosse delle specie vegetali minacciate. La definizione di tali liste costituisce un sistema di valutazione già da molto tempo utilizzato in alcuni stati (ad esempio in Svizzera) per la definizione delle politiche di conservazione della natura. Una prima classificazione della flora minacciata a livello comunitario fu emanata dal Consiglio d'Europa nel 1983 e prese il nome di *List of rare, threatened and endemic plants in Europe*. Tale opera è stata seguita dalla pubblicazione di numerose classificazioni delle specie minacciate aventi carattere nazionale o regionale. In Italia, nel 1992, fu pubblicato il primo libro rosso delle specie minacciate sul territorio nazionale mentre, nel 1997 fu compilata la nuova lista rossa delle specie vegetali avente una scala di studio regionale (Pignatti *et Al.*, 2001).

Le varie classificazioni della flora minacciata sono basate sul sistema di valutazione IUCN, nato negli anni '60 e mirante alla definizione del grado di pericolo al quale è esposta una specie attraverso una serie di categorie di minaccia. L'attuale protocollo di valutazione IUCN prevede la classificazione di una specie nelle seguenti categorie:

- estinta (*extinct*) (EX), nel caso in cui si abbia una relativa certezza che l'ultimo individuo appartenente alla specie sia morto;

- estinta in natura (*extinct in the wild*) (EW), nel caso in cui la specie sopravviva soltanto in cattività o come specie naturalizzata molto al di fuori del suo areale di origine;
- gravemente minacciata (*critically endangered*) (CR), quando si trova esposta a un gravissimo rischio di estinzione in natura nell'immediato futuro;
- minacciata (*endangered*) (EN), qualora essa sia esposta a grave rischio di estinzione in natura in un futuro prossimo;
- vulnerabile (*vulnerable*) (V), si verifica nel caso in cui una specie sia fortemente sfruttata e possa ricadere nelle categorie minacciate se non cessano le pressioni su di essa;
- dipendente dalla protezione (*conservation dependent*) (cd), nel caso in cui la specie è oggetto di programmi di protezione che se interrotti la farebbero ricadere in una delle categorie di minaccia precedenti;
- quasi a rischio (*near threatened*) (nt) nel caso in cui la specie pur non essendo classificabile nelle categorie precedenti è sottoposta a minacce che potrebbero portare al suo ingresso in un breve lasso di tempo nella categoria vulnerabile;
- a rischio relativo (*least concern*) (lc), qualora la specie non sia includibile nelle due categorie precedenti, vi rientrano quelle specie ampiamente diffuse ed abbondanti (Pignatti *et Al.*, 2001).

Le liste rosse costituiscono un importante presupposto per l'attuazione di politiche di conservazione della natura e da molto tempo sono utilizzate per tale fine in alcuni stati; in Svizzera, ad esempio, esse hanno addirittura assunto valore giuridico (Pignatti *et Al.*, 2001).

2.2 Le tecniche di conservazione della biodiversità

La Convenzione sulla Biodiversità tenutesi a Rio de Janeiro nel 1992 evidenziava la necessità di ricercare delle tecniche efficienti per la conservazione della diversità biologica. La conservazione della diversità vegetale può essere attuata mediante il ricorso a due strategie:

- conservazione *in situ*;
- conservazione *ex situ*.

Così come definito dalla Convenzione sulla Biodiversità la conservazione *in situ* consiste nella conservazione di ecosistemi ed habitat e nel mantenimento e ripristino di specie nell'ambiente in cui vivono naturalmente o, nel caso di specie domestiche o coltivate, nell'ambiente nel quale esse hanno sviluppato le proprie caratteristiche distintive. La

conservazione *ex situ*, a differenza di quella *in situ*, prevede la conservazione delle risorse genetiche al di fuori del loro ambiente naturale (Hawkes *et Al.*, 2000)

Per un approccio ottimale alla conservazione le due tecniche dovrebbero essere integrate in quanto in tal modo si potrebbero cumulare gli aspetti positivi delle due tecniche: il vantaggio offerto della conservazione *in situ* è quello di consentire il mantenimento dei normali processi evolutivi ai quali gli organismi viventi sono esposti in natura, quella *ex situ*, invece, risulta necessaria per far fronte a eccessive pressioni antropiche che, minacciando la sopravvivenza delle specie, rendono difficilmente applicabile un approccio conservativo *in situ*. Può essere necessario ricorrere alle tecniche *ex situ* qualora la preservazione *in situ* non consenta sicurezza di conservazione a lungo termine della biodiversità vegetale. La gestione *ex situ* inoltre è utile in quanto rende maggiormente accessibili le risorse genetiche, rendendole prontamente utilizzabili nel campo della ricerca e del miglioramento genetico o moltiplicabili per la produzione di materiale certificato da utilizzare per interventi di riqualificazione, recupero o gestione del territorio (Hawkes *et Al.*, 2000; Piotto *et Al.*, 2010).

2.3 La conservazione *in situ*

La conservazione delle risorse genetiche *in situ* consiste nella loro protezione all'interno dell'habitat naturale di crescita. Tale tipologia di conservazione viene attuata mediante l'istituzione di un'area protetta pertanto essa consente di proteggere non solo una specie ma anche l'ecosistema di cui essa fa parte. La conservazione *in situ* può perseguire differenti obiettivi:

- conservazione di ecosistemi naturali o seminaturali per mantenere la biodiversità ecosistemica, consiste nella salvaguardia di un determinato paesaggio o habitat necessario per la sopravvivenza di specie target quali possono essere le specie minacciate o quelle rare.
- Conservazione della biodiversità agricola, intesa come la preservazione della diversità di popolazioni appartenenti a specie utilizzate in agricoltura o utilizzabili come fonte di geni per il miglioramento genetico delle colture. Tale obiettivo può essere conseguito mediante la protezione di interi agro-sistemi o attraverso la coltivazione delle differenti popolazioni in aziende agricole (on-farm conservation).
- Mantenimento di una determinata specie mediante la conservazione dell'ambiente che ne costituisce l'habitat. In questo caso l'oggetto della conservazione *in situ* non è un intero ecosistema ma una o poche specie.

- Recupero di specie rare o minacciate attraverso la loro introduzione in aree protette.
- Restauro o ricostruzione di habitat.

La conservazione *in situ*, pertanto, consente di proteggere non una singola specie ma la biodiversità in tutti i livelli di organizzazione, da quello genetico a quello ecosistemico. Caratteristica fondamentale di tale metodologia di conservazione è quella di mantenere la dinamicità delle popolazioni protette in quanto esse continuano ad essere esposte alla selezione naturale (Heywood e Dulloo, 2005). Idealmente sarebbe opportuno conservare tutte le specie e popolazioni *in situ*, nel loro ecosistema, ma ciò talvolta non è possibile a causa delle minacce di erosione genetica insistenti nell'area di origine (Hawkes *et Al.*, 2000).

2.4 La conservazione *ex situ*

La conservazione *ex situ* consiste nella protezione delle risorse genetiche vegetali all'esterno del loro habitat naturale al fine di preservarle dal rischio di erosione genetica. La tecnica di conservazione *ex situ* utilizzata dipenderà dalla tipologia di materiale da conservare. E' possibile distinguere le seguenti tecniche:

- conservazione di semi;
- mantenimento in banche del germoplasma in coltura (field genebank);
- conservazione in giardini botanici;
- conservazione del DNA;
- conservazione di polline;
- conservazione in vitro.

La tecnica maggiormente utilizzata nel caso di specie che producono semi non recalcitranti è quella di conservazione dei semi, visto che essi possono essere facilmente conservati per lunghi periodi; per le altre specie, invece, sono state sviluppate le differenti tecniche alternative.

Negli ultimi decenni sono stati compiuti notevoli sforzi per l'ottimizzazione delle metodologie di conservazione *ex situ* delle risorse genetiche e, grazie ad essi, nei vari paesi sono state fondate più di 1.300 collezioni di germoplasma, nelle quali sono conservate più di 6,1 milioni di accessioni vegetali. Il materiale genetico conservato appartiene principalmente alle colture agrarie maggiormente diffuse a livello mondiale, come cereali o leguminose, che possono essere facilmente conservate in banche di semi (Engels *et Al.*, 2002)

2.4.1 La conservazione di semi

La conservazione dei semi costituisce la tecnica economicamente più conveniente, di semplice applicazione e, conseguentemente, più ampiamente utilizzata nel caso di specie che producono semi ortodossi, ovvero resistenti alla disidratazione. Gran parte delle specie vegetali producono semi ortodossi che costituiscono delle strutture atte a superare avversità ambientali e climatiche ed a perpetuare le specie nel tempo. Mediante la tecnica di conservazione dei semi, vista la sua semplicità ed economicità di utilizzo, sono conservate oltre il 90% delle risorse genetiche vegetali presenti nelle banche del germoplasma (Hawkes *et Al.*, 2000; Engels *et Al.*, 2002).

I semi vengono normalmente conservati con un ridotto contenuto di umidità relativa (3-7%) e a temperatura ridotta (ottimale -18°C o inferiore); tali condizioni di conservazione consentono di prolungare la vitalità dei semi rendendo possibile un loro stoccaggio a lungo termine. La tecnica, inoltre, non comporta dei costi elevati vista la ridotta necessità di spazio e la semplicità delle tecniche di conservazione (FAO/IPGRI, 1994; Engels *et al.*, 2002; Bacchetta *et al.*, 2006). I processi di degradazione enzimatica, nonostante la temperatura ridotta non sono completamente bloccati, ragion per cui i semi saranno comunque soggetti ad una lenta degradazione (Bacchetta *et al.*, 2006)

Più recentemente è stata sviluppata la tecnica di conservazione mediante ultradisidratazione, o liofilizzazione, la quale consiste nella disidratazione dei semi fino a contenuti estremamente ridotti di umidità relativa (1-3%) e nella loro conservazione a temperatura ambiente. L'ultradisidratazione ha mostrato di essere in grado di determinare una germinabilità leggermente superiore rispetto alla tecnica tradizionale di conservazione dopo dieci anni di stoccaggio dei semi. Inconveniente di tale tecnica è però che essa non è adattabile a tutte le specie. Ulteriore vantaggio della liofilizzazione è di consentire l'effettuazione di un test di vitalità e germinabilità quarantotto ore dopo il processo di disidratazione e, quindi, di individuare e risolvere eventuali problemi nel protocollo di conservazione. L'ultradisidratazione, attuata in camere ad umidità controllata, permette la conservazione dei semi a temperatura ambiente, riducendo conseguentemente i costi di mantenimento delle collezioni di semi (Engels *et al.*, 2000; Bacchetta *et al.*, 2006).

2.4.2 La conservazione in banche del germoplasma in coltura

La conservazione delle risorse genetiche vegetali mediante la costituzione di banche del germoplasma in coltura (*field genebank*) costituisce la tecnica tradizionale di

conservazione per tutte quelle specie che, producendo semi recalcitranti (es. specie tropicali) o essendo propagate vegetativamente (es. patata, aglio, batata, cacao), non possono essere conservate in *seed genebank*. La conservazione in coltura è importante anche per numerose specie forestali, nonostante esse producano semi ortodossi; tali arboreti vengono gestiti con finalità di ricerca e di conservazione di tali specie. Anche numerose specie arboree importanti dal punto di vista commerciale sono conservate utilizzando tale metodologia (Hawkes *et Al.*, 2000; Engels *et Al.*, 2002). La conservazione in *field genebank* è ampiamente diffusa e attualmente a livello mondiale oltre 527.000 accessioni sono conservate mediante tale tecnica (Engels *et Al.*, 2002).

La conservazione in coltura delle risorse genetiche vegetali risulta estremamente positiva dal punto di vista della ricerca scientifica in quanto consente una semplice accessibilità e utilizzazione delle specie. La gestione delle field genebank presenta però numerose difficoltà relative ai notevoli costi di gestione ed alle ampie aree necessarie per la conservazione in campo. Le specie conservate, inoltre, sono continuamente esposte al rischio di danni dovuti ad agenti biotici ed abiotici che potrebbero portare ad un danneggiamento della riserva genetica. Altro aspetto negativo di tale forma di conservazione è dato dall'impossibilità di scambiare prontamente materiale di propagazione in quanto esso potrebbe comportare la trasmissione di eventuali fitopatie (Hawkes *et Al.*, 2000; Engels *et Al.*, 2002).

2.4.3 La conservazione nei giardini botanici

I giardini botanici, che tradizionalmente si sono occupati della coltivazione di piante per finalità espositive, educative ed economiche, negli ultimi anni hanno cominciato a studiare le tecniche di conservazione delle risorse genetiche vegetali. L'attività di conservazione presso i giardini botanici, presenti principalmente in Europa ed in Nord America, riguarda principalmente specie selvatiche con valore ornamentale, rare o minacciate in natura. Si calcola che i giardini botanici contengano circa 3-4 milioni di piante viventi, corrispondenti a circa 80-100.000 specie, delle quali circa 12-15.000 sono minacciate in natura. Aspetto cruciale relativo alla conservazione attuata presso gli orti botanici è che essa mira maggiormente alla salvaguardia della diversità specifica piuttosto che intraspecifica. Alcuni importanti giardini botanici quali i Royal Botanical Garden ed il Missouri Botanical Garden si occupano anche della conservazione della variabilità intraspecifica (Hawkes *et Al.*, 2000).

2.4.4 La conservazione di polline e DNA

La conservazione di polline e DNA costituisce un caso particolare di conservazione in quanto oggetto della conservazione è l'informazione genetica piuttosto che le risorse genetiche.

La conservazione del polline normalmente viene utilizzata per attuare delle fecondazioni controllate che non potrebbero avvenire in natura, con l'obiettivo finale del miglioramento genetico e della creazione di nuove varietà (Hawkes *et Al.*, 2000). Le esigenze di conservazione variano in funzione della specie in esame ma normalmente la conservabilità è correlata a contenuto in umidità relativa e in carboidrati di riserva. Un elevato contenuto di umidità nei granuli di polline comporta maggiori difficoltà per la conservazione. I metodi più comuni di stoccaggio del polline prevedono:

- conservazione a bassa temperatura (comprese tra -20 e 4°C) e ridotta umidità relativa (inferiore al 10%);
- conservazione sottovuoto e a bassa temperatura (0°C), ciò viene effettuato dopo aver congelato rapidamente il polline a -60 ÷ -80°C ed aver rimosso parzialmente l'umidità per sublimazione;
- conservazione in azoto liquido, dopo aver disidratato il polline;
- conservazione in solventi organici, dopo aver comunque disidratato parzialmente i granuli pollinici.

L'aspetto più complicato nella conservazione palinologica è comunque il passaggio dalle condizioni di conservazione a quelle ambientali o di laboratorio (Bacchetta *et Al.*, 2006). Lo stoccaggio del polline costituisce un'opzione a basso costo per la conservazione del germoplasma ma l'aspetto negativo di tale metodo è che si può conservare esclusivamente materiale aploide maschile (Hawkes *et Al.*, 2000).

La conservazione del germoplasma sotto forma di banche del DNA comincia ad essere una tecnica reale, soprattutto relativamente alla conservazione di geni dotati di caratteristiche di interesse. Difficile invece risulta la sua applicazione alla conservazione di specie e popolazioni, principalmente a causa dell'attuale impossibilità di trasferire interi genomi. Attualmente non si è in grado di rigenerare intere piante a partire dal DNA conservato. Vista la rapidità di avanzamento delle biotecnologie si prevede che in breve tempo tali difficoltà possano essere superate, rendendo la tecnica di conservazione del DNA una reale possibilità per preservare le risorse genetiche vegetali (Hawkes *et Al.*, 2000).

2.4.5 La conservazione in vitro

La conservazione *in vitro* delle risorse genetiche vegetali costituisce un'importante alternativa per quelle specie che non sono salvaguardabili mediante il ricorso a banche di semi. Obiettivo principale della conservazione *in vitro* è l'introduzione di espianti vegetali in coltura sterile ed il loro mantenimento nel tempo in un ambiente privo di patogeni, così da rendere tali risorse disponibili per il futuro. Il ricorso alla coltura *in vitro* consente di far fronte ai principali inconvenienti dovuti alla conservazione in *field genebank* quali l'elevato spazio e gli elevati costi richiesti per la conservazione. Inoltre il materiale stoccato risulterà protetto da eventuali avversità biotiche e abiotiche che potrebbero comprometterne la sopravvivenza. Nonostante tali vantaggi la conservazione *in vitro* presenta alcuni aspetti negativi legati alla variabilità somaclonale che potrebbe insorgere durante lo stoccaggio e la necessità di studiare protocolli individuali per la maggior parte delle specie (Hawkes *et Al.*, 2000; Bacchetta *et Al.*, 2008).

Sono state sviluppate diverse tecniche per la conservazione in vitro del germoplasma; queste tecniche possono essere raggruppate in diverse categorie:

- micropropagazione
- tecniche basate sulla crescita rallentata (*slow growth*), dove il materiale vegetale viene mantenuto come tessuti vegetali o plantule su mezzo gelificato;
- crioconservazione, mediante la quale le accessioni vegetali, dopo essere state opportunamente trattate, vengono conservate mediante immersione in azoto liquido (Bacchetta *et Al.*, 2008).

2.5 Stato della conservazione in Italia

La necessità di salvaguardare la biodiversità è stata oggetto di legislazione a livello internazionale e nazionale.

La più importante convenzione delle Nazioni Unite che costituisce la base dei vari programmi di conservazione della biodiversità nel mondo è la cosiddetta Convenzione sulla Diversità Biologica, approvata nel corso della Conferenza sull'Ambiente e sullo Sviluppo delle Nazioni Unite (United Nations Conference on Environment and Development), meglio nota come Summit della Terra. Tale conferenza si tenne a Rio de Janeiro nel 1992 e ad essa parteciparono i delegati di 172 paesi, numerose organizzazioni governative e 2.400 membri di organizzazioni non-governative. La Convenzione sulla Diversità Biologica, adottata dall'Italia nel 1994, porta in primo piano il problema della

conservazione della biodiversità e la necessità della sua salvaguardia da conseguire attraverso azioni di conservazione *in situ* ed *ex situ* e mediante un'utilizzazione sostenibile delle risorse naturali (Padovani *et Al.*, 2009). Altre importanti normative regolamentanti la conservazione della diversità biologica sono la “Carta di Siracusa sulla Biodiversità”, approvata nel 2009 dal G8 nell'omonima città Italiana, e la Direttiva Habitat dell'Unione Europea, approvata nel 1992, la quale evidenzia come obiettivi prioritari la salvaguardia di habitat naturali e seminaturali e di flora e fauna selvatiche (Blasi *et Al.*, 2005).

La salvaguardia della biodiversità in Italia si basa, così come previsto dalla Convenzione sulla Diversità Biologica, su azioni di conservazione *in situ* ed *ex situ*.

La protezione della biodiversità *in situ* è stata oggetto di notevole attenzione nel corso degli anni, giungendo alla costituzione di ben 772 aree protette, la cui istituzione e gestione si basano sulla legge 394 del 6 dicembre 1991. Attualmente le aree protette coprono circa il 10% del territorio nazionale e, se a tale superficie si aggiungono i siti considerati di importanza comunitaria (pSIC), il territorio protetto arriva al 19% della superficie totale italiana. Vista l'eterogeneità dell'ambiente italiano l'ampia superficie protetta potrebbe non essere sufficiente per svolgere il ruolo conservativo per la quale è stata concepita; nonostante i sistemi montani siano ben rappresentati all'interno del territorio sottoposto a protezione, altrettanto non può dirsi per le aree costiere e per le zone alluvionali. Tale considerazione potrebbe rendere necessaria una revisione delle aree sottoposte a protezione o un loro ampliamento (Blasi *et Al.*, 2005).

Le tecniche di conservazione *in situ* non risultano sufficienti per la salvaguardia di alcune specie viventi in ambienti particolarmente minacciati, specie per le quali è fondamentale l'integrazione di tali tecniche con quelle di conservazione *ex situ*. In Italia la conservazione *ex situ* delle specie spontanee è attuata presso circa venti banche del germoplasma, le quali conservano circa un terzo delle 1.020 specie spontanee considerate a rischio di estinzione (Bacchetta *et Al.*, 2006; Piotto *et Al.*, 2010). Le più importanti banche del germoplasma presenti nel nostro paese sono quelle dei giardini botanici di Palermo, Cagliari e Pisa, oltre alla nuova banca allestita a Trento e gestita dal Museo Tridentino di Scienze Naturali. Importanti banche del Germoplasma sono anche quelle di Lucca, quella dell'Istituto del Germoplasma di Bari, gestita dal Consiglio Nazionale per le Ricerche, e quella del Corpo Forestale dello Stato conservante semi di specie forestali e spontanee (Blasi *et Al.*, 2005; Bacchetta *et Al.*, 2006). Relativamente alla conservazione del germoplasma di specie coltivate essa è attuata principalmente da CRA e CNR oltre che da una decina di organizzazioni non governative.

Aspetti fortemente limitanti l'efficacia della conservazione *ex situ* delle specie spontanee e coltivate in Italia sono costituiti dalla mancanza di una strategia di conservazione gestita a livello nazionale, dalla carenza di studi inerenti le tecniche di conservazione della maggior parte delle specie spontanee e forestali, la scarsa collaborazione tra i diversi enti. Nel 2005, per far fronte alla carenza organizzativa e legislativa a livello nazionale, diversi organismi attivi nella conservazione *ex situ* di risorse vegetali hanno approvato un protocollo di intesa per la creazione della "Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea" (RIBES). Tale organismo si occupa della gestione a livello nazionale di progetti inerenti la protezione di specie vegetali a rischio di estinzione e della redazione di un piano d'azione avente come obiettivo il miglioramento della qualità e della sicurezza delle riserve di germoplasma di specie spontanee in Italia (Bacchetta *et Al.*, 2006; Piotto *et Al.*, 2010).

In Italia la conservazione delle risorse genetiche vegetali è effettuata soprattutto mediante il ricorso a collezioni *in vivo* o mediante banche del seme; soltanto raramente sono adottate metodologie di conservazione *in vitro*. La tecnica di criconservazione nel nostro paese rimane attualmente relegata ad un ambito sperimentale piuttosto che ad uno applicativo (Piotto *et Al.*, 2010).

CAPITOLO 3 La conservazione delle risorse genetiche vegetali mediante micropropagazione

3.1 La micropropagazione

La micropropagazione è una tecnica che consente la propagazione di germoplasma selezionato utilizzando la coltura *in vitro* (Bacchetta *et Al.*, 2008).

La micropropagazione, così come la coltura *in vitro* di cellule e tessuti, si basa su tre principi fondamentali, ovvero:

- la totipotenza cellulare, ovvero la possibilità di ottenere tessuti e piante intere a partire da singole cellule o da tessuti;
- la possibilità di influenzare la tipologia di sviluppo seguita da cellule e tessuti mediante l'applicazione di regolatori di crescita;
- la successione morfogenetica, ovvero il susseguirsi di stadi mediante i quali, a partire da cellule o tessuti si giunge alla formazione di piante intere (Bacchetta *et Al.*, 2008).

La micropropagazione può essere attuata mediante la proliferazione di gemme o meristemi preformati, formazione di germogli avventizi, embriogenesi. Le tecniche che prevedono organogenesi ed embriogenesi passando dallo stadio di callo (organogenesi ed embriogenesi indirette) non sono applicabili per la conservazione del germoplasma in quanto possono comportare l'insorgenza di eventuali mutazioni e, quindi, una non rispondenza genetica del materiale conservato. Per la conservazione delle risorse genetiche vegetali la tecnica di micropropagazione maggiormente utilizzata prevede il ricorso a gemme preformate nelle piante madri (Bacchetta *et Al.*, 2008).

Il processo di micropropagazione può essere suddiviso in differenti stadi. Nel 1984 Murashige ha definito 3 fasi (I-III) nella moltiplicazione *in vitro* delle piante:

- I. avvio della coltura asettica;
- II. moltiplicazione
- III. allungamento e radicazione.

Tali fasi sono state integrate successivamente, ad opera di Maene e Debergh (1981), con l'aggiunta di una fase 0, relativa alla preparazione delle piante madri, ed una quarta fase, relativa al trasferimento delle piante ottenute mediante coltura *in vitro* dalle condizioni di laboratorio alle condizioni esterne. La tecnica da adottare per la propagazione *in vitro*

dipende dalla specie, dal tipo di espianto e dalla tecnica di rigenerazione; le fasi del processo micropropagativo sono però le medesime, indifferentemente da tali fattori.

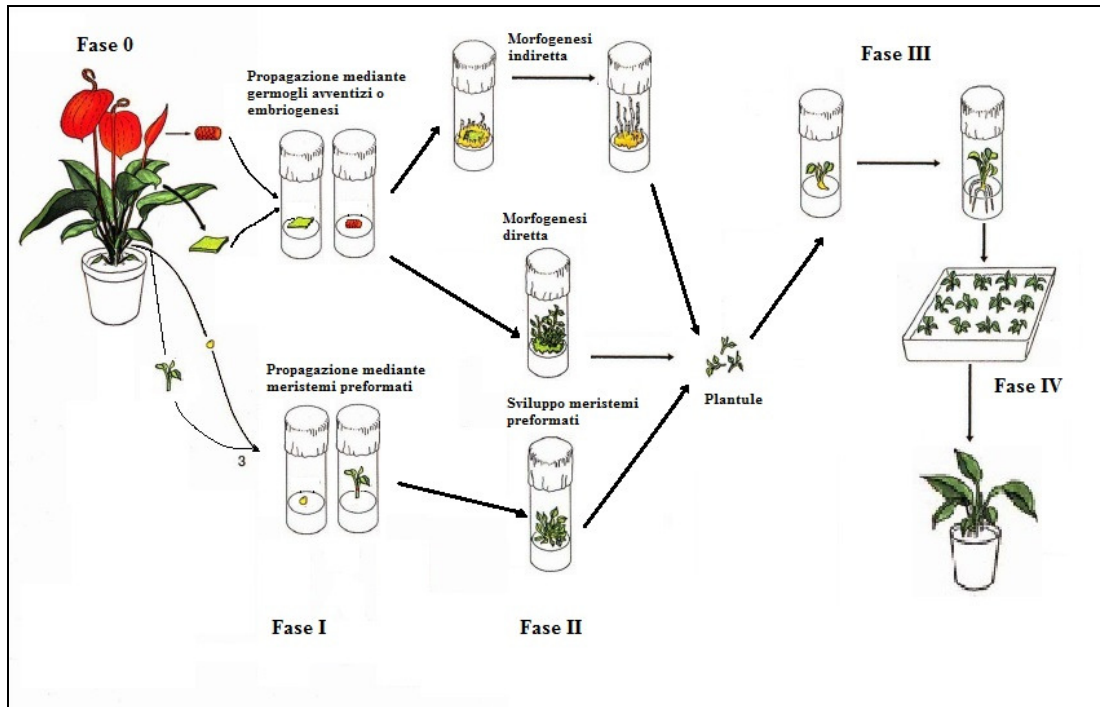


Figura 3-0-1: Fasi del processo di micropropagazione

La **fase 0** ha come obiettivo la selezione delle piante madri dalle quali prelevare gli espianti da immettere in coltura. Le piante madri devono presentare i caratteri tipici della specie da propagare e devono essere prive di segni evidenti di fitopatie. Nel caso di specie a rischio di estinzione, qualora si disponga di semi, è bene farli germinare *in vitro* così da ottenere plantule sterili da utilizzare successivamente per il prelievo degli espianti da micropropagare. L'utilizzazione di semenzali come materiale di base consente di mantenere la massima variabilità all'interno della specie salvaguardata (Bacchetta *et Al.*, 2008).

Successivamente alla selezione degli espianti si procede con l'applicazione della **fase I**, che prevede la sterilizzazione degli stessi così da renderli idonei alla coltivazione *in vitro*. Dopo un breve periodo di incubazione gli eventuali contenitori che mostrano sintomi di contaminazione vengono scartati. Lo stadio I sarà soddisfacente se si riuscirà ad ottenere un adeguato numero di espianti non contaminati (Bacchetta *et Al.*, 2008).

L'obiettivo della **fase II**, cosiddetta di moltiplicazione, è l'ottenimento di materiale di propagazione da utilizzare nelle fasi successive per l'ottenimento di piante intere. La

moltiplicazione viene ottenuta regolando opportunamente la composizione del mezzo in regolatori di crescita. Normalmente si utilizzano dei mezzi con rapporto tra citochinine ed auxine spostato in favore delle prime che sono responsabili dell'eliminazione della dominanza apicale e, quindi, dello sviluppo di germogli laterali. Alcuni dei propaguli prodotti durante la fase II possono essere utilizzati come base per ulteriori cicli di moltiplicazione (subcolture) che consentono di incrementare in modo esponenziale il numero di piante ottenute (Bacchetta *et Al.*, 2008; Tigiano e Gray, 2003).

Il materiale di propagazione ottenuto mediante l'applicazione dello stadio II è normalmente di dimensioni ridotte per tal motivo è necessario provvedere al suo allungamento ed alla sua radicazione durante la **fase III**. Lo stadio III viene normalmente suddiviso, come suggerito da Debergh e Maene (1981), in:

- Fase IIIa, di allungamento delle gemme o dei germogli formati durante la fase II, così da fornire germogli di dimensioni adeguate per la fase IIIb;
- Fase IIIb, di radicazione dei germogli ottenuti durante la fase IIIa in vitro o ex vitro.

Normalmente allungamento e radicazione vengono ottenuti incrementando il contenuto in auxine nel mezzo di coltura (Tigiano e Gray, 2003; Bacchetta *et Al.*, 2008).

La **fase IV** è quella che porta al trasferimento delle piante ottenute in vitro in condizioni ex vitro. La metodologia con cui le giovani piantine sono trasferite dalla coltivazione in vitro alle condizioni esterne risulta di estrema importanza. Se il trasferimento all'ambiente esterno non viene eseguito con cautela si può avere una notevole perdita del materiale propagato a causa della sua ridotta capacità di regolare la traspirazione, di effettuare la fotosintesi e di assorbire nutrienti dal suolo. Le ragioni di ciò sono principalmente due:

- i germogli coltivati in vitro sono prodotti normalmente in condizioni di elevata umidità e ridotta intensità luminosa. Questo comporta la presenza di una ridotta barriera cerea epicuticolare o di composti cerei con composizione chimica alterata rispetto alle normali piante coltivate. In alcune piante prodotte in vitro, inoltre, gli stomi possono essere anomali e incapaci di chiudersi in maniera completa se sottoposti a condizioni di ridotta umidità relativa. Piante ottenute in vitro quindi perdono acqua rapidamente quando sottoposte alle normali condizioni esterne.
- Le piante coltivate in vitro vengono alimentate con saccarosio o altri zuccheri e sottoposte a ridotta intensità luminosa, questo fa sì che esse non siano completamente dipendenti dalla propria fotosintesi. L'avvio della fase di crescita autotrofica si verifica solo alcuni giorni dopo il trasferimento in *ex vitro* (Tigiano e

Gray, 2003; Bacchetta *et Al.*, 2008).

La tecnica di micropropagazione mediante colture di embrioni somatici o di germogli è stata ampiamente utilizzata in programmi finalizzati alla valorizzazione colturale e alla tutela di specie vegetali a rischio d'estinzione (Ravichandran e Manimekalai, 2006).

3.2 La conservazione in condizioni di crescita controllata (*slow growth*)

La conservazione *in vitro* in condizioni di crescita controllata ha come obiettivo quello di ridurre il numero di subculture e, conseguentemente, la manutenzione e le attenzioni necessarie per il mantenimento del materiale vegetale. Mentre alcune specie possono sopportare lunghe subculture anche in condizioni normali (es. caffè), alcune necessitano dell'applicazione di condizioni particolari per ridurre la velocità di crescita ed il numero di trasferimenti. La riduzione della velocità di accrescimento può essere ottenuta mediante trattamenti fisici o chimici oppure integrando le due tipologie di trattamento (Hawkes, 2000; Shibli *et Al.*, 2006, Paunescu, 2009).

Relativamente ai fattori fisici si può ridurre la crescita degli espianti intervenendo sulle condizioni termiche e luminose dell'ambiente di coltivazione. La temperatura di conservazione può essere ridotta a livelli compresi tra 0 e 5°C per le specie resistenti al freddo mentre per le specie tropicali, sensibili a tale fattore, la riduzione può essere effettuata fino a livelli di 15-20°C. L'accrescimento può essere influenzato anche riducendo la luminosità o il numero di ore di luce dell'ambiente di coltivazione fino, in alcuni casi, alla completa oscurità. Normalmente l'umidità relativa deve essere mantenuta tra il 40 ed il 50% (Hawkes, 2000; Shibli *et Al.*, 2006, Paunescu, 2009).

La crescita può essere ridotta chimicamente intervenendo sulla presenza di fattori essenziali nel mezzo, quali ad esempio gli zuccheri, fonte di carbonio per le piante coltivate *in vitro*. Altra tecnica chimica prevede la somministrazione di ritardanti di crescita, come l'acido abscissico, o di sostanze che agiscono osmoticamente sull'accrescimento delle plantule, tra cui mannitolo, sorbitolo o saccarosio, se somministrato in concentrazioni eccessive. L'applicazione di sostanze osmoticamente attive riduce il potenziale osmotico delle cellule e la capacità di distensione cellulare; tale stress riduce il tasso di crescita degli espianti (Hawkes, 2000; Shibli *et Al.*, 2006).

Altro approccio alla conservazione in condizioni di *slow growth* prevede la riduzione dell'ossigeno disponibile mediante coltivazione in atmosfera controllata o trattamento con oli che riducono la capacità di scambio gassoso delle plantule (Paunescu, 2009).

Nonostante la tecnica di slow growth costituisca un importante strumento per la conservazione a medio termine vista la capacità di ridurre l'accrescimento delle plantule ed il numero di subculture necessarie, per tempi di conservazione più lunghi è ottimale bloccare completamente il loro sviluppo; ciò può essere attuato ricorrendo alla tecnica di crioconservazione (Hawkes, 2000).

CAPITOLO 4 La crioconservazione delle risorse genetiche vegetali

4.1 La crioconservazione

La crioconservazione è una tecnica che consente la conservazione di materiale vivente (cellule e tessuti) a temperature ultrabasse, normalmente in azoto liquido a -196°C, per più anni, mantenendo la capacità del materiale di riprendere le normali attività biologiche allo scongelamento (Day *et Al.*, 2008). Durante la crioconservazione i vari processi fisiologici vengono bloccati a causa delle temperature ultrabasse e, conseguentemente, le cellule possono mantenere inalterate le loro caratteristiche (Shibli *et Al.*, 2006).

La crioconservazione inizialmente è stata sviluppata per cellule animali e, in un secondo tempo, sulla base di tali successi si è iniziata a studiare la conservazione di espianti vegetali. I primi risultati positivi concernenti la ripresa di espianti vegetali successivamente alla crioconservazione sono stati ottenuti da Sakai nel 1956, il quale dimostrò la possibilità di conservare in azoto liquido germogli ben lignificati di gelso (*Morus Spp.*) (Shibli *et Al.*, 2006). Nonostante negli ultimi decenni siano state sviluppate e testate numerose metodologie di crioconservazione di espianti vegetali, tale tecnica è diventata di routine soltanto negli ultimi anni (Reed *et Al.*, 2008).

Le ricerche messe in atto negli ultimi anni hanno permesso di sviluppare la conservazione di differenti tipologie di materiale vegetale, nonostante ciò, gli espianti maggiormente utilizzati per la crioconservazione sono gli apici vegetativi di lunghezza compresa tra 1 e 3 mm; essi sono preferiti in quanto caratterizzati da adattabilità alle temperature ultrabasse ed elevata stabilità genetica, garanzia non fornita nel caso si conservino colture cellulari o di callo. Gli apici vegetativi, inoltre, sono caratterizzati dalla presenza di un elevato numero di cellule in divisione attiva che consentono una pronta ripresa dell'accrescimento successivamente allo scongelamento (Shibli *et Al.*, 2006).

4.2 Basi biologiche e fisiche dalla crioconservazione

La resistenza del materiale vegetale alla crioconservazione dipende, ovviamente, dalla capacità di far fronte agli stress che si verificano a causa dell'esposizione al freddo intenso. Fenomeno fondamentale che si verifica a causa dell'esposizione degli espianti alle basse temperature è il congelamento dell'acqua disponibile che, normalmente, costituisce circa il 95% dell'acqua totale presente in essi. Perché avvenga il congelamento dell'acqua è necessario che si formino dei nuclei di cristallizzazione, la cui formazione in presenza di

soluti avviene in condizioni di sopraffusione, ovvero al di sotto di 0°C. A partire dalla nucleazione i cristalli di ghiaccio hanno la capacità di crescere esponenzialmente a causa della sempre maggiore partecipazione delle molecole di acqua, formando complessi gruppi connessi tra di loro (Benson, 2008). Normalmente la congelazione avviene a partire dagli spazi extracellulari visto che in essi risulta più semplice iniziare la nucleazione. Conseguentemente all'inizio della formazione di nuclei di ghiaccio si ridurrà l'acqua di solubilizzazione presente negli spazi extracellulari e si genererà, per effetto del potenziale osmotico, una fuoriuscita di acqua dalle cellule. Con il procedere di tale fuoriuscita la concentrazione di soluti all'interno delle cellule risulterà talmente elevato da condurre al danneggiamento delle proprietà colligative ed osmotiche delle cellule e, quindi, alla loro morte (Fuller, 2004; Benson, 2008; Day *et Al*, 2008). Tale situazione si verifica qualora si abbia un congelamento sufficientemente lento da permettere la fuoriuscita di acqua dalle cellule. Nel caso in cui si verifichi un raffreddamento rapido è possibile che allo stress osmotico-colligativo si accompagni la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari che possono determinare dei danni meccanici alle cellule, principalmente a plasmalemma, nucleo ed organelli cellulari, compromettendone la vitalità (Fuller, 2004; Day *et Al*, 2008). Le due tipologie di danno normalmente si verificano allo stesso tempo in rapporti diversi in funzione della velocità di congelamento.

Altro fenomeno che può impedire la ricrescita del materiale vegetale successivamente alla crioconservazione è la formazione di forme attive dell'ossigeno (ROS) quali radicali di perossidi di ossigeno (O_2^-), radicali di idrossidi (OH \cdot), idrossido di idrogeno (H_2O_2), ossigeno allo stato di singoletto (1O_2). Tali forme di ossigeno interagiscono con le membrane lipidiche portando ad una loro degradazione ed alla formazione di prodotti di loro per ossidazione. Tra i composti prodotti sono da annoverare soprattutto idrocarburi, lipidi aldeidici tossici e radicali secondari che, insieme ai radicali primari vanno a reagire con i fosfolipidi così come con molecole ricche di elettroni quali le proteine ed il DNA. Risultati di tali reazioni sono la disorganizzazione della membrana lipidica e l'arresto dell'attività metabolica cellulare (Benson, 1990).

Le tecniche di crioconservazione, visto quanto sopraddetto, hanno come obiettivo quello di evitare i danneggiamenti dovuti alla congelazione degli espianti ed agli stress messi in atto durante il processo di conservazione.

4.3 Le tecniche di crioconservazione

Principio fondamentale della crioconservazione è quello di evitare la formazione di ghiaccio intracellulare che potrebbe danneggiare irreparabilmente le cellule. Ciò viene attuato mediante la disidratazione delle cellule ad un livello tale da impedire la nucleazione dei cristalli di ghiaccio e la solidificazione dell'acqua intracellulare in uno stato vetroso.

La formazione di ghiaccio intracellulare può essere evitata mediante il ricorso a due approcci:

- Crioconservazione con formazione di ghiaccio extracellulare o controlled rate cooling;
- Crioconservazione basata sulla vitrificazione in assenza di ghiaccio extracellulare (Day *et Al.*, 2008; Gonzalez-Arno, 2008).

Quale che sia l'approccio seguito particolare importanza è rivestita dall'applicazione di un'adeguata strategia crioprotettiva (Day *et Al.*, 2008). I soluti crioprotettivi sono degli additivi che somministrati alle cellule prima del loro congelamento, consentono un incremento della loro sopravvivenza post-scongelo (Fuller, 2004). Gli agenti crioprotettivi possono essere suddivisi in due importanti gruppi:

- penetranti o colligativi;
- non penetranti, detti anche osmotici.

Gli additivi penetranti svolgono numerosi ruoli nel corso del processo di crioconservazione ma il ruolo principale da essi svolto è quello di proteggere le cellule da eventuali danni colligativi; ciò viene attuato incrementando l'osmolarità delle cellule ed evitando la riduzione eccessiva del volume cellulare dovuta a disidratazione (Benson, 2008; Day *et Al.*, 2008). Poiché la protezione delle proprietà colligative sia efficace è necessario che gli additivi penetranti possiedano le seguenti caratteristiche:

- devono essere in grado di penetrare nelle cellule, altrimenti provocherebbero una disidratazione osmotica e, conseguentemente, provocherebbero il danno contro il quale dovrebbero proteggere;
- non devono essere tossici per l'attività cellulare alle concentrazioni richieste per l'esplicitazione delle loro funzioni (Benson, 2008).

I crioprotettivi colligativi interagiscono, mediante la costituzione di ponti a idrogeno, con importanti macromolecole biologiche, quali ad esempio le proteine che vengono stabilizzate termo-dinamicamente qualora si verificano condizioni di stress. Gli additivi costituiti da disaccaridi, tra i quali il saccarosio, hanno dimostrato di essere in grado di stabilizzare le membrane cellulari interagendo con le teste polari dei fosfolipidi,

proteggendo tali strutture nel corso di esposizione a soluzioni ipertoniche e formazione di cristalli di ghiaccio (Fuller, 2004). Gli additivi colligativi sono inoltre in grado di incrementare la viscosità presente all'interno delle cellule formando dei ponti a idrogeno con le molecole di acqua ivi presenti e, qualora questa proprietà sia elevata oltre un certo limite, inibiscono la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari. Mediante tale fenomeno è possibile la solidificazione della soluzione citoplasmatica in uno stato vetroso, non dannoso per la struttura cellulare (Fuller, 2004; Benson, 2008).

Nel corso degli ultimi decenni sono stati individuati numerosi crioprotettivi colligativi ma quelli maggiormente utilizzati sono: glicerolo, dimetilsolfossido (DMSO), metanolo e glicoli a ridotto peso molecolare (Benson, 2008).

Gli additivi non penetranti rivestono svariati ruoli protettivi per le cellule; essi, infatti, riducono il punto di congelamento, causano la disidratazione osmotica delle cellule e riducono il quantitativo di acqua disponibile per la formazione di cristalli di ghiaccio extracellulari. I crioprotettivi non penetranti possono essere distinti in due gruppi:

- in grado di penetrare la parete cellulare ma non la membrana citoplasmatica, tra i quali oligosaccaridi, amminoacidi (prolina), e polimeri a ridotto peso molecolare (PEG₁₀₀₀);
- incapaci di penetrare la parete cellulare, gruppo al quale appartengono polimeri ad elevato peso molecolare (PEG₆₀₀₀, PVP), polisaccaridi e proteine (Benson, 2008)

I crioprotettivi che rimangono negli spazi intercellulari impediscono la formazione di cristalli eccessivamente grandi, proteggendo le cellule da deformazione meccanica (Benson, 2008).

4.3.1 Crioconservazione mediante Controlled rate cooling

La tecnica di “controlled rate cooling”, definita anche come tecnica tradizionale visto che è la metodologia sviluppata inizialmente per la crioconservazione, si basa sul raffreddamento controllato del materiale vegetale immerso in una soluzione crioprotettiva fino ad una temperatura di circa -40°C, temperatura superiore a quella minima di sopraffusione dell'acqua (Day *et Al.*, 2008; Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008). Il raffreddamento controllato viene messo in atto nella cosiddetta fase di *rump* mediante il ricorso a congelatori con tasso di raffreddamento programmabile (Benson, 2008). Visto che naturalmente la nucleazione dei cristalli di ghiaccio avviene inizialmente negli spazi extracellulari si viene a creare un deficit di pressione di vapore tra esterno ed interno delle cellule; ciò comporta la migrazione delle molecole di acqua da vacuoli e citoplasma verso

gli spazi extracellulari per mantenere l'equilibrio osmotico (Benson, 2008; Day *et Al.*, 2008; Gonzalez-Arnao *et Al.*, 2008). La fuoriuscita di acqua dalle cellule fa sì che si innalzi la concentrazione della soluzione citoplasmatica, riducendo la temperatura di congelamento e, conseguentemente, allungando il tempo disponibile per la fuoriuscita di acqua dalle cellule (Benson, 2008). In funzione della velocità di congelamento un quantitativo di acqua variabile viene rimosso dalle cellule prima che la soluzione citoplasmatica sia solidificata mediante immersione in azoto liquido: Il tasso di raffreddamento maggiormente adottato è di $0,5-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ fino al raggiungimento di -40°C (Gonzalez-Arnao *et Al.*, 2008).

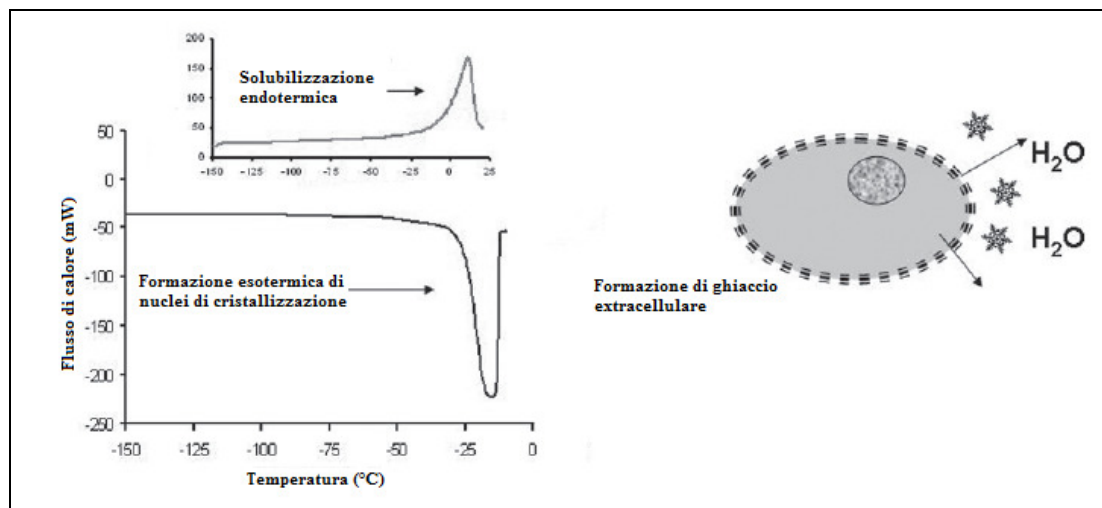


Figura 4-1: Rappresentazione schematica dei principi fisici e termici della tecnica di controlled rate cooling. Il diagramma è ottenuto mediante differential scanning calorimetry e dimostra l'esotermicità della nucleazione. L'immagine mostra come la formazione di ghiaccio extracellulare crei un deficit di pressione osmotica attraverso la membrana cellulare, provocando lo spostamento delle molecole di acqua verso l'esterno delle cellule (Day *et Al.*, 2008).

Successivamente al raggiungimento dei -40°C gli espanti possono essere immersi direttamente in azoto liquido oppure essere mantenuti a tale temperatura per 30-45 minuti (*hold*) prima dell'immersione (Benson, 2008). Qualora la fase di raffreddamento controllato sia stata adeguatamente eseguita, al momento dell'immersione in azoto liquido la soluzione citoplasmatica risulterà sufficientemente concentrata e viscosa da ostacolare il movimento delle molecole di acqua; pertanto si avrà la solidificazione dell'acqua nello stato vetroso amorfo (Gonzalez-Arnao *et Al.*, 2008).

La formazione di ghiaccio intracellulare deve essere ostacolata anche nella fase di scongelamento; ciò viene messo in atto riscaldando i campioni in bagnomaria a 40°C per

qualche minuto. L'elevata velocità di scongelamento fa sì che non il lasso di tempo a disposizione non sia sufficiente per l'aggregazione delle molecole di acqua in cristalli di ghiaccio (Gonzalez-Arnao *et Al.*, 2008).

Da quanto detto emerge chiaramente che la metodologia tradizionale di crioconservazione è basata sul controllo della dinamica di congelamento-disidratazione. L'ottimizzazione della cristallizzazione extracellulare è la fase chiave durante il raffreddamento. Il ricorso ad un elevato tasso di riscaldamento, invece, costituisce il fondamento per evitare la ricristallizzazione dell'acqua durante lo scongelamento (Gonzalez-Arnao *et Al.*, 2008)

4.3.2 Crioconservazione basata sulla vitrificazione in assenza di ghiaccio extracellulare

I protocolli basati sulla vitrificazione in assenza di ghiaccio extracellulare si basano sulla disidratazione osmotica o evaporativa dei campioni a temperatura maggiore di quella di congelamento; ciò consente di incrementare la viscosità intracellulare e, conseguentemente, di ottenere la vitrificazione immergendo il materiale vegetale direttamente in azoto liquido (Benson, 2008; Gonzales-Arnao *et Al.*, 2008). Tale metodologia differisce da quella tradizionale di crioconservazione nella quale la vitrificazione è ottenuta mediante incremento della viscosità a temperatura inferiore a quella di congelamento mediante regolazione della cristallizzazione extracellulare; l'approccio tradizionale può pertanto essere definito anche come vitrificazione parziale (Sakai e Engelmann, 2007).

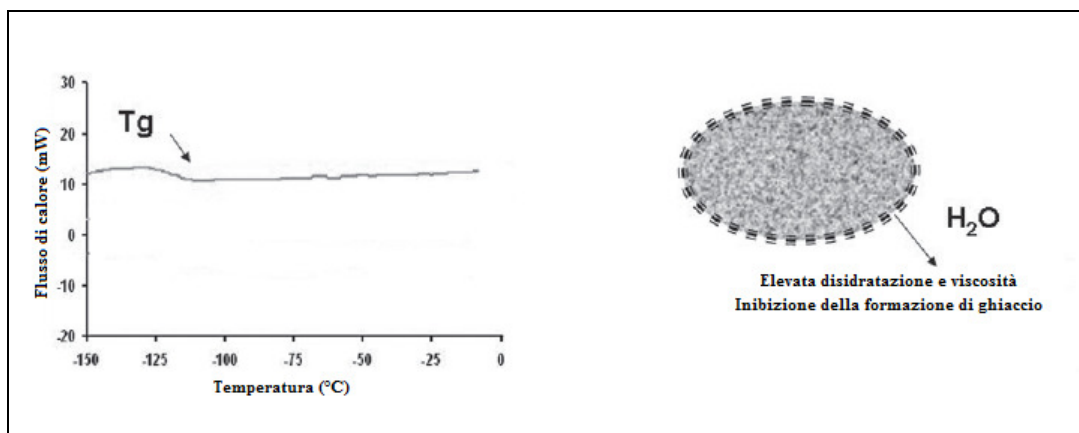


Figura 4-2: Rappresentazione schematica dei principi fisici e termici della tecnica di vitrificazione. Il diagramma è ottenuto mediante differential scanning calorimetry (DSC) e dimostra l'assenza di nucleazione ricorrendo alla tecnica di vitrificazione. L'immagine mostra la disidratazione e la conseguente elevata viscosità consentano di evitare la formazione di cristalli di ghiaccio intra o extra cellulari (Day *et Al.*, 2008).

La vitrificazione è un processo fisico che si verifica alla cosiddetta temperatura di transizione vetrosa, consistente nella solidificazione di un liquido senza cristallizzazione, sotto forma di vetro amorfo (Benson, 2008). Tale stato mantiene la disposizione delle molecole tipica dello stato liquido ma possiede delle caratteristiche fisiche e meccaniche tipiche di quello solido (Benson, 2008; Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008). Vista l'elevata viscosità dello stato vetroso tutte le reazioni chimiche che richiedono la diffusione in mezzo acquoso vengono bloccate, consentendo di mantenere le condizioni di stabilità per lunghi intervalli temporali (Benson, 2008; Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008).

Tale stato, grazie all'assenza di una struttura organizzata, risulta molto meno dannoso per le cellule rispetto a quello di ghiaccio e, conseguentemente, consente di incrementare il tasso di ripresa post-scongelo (Benson, 2008). Lo stato vetroso è metastabile, ovvero in grado di ritornare più o meno facilmente allo stato liquido e/o di dare origine a cristallizzazione nel caso in cui vengano modificate le condizioni termiche pertanto, anche nella fase di scongelamento, bisogna adottare degli accorgimenti atti a prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare di dimensioni sufficientemente grandi da determinare danni strutturali al materiale crioconservato, il quale inoltre risulta caratterizzato da maggiore delicatezza dovuta all'incrementata rigidità cellulare. Questo rischio viene normalmente evitato ricorrendo ad un riscaldamento rapido. (Benson, 2008; Day *et al.*, 2008).

Quando il protocollo di crioconservazione risulta ottimizzato tutte o la maggior parte delle strutture meristematiche rimangono intatte, consentendo la ripresa diretta dell'accrescimento senza passare dalla formazione di callo indifferenziato; ciò costituisce un vantaggio in termini di stabilità genetica del materiale conservato (Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008). Un notevole vantaggio della vitrificazione senza formazione di cristalli extracellulari è quello di non richiedere un raffreddamento controllato e le tecnologie ad esso collegate, conseguentemente tale tecnica può essere applicata anche presso laboratori non specializzati (Day *et Al.*, 2008).

Basandosi sul concetto di vitrificazione sono state sviluppate diverse tecniche di crioconservazione, le quali possono essere distinte in sette tipologie:

- preaccrescimento (pregrowth);
- disidratazione (dehydration);
- preaccrescimento-disidratazione (pregrowth-dehydration);
- vitrificazione (vitrification);

- incapsulamento-disidratazione (encapsulation-dehydration);
- incapsulamento-vitrificazione (encapsulation-vitrification);
- vitrificazione in goccia (droplet-vitrification) (Gonzalez-Arnao *et Al.*, 2008).

4.3.2.1 Vitrificazione

La tecnica di crioconservazione mediante vitrificazione si basa sulla disidratazione delle cellule mediante l'applicazione delle cosiddette soluzioni vitrificanti, ovvero delle soluzioni estremamente concentrate (7-8 M) di crioprotettivi. Tessuti sufficientemente disidratati mediante soluzione vitrificante consentono la solidificazione dell'acqua presente in essi allo stato vetroso (Sakai *et Al.*, 2008).

Un protocollo di vitrificazione si compone normalmente delle seguenti fasi:

- precondizionamento, avente come obiettivo quello di incrementare la resistenza degli espianti alle successive fasi di crioconservazione. Trattamenti attuabili sono la coltivazione delle piante madri a basse temperature, dissezione degli espianti dopo un determinato periodo di coltura ed in un determinato stato fisiologico (Gonzalez-Arnao e Engelmann, 2006; Sakai e Engelmann, 2007).
- Precoltura degli espianti successivamente alla loro dissezione, si è visto come la precoltura degli espianti su mezzo solido arricchito in saccarosio con concentrazione da 0,3 a 0,7 M per uno o due giorni consenta di incrementare nettamente la loro sopravvivenza al termine della crioconservazione. Durante la precoltura si registra un incremento notevole del contenuto in saccarosio nei tessuti e l'accumulo di crioprotettivi endogeni quali zuccheri e alcool, che consentono di incrementare la stabilità delle membrane nel corso della successiva disidratazione spinta (Sakai e Engelmann, 2007).
- Osmoprotezione mediante trattamento con soluzione di loading, tale fase ha la funzione di ridurre la tossicità dovuta a destabilizzazione delle membrane cellulari che potrebbe aversi nel caso di esposizione diretta alla soluzione vitrificante. L'esposizione alla soluzione di loading consente, inoltre, di incrementare la concentrazione di soluti presente nella soluzione citoplasmatica così che essa subisca la vitrificazione quando immersa in azoto liquido. Normalmente per il loading vengono utilizzate delle soluzioni altamente concentrate a base di glicerolo (1-2,5 M) e saccarosio (0,4-0,7M) (Kim *et Al.*, 2009^a).
- Disidratazione mediante soluzione vitrificante, tale fase risulta fondamentale per il successo del protocollo crioconservativo. Le soluzioni vitrificanti sono delle

soluzioni che possono essere raffreddate lentamente al di sotto della temperatura di transizione dello stato vetroso senza che si abbia produzione apprezzabile di cristalli di ghiaccio. Esse pertanto consentono di ottenere la produzione dello stato vetroso amorfo intracellulare durante il congelamento ed il suo mantenimento durante il riscaldamento. Le soluzioni di vitrificazione sono costituite da una miscela di elementi penetranti e non. Gli additivi penetranti riescono ad entrare rapidamente all'interno delle cellule incrementando la concentrazione in soluti e la viscosità e proteggendo dallo stress osmotico che può verificarsi nel corso della disidratazione. Elementi penetranti maggiormente utilizzati sono DMSO, Etilen glicole (EG) e glicerolo. Come detto vengono somministrati anche degli elementi non penetranti, costituiti principalmente da zuccheri, aventi la funzione di disidratare gli espianti e di costituire un tampone osmotico (Kim *et Al.*, 2009^b). Le soluzioni vitrificanti maggiormente utilizzate sono la cosiddetta plant vitrification solution 2 (PVS 2), costituita da 30% (peso/volume) glicerolo, 15% (peso/volume) DMSO, 15% (peso/volume) EG e 13,7% (peso/volume) saccarosio, e la PVS 3, costituita da 50% (peso/volume) glicerolo e 50% (peso/volume) saccarosio (Sakai *et Al.*, 2008). Il tempo di trattamento deve essere opportunamente calibrato in funzione della specie e del tipo e della dimensione degli espianti utilizzati (Sakai e Engelmann, 2007). I tempi di immersione in soluzione vitrificante possono essere ridotti trattando a 0°C anziché a temperatura ambiente, visto che in tal modo si ridurrà la velocità di diffusione degli elementi penetranti attraverso la parete (Sakai *et Al.*, 2008).

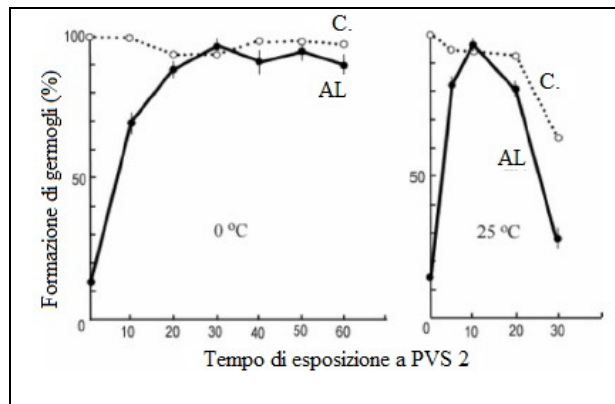


Figura 4-3: Produzione di germogli da espianti di wasabi crioconservati (AL) e non (C) vitrificati mediante trattamento con PVS2 per differenti durate a temperatura di 0°C e 25°C (Sakai *et Al.*, 2008).

- Congelamento, viene attuato ponendo gli espianti in crioprovette riempite con 0,5 ml di PVS e immergendo direttamente queste ultime in azoto liquido; in tal modo si raggiunge un tasso di raffreddamento di circa 200°C/min (Sakai e Engelmann, 2007; Sakai *et Al.*, 2008).
- Riscaldamento, per scongiurare danni da devitrificazione e cristallizzazione deve essere attuato rapidamente, ciò si ottiene mediante immersione dei campioni in bagnomaria a 37-40°C. Mediante tale procedura si riesce ad ottenere un tasso di riscaldamento di circa 250°C/min, sufficientemente elevato da evitare la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare (Sakai e Engelmann, 2007).
- Diluizione, viene attuata mediante la cosiddetta soluzione di unloading, una soluzione arricchita in saccarosio, ed ha lo scopo di eliminare gli elementi crioprotettivi potenzialmente letali per le cellule (Day *et Al.*, 2008).
- Successivamente a tali fasi è possibile ultimare il protocollo di crioconservazione mediante la messa in coltura degli espianti scongelati, i quali è bene che siano mantenuti in condizioni di oscurità per qualche giorno col fine di evitare danni da stress fotossidativo.

4.3.2.2 Incapsulamento-disidratazione

La tecnica di incapsulamento-disidratazione è un'innovazione alla tradizionale vitrificazione, sviluppata su apici vegetativi di pero e patata da Fabre e Dereuddre nel 1990, basata sulla tecnica di produzione dei semi sintetici (Engelmann *et Al.*, 2008; Nair e Reghunath, 2009).

Gli espianti incapsulati in gocce di alginato di calcio sono in grado di resistere a disidratazione spinta fino a livelli che risulterebbero dannosi o addirittura letali per materiale vegetale non incapsulato. Per effetto dell'estrema disidratazione viene rimossa la maggior parte dell'acqua disponibile per la cristallizzazione e, conseguentemente, immergendo gli espianti in azoto liquido si ottiene la loro vitrificazione (Engelmann *et Al.*, 2008).

La tecnica inizialmente è stata applicata a piante di origine temperata utilizzando come espianti apici vegetativi (pero, patata, vite, eucalipto) ed embrioni somatici (carota). Successivamente la tecnica è stata adattata anche alla crioconservazione di apici di piante tropicali quali cassava, canna da zucchero e caffè. Attualmente l'incapsulamento-disidratazione è applicata a oltre settanta specie vegetali, modificando le condizioni tipiche delle varie fasi del processo di crioconservazione (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006;

Engelmann *et Al*, 2008).

L'adattamento della tecnica di incapsulamento disidratazione alle esigenze delle differenti specie richiede l'ottimizzazione delle sue differenti fasi, ovvero:

- Precondizionamento.
- Precoltura, che consiste nella coltivazione degli espianti in mezzo arricchito in saccarosio, normalmente per un notte, prima dell'inclusione in gocce di alginato di calcio (Engelmann *et Al.*, 2008).
- Incapsulamento, durante tale fase si provvede all'inclusione degli espianti in gocce di alginato di calcio. Il processo di incapsulamento prevede in un primo tempo la sospensione degli espianti in un mezzo privo di calcio con in soluzione il 3% di alginato di sodio; successivamente si provvede a gocciolamento di tale mezzo contenente gli espianti in un mezzo arricchito in cloruro di calcio (normalmente 100 mM CaCl₂) (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008). In tal modo si provoca la polimerizzazione dell'alginato attorno agli espianti sotto forma di alginato di calcio. Perché tale processo venga completato è necessario lasciare le biglie nel mezzo di polimerizzazione per almeno 15 minuti (Block, 2003); normalmente si prolunga tale periodo fino a 20-30 minuti per essere sicuri di ottenere un buon livello di polimerizzazione. In tal modo si ottengono delle biglie con diametro di 4-5 mm (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008).
- Protezione osmotica degli espianti incapsulati, in questa fase i campioni vengono posti in beute Erlenmeyer e sottoposti a precoltura in agitazione, utilizzando un mezzo liquido con elevata concentrazione di saccarosio, normalmente tra 0,50-1,25 M. La durata di tale trattamento, in funzione del materiale da crioconservare, può variare da 16-18 ore a 7-10 giorni. L'elevata concentrazione di saccarosio e la durata della precoltura influenzeranno la tossicità esercitata sugli espianti e, quindi, la sopravvivenza degli espianti. La concentrazione e la durata della precoltura da utilizzare sono quelli che si hanno immediatamente prima della diminuzione della sopravvivenza degli espianti. La precoltura in soluzioni ad elevata concentrazione di saccarosio consente di ridurre il contenuto in acqua degli espianti innalzandone il potenziale osmotico e di aumentare la concentrazione di soluti all'interno delle cellule (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008). Si è visto che il trattamento mediante soluzione ad elevato potenziale osmotico consente di

incrementare la resistenza alle basse temperature e di incrementare il tasso di sopravvivenza post disidratazione e congelamento (Block, 2003).

- Disidratazione, viene attuata riducendo fisicamente, mediante evaporazione, il contenuto in acqua delle biglie di alginato di calcio e degli espianti in esse contenuti. L'essiccazione dei campioni può essere attuata mediante l'applicazione di un flusso d'aria all'interno di cappe a flusso laminare oppure all'interno di contenitori ermetici contenenti gel di silice disidratato. La disidratazione mediante gel di silice offre il vantaggio di consentire condizioni sperimentali standardizzate e riproducibili (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008). Il processo di disidratazione prima dell'immersione in azoto liquido è quello più incisivo nel determinare il tasso di sopravvivenza e ricrescita post congelamento. Generalmente il contenuto idrico che consente la più elevata sopravvivenza degli espianti alla congelazione è di circa il 20%, in quanto con tale contenuto di umidità si avrà la solidificazione dell'acqua sotto forma vetroso amorfa (Nair e Reghunath, 2009). Sulla base di studi effettuati su biglie di alginato di calcio prive degli espianti da Block (2003), si è visto che un contenuto in umidità del 26% sul peso fresco è necessario per far sì che si abbia soltanto acqua inattiva osmoticamente. A tale contenuto di umidità si riducono le possibilità di destabilizzazione dello stato vetroso durante lo scongelamento. Il contenuto ottimale di umidità per garantire la maggiore sopravvivenza del materiale vegetale può però variare in funzione della specie e del tipo di espianto da conservare (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008).
- Crioconservazione, successivamente alla disidratazione degli espianti è possibile provvedere alla loro immersione diretta in azoto liquido. Per far ciò, normalmente, le biglie di alginato di calcio contenenti i campioni sono poste in crioprovette da 1 o 2 ml e congelate. La crioconservazione può essere attuata in normali recipienti per azoto liquido (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008).
- Scongelamento e ricrescita. Lo scongelamento dei campioni incapsulati può essere eseguito lentamente ponendo gli espianti a temperatura ambiente in capsule petri all'interno di cappe a flusso laminare oppure sul normale mezzo di ricrescita. È importante mantenere gli espianti in condizioni di oscurità per qualche giorno (normalmente una settimana) per evitare danni da fotossidazione. Successivamente a tale fase gli espianti potranno essere coltivati in normali condizioni di coltura in vitro (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann *et Al.*, 2008).

4.3.2.3 Incapsulamento-vitrificazione

La metodologia di crioconservazione mediante incapsulamento-vitrificazione, encapsulation-vitrification, costituisce una combinazione delle procedure di incapsulamento-disidratazione e di e vitrificazione; in tale tecnica i campioni sono incapsulati gocce di alginato e successivamente sottoposte a congelamento seguendo la procedura utilizzata per la vitrificazione. Tale tecnica permette di integrare i vantaggi delle due tecniche di cui è la sintesi, ovvero la rapidità di sviluppo dei protocolli di vitrificazione e la semplicità di manipolazione tipica dell'incapsulamento-disidratazione. Questa metodologia è stata applicata con successo a numerose specie sia di origine tropicale che temperata (Sakai e Engelmann, 2007).

4.3.2.4 Vitrificazione in goccia

La tecnica di vitrificazione in goccia (doplet-vitrification) è derivata da quella di congelazione in goccia (droplet-freezing) sviluppata nel 1982 da Kartha *et Al.* per il congelamento di apici di germoglio di cassava. Secondo la tecnica da questi sviluppata gli espianti erano posti in gocce di crioprotettivi e congelate mediante controlled rate cooling (Sakai e Engelmann, 2007). Tale tecnica consente di incrementare il tasso di raffreddamento e riscaldamento rispetto alle altre tecniche basate sulla vitrificazione; ciò è dovuto al fatto che i campioni posti singolarmente in piccole gocce di PVS (5-10 μ l) in strisce di carta alluminio sono congelati mediante immersione diretta in azoto liquido (Sakai e Engelmann, 2007; Gonzales-Arno *et Al.*, 2008). Tale tecnica consente di incrementare il tasso di sopravvivenza e ricrescita rispetto ai protocolli di congelazione in goccia e vitrificazione da cui è derivata. Fino ad ora tale tecnica è stata applicata ad un numero ridotto di specie fornendo, tuttavia, dei risultati nettamente positivi che aprono importanti prospettive per gli sviluppi futuri della tecnica (Sakai e Engelmann, 2007).

4.3.2.5 Altri metodi di crioconservazione basati sulla vitrificazione

Oltre alle tecniche di crioconservazione sopramenzionate basate sulla vitrificazione senza formazione di ghiaccio extracellulare ne esistono delle altre che rivestono minore importanza per la conservazione di tessuti vegetali. Da menzionare sono:

- pre-accrescimento, che consiste nella coltivazione degli espianti in presenza di elementi crioprotettivi e nella successiva fase di congelamento rapido dei campioni mediante immersione diretta in azoto liquido. Questa tecnica è stata sviluppata per

colture meristematiche di *Musa spp.* (Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008).

- Disidratazione, costituisce la tecnica più semplice basata sulla vitrificazione, visto che consiste nella disidratazione degli espianti e nella loro successiva immersione rapida in azoto liquido. Tale tecnica è utilizzata principalmente per embrioni zigotici e per assi embrionali estratti dai semi. Questa tecnica è stata ampiamente applicata a embrioni di specie con semi recalcitranti e semi-recalcitranti. La disidratazione normalmente viene messa in atto mediante corrente d'aria in cappe a flusso laminare ma una più precisa disidratazione può essere ottenuta mediante l'utilizzo di aria compressa o di gel di silice. Un disseccamento ultra-rapido ottenuto mediante corrente d'aria compressa e secca (chiamato flash drying) consente di congelare i campioni con un contenuto relativamente elevato di acqua e di ridurre conseguentemente il danno da disseccamento. Normalmente comunque un'ottimale sopravvivenza degli espianti viene ottenuta con un contenuto d'umidità compreso tra il 10 e il 20% (Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008).
- **Pregrowth-dehydration**, consiste nella coltura degli espianti in presenza di sostanze crioprotettive, nella successiva disidratazione di queste in flusso d'aria o con silica gel e, infine, nel congelamento rapido dei campioni. Questa tecnica è stata messa a punto per segmenti di stelo di asparago, per colture poliembrioniche di palma da olio e per embrioni zigotici di palma da cocco (Gonzalez-Arno *et Al.*, 2008).

4.4 La stabilità genetica del materiale crioconservato

Il processo di crioconservazione comporta l'esposizione degli espianti vegetali ad una serie di eventi stressanti dal punto di vista fisico e chimico; ciò potenzialmente potrebbe determinare l'insorgenza di variabilità genetica nelle piante da essi ottenute. Tali considerazioni hanno portato numerosi ricercatori a svolgere ricerche inerenti la valutazione della stabilità del materiale crioconservato.

Ricerche eseguite su banano (Cote *et Al.*, 2000) e canna da zucchero (Gonzalez-Arno *et Al.*, 1999) hanno permesso di evidenziare l'assenza di differenze morfologiche e agronomiche tra le piante crioconservate ed i controlli non trattati. Le analisi sulla stabilità genetica, eseguite mediante differenti tipologie di marcatori molecolari, hanno consentito di accertare l'affidabilità della crioconservazione per la preservazione del germoplasma, in quanto nella generalità dei casi non sono state riscontrate delle variazioni genetiche (Zhai *et Al.*, 2003). Ricerche eseguite mediante l'utilizzazione di microsatelliti, delle tecniche

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) su *Solanum tuberosum* hanno permesso di evidenziare l'assenza di variazioni relative al livello di ploidia, all'RNA ribosomiale ed al DNA nucleare e cloroplastico (Schafer-Menuhr *et Al.*, 1996; Barandalla *et Al.*, 2003; Zarghami *et Al.*, 2008). Ricerche eseguite mediante la tecnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) su *Hypericum perforatum* hanno permesso di evidenziare l'assenza di variazioni relative al numero di cromosomi ed all'attività mitotica (Urbanova *et Al.*, 2002). L'applicazione della tecnica RAPD, mostratasi un efficiente metodo per valutare le variazioni genetiche, ha permesso di confermare tali dati su numerose altre specie, tra le quali *Dioscorea floribunda*, *Solanum tuberosum*, *Grevillea scapigera*, *Anigozanthos iridis*, *Vitis vinifera* e *Actinidia deliciosa* (Zhai *et Al.*, 2003).

Nonostante i risultati di tali ricerche, degli studi recenti hanno permesso di evidenziare l'esistenza di variazioni di tipo epigenetico, principalmente riguardanti lo stato di metilazione del DNA, nelle piante rigenerate successivamente a crioconservazione. Tali variazioni sono state osservate per esempio su papaya (Kaity *et Al.*, 2008), fragola (Hao *et Al.*, 2002) e *Humulus lupulus* (Peredo *et Al.*, 2008). Le ricerche su *Humulus lupulus* hanno permesso di evidenziare che tali variazioni rispetto alle piante coltivate in campo sono presenti *in vitro* sia su piante crioconservate che non, mostrando che probabilmente tali differenze sono dovute più all'adattamento alle condizioni di coltivazione *in vitro* che dalla conservazione a temperature ultrabasse (Peredo *et Al.*, 2008). Ricerche eseguite su piante del genere *Rubus*, inoltre, hanno permesso di evidenziare durante la coltivazione in campo delle differenze relative al vigore ed alle dimensioni fogliari tra piante crioconservate e non, ciò nonostante l'analisi con marcatori molecolari avesse messo in evidenza l'assenza di differenze genetiche (Castillo *et Al.*, 2010).

Da quanto descritto emergono le notevoli garanzie fornite dalla crioconservazione in merito alla stabilità genetica del materiale conservato ma anche la necessità di mettere in atto degli studi inerenti tale parametro prima dell'applicazione su ampia scala di uno specifico protocollo di conservazione in azoto liquido. Tale studio può essere eseguito mediante analisi di tipo fenotipico, citologico, biochimico e molecolare.

4.5 Crioterapia

Il ricorso alla conservazione a temperature ultrabasse costituisce, oltre ad un importante strumento per la conservazione del germoplasma, un'importante metodo per l'eradicazione dei patogeni dagli espianti mediante la cosiddetta crioterapia. La crioterapia ha dimostrato

la sua efficacia nella rimozione di virus batteri e citoplasmi su numerose specie tra le quali: *Solanum tuberosum*, *Ipomea batatas*, *Vitis vinifera*, *Citrus* spp., *Prunus* Spp., *Rubus idaeus*, *Musa* Spp. (Wang e Valkonen, 2008)

Un aspetto positivo della crioterapia rispetto alla tradizionale coltura di meristemi è costituito dall'utilizzabilità di espianti di maggiori dimensioni. L'efficacia della crioterapia, infatti, risulta indipendente dalle dimensioni degli apici meristemati utilizzati.

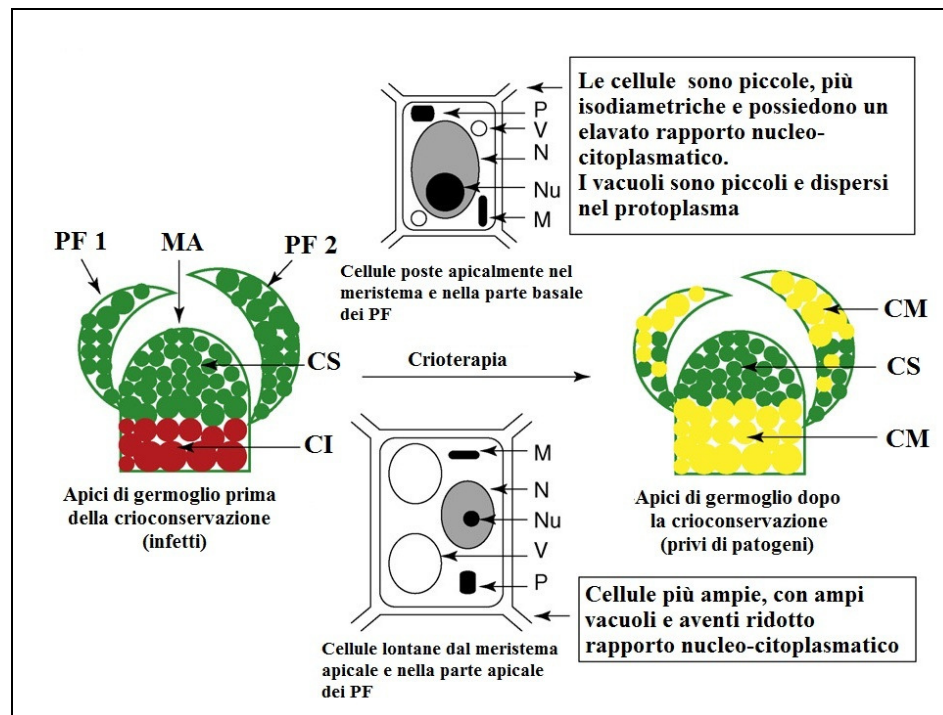


Figura 4-4: Risanamento di apici di germoglio in seguito ad applicazione della crioterapia. E' possibile riscontrare le differenze anatomiche presenti tra le cellule meristematiche e quelle maggiormente differenziate. Tali differenze comportano la morte delle cellule differenziate, dove sono presenti i patogeni, e la sopravvivenza di quelle sane del meristema apicale. (MA, meristema apicale; PF, primordio fogliare; MS, cellule sane; CI, cellule infette; CS, cellule sopravvissute; CM, cellule morte; M, mitocondrio; N, nucleo; Nu, nucleolo; V, vacuolo; P, pro-plastidio).

L'efficacia di tale metodo è basata sulla differente capacità delle cellule di sopportare il congelamento a temperature ultrabasse in funzione della loro localizzazione sull'apice o delle loro differenze fisio-anatomiche; le cellule meristematiche infatti sono in grado di resistere a tale trattamento stressante mentre quelle poste al di fuori di tale area non possiedono tale capacità. Visto che normalmente i patogeni si trovano nelle cellule differenziate, al di fuori dell'area meristemata, la morte di tale cellule consente di eliminare i patogeni presenti negli espianti. Un'elevata percentuale di piantule ottenute

mediante tale metodo risulterà pertanto priva di patogeni (Wang e Valkonen, 2008; Wang *et Al.*, 2009). L'efficacia del trattamento crioterapico può essere incrementata sottoponendo le piante a termoterapia prima di provvedere alla dissezione degli espianti (Wang *et Al.*, 2009).

La crioterapia costituisce quindi un'alternativa nella produzione di piante *pathogen-free* e che possono essere utilizzate come materiale sicuro da utilizzare negli scambi intra ed extra-nazionali di piante (Feng *et Al.*, 2010).

CAPITOLO 5 La diversità vegetale nel Bacino del mediterraneo

5.1 Il Bacino del Mediterraneo

La regione del Bacino del Mediterraneo si estende su una superficie di circa 4,3 milioni di km² comprendendo parte dell'Europa meridionale, dell'Africa settentrionale e del Asia medio-orientale (Yaalon, 1997; Piotto *et Al.*, 2001).

Tale area è stata interessata da una complessa storia geologica, in termini di cambiamenti associati alla tettonica a placche, all'attività vulcanica e alla nascita delle alpi; inoltre, numerose oscillazioni climatiche si sono verificate già a partire dal Miocene-Pliocene, periodo in cui si considera si sia affermato nell'area il clima di tipo mediterraneo. L'insistenza di tali pressioni evolutive sul Bacino del Mediterraneo ha determinato l'insorgenza di una notevole diversità geografica e topografica, con catene montuose di notevole elevazione, con penisole e con uno dei più grandi arcipelaghi mondiali (Blondel e Aronson, 1995). Il Bacino del Mediterraneo presenta, inoltre, una linea costiera ampiamente frastagliata, che si estende per circa 46.000 km attorno al mar Mediterraneo (Blondel e Aronson, 1995). Altre caratteristiche che contraddistinguono il Bacino del Mediterraneo sono un'elevata biodiversità, dovuta all'adattamento degli esseri viventi alla notevole variabilità biogeografica, e un elevato impatto antropico sull'ambiente sin dai tempi più remoti, grazie ai benefici offerti da tale ambiente in termini di clima mite e suolo utilizzabili per fini agricoli (Scarascia-Mugnozza *et Al.*, 2000; De Dato, 2004).

Il Bacino del Mediterraneo risulta diviso in due porzioni dal canale di Sicilia: porzione occidentale e orientale. Il Mediterraneo può essere suddiviso, a sua volta, in diversi sottobacini: nella parte occidentale troviamo il mare di Alboran, il bacino Algero-provenzale, il mar Ligure e il mar Tirreno, mentre nella porzione orientale troviamo il mar Adriatico, il mar Ionio, il mar Egeo e il bacino Levantino.

Le coste delle terre bagnate dal Mediterraneo sono caratterizzate dall'essere basse e regolari a nord e alte e frastagliate a sud; inoltre nel bacino si trovano numerose isole, tra le quali le più estese sono Sicilia, Sardegna, Cipro, Corsica e Creta. I principali fiumi che sfociano nel mediterraneo sono: Ebro, Rodano e Po per le coste settentrionali e il Nilo per le coste meridionali (AA.VV., 2001).

L'area mediterranea presenta delle caratteristiche alquanto variabili, carattere che la contraddistingue è il clima di tipo mediterraneo; tale clima è rinvenibile anche in altre quattro aree geograficamente distanti dal mar Mediterraneo ma accomunate dal trovarsi tra

i 30 e i 45° di latitudine dei due emisferi: la California, il Cile, la regione del Capo del Sud Africa, l'Australia sud-occidentale (Piotto *et Al.*, 2001; Cervelli, 2005).



Figura 5-1: Limiti dell'area isoclimatica mediterranea. In nero i limiti del Bacino del Mediterraneo (Barbero e Quezel, 1982).

Il clima del Bacino del Mediterraneo secondo la classificazione di Koppen è di tipo temperato caldo con estate secca e calda (Csa) (Kottek *et Al.*, 2006); esso presenta delle caratteristiche di transizione tra il clima della fascia temperata dell'Europa e quello tropicale arido dell'Africa settentrionale (Minelli, 2008).

Esso è caratterizzato da una marcata stagionalità, con presenza di estate calda e secca con elevata irradiazione solare e periodo autunno-invernale piovoso e con temperature relativamente moderate (AA.VV., 2001; Minelli, 2008). Il periodo estivo, caratterizzato dalla minima precipitazione annua, coincide anche con la fase di massima evapotraspirazione a causa delle elevate temperature; ciò porta a un depauperamento delle risorse idriche disponibili per le piante. Nel corso dell'evoluzione tale caratteristica ambientale ha indotto lo sviluppo di numerosi meccanismi di adattamento per fronteggiare tale stress (Ceballos *et Al.*, 2004). Gli eventi piovosi invernali tipici del clima mediterraneo hanno un'origine ciclonica mentre l'assenza di precipitazioni in estate è causata dalla presenza di celle subtropicali di alta pressione che insistono in prossimità del mar Mediterraneo (Goubanova e Li, 2007).

La piovosità nell'area mediterranea varia tra i 600 e i 1200 mm, ma vi sono aree in cui le precipitazioni scendono a 350-400mm e anche 100mm nelle aree sub-desertiche. La ripresa

degli eventi piovosi nel periodo autunnale, con suolo nudo, può determinare una notevole erosione del suolo (AA.VV., 2001; Minelli, 2008).

La piovosità e le caratteristiche termiche nell'ambiente mediterraneo variano più o meno regolarmente in funzione di latitudine e altitudine sul livello del mare; le temperature decrescono con l'incrementare della latitudine e del gradiente altitudinale mentre la piovosità segue un andamento opposto (Blondel e Aronson, 1999).

Non è semplice definire chiaramente il clima mediterraneo in quanto la notevole variabilità geomorfologica dell'area mediterranea fa sì che esso sia il risultato di un ampio range di climi locali, inoltre, il clima mediterraneo si integra gradualmente con i climi adiacenti (continentale a nord e desertico a sud) rendendo ancora più complicata la sua caratterizzazione. Criteri classici adottati per la delimitazione della regione con clima mediterraneo si basano su: limiti di distribuzione di specie vegetali dominanti (*Quercus ilex*, *Olea europea*, *Stipa tenacissima*), analisi della vegetazione, studio della variazione climatica utilizzando degli indici di classificazione (Blondel e Aronson, 1995).

L'identificazione dell'areale di coltivazione dell'olivo con l'area a clima mediterraneo, probabilmente eseguita per la prima volta da Plinio il Vecchio, è giustificata dal fatto che tale specie è piuttosto rappresentativa della vegetazione sempreverde adattata a lunghe estati secche e le foglie coriacee e cerosi rappresentano un meccanismo di protezione dagli stress idrici adottato da numerose specie arboree e arbustive sempreverdi appartenenti alla macchia mediterranea.

Tuttavia è possibile sollevare alcune obiezioni relative al ricorso all'olivo come specie indicatrice; una delle principali obiezioni riguarda la complessità e l'imprecisione derivata dal ricorso ad una specie coltivata per l'identificazione dell'area mediterranea. Una delle specie alternative utilizzabili per delimitare l'area mediterranea è il leccio (*Quercus ilex*); esso è caratterizzata da foglie sempreverdi e ha caratteristiche ecologiche simili a quelle dell'olivo. Il leccio, inoltre, è una sclerofila, così come gran parte delle piante appartenenti alla macchia mediterranea. Anche per questa specie, però, sussistono dei problemi visto che nella metà orientale del Bacino del Mediterraneo essa è presente esclusivamente nelle pianure e nelle colline vicino alla costa; il leccio, inoltre, si sviluppa bene anche in alcune zone al di fuori dell'area mediterranea. Per far fronte a tale inconveniente è possibile ricorrere all'analisi di associazioni vegetali composte da *Quercus ilex* o da altre specie sempreverdi del genere *Quercus* (Blondel e Aronson, 1999).

Per delimitare l'area mediterranea è possibile ricorrere all'utilizzo di indici bioclimatici, la maggior parte dei quali si basano sull'analisi di intensità di freddo e piovosità nella

stagione invernale e del periodo di deficit idrico estivo. Una classificazione bioclimatica particolarmente importante per i suoi riflessi sulla vegetazione è quella basata sull'indice di Bagnouls e Gaussen, il quale si basa sul numero di mesi secchi. Per mese secco si intende quello in cui le precipitazioni totali medie espresse in mm sono uguali o inferiori al doppio della temperatura mensile espressa in gradi centigradi. In base a tale classificazione il clima mediterraneo può essere suddiviso in quattro sottotipi:

Xero-termomediterraneo, con 7-8 mesi secchi;

Termo-mediterraneo, con 5-6 mesi secchi;

Meso-mediterraneo, con 3-4 mesi secchi;

Sub-mediterraneo, con 1-2 mesi secchi (Fierotti, 1997).

Altra importante indice applicato dai bioclimatologi ai climi mediterranei è quello di Emberger; la classificazione di tale bioclimatologo si basa sul cosiddetto quoziente pluviometrico Q^2 , determinato sulla base della seguente espressione:

$$Q^2 = 2000P / (M^2 - m^2).$$

In tale indice il coefficiente P indica la piovosità media annua, M e la media delle massime del mese più caldo e m è la media delle minime del mese freddo.

Utilizzando il quoziente pluviometrico il clima mediterraneo può essere suddiviso nei seguenti sottotipi:

- perarido (Q^2 minore di 10);
- arido (Q^2 compreso tra 10 e 45);
- semiarido (Q^2 compreso tra 45 e 70);
- subumido (Q^2 compreso tra 70 e 110);
- umido (Q^2 compreso tra 110 e 150);
- perumido (Q^2 maggiore di 150).

In ognuno di questi bioclimi è possibile distinguere delle variabili climatiche sulla base della media delle minime del mese più freddo (m):

- Molto caldo (m maggiore di 10°C);
- Caldo (m compreso tra 7 e 10°C);
- Temperato (m compreso tra 3 e 7°C);
- Fresco (m compreso tra 0 e 3°C);
- Freddo (m compreso tra -3 e 0°C);
- Molto freddo (m compreso tra -7 e -3°C);
- Estremamente freddo (m compreso tra -10 e -7°C);
- Ghiacciato (m inferiore a -10°C) (Barbero e Quezel, 1982).

All'interno di un medesimo bioma troveremo specie differenti le quali si sono evolute in relazione a una pressione climatica comune e, pertanto, presentano delle somiglianze dal punto di vista biologico; ciò può essere riassunto nel concetto di areale bioclimatico, ossia un'area caratterizzata da determinati valori di Q^2 e m , valori che rappresentano il comportamento di una determinata specie nei confronti di piovosità e temperatura. Specie con esigenze climatiche simili occuperanno areali che parzialmente coincidono (De Dato, 2004).

5.2 La vegetazione naturale nel Bacino del Mediterraneo

Il Bacino del Mediterraneo è caratterizzato da un'ampia ricchezza di specie vegetali, circa 25.000, originatesi dalla notevole variabilità ambientale e climatica presente nell'area.

La vegetazione presente nella Regione Mediterranea è stata plasmata dalle peculiari condizioni ambientali presenti in essa; particolare effetto selettivo è stato esercitato dall'aridità estiva tipica del Bacino del Mediterraneo, che ha influenzato lo sviluppo di particolari adattamenti morfologici, fisiologici e fenologici (Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000).

Caratteri morfologici tipici delle piante mediterranee sono: sclerofillia, apparato radicale con notevole capacità di approfondimento nel terreno, elevato spessore dello strato corticale, elevata capacità di emettere germogli (Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000). La sclerofillia è una caratteristica delle piante del Bacino del Mediterraneo e consiste nella presenza di foglie inspessite di dimensioni ridotte e coriacee adatte a fronteggiare lo stress idrico estivo. Le foglie delle sclerofille anatomicamente sono caratterizzate dalla presenza di una cuticola inspessita, di un mesofillo molto denso e formato da più strati. La capacità di tali foglie di conferire resistenza al deficit idrico è data dalla riduzione degli scambi gassosi; ciò, però, implica una riduzione dell'efficienza fotosintetica. La presenza di sostanze impregnanti con funzione protettiva, inoltre, costituendo un costo metabolico, sottrae energia all'accrescimento delle piante (Cervelli, 2005).

Le piante mediterranee, inoltre, presentano adattamenti fisiologici che gli consentono di tollerare la disidratazione dei tessuti, di attivare precocemente i processi fotosintetici alla ripresa vegetativa primaverile, di adattare la fotosintesi alle variazioni termiche stagionali, di superare il periodo di stress idrico estivo e, successivamente ad esso, di riprendere prontamente a vegetare (Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000).. Un adattamento fisiologico molto importante adottato per far fronte al deficit idrico estivo è costituito dalla chiusura degli stomi nelle ore più calde della giornata (Cervelli, 2005). Vista la frequenza di incendi

nell'area mediterranea molte specie hanno sviluppato anche la capacità di superare tali eventi e di emettere germogli successivamente ad essi (Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000).

Le specie mediterranee per completare il loro ciclo vitale possono ricorrere a diverse tipologie di ritmi fenologici, sotto tale punto di vista tali piante possono essere suddivise tra i seguenti gruppi:

- specie sclerofille sempreverdi (tra cui *Arbutus unedo*, *Phillyrea spp.*, *Pistacia lentiscus*, *Ruscus aculeatus*, *Erica arborea*, *Quercus ilex*, *Smilax aspera*) che presentano una stasi vegetativa nel periodo estivo e riprendono ad accrescersi dopo i primi eventi piovosi;
- specie decidue nel periodo arido (es. *Calicotome villosa*), che presentano una crescita primaverile e una autunnale separate da un periodo con assenza di foglie;
- specie semidecidue (tra cui *Cistus monspeliensis*), che presentano foglie di tipo mesofitico e ricorrono a una strategia intermedia, con accrescimenti sia durante la stagione arida che durante quella fredda (Cervelli, 2005).

L'organizzazione attuale della vegetazione mediterranea è il risultato delle modificazioni climatiche che si sono venute a creare in seguito alla fine delle ere glaciali. L'equilibrio venutosi a creare in funzione delle condizioni climatiche è però stato perturbato dall'attività umana che, pertanto, ha influenzato l'evoluzione della vegetazione (Quezel, 1999).

Le caratteristiche della vegetazione naturale presente nell'area mediterranea sono correlate alle peculiari caratteristiche locali e dipendono, inoltre, dal gradiente altitudinale, fattore importante che permette di definire le cosiddette fasce di vegetazione. La vegetazione mediterranea può essere suddivisa in diversi livelli a seconda della latitudine e del gradiente altitudinale; tale classificazione viene eseguita sulla base delle ricerche eseguite da Flahault (1901), Gaussen (1926), Quezel (1974), Ozenda (1975). La suddivisione in fasce di vegetazione viene eseguita principalmente sulla base delle condizioni termiche cui la vegetazione è sottoposta (Barbero e Quezel, 1982; Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000).

La vegetazione mediterranea può essere suddivisa tra le seguenti fasce altitudinali in funzione delle progressive variazioni presenti all'interno dello stesso bioclima mediterraneo:

- **Infra-mediterranea**, corrispondente al Marocco occidentale e caratterizzato dalla presenza principale di specie arbustive tra cui strutturanti risultano *Argania spinosa* e *Acacia gummifera*.

- **Termo-mediterranea**, insistente lungo tutta l'area costiera del mediterraneo, la cui vegetazione è costituita da associazioni di sclerofille con *Olea-Ceratonia*, *Pistacea lentiscus*, *Pinus halepensis*, *Pinus brutia* e *Tetraclinis articulata*.
- **Meso-mediterranea**, la cui vegetazione è costituita da foreste di *Quercus ilex* e *Quercus rotundifolia*, nella zona occidentale e centrale del Mediterraneo, da *Quercus calliprinos* nella zona orientale del bacino. In questo livello è riscontrabile anche la presenza di foreste di *Pinus halepensis* e *Pinus brutia*, che costituiscono dei paraclimax.
- **Supra-mediterranea**, che è dominato dalla presenza di specie decidue in aree con bioclima umido, le quali sono sostituite da specie sclerofille di quercia nelle aree sub-umide o semi aride del Mediterraneo meridionale.
- **Montano-mediterranea**, all'interno del quale si trovano essenzialmente formazioni di conifere comprendenti *Cedrus*, *Pinus nigra* e abeti mediterranei.
- **Oro-mediterranea**, costituito spesso da pascoli erbacei o garriga costituita da arbusti spinescenti come quelli appartenenti al genere *Juniperus*.
- **Alto-mediterranea**, livello posto alle altitudini maggiori, difficilmente distinguibile e costituito da Chamaephytae (Barbero e Quezel, 1982).

Nel Bacino del Mediterraneo è possibile riscontrare essenzialmente tre tipologie di strutture vegetazionali: la foresta, la macchia e la gariga (Aidoud, 1997; Cervelli, 2005)

Nella regione biogeografica mediterranea lo sviluppo di strutture forestali propriamente dette è relativamente recente e risale al periodo successivo all'ultima glaciazione. In tale ambiente si sono differenziate diverse tipologie di foresta, ascrivibili ai seguenti gruppi:

- foreste di sclerofille;
- foreste di caducifoglie;
- foreste di conifere.

La **foresta di sclerofille** rappresenta la tipica formazione forestale del Bacino del Mediterraneo e per tal motivo è stata utilizzata da molti autori per delimitare tale regione biogeografica. Tale tipologia di formazione vegetale domina principalmente la fascia meso-mediterranea ma è presente anche nella fascia termo-mediterranea e negli stadi superiori dove le condizioni climatiche locali sono favorevoli (Quezel, 1999). La tipologia di foresta sempreverde maggiormente diffusa nell'area mediterranea è costituita dalle associazioni dominate dal leccio (*Quercus ilex*), definite *Quercion ilicis*, le quali risultano presente in tutto il bacino Occidentale, seppure nell'area interessata Spagna e Portogallo la sottospecie *ilex* è sostituita dalla *ballota*. Nel settore orientale al posto di *Quercus ilex* si

riscontra la presenza della quercia spinosa con la specie *Quercus coccifera* (susspecie *coccifera* e *ballota*). Nelle associazioni vegetali dell'area mediterranea spesso si ritrova *Quercus suber* insieme al leccio o al suo posto; la presenza di tale specie deriva principalmente dall'attività colturale (Cervelli, 2005).

La **foresta di caducifoglie** è presente essenzialmente nella fascia supra-mediterranea ed è costituita principalmente da specie spoglianti appartenenti di quercia. Tale tipologia forestale non si trova solamente in tale fascia altitudinale ma anche nelle fasce meso e termo-mediterranee dove forma delle associazioni vegetali particolari; esempi di tali formazioni sono quelle dominate da *Quercus pubescens* nella fascia meso-mediterranea francese, da *Quercus canariensis* e *Quercus faginea* nelle aree meso e supra-mediterranee in Spagna e nei paesi del Magreb, da *Quercus brachyphylla* nelle medesime fasce altitudinali presso l'isola di Creta, da *Quercus cerris* e *Quercus macrolepis* in Grecia ed in Turchia meridionale. La presenza di essenze caducifoglie è riscontrabile anche nella fascia montano-mediterranea dove le specie maggiormente rappresentate sono: *Fagus sylvatica*, *Fagus orientalis* e *Quercus sessiliflora*. Spesso nel Bacino del Mediterraneo si riscontra la presenza di altre specie che si trovano associate alle formazioni dominate dalle querce caducifoglie; le specie più importanti che si possono osservare nelle foreste caducifoglie mediterranee sono: *Acer*, *Tilia*, *Fraxinus*, *Ulmus*, *Corylus* ecc. Solamente *Ostrya* e *Carpinus orientalis* in alcuni casi, nel Mediterraneo orientale, formano delle serie vegetali specifiche. Le formazioni a base di caducifoglie presentano delle esigenze particolari; esse colonizzano principalmente aree con bioclima umido e sub-umido, caratterizzate da suoli particolarmente profondi (Quezel, 1999).

Nelle **foreste montane** è riscontrabile principalmente la presenza di conifere quali *Pinus nigra*, *Abies* spp., *Cedrus* spp. Tali formazioni sono rinvenibili essenzialmente nel piano altitudinale montano, ad altezza superiore a 1200-1600 metri sul livello del mare, in funzione della latitudine (Quezel, 1999).

La cosiddetta **macchia mediterranea** normalmente è riscontrabile in aree caratterizzate da condizioni climatiche ed edafiche particolarmente difficili che fanno sì che la vegetazione non evolva in strutture propriamente forestali, rimanendo in uno stato di *paraclimax*; tale tipologia di macchia è definibile come primaria. Si parlerà invece di macchia secondaria quando questa deriva dalla degradazione della foresta di sclerofille mediterranee a causa di attività antropiche quali incendi ripetuti, attività agricole, eccessive pressioni pascolative, tagli frequenti, ecc.

Questa tipologia di vegetazione viene definita con nomi differenti nelle diverse aree del mondo; termini più usati nella letteratura scientifica sono l'italiano *macchia* e il francese *maquis* mentre termini locali sono *matorral* in Spagna e Cile, *chaparral* in California, *strandvel* e *renosterveld* in Sud Africa, *mallee* in Australia

La macchia è costituita da specie arbustive che sono disposte a formare una fitocenosi molto densa; le specie che fanno parte di tale formazione sono simili a quelle della foresta di sclerofille. In alcuni casi le specie facenti parte della macchia sono piante arboree che a causa della severità delle condizioni locali assumono un habitus arbustivo; tra tali specie si possono evidenziare ad esempio la quercia spinosa, la fillirea o il ginepro, il quale si pensa che partecipi alla macchia in quanto vi ha trovato delle condizioni rifugiali.

Le formazioni a macchia mediterranea possono essere suddivise in diverse categorie in funzione di diversi parametri quali altezza, densità e composizione floristica (Cervelli, 2005).

La macchia mediterranea può essere suddivisa in numerosi raggruppamenti in funzione della composizione floristica visto che questa è notevolmente variabile in funzione di fattori ecologici e antropici. Nelle aree più fresche si trovano formazioni a macchia più evolute, come quelle formate dal leccio; tali formazioni sono considerabili come derivate da leggera degradazione della lecceta e la loro composizione floristica è molto simile a questa. La macchia a leccio è diffusa su un'area maggiore rispetto alla foresta sempreverde affine. In tale tipologia di macchia sono presenti anche corbezzolo, lentisco, fillirea ed alaterno oltre ad altri arbusti sclerofilli sempreverdi. Nelle aree litorali con un clima caratterizzato da maggiore aridità e da temperature più elevate si riscontrano sovente formazioni definite dei *Pistacio-Rhamnetalia alaterni*; tali formazioni possono essere suddivise in macchie a corbezzolo ed Erica arborea (*Ericion arboreae*), macchie a carrubo ed oleastro (*Oleo-Ceratonion*) e ginepreti (*Juniperion turbinatae*). Nelle aree dove la macchia è meno evoluta e tende alla gariga si trovano, invece, formazioni caratterizzate dalla presenza di bassi arbusti quali, ad esempio, lavanda selvatica e cisti (Formazione dei *Cisto-Lavanduletea*) nel caso il substrato sia di tipo acido, *Erica multiflora* e rosmarino (associazione *Rosmarino-Ericion, Rosmarinetalia*) su substrati calcarei e marnosi (Minelli, 2008).

In funzione dell'altezza della vegetazione arbustiva la macchia mediterranea può essere suddivisa in:

macchia alta, costituita da formazioni con altezza di 4-5 m dominate da leccio, corbezzolo e talvolta quercia da sughero, le quali possono essere affiancare o sostituite nelle aree più

fresche e a quote superiori da caducifoglie quali roverella (*Quercus pubescens*) e cerro (*Quercus cerris*);

macchia bassa, composta da arbusti con altezza ridotta, circa 1,5-2 m, quali lentischi, alaterni, ginepri, filliree, cisti e altre specie (Minelli, 2008).

Altra formazione vegetale presente nel Bacino del Mediterraneo è la cosiddetta gariga, il cui nome deriva dalla parola francese *garrigue* che significa quercia spinosa. La formazione della gariga si può avere per effetto di una notevole degradazione della macchia, in presenza di suoli non particolarmente evoluti oppure in aree caratterizzate da un clima particolarmente secco ad arido.

Tale formazione vegetale è caratterizzata dalla presenza di piante con ridotto sviluppo in altezza (raramente superiore a mezzo metro) e disposte in maniera discontinua sul terreno, in modo da lasciare ampi tratti di suolo nudo; spesso la gariga è riscontrabile lungo i versanti più soleggiati di versanti collinari non eccessivamente scoscesi. Le piante che vi si trovano sono piccoli arbusti o suffrutici, spesso di tipo aromatico. Possono essere distinte numerose associazioni a gariga in funzione delle caratteristiche ambientali: in suoli alcalini specie presenti saranno soprattutto timo (*Thymus capitatus*), rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), cisti (*Cistus spp.*), erica rosa (*Erica rosea*), Euphorbia (*Euphorbia spp.*), ecc.; in suoli acidi specie maggiormente rappresentate sono invece lavanda (*Lavandula stoechas*), *Erica multiflora*, *Genista spp.*, *Cistus spp.* e anche diverse specie di *Cistus*.

Nella gariga si trovano numerose altre specie tra le quali numerose orchidee e numerose bulbose come Urginea maritima., *Colchicum spp.*, *Iris spp.*, *Allium spp.*, *Leopoldia spp.*, *Muscari spp.* La gariga, se ulteriormente sottoposta a degradazione, può portare all'ottenimento di formazioni steppiche, caratterizzate da vegetazione erbacea e costituita in prevalenza da specie graminacee (AA.VV., 2001; Cervelli, 2005).

Nell'area mediterranea spesso è possibile riscontrare la presenza di pinete, le quali però spesso sono di origine antropica, come ad esempio le pinete di *Pinus pinea* adibite alla produzione di pinoli o le formazioni impiantate con finalità turistiche e paesaggistiche. In natura, le pinete rappresentano uno stadio evolutivo iniziale della vegetazione mediterranea e sono caratterizzate da una copertura del suolo ridotta che permette un notevole accesso della luce agli strati inferiori, dove vivono prevalentemente delle specie cespugliose tipiche della macchia mediterranea (Cervelli, 2005).

5.3 Stato della biodiversità e conservazione del germoplasma in ambiente mediterraneo

L'area circostante il Mediterraneo è considerata a livello mondiale come un *hotspot* della biodiversità visto l'elevato numero di specie presenti e l'elevato tasso di antropizzazione dell'area (Myers *et Al.*, 2000). La flora del bacino del mediterraneo risulta estremamente ricca, comprendendo circa 25.000 specie (20% della ricchezza floristica mondiale) mentre ad esempio le aree dell'Europa centrale e settentrionale comprendono appena 6.000 specie (Verlaque *et Al.*, 1997; Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000). Un'idea dell'elevata ricchezza specifica può essere fornita dall'analisi della loro distribuzione, infatti, in tale area sono presenti mediamente 10,8 specie/1000 km²; tale densità specifica risulta nettamente superiore a quella di aree come Brasile (6,5 specie/1000 km²), Cina (3,1 specie/1000 km²), Zaire e India (4,7 specie/1000 km²) ma inferiore a quella di Colombia (40 specie/1000km²) e Panama (90 specie/1000km²) (Medail e Quezel, 1999).

La flora mediterranea oltre a rappresentare il 20% della flora mondiale è caratterizzata da un elevato tasso di endemismi, i quali rappresentano circa il 50% delle specie viventi nell'area (Verlaque *et Al.*, 1997; Scarascia-Magnuzza *et Al.*, 2000). La ricchezza floristica del Bacino del Mediterraneo non risulta uniformemente distribuita pertanto all'interno di tale area è possibile distinguere 10 *hotspot* locali caratterizzati dalla presenza di almeno 2.000 specie per 15.000 km² di cui almeno il 10% rappresentate da endemismi. Gli *hotspot* mediterranei sono localizzati in corrispondenza di: Isole Canarie e Madeira, aree settentrionali e centrali del Massiccio Montuoso dell'Atlante, complesso dei Monti del Rif e della Cordigliera Betica, Alpi Liguri e Marittime, Isole Tirreniche, aree centrali e meridionali della Grecia, Creta, Anatolia Meridionale e Cipro, area interessante Siria, Libano e Israele, Cirenaica Mediterranea (Medail e Quezel, 1999). Questi *hotspot* singolarmente coprono delle aree comprese tra 10.000 e 130.000 km² e totalmente rappresentano il 22% della superficie del Bacino del Mediterraneo (515.000 km²); in esse vivono circa 5.500 entità endemiche, rappresentanti il 44% degli endemismi mediterranei (Medail e Quezel, 1999). E' da segnalare che le isole mediterranee e specialmente la Sicilia possiedono un elevato numero di specie legnose endemiche (Quezel *et Al.*, 1999). Relativamente alla Sicilia, essa così come le altre isole del Bacino del Mediterraneo è caratterizzata da un'ampia ricchezza specifica; sono infatti presenti circa 2.700 taxa specifici e intraspecifici di specie vascolari di cui circa 400 taxa endemici o sub-endemici dell'isola (Commodari *et Al.*, 2005).

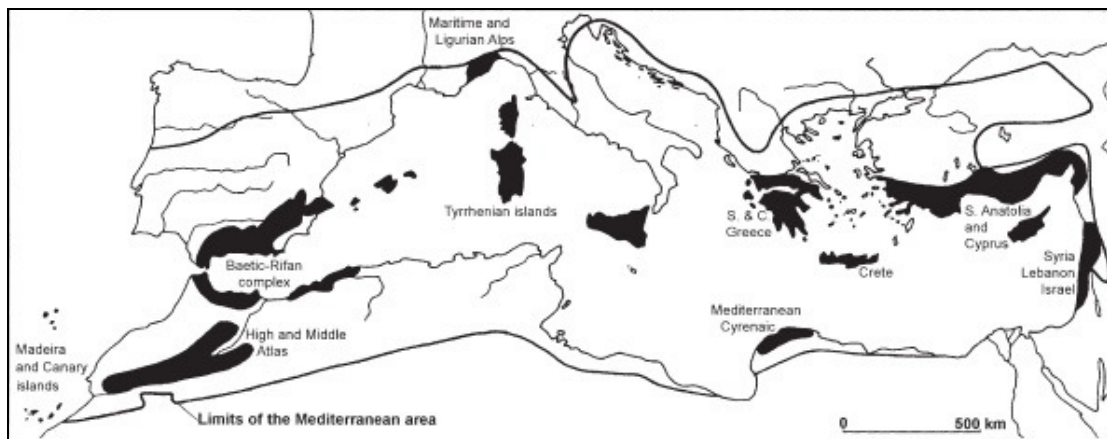


Figura 5-2: I 10 hotspot identificati nel Bacino del Mediterraneo (Medail e Quezel, 1999).

Il Bacino del Mediterraneo, nonostante presenti degli eccezionali livelli di densità specifica e di endemismi, è caratterizzato da una notevole degradazione del territorio; soltanto il 5% di territorio incluso all'interno dei vari *hotspot* è infatti caratterizzato dalla presenza di vegetazione forestale incontaminata (Palahi *et Al.*, 2008). Gran parte delle specie presenti nel Bacino del Mediterraneo è sottoposta a minacce antropiche che ne mettono a rischio la sopravvivenza. Si calcola che circa il 53% delle specie endemiche (1.529 taxa) siano minacciate di erosione genetica o, nei casi più gravi, di estinzione (Quezel *et Al.*, 1999).

Vista la gravità insita nella perdita di una specie, dovuta non solo alla sua scomparsa ma anche alla perturbazione degli equilibri specifici presenti, fondamentali risultano le azioni di salvaguardia da intraprendere per tutelare tale biodiversità regionale. Per le specie minacciate di erosione genetica o, nei casi più gravi, di estinzione risulta fondamentale l'integrazione delle tradizionali tecniche di salvaguardia del germoplasma *in situ*, consistenti nell'istituzione di riserve naturali, con tecniche di conservazione *ex situ*. In tale contesto si sono inserite le ricerche svolte durante il dottorato di ricerca ed inerenti la salvaguardia *in vitro* mediante micropropagazione di *Erica multiflora*, e mediante criconservazione di *Lithodora rosmarinifolia* e *Limonium serotinum*. Tali specie, endemiche del Bacino del Mediterraneo, presentano un notevole valore estetico-ornamentale e, pertanto, le azioni di conservazione assumono un valore aggiuntivo in vista delle possibili utilizzazioni commerciali di tali specie in ambito floricolo.

CAPITOLO 6 Scopi delle ricerche

Come menzionato precedentemente, le tecniche di coltura in vitro costituiscono un'importante alternativa per la conservazione delle risorse genetiche vegetali relative a specie che non sono conservabili mediante banche dei semi, in quanto producono semi recalcitranti o poiché normalmente propagate per via agamica. Le tecniche di coltura in vitro presentano il vantaggio di consentire la conservazione dei vegetali a partire da un quantitativo esiguo di materiale di propagazione, caratteristica fondamentale per le specie a rischio di estinzione delle quali non si ha a disposizione un grande numero di esemplari, e di permettere la protezione del materiale vegetale da eventuali eventi traumatici che si potrebbero verificare nel caso di conservazione in coltura di campo, tradizionale alternativa per la conservazione delle specie non stoccabili in banche del seme. Le colture mantenute in vitro inoltre, se ben condotte, consentono di mantenere la stabilità genetica del materiale conservato, caratteristica essenziale nella conservazione del germoplasma. Tali tecniche però necessitano della definizione di un protocollo applicativo per ogni specie e talvolta per ogni singolo clone, costringendo ad un preventivo e specifico lavoro sperimentale.

Lo studio effettuato durante il corso di dottorato di ricerca ha mirato alla definizione di protocolli di conservazione *in vitro* di materiale genetico vegetale mediante le tecniche di micropropagazione (1) e crioconservazione (2).

- 1) La tecnica di micropropagazione, che rappresenta un'importante alternativa per la conservazione a breve e medio termine, è stata applicata alla specie mediterranea *Erica multiflora* con l'obiettivo di definire un protocollo specifico. Tale specie è stata oggetto di studio visto il suo notevole valore ornamentale e la possibilità di incentivare il suo utilizzo nel campo floricolo. La micropropagazione, consentendo elevati tassi di moltiplicazione, costituisce una tecnica utile per l'ottenimento del materiale da utilizzare per la coltura floricola e, inoltre, rappresenta un'importante tecnica utilizzabile per la conservazione della specie.
- 2) Le ricerche inerenti la crioconservazione di apici vegetativi sono state svolte presso l'IRD (Institute de Recherche pour le Développement) di Montpellier (Francia) e per tal motivo hanno riguardato sia a specie mediterranee, oggetto di studio da parte del Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali dell'Università degli Studi di Palermo, che specie tropicali facenti parte di programmi di ricerca dell'IRD. Le specie mediterranee studiate sono state *Limonium serotinum* e *Lithodora*

rosmarinifolia; le ricerche sono state concentrate su tali specie viste le minacce di erosione genetica alle quali esse sono sottoposte ad opera dell'uomo nel loro habitat naturale e visto il loro valore ornamentale. Le ricerche riguardanti le specie mediterranee hanno mirato alla definizione di un protocollo specifico di crioconservazione mediante vitrificazione in goccia. Sono stati studiati l'applicazione di differenti pretrattamenti e l'effetto determinato dall'utilizzo di differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ripresa di apici vegetativi. Le specie tropicali inserite nelle ricerche inerenti la crioconservazione sono state la canna da zucchero (*Saccharum* spp.) e *Dioscorea alata*. Tali specie sono normalmente coltivate nei paesi tropicali ma la coltivazione è sempre più basata sull'utilizzo di ibridi commerciali o cultivar geneticamente migliorate, ragion per cui le tradizionali varietà locali sono sottoposte al rischio di abbandono. Per evitare la perdita di tale germoplasma, fondamentale oltre che per la produzione tradizionale anche per l'attuazione di programmi di miglioramento genetico, è essenziale la sua conservazione e, visto che tali colture sono conservabili esclusivamente mediante propaguli vegetativi, la crioconservazione assume un ruolo fondamentale in quanto tecnica in grado di assicurare la conservazione a lungo termine. Lo studio effettuato sulla canna da zucchero ha mirato alla comparazione delle tecniche di crioconservazione di apici vegetativi mediante incapsulamento-disidratazione e vitrificazione in goccia, effettuata mediante l'esposizione degli espianti a due soluzioni vitrificanti; gli esperimenti sono stati condotti su due differenti cloni. La specie *Dioscorea alata*, invece, è stata oggetto di ricerche inerenti l'analisi del comportamento istologico durante il processo di crioconservazione attuato mediante la tecnica di incapsulamento-disidratazione. L'osservazione degli espianti al microscopio ottico e l'analisi mediante software specifico delle immagini ottenute hanno avuto come obiettivo finale la comprensione dei processi implicati nel successo della tecnica crioconservativa e nella ricrescita degli espianti successivamente al congelamento in azoto liquido.

CAPITOLO 7 La micropropagazione di *Erica multiflora*

7.1 Introduzione

Il genere *Erica*, appartenente alla famiglia delle Ericaceae, comprende circa 735 specie con habitus di crescita da arbustivo prostrato ad arboreo. Il genere risulta ampiamente diffuso sulla terra ed ha colonizzato ambienti caratterizzati da condizioni climatiche profondamente differenti, spaziando da quelle calde e secche del Sud Africa a quelle caldo-umide dell'Europa occidentale. Circa il 90% delle specie è rinvenibile in Sud Africa ma specie appartenenti a tale genere sono rinvenibili sia nella restante parte del continente africano che in Europa e nel Medio Oriente (Huxley *et Al.*, 1997).

Erica multiflora è una specie tipica della macchia mediterranea con ampia diffusione territoriale nel Bacino del Mediterraneo, dove è rinvenibile ampiamente nella porzione occidentale (Gratani e Varone, 2004); essa predilige gli ambienti aridi, con suolo calcareo, e le rupi (Federico, 1999).



Figura 7-1: Areale di diffusione di *Erica multiflora* (fonte The Heather Society).

Erica multiflora è una specie arbustiva sempreverde che raggiunge un'altezza di 30-100 cm, presenta un portamento a pulvino e produce dei rami eretti sui quali sono inserite le foglie di dimensioni ridotte (1,5 x 10 mm), persistenti e sclerificate; esse presentano un margine revoluto e sono dotate di tricomi (Federico, 1999; Gratani e Varone, 2004).

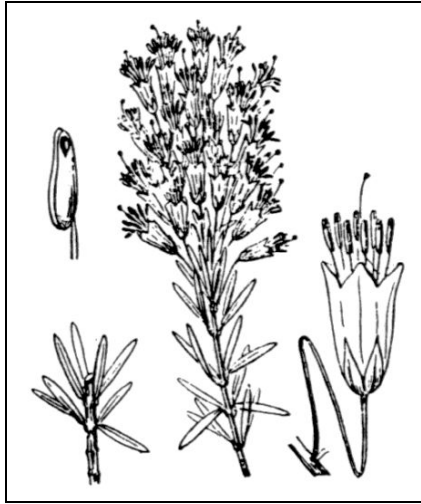


Figura 7-2: Rappresentazione grafica della pianta di *Erica multiflora*.



Figura 7-3: Infiorescenza di *Erica multiflora*.

La specie è dotata di lignotuberi, a partire dai quali vengono ricacciati i germogli, e presenta un apparato radicale con notevole capacità di approfondimento nel terreno (Llorens *et Al.*, 2003; Gratani e Varone, 2004). La pianta presenta due flussi annuali di accrescimento vegetativo: uno primaverile, nel periodo compreso tra marzo e giugno, ed uno autunnale, tra settembre e novembre. Durante il periodo compreso tra metà settembre e metà dicembre, inoltre, le piante presentano la fase di fioritura (Vilà e Terradas, 1998). I fiori sono campanulati, con corolla rosa intenso, presentanti antere scure che sporgono dal tubo corollino (Federico, 1999); essi sono raggruppati in gruppi costituiti da 100 fino ad alcune centinaia di fiori in infiorescenze dense e fogliose, localizzate in posizione terminale nei rami (Vilà e Terradas, 1998; Federico, 1999).

La fruttificazione avviene in gennaio e porta alla produzione di capsule con diametro di meno di 3 mm, contenenti circa 25 semi (Vilà e Terradas, 1998).

Erica multiflora non è attualmente diffusa in coltura (Huxley *et Al.*, 1997), essa però presenta una fioritura abbondante e prolungata nel tempo, carattere di notevole interesse dal punto di vista ornamentale. La propagazione di *Erica multiflora* per via gamica risulta difficoltosa visto che, essendo la specie tipica di ambienti percorsi periodicamente da incendi, i semi germinano difficilmente se non sottoposti ad alte temperature e a trattamenti con il fumo (Piotto e Di Noi, 2001); per tal motivo risulta necessario sviluppare le tecniche di propagazione agamica per poter rendere attuabile la coltura della specie. In un'ottica di conservazione e valorizzazione del germoplasma

mediante l'incentivazione del suo utilizzo in coltura si è ritenuto importante lo studio delle tecniche di micropropagazione applicabili a tale specie. Lo studio effettuato su tale specie ha mirato all'individuazione delle condizioni ottimali di moltiplicazione e radicazione in vitro, col fine di mettere a punto un protocollo di micropropagazione specifico. Tali ricerche sono state svolte presso il laboratorio di micropropagazione del Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali dell'Università degli Studi di Palermo.

7.2 Materiali e metodi

7.2.1 Sterilizzazione degli espianti ed avvio della coltura in vitro

Il materiale vegetale di base utilizzato per gli esperimenti di micropropagazione di *Erica multiflora* è stato prelevato da piante presenti nella Riserva Naturale di Capo Gallo sita sulla costa nord della Sicilia a circa 5 km da Palermo (longitudine 13°19' Est e latitudine 38°09' Nord). Il materiale da sottoporre a sterilizzazione e successiva introduzione in vitro è stato prelevato a partire da germogli apicali della lunghezza di circa 12-15 cm ed il diametro di 2-3 mm, portanti 10-15 nodi. I germogli sono stati prima sottoposti ad un protocollo di sterilizzazione. Tale protocollo ha previsto un prelavaggio in acqua corrente per la durata di circa 10 minuti e la successiva sterilizzazione attuata mediante immersione in etanolo al 70% per 30 secondi e successivo mantenimento in agitazione per 20 minuti in soluzione con candeggina commerciale al 20% (v/v) [1,05% NaOCl (p/v)] contenente 20 gocce/litro di Tween 20 (Sigma Chemical Co.). Dopo tre risciacqui in acqua distillata sterile gli espianti sono stati sottoposti a rimozione delle due estremità e suddivisi in segmenti di 1,5-2 cm di lunghezza, portanti due-tre nodi. Tali segmenti sono stati utilizzati nella prima fase dell'esperimento col fine di incrementare il materiale vegetale allevato in vitro. I segmenti sono stati, pertanto posti verticalmente in test tube sterili con dimensione 25 x 150 mm, contenenti 10 ml di mezzo di coltura MS (Murashige and Skoog, 1962) con pH 5,7 sottoposto a solidificazione mediante 2,5 g/l di phytigel ed arricchito con 20 g/l di saccarosio e 4,92 µM della citochinina 2 isopentenil adenina (2-iP.) I germogli ascellari originatesi dai segmenti utilizzati in tale fase sono stati separati e sottoposti a subculture nel medesimo mezzo di coltura con cadenza mensile fino all'ottenimento di un quantitativo sufficiente di materiale vegetale da utilizzare per gli esperimenti volti alla definizione del protocollo di micropropagazione.

Le condizioni di coltura attuate in ogni fase della ricerca hanno previsto il mantenimento ad una temperatura di $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e l'esposizione ad un fotoperiodo di 16 ore di luce,

ottenuto mediante il ricorso a tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

7.2.2 Definizione del protocollo di moltiplicazione

Tale fase della ricerca ha previsto la definizione delle condizioni ottimali di proliferazione in vitro della specie. Per tale studio sono stati utilizzati espianti prelevati dalle colture di germogli precedentemente stabilizzate. I germogli, in asepsi, sono stati sezionati in segmenti nodali di 0,5-0,7 cm aventi 3-4 nodi ciascuno. Gli espianti, sono stati deposti verticalmente test tube sterili con dimensione 25 x 150 mm, contenenti 10 ml di mezzo coltura Anderson addizionato con diversi fitoregolatori di crescita. Il mezzo è stato mantenuto a pH 5,7 e arricchito con 20 g/l di saccarosio e solidificato con 2,5 g/l di phytigel.

Si è deciso di utilizzare come mezzo di base la composizione nutritiva definita da Anderson (1984) e frequentemente utilizzata per la micropropagazione di specie appartenenti alla famiglia delle Ericaceae. Tale decisione è stata basata sui risultati di prove preliminari che hanno mostrato la superiorità del mezzo definito da Anderson rispetto al tradizionale mezzo MS per la coltura in vitro di *Erica multiflora*.

L'esperimento ha mirato alla definizione della concentrazione di citochinine (2-iP) ed auxine (NAA) in grado di indurre il più alto tasso di proliferazione degli espianti senza indurre produzione di callo.

Applicando uno schema fattoriale sono state messe a confronto concentrazioni crescenti (0, 4,92, 9,84 e 19,68 μM) di 2-iP in combinazione con 2 concentrazioni di NAA (acido α -naphthalene acetico) (0 e 0,54 μM). È stato adottato uno schema sperimentale a blocco randomizzato con tre blocchi per ciascuno dei trattamenti. Sono stati utilizzati 15 germogli per blocco per un totale di 45 espianti per trattamento.

I dati rilevati sono stati sottoposti ad analisi della varianza ed il confronto tra le medie è stato effettuato applicando il test delle differenze minime significative di Fisher. Le osservazioni effettuate dopo 4 e 8 settimane dalla messa in coltura hanno riguardato il numero e la lunghezza dei germogli ascellari sviluppatasi da ogni espianto. Le colture sono state mantenute nelle medesime condizioni di crescita dell'esperimento precedente.

7.2.3 Definizione del protocollo di radicazione

L'esperimento mirante all'individuazione della concentrazione ormonale ottimale per la radicazione è stato messo in atto utilizzando delle microtalee di circa 1,5 cm di

lunghezza e prelevate da colture di germogli stabilizzate. Tali espianti sono stati posti in capsule Petri con diametro 5 cm, riempite con mezzo di base Anderson (1984) con caratteristiche nutritive analoghe a quelle utilizzate per la moltiplicazione. L'esperimento ha previsto la comparazione degli effetti indotti sulla radicazione da quattro differenti concentrazioni (0, 0,12, 0,24 e 0,49 μM) dell'auxina acido indole-3-butirrico (IBA). Le osservazioni effettuate dopo 5 settimane dalla messa in coltura hanno riguardato la percentuale di radicazione ed il numero di radici prodotte da ciascuna microtalea. Le colture sono state mantenute nelle medesime condizioni di crescita dell'esperimento precedente.

E' stato adottato uno schema sperimentale a blocco randomizzato con tre blocchi per ciascuno dei trattamenti. Sono stati utilizzati 20 microtalee per blocco per un totale di 60 espianti per trattamento.

I dati rilevati sono stati sottoposti ad analisi della varianza ed il confronto tra le medie è stato effettuato applicando il test delle differenze minime significative di Fisher. I dati percentuali relativi alla radicazione prima di essere sottoposti all'ANOVA sono stati oggetto di trasformazione angolare mediante arcoseno.

7.2.4 Acclimatazione delle piante prodotte in vitro

Dopo la radicazione *in vitro*, le plantule sono state estratte dai tubi di coltura e le radici lavate dai residui di phytigel. Le plantule sono state trasferite in vasetti (70 x 90 mm) contenenti un terriccio a base di torba e perlite (3:1,v/v) e posti su una bancale all'interno di una serra con copertura ombreggiante al 70%.



Figura 7-4: Piantine di *Erica multiflora* durante la fase di acclimatazione.

Allo scopo di acclimatare le piante al nuovo ambiente di coltivazione, il bancale è stato coperto con un film di polietilene trasparente sostenuto da archetti in ferro. Il polietilene è stato prima forato e poi gradualmente sollevato nelle due settimane seguenti il trapianto. Dopo circa quattro settimane, le piante sono state trasferite all'esterno e sottoposte ad osservazione morfologica per valutarne la stabilità genetica.

7.3 Risultati

L'applicazione del protocollo sperimentale precedentemente descritto ha permesso la sterilizzazione degli espianti e, successivamente all'ottenimento di un materiale di base sufficiente per l'attuazione dei due esperimenti di propagazione.

L'esperimento relativo alla moltiplicazione di espianti costituiti da sezioni di germoglio ha evidenziato delle differenze significative indotte dai trattamenti. L'arricchimento del mezzo con il solo regolatore di crescita 2-iP si è mostrato superiore nel determinare la moltiplicazione di *Erica multiflora*. In particolare, i migliori tassi di moltiplicazione, espressi mediante il parametro numero germogli per espianto, sono stati ottenuti utilizzando l'ormone alla concentrazione massima (19,68 μM) con 5,2 germogli per espianto dopo 8 settimane di coltura. L'introduzione nella composizione del mezzo di NAA ha determinato, invece, a parità di concentrazione di 2-iP dei risultati significativamente inferiori. L'inclusione della sola auxina (NAA) ha determinato l'assenza di accrescimento della gemma ascellare. L'assenza di ormoni nel mezzo di coltura ha invece indotto l'accrescimento della sola gemma ascellare presente sull'espianto primario, senza determinare una produzione di ulteriori germogli.

Relativamente al parametro lunghezza dei germogli, i migliori risultati sono stati ottenuti coltivando gli espianti su mezzo dotato di sole citochinine o su mezzo privo di ormoni. Il mezzo arricchito con sole citochinine che ha fornito i migliori risultati relativamente a tale parametro è stato quello con concentrazione di 2-iP 4,92 μM mentre un incremento della concentrazione di tale ormone ha determinato una riduzione di tale parametro. Anche in questo caso l'introduzione di NAA 0,54 μM nel mezzo ha determinato un effetto depressivo sulla moltiplicazione.

Tabella 7-1: Effetti di differenti concentrazioni di 2-iP ed NAA sulla proliferazione in vitro di *Erica multiflora*.

| Fitoregolatori (μM) | | Germogli/espianto (numero) | | Lunghezza germogli (mm) | |
|----------------------------------|-------|----------------------------|-------|-------------------------|--------|
| | | Settimane di coltura | | | |
| NAA | 2-iP | 4 | 8 | 4 | 8 |
| 0,00 | 0 | 1,0 d | 1,0 d | 7,3 a | 16,3 a |
| 0,00 | 4,92 | 3,4 a | 3,6 b | 6,4 b | 15,0 a |
| 0,00 | 9,84 | 3,3 a | 3,5 b | 3,5 d | 12,0 b |
| 0,00 | 19,68 | 3,5 a | 5,2 a | 5,0 c | 10,6 c |
| 0,54 | 0 | 0,0 e | 0,0 e | 0,0 g | 0,0 f |
| 0,54 | 4,92 | 1,1 d | 1,4 d | 1,1 f | 8,3 de |
| 0,54 | 9,84 | 1,4 c | 1,5 d | 1,4 f | 5,4 e |
| 0,54 | 19,68 | 2,0 b | 2,4 c | 2,4 e | 5,0 e |

In ogni colonna le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,01$ secondo il test di Fisher.

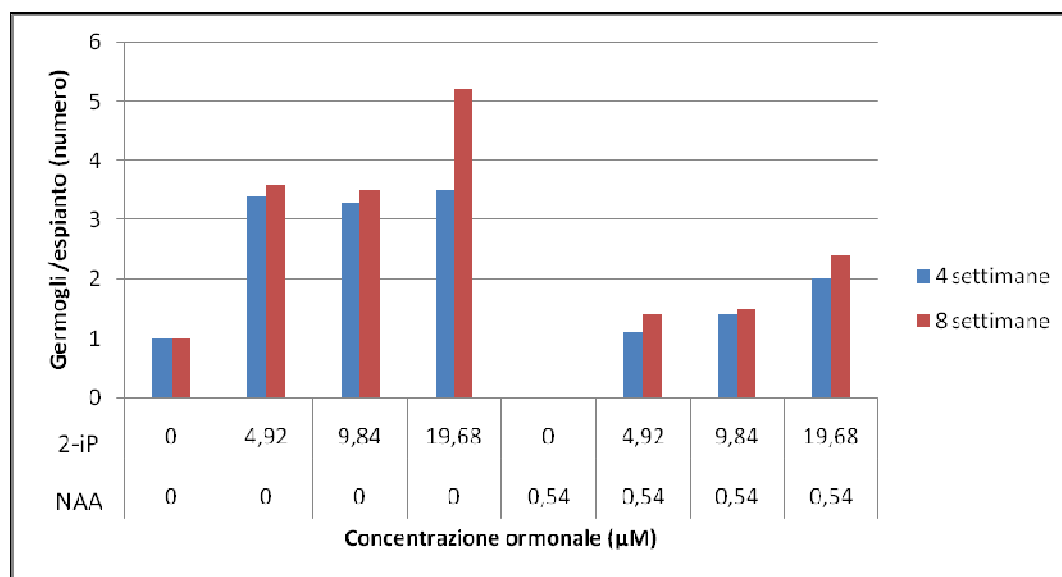


Grafico 7-1: Effetto di differenti concentrazioni di 2-iP e NAA sul numero di germogli prodotti/espianto.

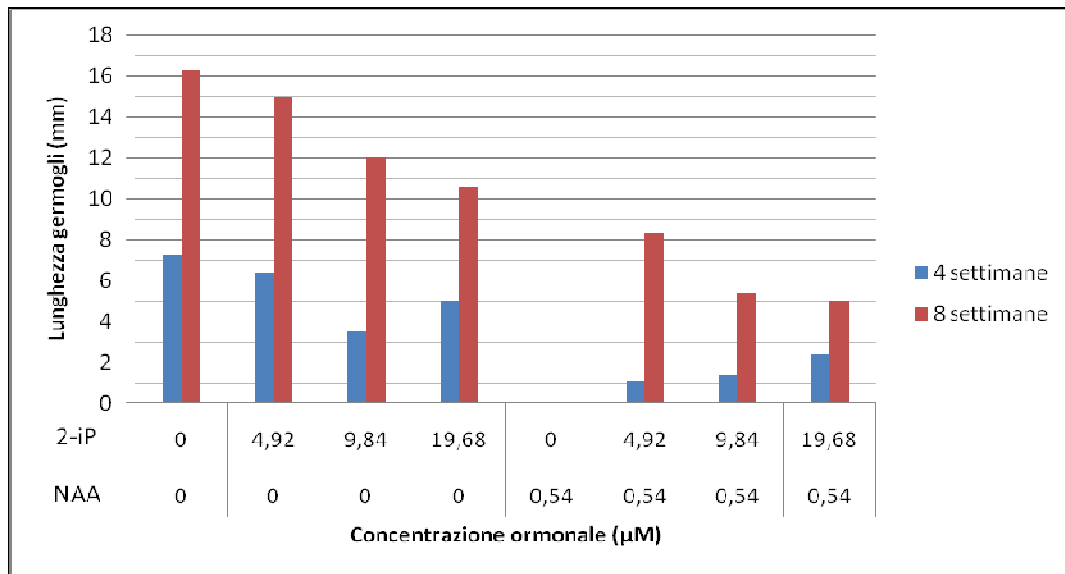


Grafico 7-2: Effetto di differenti concentrazioni di 2-iP e NAA sulla lunghezza dei germogli prodotti da espianti di *Erica multiflora*.



Figura 7-5: Germogli di *Erica multiflora* durante la fase di moltiplicazione.

Nel corso del secondo esperimento gli espianti di *Erica multiflora* hanno mostrato dopo cinque settimane in coltura una buona capacità di radicazione raggiungendo i tassi di radicazione massima mediante l'inclusione nel mezzo dell'auxina IBA ad una concentrazione 0,12 e 0,24 μM (rispettivamente 71 e 75%, valori non significativamente differenti tra loro). I peggiori risultati sono stati ottenuti escludendo l'ormone dalla composizione del mezzo.

Le microtalee hanno prodotto il maggior numero di radici in assenza di IBA o alla sua concentrazione inferiore nel mezzo (0,12 μM), ottenendo delle produzioni rispettivamente di 7,30 e 9,30 radici/microtalea. La migliore combinazione in termini di tasso di

radicazione e numero di radici prodotto è stata dunque quella con IBA 0,12 μM . La quasi totalità delle piante (90%) è stata acclimatata alle condizioni ex vitro dopo tre settimane.

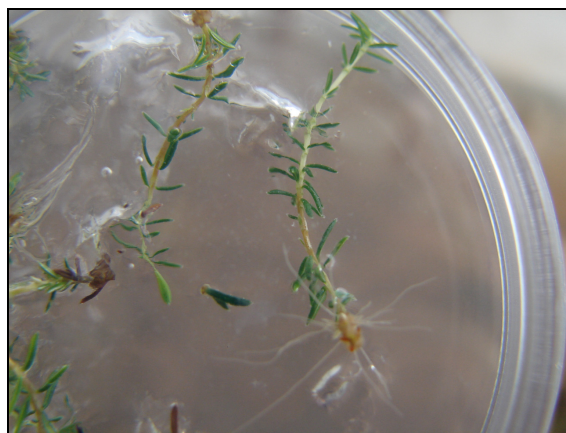


Figura 7-6: Microtalee di *Erica multiflora* durante la fase di radicazione.

Tabella 7-2: Effetto di differenti concentrazioni di IBA sulla radicazione di *Erica multiflora*.

| IBA (μM) | Radicazione (%) | Radici/microtalea (numero) |
|-----------------------|-----------------|-------------------------------|
| 0,00 | 29,0 c | 7,3 a |
| 0,12 | 71,0 a | 9,3 a |
| 0,24 | 75,0 a | 4,3 b |
| 0,49 | 51,0 b | 2,3 b |

In ogni colonna le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,01$ secondo il test di Fisher.

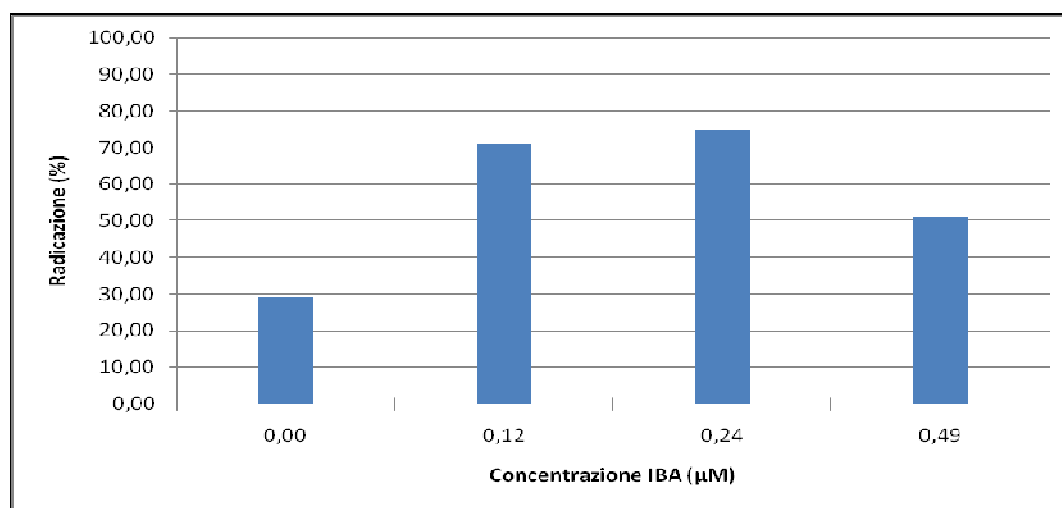


Grafico 7-3: Effetto di differenti concentrazioni di IBA sulla percentuale di radicazione di *Erica multiflora*.

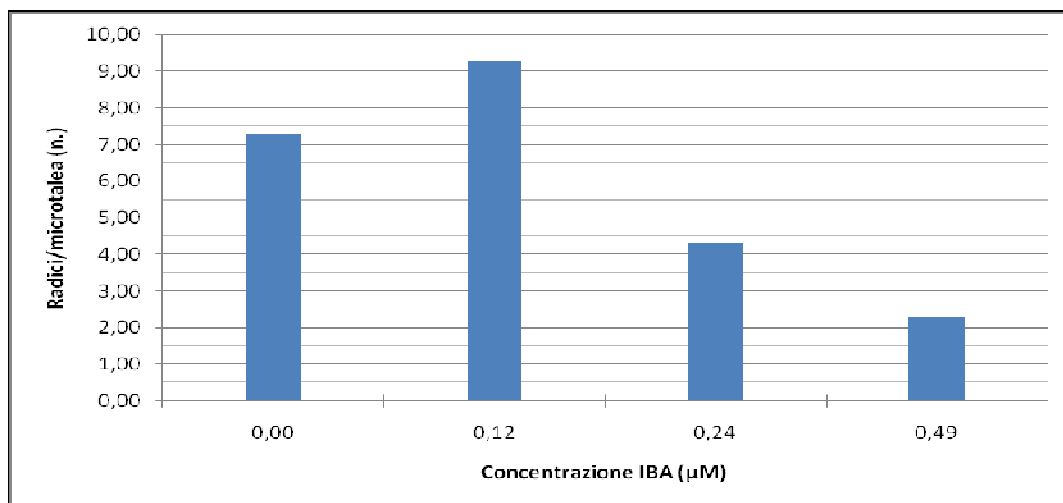


Grafico 7-4: Effetto di differenti concentrazioni di IBA sul numero di radici prodotte da ciascuna microtubero di *Erica multiflora*.

7.4 Discussione

La seguente ricerca ha consentito la definizione di un protocollo efficiente per la micropropagazione della specie mediterranea *Erica multiflora*, relativamente alle fasi di introduzione in coltura asettica, moltiplicazione e radicazione ed acclimatazione all'ambiente esterno. La specie ha dimostrato un buon adattamento alla coltivazione su mezzo Anderson e ha fornito dei buoni tassi di moltiplicazione. Il più elevato tasso di proliferazione è stato ottenuto in presenza di 2-iP alla dose di 19,68 µM. L'introduzione nel mezzo dell'auxina NAA, ha avuto un effetto deprimente la moltiplicazione. La radicazione della specie risulta soddisfacente con una concentrazione di IBA estremamente ridotta (0,12 µM) e per tale processo sono necessarie circa 5 settimane.

Tale ricerche hanno, quindi, consentito di dimostrare l'applicabilità della micropropagazione a *Erica multiflora*. Tale tecnica costituisce un importante mezzo per la produzione di materiale di propagazione da utilizzare in programmi di valorizzazione della specie in campo floricolo-ornamentale ed, inoltre, rappresenta un'importante alternativa per la conservazione del germoplasma di tale specie mediterranea.

CAPITOLO 8 Definizione di un protocollo di crioconservazione di apici vegetativi di *Limonium serotinum* mediante la tecnica di vitrificazione in goccia

8.1 Introduzione

Il *Limonium serotinum* (Reichenb) è una specie appartenente alla famiglia delle *Plumbaginaceae* ed al genere *Limonium*. Tale genere comprende circa 400 specie con ampia diffusione territoriale (Palacios e Gonzalez-Candelas, 1997), caratterizzate principalmente da un habitus a rosetta e dalla produzione di appariscenti infiorescenze (Amo-Marco e Ibanez, 1998). Le specie appartenenti al genere sono rinvenibili principalmente aree costiere del Bacino del Mediterraneo, il quale costituisce l'areale di diversificazione del genere, così come nelle steppe dell'Asia centrale e in alcune aree dell'estremo oriente. Il genere è caratterizzato da un'ampia variabilità genetica, evidenziata dalla presenza di un elevato numero di specie botaniche notevolmente diverse tra loro.

Il Bacino del Mediterraneo è particolarmente ricco di specie botaniche e tra le maggiormente diffuse troviamo il *Limonium serotinum* il quale è rinvenibile in gran parte delle aree costiere della penisola italiana (Burchi, 2002).



Figura 8-1: Rappresentazione della pianta di *Limonium serotinum* (Alessandrini e Bonafede, 1996).

Il *Limonium serotinum* è una specie erbacea perenne, formante una rosetta basale costituita da 5-10 foglie lanceolate e spatolate penninervie lunghe 15-30 cm e caratterizzate da un margine intero e sinuato. Da tale rosetta si diparte lo stelo florale che si sviluppa fino ad un'altezza compresa tra i 30 e gli 80 cm e che porta un'infiorescenza a pannocchia corimbosa. L'infiorescenza è ramificata e caratterizzata dalla presenza di dense spighe unilaterali. I fiori di colore roseo-lilla sono raggruppati in spighette biflore con brattea interna di 3 mm. I fiori presentano corolla gamopetala penta-lobata, 5 stami opposti ai lobi della corolla, ovario supero. I frutti sono degli acheni di dimensioni ridotte e di colore brunastro (Pignatti, 1982). La fioritura normalmente avviene tra giugno e settembre e risulta estremamente vistosa, al punto da caratterizzare il paesaggio delle aree umide costiere (Alessandrini e Bonafede, 1996).

Il *L. serotinum*, così come le altre specie appartenenti al genere *Limonium*, è caratterizzato da una notevole capacità di adattamento alle condizioni pedoclimatiche più difficili presentando notevole resistenza alla salinità ed agli stress idrici. Le specie appartenenti a tale genere, infatti, sono in grado di resistere alle condizioni di elevata salinità accumulando osmoliti compatibili non tossici (osmoprotettivi) in risposta a stress salini ed idrici; tra i composti accumulati troviamo: Colin-O-Solfato, Beta-alanina betaina e la Glicina betaina (Burchi, 2002). Viste tali caratteristiche di resistenza il *L. serotinum* è riscontrabile nelle aree costiere di numerose regioni italiane su suoli preferibilmente argillosi periodicamente inondati dal mare, nelle paludi salmastre o nelle aree occupate da saline (Pignatti, 1982).

Visto l'elevato valore ornamentale, la notevole rusticità e l'adattabilità alle tecniche di manipolazione *in vitro* le specie appartenenti al genere *Limonium* sono oggetto di una crescente attenzione nel settore ornamentale. La propagazione dei *Limonium* può essere effettuata naturalmente per seme; la fecondazione normalmente è allogama per la presenza di dimorfismo del polline, dello stilo e dello stimma. Per le utilizzazioni colturali, vista l'esigenza di ottenere delle piante uniformi e l'utilizzo preferenziale di ibridi, migliore risulta il ricorso alla propagazione agamica. Tecnica che è facilmente adottabile per la moltiplicazione dei *Limonium* è la micropropagazione (Burchi, 2002).

Il *L. serotinum*, così come altre specie appartenenti al genere, visto l'elevato valore ornamentale è stato oggetto di raccolta indiscriminata in natura che, associata alla distruzione dell'habitat naturale, ha condotto una drastica riduzione delle popolazioni presenti e all'instaurazione di un rischio di estinzione in numerose aree. Il *L. serotinum* è considerato specie minacciata in numerose regioni italiane ed in esse è pertanto sottoposto

a politiche di protezione (Alessandrini e Bonafede, 1996). Le tecniche di coltura in vitro rappresentano un'efficace metodo per la conservazione di numerose specie minacciate vista la possibilità di ottenere discendenze numerose a partire da un esiguo materiale di partenza, con un conseguente ridotto impatto sulle popolazioni selvatiche. Per la propagazione e conservazione di un determinato genotipo, viste le strategie riproduttive messe in atto dalle numerose specie appartenenti al genere *Limonium* (meccanismi di ibridazione, poliploidia, apomissia, ecc.), è fondamentale il ricorso alla micropropagazione che viene normalmente attuata a partire dalle gemme ascellari prodotte dalle rosette (Amo-Marco e Ibanez, 1998). Tale materiale può essere utilizzato per una conservazione a lungo termine mediante il ricorso alle tecniche di crioconservazione, la cui applicazione relativamente a tre ibridi di *Limonium* è già stata studiata da Matzumoto *et Al.* nel 1998.

Lo sviluppo di un protocollo di crioconservazione applicabile a *Limonium serotinum* ha costituito l'obiettivo di tale gruppo di ricerche effettuate durante il corso di dottorato di ricerca. La tecnica di crioconservazione studiata è stata quella di vitrificazione in goccia. La definizione del protocollo ha previsto una prima fase di valutazione degli effetti di un eventuale pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio sul successo della successiva fase di crioconservazione vera e propria. In una seconda fase si è, invece, provveduto alla comparazione di differenti soluzioni di vitrificazione per giungere appunto alla definizione del protocollo ottimale di crioconservazione.

8.2 Materiali e metodi

8.2.1 Materiale vegetale

Gli esperimenti su menzionati sono stati eseguiti su piante micropropagate di *Limonium serotinum*, fornite dalla "Unità di ricerca per il recupero e la valorizzazione delle specie floricole mediterranee" del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura con sede a Bagheria (Palermo).

Le piante madri sono state coltivate *in vitro* su mezzo Murashige and Skoog (1962) arricchito con 30 g/l di saccarosio, 0,05 mg/l di BAP e 6,3 g/l di agar mantenuto a pH 5,8. Tali piante sono state soggette a trasferimento e attuazione di subcolture ogni 30-40 giorni. La loro coltivazione è stata effettuata in camere di crescita con temperatura di $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo con 16 ore di luce e 8 ore di buio, ottenuto mediante l'utilizzo di tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).



Figura 8-2: Piante madri di *Limonium serotinum* utilizzate per la dissezione degli espianti da utilizzare negli esperimenti di crioconservazione.

8.2.2 Crioconservazione

Per la crioconservazione sono stati utilizzati apici vegetativi di circa 1-2 mm di lunghezza dissezionati a partire da piante madri di 30-40 giorni.

Il primo esperimento svolto ha avuto come obiettivo la valutazione degli effetti di un pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio su sopravvivenza e ricrescita degli espianti crioconservati. Per la condizione pretrattata l'applicazione del protocollo di crioconservazione è stata preceduta dall'immersione degli espianti in mezzo liquido MS 0,3 M di saccarosio per 16 ore e dalla successiva immersione in mezzo liquido MS 0,7 M di saccarosio per 5 ore. I campioni durante il pretrattamento sono stati mantenuti in condizioni di oscurità a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ed in agitazione (90 oscillazioni/minuto). I controlli non trattati, invece, sono stati coltivati per 16 ore in mezzo MS gelificato arricchito con 0,3M di saccarosio in condizioni di oscurità a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. La soluzione vitrificante utilizzata per tale esperimento è stata la PVS A1 in quanto la sua applicazione era stata già testata positivamente su ibridi appartenenti a *Limonium spp.* da Matsumoto *et Al* (1998)

Il secondo esperimento ha previsto la valutazione dell'effetto di cinque differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ricrescita di espianti crioconservati e non. Sono stati utilizzati degli espianti pretrattati mediante soluzioni arricchite in saccarosio (pretrattamento con 0,3 M saccarosio per 16 ore e 0,7 M saccarosio per 5 ore) ed a questi è stato applicato il protocollo di crioconservazione. Le soluzioni vitrificanti utilizzate sono state:

- PVS A1 (o PVS2);
- PVS A3;
- PVS A9;

- PVS B1;
- PVS B5 (Kim *et Al.*, 2009).

Tabella 8-1: Composizione e concentrazione totale delle soluzioni vitrificanti utilizzate (Kim *et Al.*, 2009).

| Soluzione vitrificante | Composizione (% peso/volume) | Conc. Totale (%) | Note |
|------------------------|--|------------------|------|
| A1 | Glicerolo 30,0 + DMSO 15 + EG 15 + Saccarosio 13,7 | 73,7 | PVS2 |
| A3 | Glicerolo 37,5 + DMSO 15 + EG 15 + Saccarosio 22,5 | 90,0 | |
| A9 | Glicerolo 30,0 + DMSO 20 + EG 20 + Saccarosio 15,0 | 85,0 | |
| B1 | Glicerolo 50 + Saccarosio 50 | 100,0 | PVS3 |
| B5 | Glicerolo 40 + Saccarosio 40 | 80,0 | |

Il protocollo di crioconservazione ha previsto l'immersione degli espianti in soluzione di loading per una durata di 20 minuti, con il fine di proteggere osmoticamente i campioni; è stata utilizzata una soluzione di loading costituita da 1,9 M di glicerolo (17,5 % p/v) e 0,5 M saccarosio (17,5 % p/v) e con concentrazione totale del 35,0% (p/v).

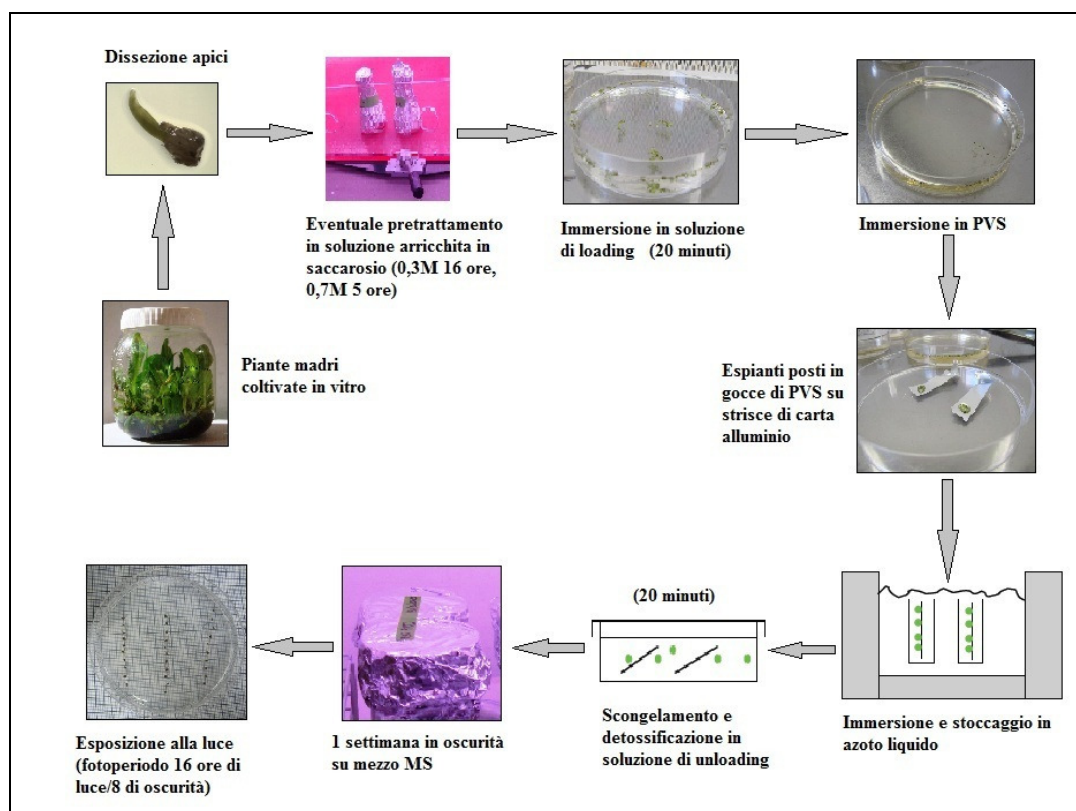


Figura 8-3: Protocollo applicato per la crioconservazione di *Limonium serotinum* mediante vitrificazione in goccia.

La tappa successiva è stata la sottoposizione degli espianti alla soluzione vitrificante per differenti durate ed a temperatura ambiente, avente come obiettivo l'ottenimento della disidratazione osmotica e la conseguente acquisizione di resistenza al congelamento in azoto liquido. Successivamente a tale fase gli espianti posti in gocce di soluzione vitrificante su strisce di carta alluminio sono stati immersi in azoto liquido per un tempo di almeno 5 minuti.

Gli espianti sono stati scongelati mediante immersione in circa 10 ml di soluzione di unloading riscaldata a 40°C; dopo circa 30 secondi la temperatura della soluzione di unloading è stata abbassata mediante l'aggiunta di un volume pressoché uguale della medesima soluzione mantenuta a temperatura ambiente. Il materiale vegetale è stato mantenuto nella soluzione di unloading per 20 minuti prima di essere asciugato mediante carta da filtro e trasferito nel mezzo di ricrescita, un mezzo MS addizionato con 30g/l di saccarosio, 0,05 mg/l di BAP e 6,3 g/l di agar con pH 5,8.

Gli espianti sono stati coltivati in camera di crescita con temperatura di 23 ±1°C e in assenza di illuminazione per una settimana, col fine di evitare danni da fotossidazione; successivamente essi sono stati messi alla luce e sottoposti ad un fotoperiodo con 16 ore di luce e 8 ore di buio, ottenuto mediante l'utilizzo di tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda (50 μmol m⁻² sec⁻¹).

8.2.3 Valutazione sopravvivenza e ricrescita

L'effetto dei differenti trattamenti sulla crioconservazione è stato analizzato prendendo in esame i parametri sopravvivenza e ricrescita. Per sopravvivenza si è intesa la presenza di qualsiasi tessuto vivente e qualunque forma di accrescimento (anche callo); essa è stata valutata dopo una settimana dallo svolgimento dell'esperimento. Gli espianti morti normalmente hanno manifestato una colorazione bruna.

La presenza di ricrescita è stata valutata dopo 8 settimane e con tale parametro si è intesa la produzione di normali germogli. Entrambe i parametri sono stati espressi come percentuale sul totale degli espianti trattati; per ciascuna condizione sono state eseguite 3 repliche di 10 espianti. I risultati sono stati analizzati mediante il software di analisi statistica SPSS, eseguendo l'analisi della varianza (ANOVA) basata sul test di Duncan; l'ANOVA è stata realizzata sui dati ottenuti mediante trasformazione con arcoseno delle percentuali di sopravvivenza e ricrescita.

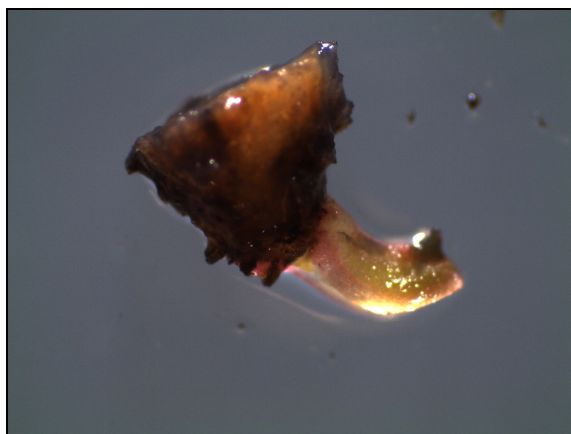


Figura 8-4: Espianto di *Limonium serotinum* sottoposto a crioconservazione e con evidenti segni di vitalità.

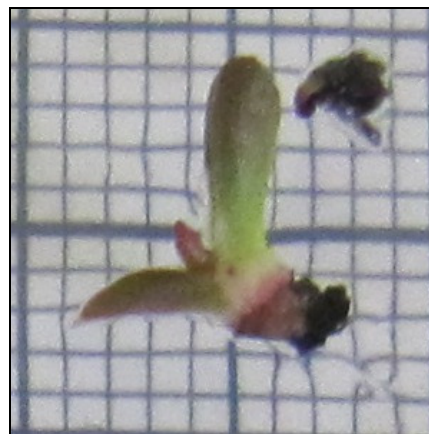


Figura 8-5: Espianto di *Limonium serotinum* sottoposto a crioconservazione ed in fase di ricrescita.

8.3 Risultati

Il primo esperimento eseguito su *Limonium serotinum* ha avuto come obiettivo di valutare l'efficacia di un pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio sulla crioconservabilità dei campioni disidratati mediante PVS A1. Analizzando i dati relativi alla sopravvivenza dei campioni in assenza di pretrattamento è possibile evidenziare una buona resistenza di questi alle soluzioni vitrificanti ed alla congelazione in azoto liquido. Il massimo valore di sopravvivenza dei controlli non pretrattati in seguito al congelamento in azoto liquido è stato raggiunto dopo disidratazione osmotica di 20 minuti (47%). Nonostante l'elevato tasso di sopravvivenza gli espianti non sono stati in grado di produrre nuovi germogli per tutti i tempi di disidratazione, sintomo di notevoli danni subiti dagli espianti nella fase di congelamento. Gli espianti sottoposti a pretrattamento hanno fornito degli ottimi risultati in termini di sopravvivenza, risultati non significativamente differenti se comparati a quelli ottenuti in assenza di pretrattamento. L'immersione degli espianti in soluzione arricchita in saccarosio ha però consentito di ottenere una produzione di germogli statisticamente significativa in seguito ad applicazione del protocollo crioconservativo; il valore massimo di ricrescita è stato ottenuto dopo disidratazione osmotica di 30 minuti. Tale produzione di germogli è però risultata molto lenta e da tale considerazione è derivata la necessità di valutare il parametro ricrescita dopo 8 settimane dallo scongelamento degli espianti.

Tabella 8-2: Effetto del trattamento con PVS A1 in assenza di pretrattamento sulla sopravvivenza di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Sopravvivenza (%) | | | |
|--------|-------------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 a | 79 a | 72 a | 77 a |
| +LN | 0 c | 20 b | 47 a | 33 ab |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 8-3: Effetto del trattamento con PVS A1 in assenza di pretrattamento sulla ripresa dell'accrescimento di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Ricrescita (%) | | | |
|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 87 a | 56 b | 53 b | 17 c |
| +LN | 0 a | 0 a | 3 a | 0 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

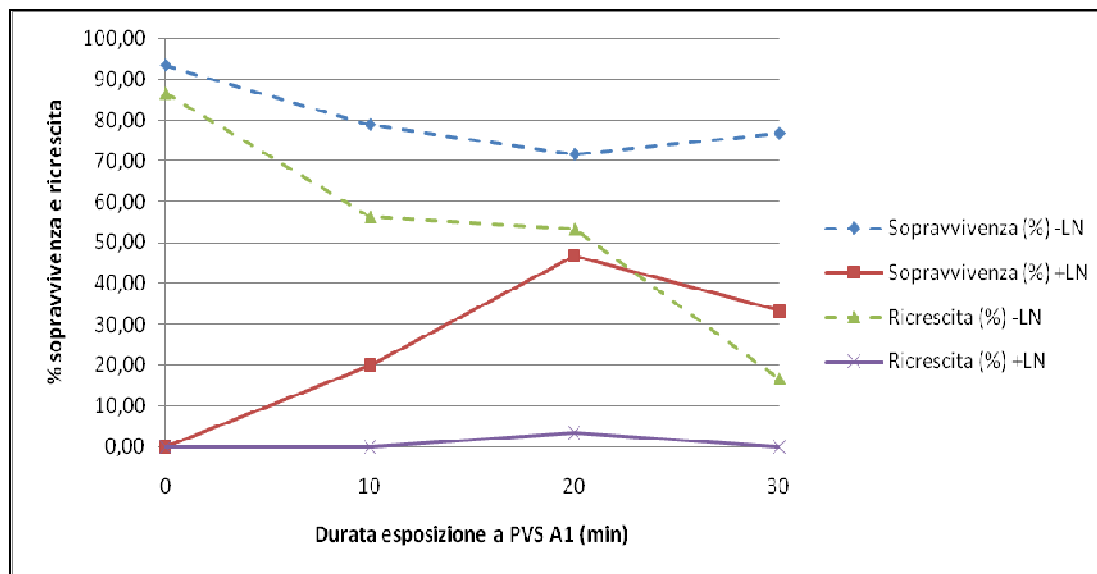


Grafico 8-1: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* non pretrattati disidratati mediante PVS A1 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

Tabella 8-4: Effetto del trattamento con PVS A1 sulla sopravvivenza di espianti di *Limonium serotinum* pretrattati sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Sopravvivenza (%) | | | |
|--------|-------------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 a | 91 ab | 71 bc | 57 c |
| +LN | 0 c | 17 b | 40 a | 50 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 8-5: Effetto del trattamento con PVS A1 sulla ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* pretrattati sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Ricrescita (%) | | | |
|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 a | 62 b | 48 b | 37 b |
| +LN | 0 c | 13 b | 0 c | 27 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

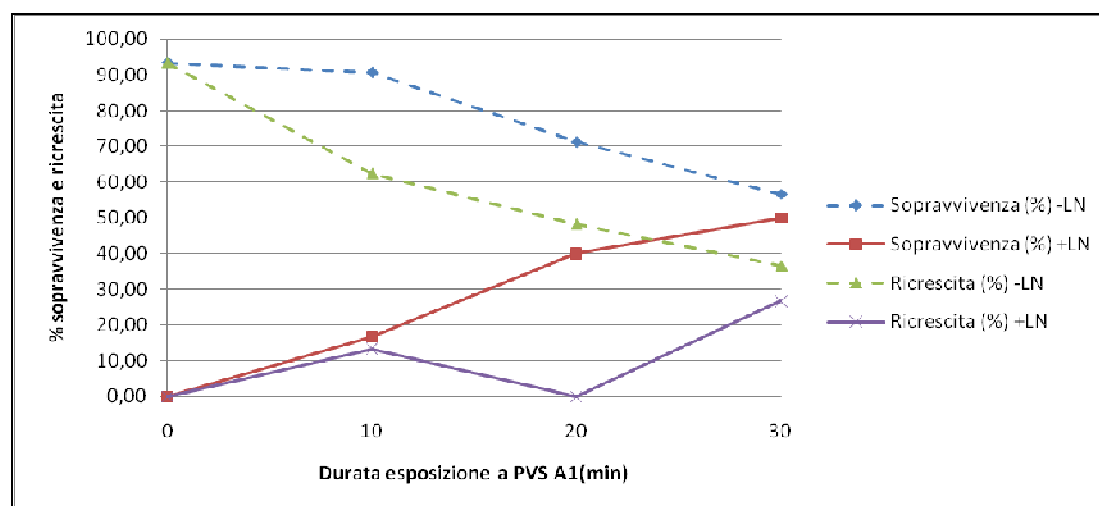


Grafico 8-2: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* pretrattati, disidratati mediante PVS A1 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

Il primo esperimento ha quindi permesso di evidenziare la superiorità del protocollo includente il pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio, visto che in seguito alla sua applicazione i campioni crioconservati sono stati in grado di riprendere l'accrescimento.

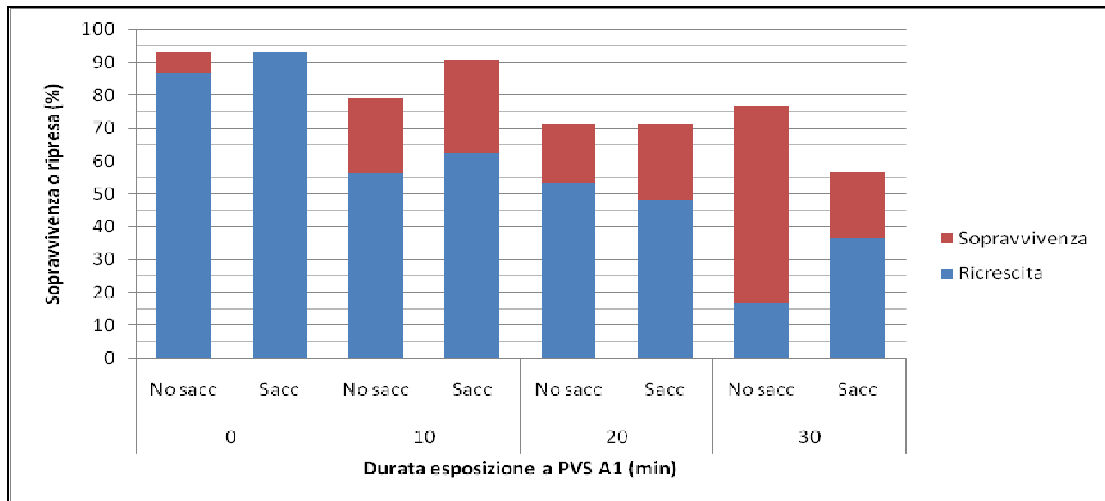


Grafico 8-3: Effetto sui controlli dell'esposizione alla soluzione PVS A1 in presenza (sacc) o meno (No sacc) di pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio.

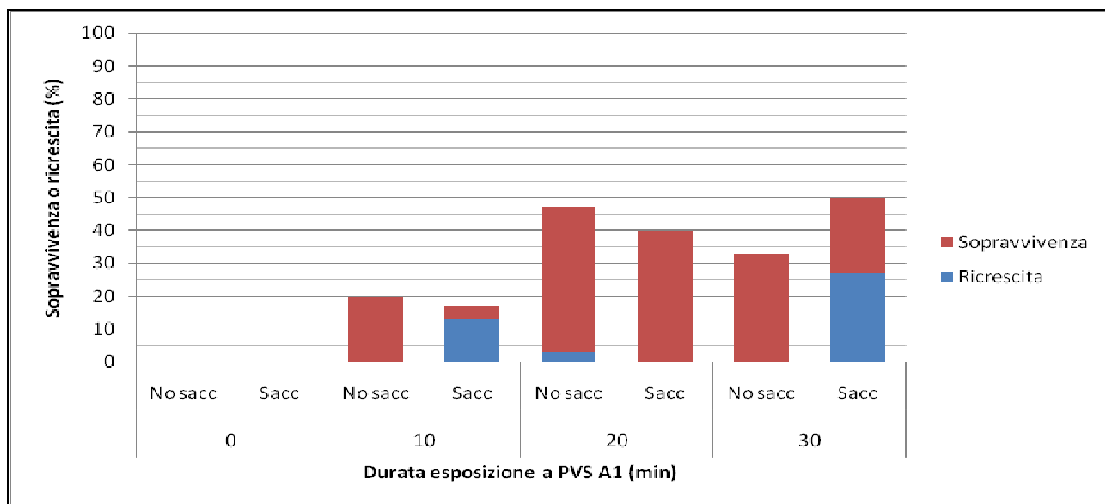


Grafico 8-4: Effetto sui campioni sottoposti a congelamento dell'esposizione alla soluzione PVS A1 in presenza (sacc) o meno (No sacc) di pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio.

Nella successiva fase di studio sono stati analizzati gli effetti di differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ripresa dell'accrescimento degli espianti crioconservati mediante vitrificazione in goccia.

L'analisi dei controlli non sottoposti a congelamento disidratati mediante PVS A3 ha consentito dimostrato una buona tolleranza degli espianti nei confronti di tale soluzione vitrificante ma difficoltà degli espianti di generare una buona ricrescita. Gli espianti hanno sopportato abbastanza bene il processo di congelamento in azoto liquido in termini di sopravvivenza ma la produzione di germogli è stata molto scarsa e non significativa

statisticamente. Il valore massimo di sopravvivenza al congelamento (53%) è stato ottenuto dopo 30 minuti di esposizione alla soluzione vitrificante e la massima ricrescita, corrispondente al 7%, dopo 10 minuti.

Tabella 8-6: Effetto del trattamento con PVS A3 sulla sopravvivenza di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Sopravvivenza (%) | | | |
|--------|-------------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 ab | 100 a | 74 b | 83 ab |
| +LN | 0 b | 40 a | 47 a | 53 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 8-7: Effetto del trattamento con PVS A3 sulla ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Ricrescita (%) | | | |
|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 a | 38 b | 45 b | 43 b |
| +LN | 0 a | 7 a | 0 a | 3 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

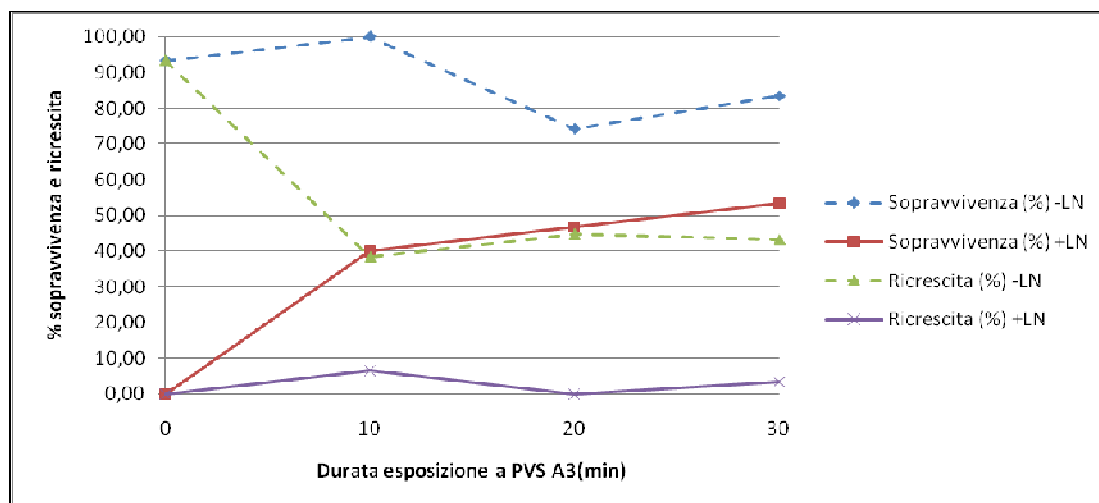


Grafico 8-5: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* disidratati mediante PVS A3 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

La disidratazione con soluzione PVS A9 ha indotto un maggiore tasso di mortalità degli espianti sia nel caso dei controlli non trattati che dei campioni sottoposti a congelamento. Il valore massimo di sopravvivenza è stato ottenuto dopo 10 e 20 minuti di disidratazione osmotica ed è risultato del 37%; tale valore non è tuttavia significativamente differenti rispetto a quello ottenuto dopo 30 minuti di esposizione alla soluzione vitrificante.

Tabella 8-8: Effetto del trattamento con PVS A9 sulla sopravvivenza di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Sopravvivenza (%) | | | |
|--------|-------------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 a | 66 b | 52 b | 40 b |
| +LN | 0 b | 37 a | 37 a | 23 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 8-9: Effetto del trattamento con PVS A9 sulla ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Ricrescita (%) | | | |
|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | 93 a | 60 b | 52 b | 33 b |
| +LN | 0 c | 30 a | 37 a | 13 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

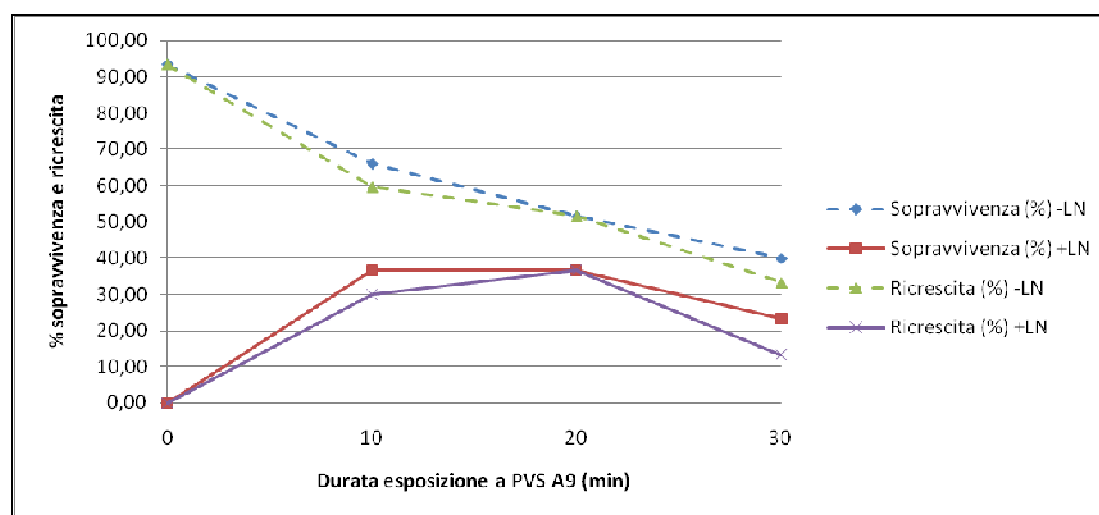


Grafico 8-6: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* disidratati mediante PVS A9 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

Nonostante il tasso di sopravvivenza non elevato, gli espianti trattati con PVS A9 hanno mostrato una buona capacità di riprendere l'accrescimento e la produzione dei germogli; i tassi di ricrescita massimi sono stati ottenuti dopo disidratazione osmotica di 10 e 20 minuti e sono risultati rispettivamente del 30 e del 37% (valori non significativamente differenti tra loro).

Gli espianti di *Limonium serotinum* sono risultati sensibili anche nei confronti della soluzione vitrificante PVS B1, la quale ha determinato nei controlli non sottoposti a congelamento una riduzione della sopravvivenza a valori del 53 % già dopo il tempo minimo di disidratazione (60 minuti). La tossicità della soluzione ha inoltre determinato dei tassi di ricrescita notevolmente bassi anche nel caso dei controlli, con valore massimo del 17% ottenuto in seguito a disidratazione di 90 minuti. Gran parte degli espianti in grado di tollerare la disidratazione osmotica hanno però dimostrato di sopravvivere al congelamento in azoto liquido, ciò ha fatto sì che si registrassero dei tassi di sopravvivenza post congelamento abbastanza elevati; il valore massimo è stato registrato dopo 60 e 90 minuti di disidratazione osmotica ed è risultato del 43%. Così come nel caso dell'applicazione delle altre soluzioni vitrificanti, anche trattando gli espianti con PVS B1 si è riscontrata una ridotta capacità di ricrescita; tale fenomeno è stato evidenziato sia nel caso dei controlli che in quello degli espianti sottoposti a congelamento in azoto liquido.

Tabella 8-10: Effetto del trattamento con PVS B1 sulla sopravvivenza di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Sopravvivenza (%) | | | |
|--------|-------------------|--------|--------|---------|
| | 0 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| -LN | 93 a | 53 b | 50 b | 37 b |
| +LN | 0 b | 43 a | 43 a | 37 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 8-11: Effetto del trattamento con PVS B1 sulla ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Ricrescita (%) | | | |
|--------|----------------|--------|--------|---------|
| | 0 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| -LN | 93 a | 10 b | 17 b | 7 b |
| +LN | 0 b | 7 ab | 17 a | 13 ab |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Il tasso di ricrescita post-scongelo massimo è stato ottenuto per gli espianti congelati dopo disidratazione osmotica della durata di 90 minuti (17%).

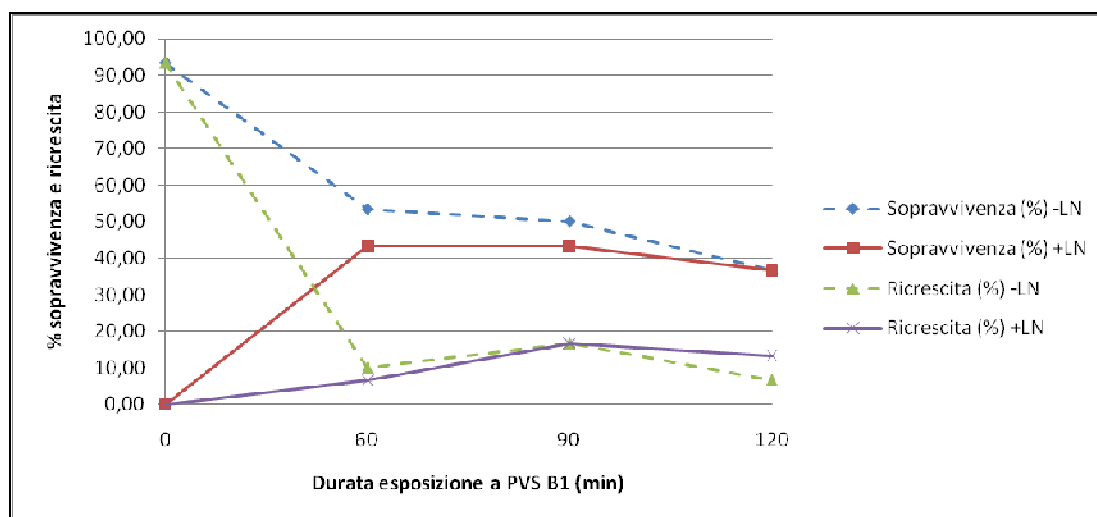


Grafico 8-7: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* disidratati mediante PVS A1 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

La soluzione PVS B5 ha mostrato di essere poco tossica nei confronti degli espianti e ciò si è ripercorso sia dal tasso di sopravvivenza che da quello di ricrescita fornito dai controlli. La ricrescita è risultata insoddisfacente dopo trattamento prolungato (120 minuti) nonostante la sopravvivenza non fosse statisticamente differente comparata agli altri tempi di disidratazione; ciò è stato causato, probabilmente, dalla tossicità della soluzione vitrificante che ha indotto dei danni cito-istologici in grado di compromettere la ripresa dell'accrescimento in gran parte degli espianti sopravvissuti. Tale soluzione è stata inoltre in grado di consentire un ottimo tasso di sopravvivenza anche nel caso degli espianti sottoposti a congelamento, con valori massimo dopo 60 minuti di esposizione alla soluzione (68%).

Tabella 8-12: Effetto del trattamento con PVS B5 sulla sopravvivenza di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Sopravvivenza (%) | | | |
|--------|-------------------|--------|--------|---------|
| | 0 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| -LN | 93 a | 87 a | 89 a | 83 a |
| +LN | 0 b | 63 a | 70 a | 53 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

La produzione di germogli (ricrescita) da parte degli espianti sottoposti a immersione in azoto liquido è risultata comunque moderata e si è attestata su valori massimi del 37% in seguito a trattamento con PVS B5 per 60 e 90 minuti; il valore di tale parametro comunque non è risultato statisticamente differente per i tre tempi di disidratazione osmotica adottati.

Tabella 8-13: Effetto del trattamento con PVS B5 sulla ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| DURATA | Ricrescita (%) | | | |
|--------|----------------|--------|--------|---------|
| | 0 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| -LN | 93 a | 68 b | 61 b | 23 c |
| +LN | 0 b | 37 a | 37 a | 27 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

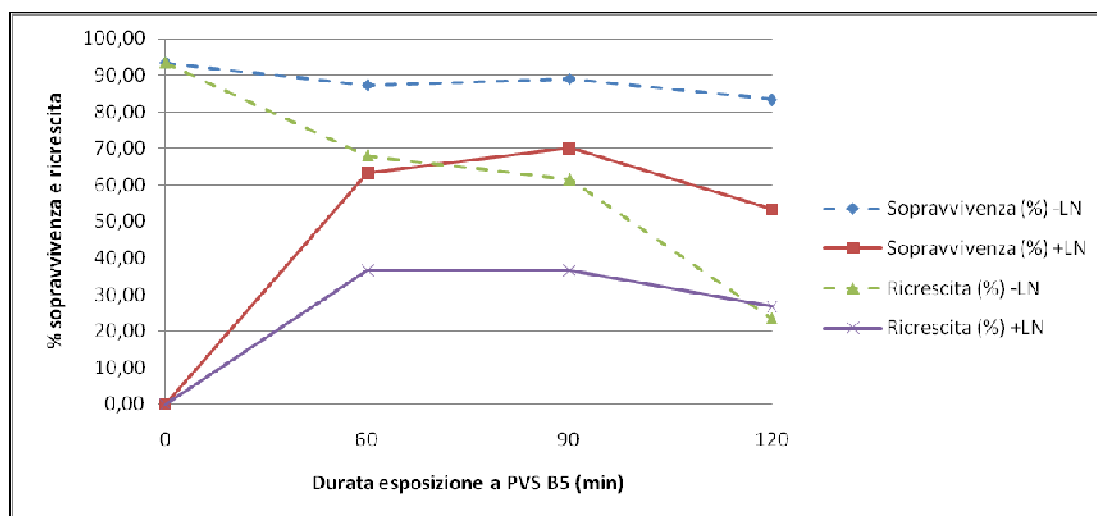


Grafico 8-8: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* disidratati mediante PVS B5 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

Comparando l'impiego delle differenti soluzioni vitrificanti sulla base delle condizioni sperimentali in grado di fornire i migliori risultati postcongelamento, relativamente al parametro sopravvivenza è emersa la superiorità della soluzione PVS B5; essa, infatti, è stata in grado, infatti, di fornire un tasso di sopravvivenza del 70%, significativamente maggiore rispetto a quello ottenuto impiegando le altre soluzioni vitrificanti. L'impiego della soluzione PVS B5 ha determinato, inoltre, l'ottenimento del maggiore tasso di ricrescita da parte degli espianti crioconservati. Il medesimo valore di ricrescita è stato ottenuto con l'impiego di PVS A9; le soluzioni PVS A3 e PVS B1 hanno portato all'ottenimento dei peggiori risultati in termini di ricrescita, rispettivamente (7 e 17 %).

Tabella 8-14: Comparazione degli effetti delle differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ripresa di espianti successivamente al congelamento in azoto liquido.

| | Trattamento | | | | |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| | PVS A1 | PVS A3 | PVS A9 | PVS B1 | PVS B5 |
| Sopravv. | 50 b | 40 b | 37 b | 43 b | 70 a |
| Ricrescita | 27 a | 7 b | 37 a | 17 ab | 37 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

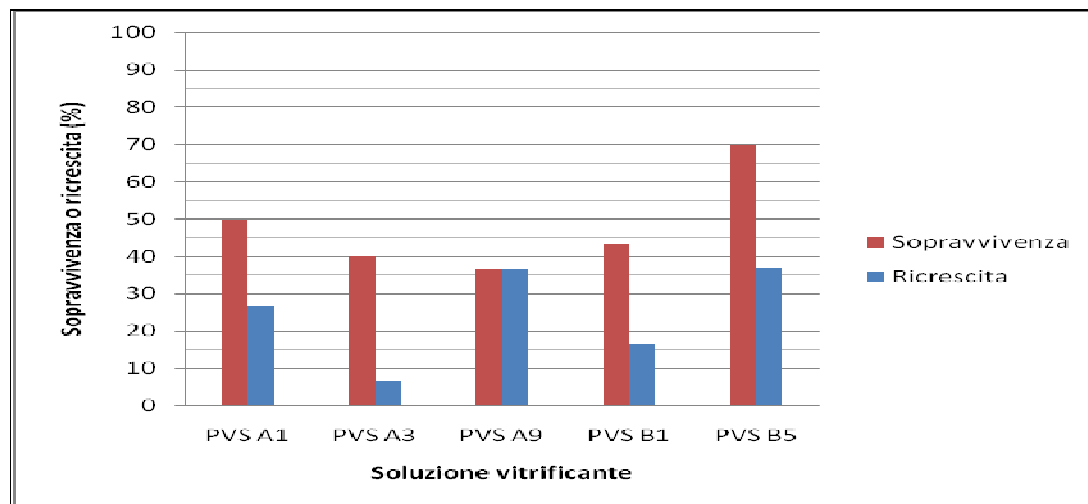


Grafico 8-9: Comparazione degli effetti del trattamento con le differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ricrescita di espianti di *Limonium serotinum* sottoposti a congelazione in azoto liquido.

8.4 Discussione

La presente ricerca relativa alla crioconservazione di *Limonium serotinum* ha permesso di evidenziare in primo luogo l'efficacia di un pretrattamento con soluzione arricchita in saccarosio nell'indurre una maggiore capacità di ricrescita degli espianti in seguito a crioconservazione. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto all'incremento dell'osmoprotezione indotta dalle soluzioni arricchite in saccarosio, che conseguentemente sono state in grado di ridurre la tossicità e i danni indotti dalle soluzioni vitrificanti. L'assenza di tale pretrattamento potrebbe avere causato dei danni cito-istologici agli apici meristematici che, seppure rimasti vitali, hanno perduto la capacità di accrescersi e di produrre germogli.

L'analisi degli effetti indotti dalla disidratazione osmotica mediante le differenti soluzioni vitrificanti sul successo del protocollo di crioconservazione mediante vitrificazione in gocci ha permesso di evidenziare un parametro comune relativo agli espianti sottoposti a congelamento, ovvero la ridotta capacità di produrre germogli. Gli espianti, infatti, seppure sopravvissuti al congelamento, hanno incontrato delle difficoltà a riprendere l'accrescimento, il quale è stato di entità ridotta sia in termini percentuali che in termini di tasso di crescita. Gli esperimenti hanno comunque permesso di evidenziare l'applicabilità della crioconservazione per la protezione a lungo termine della specie *Limonium serotinum*. Tali ricerche hanno evidenziato, inoltre, che l'ottenimento di risultati soddisfacenti è subordinato ad un'oculata scelta sia della soluzione vitrificante utilizzata per la disidratazione osmotica che dei tempi di esposizione ad essa. I migliori risultati in termini di sopravvivenza e ripresa dell'accrescimento sono stati ottenuti utilizzando la soluzione vitrificante PVS B5 con tempo di disidratazione pari a 90 minuti. La capacità di sopportare la crioconservazione da parte di *Limonium serotinum* è risultata comunque inferiore a quella emersa dalle ricerche attuate da Matsumoto *et Al* nel 1998 per cultivar ibride del medesimo genere.

Visto l'ampio margine presente tra tasso di sopravvivenza e di ricrescita è comunque auspicabile l'attuazione di ulteriori studi volti ad affinare la tecnica crioconservativa in modo da ridurre tale divario. Possibili ricerche future potrebbero riguardare sia l'ottimizzazione dei trattamenti atti a ridurre la tossicità delle soluzioni vitrificanti (precoltura, pretrattamento, loading) che di quelli post scongelamento (unloading, mezzo di ricrescita).

CAPITOLO 9 Definizione di un protocollo di crioconservazione di apici vegetativi di *Lithodora rosmarinifolia* mediante la tecnica di vitrificazione in goccia

9.1 Introduzione

Il genere *Lithodora*, appartenente alla famiglia delle *Boraginaceae*, comprende sette specie arbustive o sub-arbustive distribuite tra il Nord ed il Sud della Francia, Spagna, Italia e Sud della Grecia (Huxley *et Al.*, 1997; Iapichino, 2007).

Specie appartenente a tale genere e endemica della Sicilia e delle sue isole minori, oltre che della penisola Sorrentina (Campania) è la *Lithodora rosmarinifolia*, volgarmente chiamata erba perla (Federico, 1999).

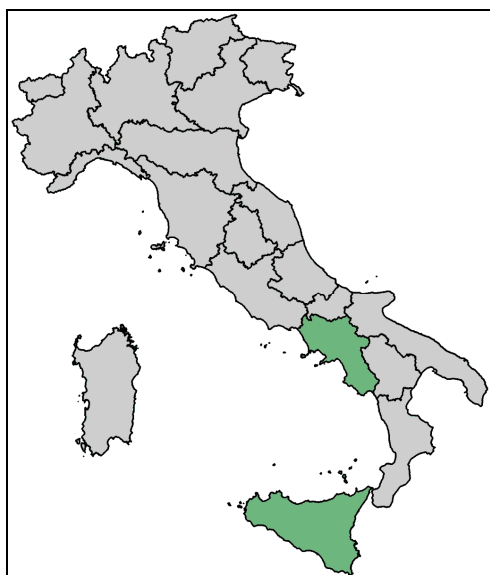


Figura 9-1: Regioni italiane dove *Lithodora rosmarinifolia* è rinvenibile in natura.



Figura 9-2: Rappresentazione della pianta di *Lithodora rosmarinifolia* (Huxley *et Al.*, 1997)

Essa è una specie arbustiva perenne e sempreverde caratterizzata da steli pubescenti, sia eretti che pendenti, che raggiungono normalmente la taglia di 30-60 cm (Huxley *et Al.*, 1997; Iapichino, 2007).

Gli steli portano delle foglie con forma lanceolata di 3x17mm con pagina fogliare di colore scuro superiormente e bianco tomentoso inferiormente; i margini fogliari sono normalmente revoluti. Gli steli portano in posizione terminale delle cime fiorifere brevi

composte da numerosi fiori di colore blu intenso con diametro di circa 12 mm, penta lobati e con lobi arrotondati; i fiori presentano un tubo pubescente all'interno del quale sono portati gli stami (Federico, 1999).



Figura 9-3: Arbusto di *Lithodora rosmarinifolia* in fioritura.

Contrariamente a molte altre specie arbustive che svolgono il proprio accrescimento nel periodo primaverile, quando è scongiurato il rischio di subire danni a causa del freddo, *L. rosmarinifolia* si sviluppa a partire dall'autunno. Gli eventi piovosi tipici del periodo autunno-invernale forniscono un quantitativo di acqua sufficiente a supportare la prolungata ed abbondante fioritura che ha luogo nel periodo tra dicembre e aprile. Durante il periodo estivo le piante perdono gran parte delle loro foglie (Federico, 1999; Iapichino, 2007).

La *Lithodora rosmarinifolia* è considerata una specie minacciata di estinzione a causa dell'attività antropica; essa è considerata come "rara" nel Libro Rosso del 1992 ed è inserita nelle Liste Rosse Regionali del 1997 all'interno della categoria IUCN "a minor rischio" (Pignatti *et Al.*, 2001). Visti i rischi di estinzione ai quali la specie è esposta fondamentale risulta l'applicazione di idonee politiche di conservazione. In considerazione del fatto che la specie è difficilmente propagabile per via gamica, a causa della produzione erratica di semi, i quali inoltre risultano difficilmente germinabili, il ricorso alla coltura in vitro costituisce un'importante alternativa per la sua salvaguardia *ex situ*. La possibilità di applicazione della coltura in vitro, in particolare della micropropagazione, per la conservazione delle specie è stata già investigata con esiti positivi da Iapichino nel 2007. La micropropagazione è stata vista anche come uno strumento per la valorizzazione floricola della specie, la quale è caratterizzata da un elevato valore ornamentale. In coltivazione la specie evidenzia un maggiore accrescimento ed una fioritura prolungata

anche ai mesi estivi, essa risulta pertanto potenzialmente utilizzabile per la produzione di piante in vaso (Iapichino, 2007).

Oltre alla definizione di un protocollo di micropropagazione si è considerata importante l'individuazione di una tecnica in grado di garantire la conservazione a lungo termine del materiale genetico di tale specie; per tal motivo si è studiata l'applicabilità della crioconservazione. Lo studio effettuato durante il corso di dottorato di ricerca ha mirato alla definizione di un protocollo di crioconservazione mediante la tecnica di vitrificazione in goccia. Con tale fine sono state analizzati gli effetti determinati da differenti soluzioni di vitrificazione sulla sopravvivenza degli espianti. Per cercare di ridurre gli effetti tossici dovuti alla soluzione vitrificante è stata inoltre testata la tecnica di vitrificazione in goccia in 3 fasi. Tale tecnica prevede l'aggiunta di una fase intermedia tra protezione osmotica e disidratazione in PVS durante la quale gli espianti sono immersi in soluzione vitrificante diluita al 50%. Tale fase ha l'obiettivo di disidratare in maniera più progressiva gli espianti e di incrementare la loro tolleranza alla PVS prima dell'immersione nella soluzione concentrata. Per testare tale tecnica è stata utilizzata come soluzione di vitrificazione la PVS B1 che aveva fornito i migliori risultati nel confronto con le altre soluzioni vitrificanti.

9.2 Materiali e metodi

9.2.1 Materiale vegetale

Gli esperimenti relativi alla definizione del protocollo di crioconservazione della specie *Lithodora rosmarinifolia* sono stati eseguiti a partire da materiale di base costituito da piante micropropagate.



Figura 9-4: Piante madri di *Lithodora rosmarinifolia* utilizzate per la dissezione degli espianti da utilizzare per gli esperimenti di crioconservazione.

Le piante madri sono coltivate in vitro su mezzo Murashige and Skoog (1962) arricchito con 20 g/l di saccarosio, 0,5 mg/l di BAP e 7,0 g/l di agar mantenuto a pH 5,8. Tali piante sono state oggetto di subcolture ogni 30-40 giorni. La loro coltivazione è stata effettuata in camere di crescita con temperatura di $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo con 16 ore di luce e 8 ore di buio, ottenuto mediante l'utilizzo di tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

9.2.2 Crioconservazione

Gli espianti da utilizzare per gli esperimenti di crioconservazione, costituiti da gemme ascellari, sono stati prelevati mediante l'ausilio di microscopio da dissezione a partire da vitroplant trasferite da 30-40 giorni. Sono stati utilizzati degli espianti di circa 2-3 mm di lunghezza in quanto da prove preliminari è emerso che la dissezione di espianti di dimensioni inferiori (circa 1 mm) causava un elevato tasso di mortalità degli stessi; con dimensioni superiori si è ottenuto il 100% di sopravvivenza alla dissezione.

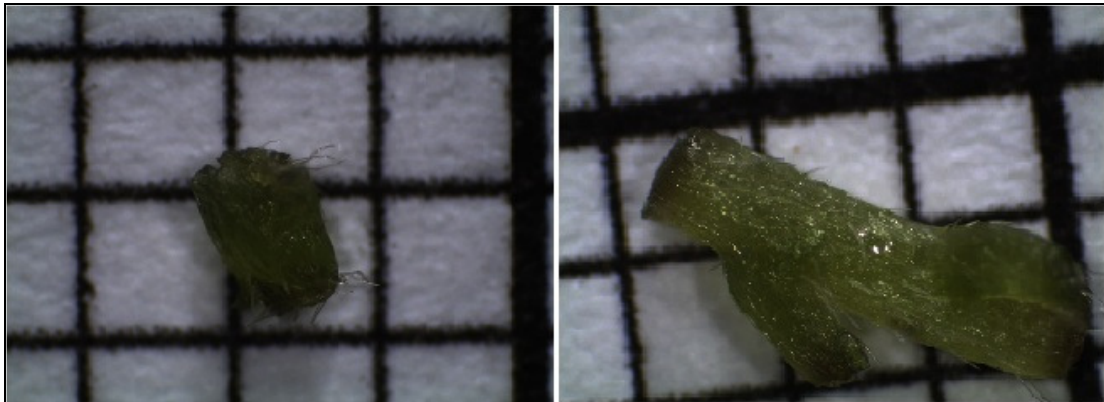


Figura 9-5: Espianti di *Lithodora rosmarinifolia* di dimensione non idonea (a sinistra) e ottimale per la crioconservazione (a destra).

Il protocollo sperimentale ha previsto un pretrattamento con soluzioni arricchite in saccarosio mediante una prima immersione in soluzione 0,3 M di saccarosio per 16 ore e una successiva in soluzione 0,7 M di saccarosio per 5 ore; il pretrattamento è stato applicato in condizioni di oscurità e mantenendo gli espianti in agitazione (90 oscillazioni/minuto).

Successivamente al pretrattamento gli espianti sono stati sottoposti a protezione osmotica mediante l'immersione in soluzione di loading per 20 minuti. E' stata utilizzata una

soluzione costituita da 1,9 M di glicerolo (17,5 % w/v) e 0,5 M saccarosio (17,5 % w/v) e con concentrazione totale del 35,0% (w/v).

La fase successiva del protocollo sperimentale ha previsto l'esposizione dei campioni a disidratazione osmotica, attuata mediante immersione in soluzione vitrificante (PVS) a temperatura ambiente per differenti archi temporali. Sono state utilizzate tre tipologie di PVS:

- PVS A3 (glicerolo 37,5% w/v, DMSO 15% w/v, EG 15% w/v, saccarosio 22,5% w/v);
- PVS B1 (glicerolo 50% w/v e saccarosio 50% w/v);
- PVS B5 (glicerolo 40% w/v e saccarosio 50% w/v) (Kim *et Al.*, 2009).

Gli espianti, per essere sottoposti al congelamento, sono stati inclusi in gocce di PVS poste su strisce di carta alluminio; fatto ciò essi sono stati immersi direttamente in azoto liquido dove sono stati lasciati per almeno 5 minuti.

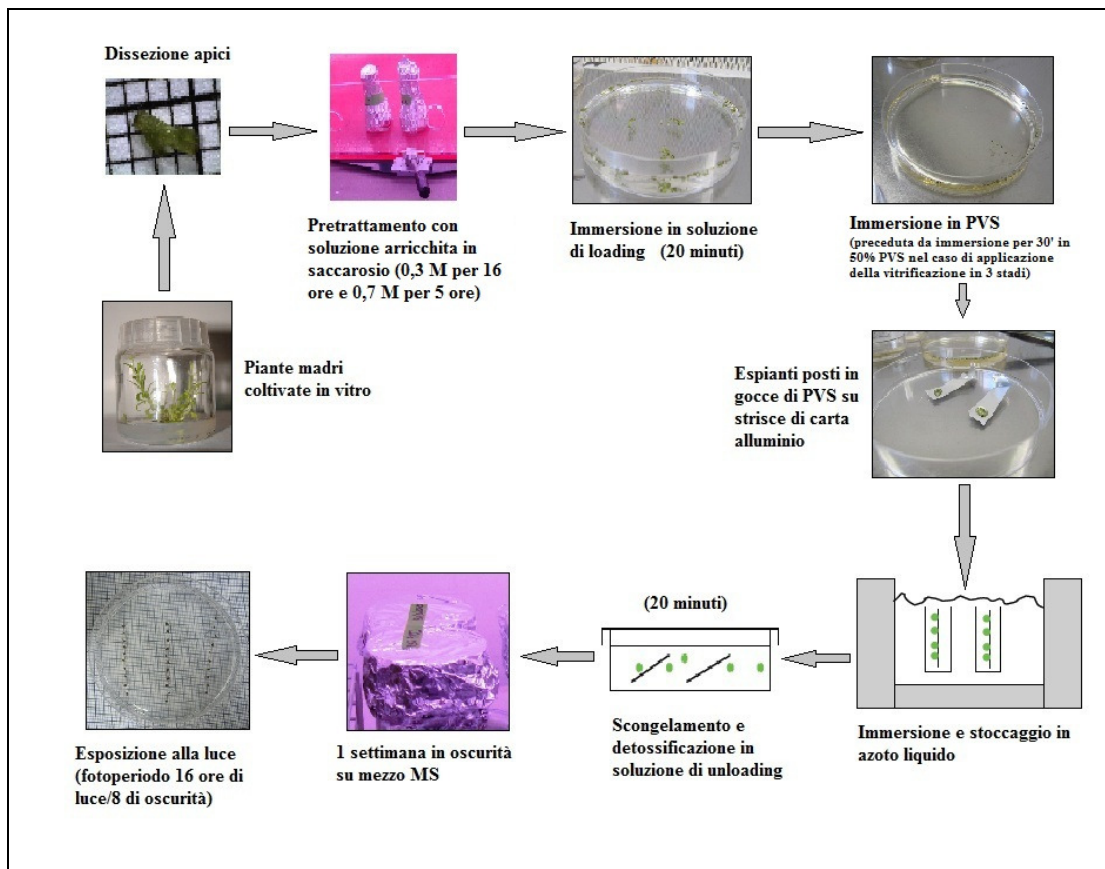


Figura 9-6: Protocollo applicato per la crioconservazione di *Lithodora rosmarinifolia* mediante vitrificazione in goccia

Ultimata tale fase gli espianti sono stati scongelati rapidamente mediante immersione in 10 ml di soluzione di unloading preriscaldata a 40°C; essi sono stati mantenuti in tali condizioni per circa 30 secondo, tempo dopo il quale si è provveduto a ridurre la temperatura della soluzione, evitando in tal modo danni agli espianti, mediante l'aggiunta di un volume all'incirca equivalente di soluzione di unloading a temperatura ambiente. L'immersione in tale soluzione per circa 20 minuti ha avuto la finalità di ridurre il contenuto in elementi tossici all'interno degli espianti.

Per testare la tecnica di vitrificazione in goccia a 3 stadi (loading, 50% PVS, PVS) la soluzione vitrificante utilizzata è stata la PVS B1 che aveva fornito i migliori risultati rispetto alle altre soluzioni. Per tale esperimento il protocollo ha subito l'aggiunta di una fase intermedia di passaggio tra loading e disidratazione osmotica durante la quale gli espianti sono stati immersi in una soluzione diluita al 50% di PVS B1 per un periodo di 30 minuti.

9.2.3 Valutazione sopravvivenza e ricrescita

L'effetto dei differenti trattamenti sulla crioconservazione è stato analizzato prendendo in esame i parametri sopravvivenza e ricrescita. Per sopravvivenza di un espianto si è inteso il mantenimento della colorazione verde e l'osservazione di un aumento del volume, segno di attività vitale. Gli apici morti in seguito all'applicazione del protocollo di crioconservazione hanno, invece, mostrato una colorazione bianco-brunastro. La sopravvivenza è stata valutata dieci giorni dopo lo svolgimento degli esperimenti.

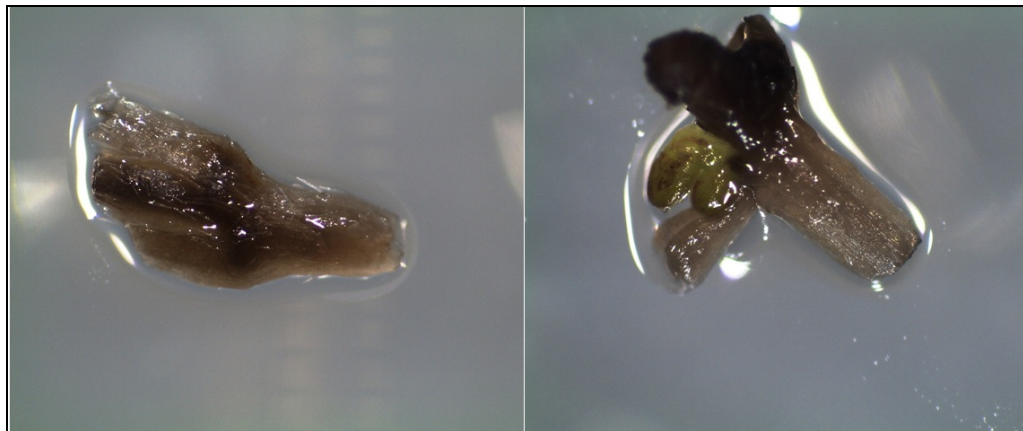


Figura 9-7: Espianti di *Lithodora rosmarinifolia* considerati come sopravvissuti (a destra) e non (a sinistra) in seguito a crioconservazione.

La ricrescita è stata valutata dopo un mese dagli esperimenti crioconservativi e con tale parametro si è intesa la produzione di normali germogli da parte degli espianti congelati in azoto liquido e non. Entrambe i parametri sono stati espressi come percentuale sul totale degli espianti trattati; per ciascuna condizione sono state eseguite 3 repliche di 10 espianti. I risultati sono stati analizzati mediante il software di analisi statistica SPSS, eseguendo l'analisi della varianza (ANOVA) basata sul test di Duncan; l'ANOVA è stata realizzata sui dati ottenuti mediante trasformazione con arcoseno delle percentuali di sopravvivenza e ricrescita.



Figura 9-8: Espiante di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposto a crioconservazione e mostrante evidente ricrescita.

9.3 Risultati

L'applicazione della soluzione vitrificante PVS A3 per differenti durate (10, 20 e 30 minuti) ha permesso di notare una notevole sensibilità degli espianti a tale soluzione, evidenziata dal rapido abbassamento delle curve di sopravvivenza e ricrescita. Da livelli ricrescita del 100% presenti successivamente alla protezione osmotica, infatti, si è scesi all'80% dopo appena 10 minuti per raggiungere dopo 20 e 30 minuti valori rispettivamente del 26% e del 10%. La soluzione PVS A3, inoltre, non è stata in grado di fornire una sufficiente protezione nei confronti dell'immersione in azoto liquido se non dopo trattamento per 30 minuti, durata per la quale si sono ottenute sopravvivenza e ricrescita post immersione in azoto liquido pari al 17%; il tasso di sopravvivenza però risulta esiguo a causa della tossicità indotta dalla soluzione vitrificante.

Tabella 9-1: Effetto del trattamento con PVS A3 sulla sopravvivenza di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| PVS A3 | Sopravvivenza % | | | | |
|--------|-----------------|--------|---------|---------|---------|
| | DURATA | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | | 100 a | 80,00 b | 30,00 c | 13,33 c |
| +LN | | 0,00 b | 3,33 b | 3,33 b | 16,67 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 9-2: Effetto del trattamento con PVS A3 sulla ripresa dell'accrescimento di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| PVS A3 | Ricrescita % | | | | |
|--------|--------------|--------|---------|---------|---------|
| | DURATA | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| -LN | | 100 a | 80,00 b | 26,67 c | 10,00 c |
| +LN | | 0,00 b | 3,33 b | 3,33 b | 16,67 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

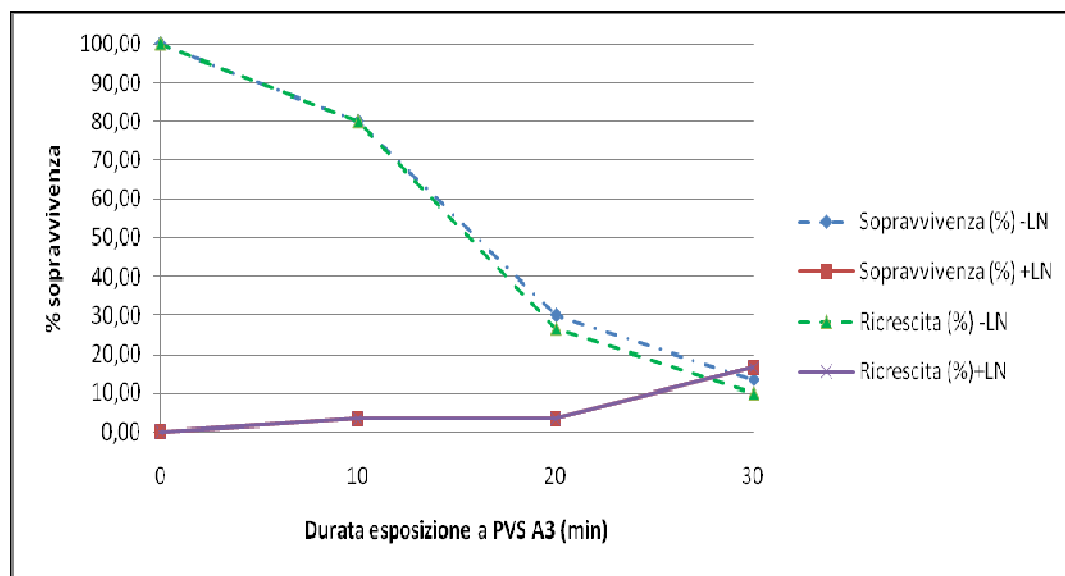


Grafico 9-1: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* disidratati mediante PVS A3 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

Vista la notevole tossicità chimica determinata dalla soluzione vitrificante PVS A3 (basata su PVS A1) si è deciso di testare la crioconservabilità della specie utilizzando soluzioni basate su PVS B1 (B1 e B5) in quanto meno tossiche chimicamente per gli espianti.

Gli espianti sottoposti a vitrificazione mediante PVS B1 per durate di 60, 90 e 120 minuti hanno anch'essi mostrato una notevole sensibilità nei confronti della soluzione vitrificante.

Con discesa della curva di sopravvivenza da livelli del 100% successivamente al loading a livelli del 57% dopo 60 minuti di disidratazione, 20% dopo 90 minuti e 13% dopo 120 minuti; l'andamento del tasso di ricrescita ha fatto evidenziare degli andamento pressoché identici. Il trattamento di disidratazione attuato mediante PVS B1 però ha indotto negli espianti una buona capacità di sopravvivenza al congelamento in azoto liquido. I migliori risultati sono stati ottenuti con disidratazione osmotica della durata di 60 minuti (33% di sopravvivenza e ricrescita); la sopravvivenza e la ricrescita sono diminuite per esposizioni maggiori visto l'incremento degli effetti tossici dovuti all'esposizione alla soluzione vitrificante.

Tabella 9-3: Effetto del trattamento con PVS B1 sulla sopravvivenza di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| PVS B1 | Sopravvivenza % | | | |
|--------|-----------------|---------|---------|---------|
| | DURATA | 0 min | 60 min | 90 min |
| -LN | 100,00 a | 56,67 b | 20,00 c | 13,33 c |
| +LN | 0,00 b | 33,33 a | 26,67 a | 0,00 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 9-4: Effetto del trattamento con PVS B1 sulla ripresa dell'accrescimento di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| PVS B1 | Ricrescita % | | | |
|--------|--------------|---------|---------|---------|
| | DURATA | 0 min | 60 min | 90 min |
| -LN | 100,00 a | 53,33 b | 13,33 c | 13,33 c |
| +LN | 0,00 c | 33,33 a | 20,00 b | 0,00 c |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

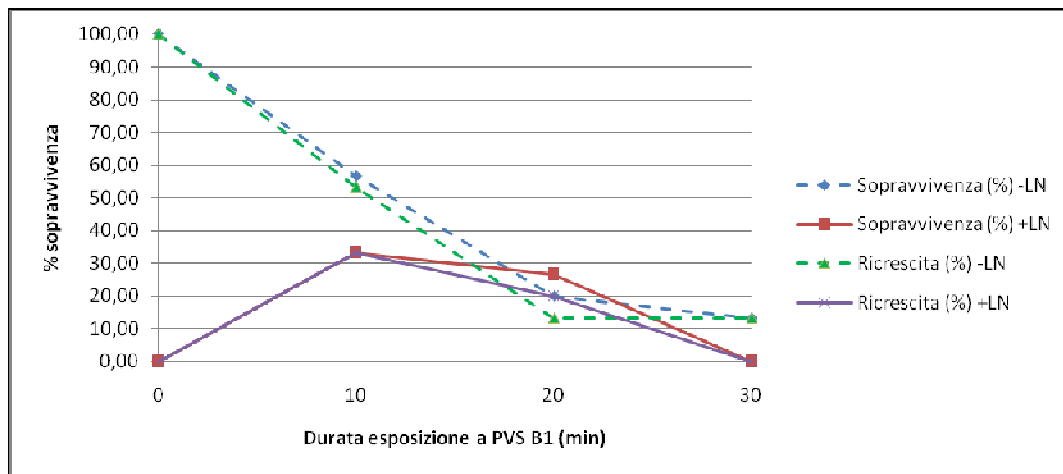


Grafico 9-2: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* disidratati mediante PVS B1 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelazione in azoto liquido.

Gli espianti hanno mostrato una buona resistenza nei confronti della soluzione PVS B5; le curve di sopravvivenza e ricrescita, infatti, hanno subito un lento abbassamento con il procedere dell'esposizione alla soluzione. L'induzione di resistenza al congelamento è però stata sufficiente a determinare sopravvivenza e ricrescita soltanto con tempi di esposizione più prolungati (90 e 120 minuti). Il maggior tasso di sopravvivenza e ricrescita (23%) è stato ottenuto con esposizione alla soluzione vitrificante per 120 minuti.

Tabella 9-5: Effetto del trattamento con PVS B5 sulla sopravvivenza di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| PVS B5 | Sopravvivenza % | | | | |
|--------|-----------------|----------|---------|---------|---------|
| | DURATA | 0 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| -LN | | 100,00 a | 90,30 a | 80,00 a | 46,67 b |
| +LN | | 0,00 b | 0,00 b | 16,67 a | 23,33 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 9-6: Effetto del trattamento con PVS B5 sulla ripresa dell'accrescimento di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| PVS B5 | Ricrescita % | | | | |
|--------|--------------|----------|----------|----------|---------|
| | DURATA | 0 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| -LN | | 100,00 a | 87,27 ab | 66,67 bc | 43,33 c |
| +LN | | 0,00 b | 0,00 b | 13,33 a | 23,33 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

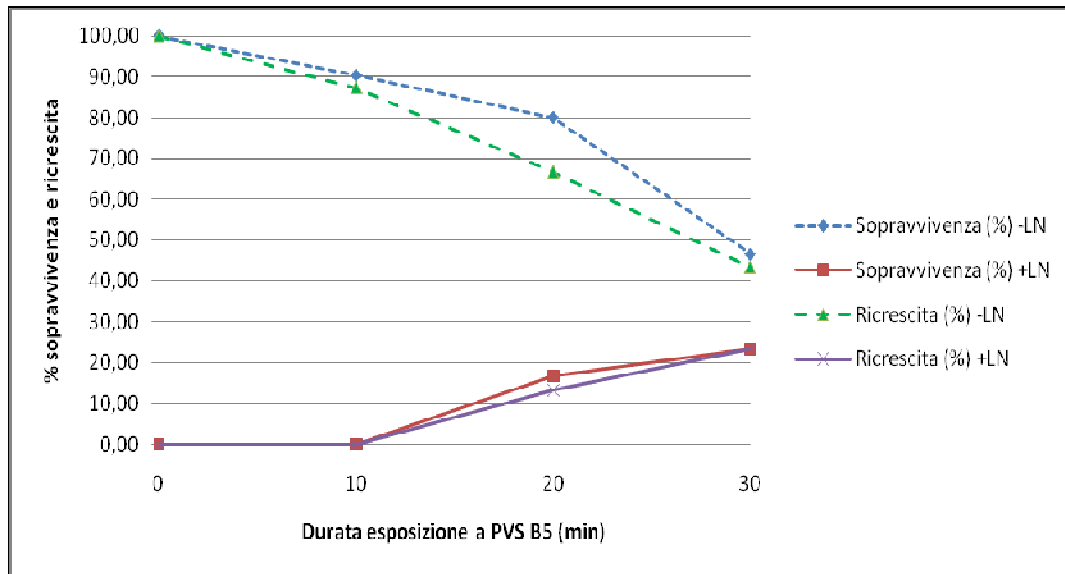


Grafico 9-3: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* disidratati mediante PVS B5 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a congelamento in azoto liquido.

Comparando per le 3 differenti soluzioni vitrificanti le durate che hanno determinato il maggior tasso di sopravvivenza e ricrescita post congelamento è emersa la significativa superiorità della soluzione PVS B1 (33% di sopravvivenza e ricrescita) mentre i peggiori risultati sono stati ottenuti impiegando la soluzione A3.

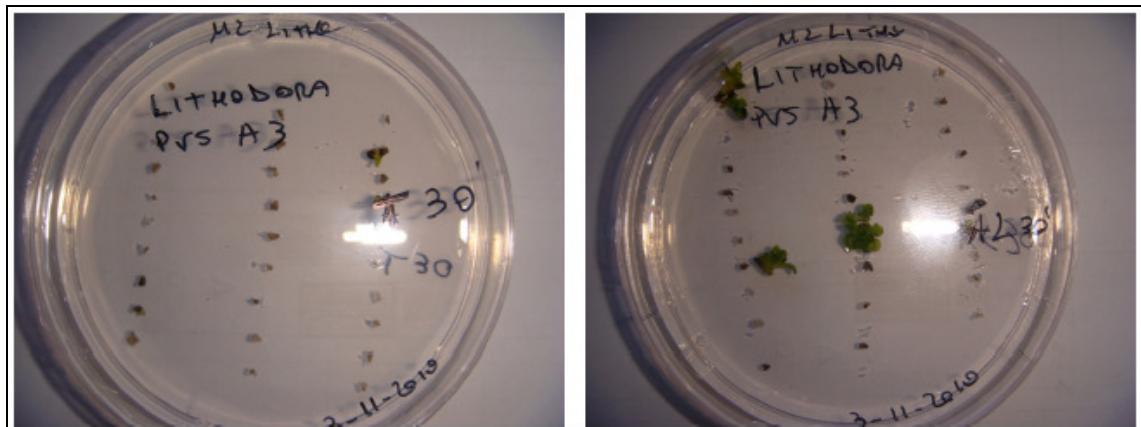


Figura 9-9: Espianti di *Lithodora rosmarinifolia* disidratati mediante PVS A3 per 30 minuti e sottoposti a congelamento (a destra) o meno (a sinistra) osservati dopo 30 giorni dall'esperimento.

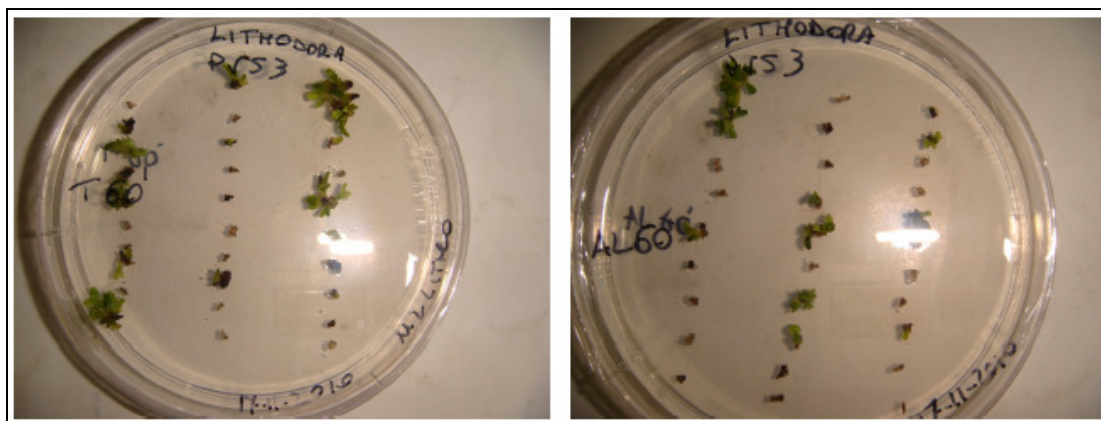


Figura 9-10: Espianti di *Lithodora rosmarinifolia* disidratati mediante PVS B1 per 60 minuti e sottoposti a congelamento (a destra) o meno (a sinistra) osservati dopo 30 giorni dall'esperimento.

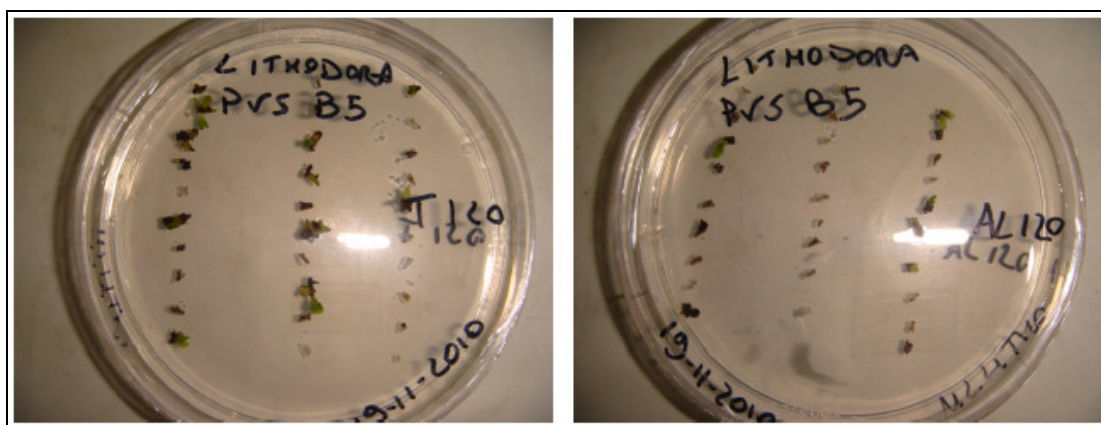


Figura 9-11: Espianti di *Lithodora rosmarinifolia* disidratati mediante PVS B5 per 120 minuti e sottoposti a congelamento (a destra) o meno (a sinistra) osservati dopo 30 giorni dall'esperimento.

Tabella 9-7: Comparazione degli effetti delle differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ricrescita di espanti successivamente al congelamento in azoto liquido.

| | Trattamento | | |
|---------------|-------------|---------|----------|
| | PVS A3 | PVS B1 | PVS B5 |
| Sopravvivenza | 16,67 b | 33,33 a | 23,33 ab |
| Ricrescita | 16,67 b | 33,33 a | 23,33 ab |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

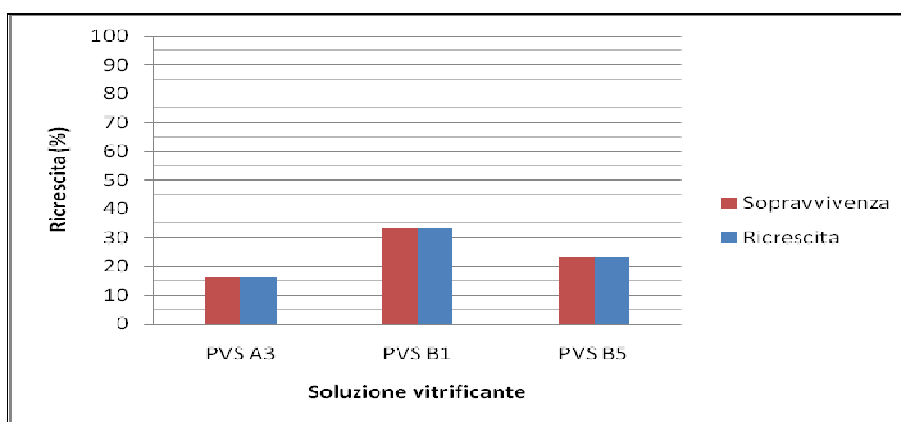


Grafico 9-4: Comparazione degli effetti delle differenti soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e la ricrescita di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti a congelazione in azoto liquido.

Durante il secondo esperimento condotto si è cercato di ridurre la tossicità dovuta a PVS B1, che aveva comunque fornito i migliori risultati durante l'esperimento precedente, adottando un protocollo di crioconservazione in 3 fasi (loading, 50% PVS, PVS). L'osservazione dei risultati ha però permesso di evidenziare come la resistenza dei controlli alla soluzione vitrificante non sia incrementata significativamente dall'interposizione del trattamento con 50% PVS tra loading e disidratazione osmotica. La sopravvivenza e la ripresa dell'accrescimento da parte degli espianti delle condizioni di controllo per le differenti durate, infatti, non differisce statisticamente. Anche la sopravvivenza massima dopo immersione in azoto liquido, registrata dopo un tempo di esposizione alla soluzione vitrificante di 60 minuti, non differisce statisticamente tra la procedura a due fasi e quella a 3, che fanno entrambe un valore del 33%. Nella vitrificazione in goccia a 3 fasi un valore di sopravvivenza e ricrescita statisticamente analogo a quello ottenuto dopo 60 minuti di esposizione a PVS B1 è stato realizzato anche congelando gli espianti previa esposizione a disidratazione osmotica per 90 minuti.

Tabella 9-8: Effetto della vitrificazione in goccia a 3 fasi mediante PVS B1 sulla sopravvivenza di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| | Sopravvivenza (%) | | | | |
|-----|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | Loading | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| | | 50% PVS B1 | PVS B1 | PVS B1 | PVS B1 |
| -LN | 100,00 a | 93,33 a | 63,33 b | 23,33 c | 16,67 c |
| +LN | 0,00 c | 0,00 c | 33,33 a | 30,00 a | 13,33 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 9-9: Effetto della vitrificazione in goccia a 3 fasi mediante PVS B1 sulla ripresa dell'accrescimento di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti (+LN) e non (-LN) a congelazione in azoto liquido.

| | Ricrescita % | | | | |
|-----|--------------|------------|---------|---------|---------|
| | Loading | 30 min 50% | 60 min | 90 min | 120 min |
| | | PVS B1 | PVS B1 | PVS B1 | PVS B1 |
| -LN | 100,00 a | 93,33 a | 63,33 b | 23,33 c | 10,00 c |
| +LN | 0,00 c | 0,00 c | 33,33 a | 30,00 a | 13,33 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

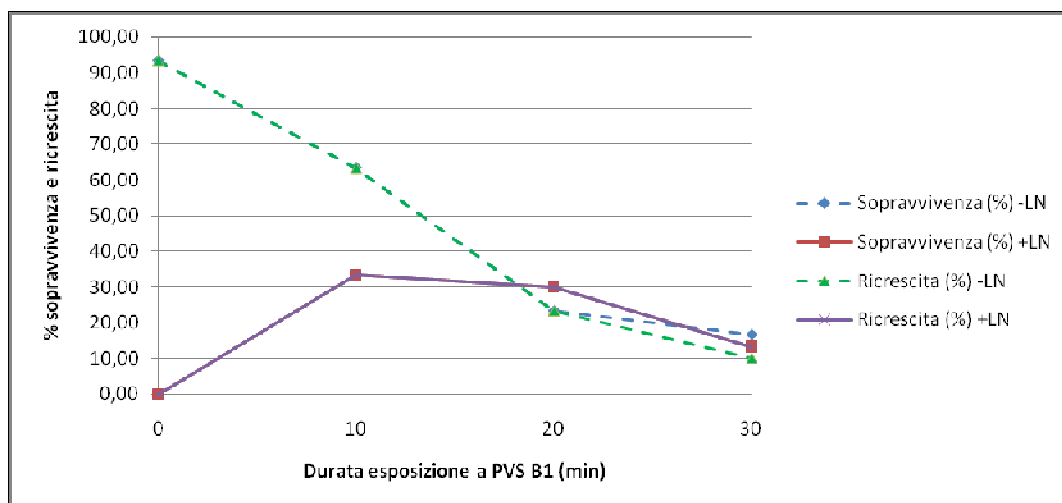


Grafico 9-5: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti di *Lithodora rosmarinifolia* sottoposti a vitrificazione in goccia mediante protocollo a 3 fasi utilizzando PVS B1 e congelati (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido.

Tabella 9-10: Comparazione protocollo di vitrificazione in goccia in 2 fasi con protocollo in 3 fasi.

| | Trattamento | |
|---------------|-------------|---------|
| | 2 steps | 3 steps |
| Sopravvivenza | 33,33 a | 33,33 a |
| Ricrescita | 33,33 a | 33,33 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

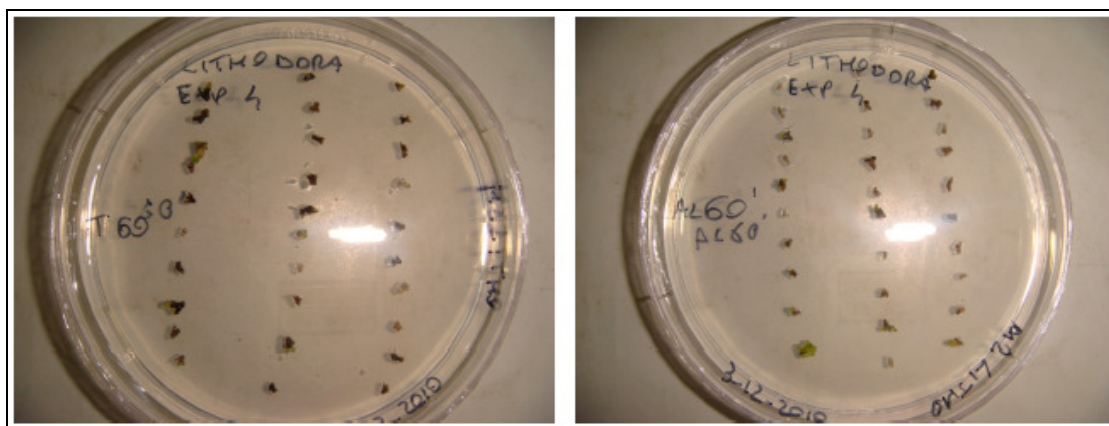


Figura 9-12: Espianti di *Lithodora rosmarinifolia* crioconservati mediante protocollo di vitrificazione in goccia a 3 fasi utilizzando PVS B1 per 120 minuti e sottoposti a congelamento (a destra) o meno (a sinistra) osservati dopo 30 giorni dall'esperimento.

9.4 Discussione

Il presente studio attuato su *Lithodora rosmarinifolia* ha permesso di evidenziare l'applicabilità delle tecniche di congelazione in azoto liquido per la conservazione di espianti costituiti da gemme ascellari di dimensioni comprese tra 2 e 3 mm.

L'immersione nella soluzione vitrificante risulta fondamentale per ridurre il contenuto di acqua all'interno degli espianti e per incrementarne la viscosità a livelli tali da consentire la loro vitrificazione nel momento di immersione diretta in azoto liquido.

La comparazione delle differenti soluzioni di vitrificazione ha permesso di evidenziare una loro differente efficacia riguardo alla capacità di indurre resistenza al congelamento. La soluzione PVS B1 è quella che ha determinato i migliori risultati. La riuscita della crioconservazione dipende dall'individuazione, oltre che della soluzione da impiegare, anche del corretto tempo di esposizione ad essa. I migliori risultati in tal senso sono stati ottenuti da esposizione a PVS B1 per 60 minuti. La soluzione A3 ha manifestato, invece, una notevole tossicità chimica, dovuta alla presenza di osmoliti tossici quali DMSO, glicerolo ed EG, e l'incapacità di indurre resistenza alla congelazione in azoto liquido. Effetti negativi sulla congelazione in azoto liquido sono stati registrati anche con PVS B5 che, seppur meno tossica delle altre soluzioni, non è stata un grado di indurre resistenza alla crioconservazione.

Il secondo esperimento, mirante a ridurre la tossicità della soluzione vitrificante PVS B1 mediante il ricorso ad una fase intermedia di adattamento ad essa mediante soluzione PVS diluita al 50% prima della disidratazione vera e propria, non ha permesso di evidenziare dei risultati significativamente differenti rispetto alla vitrificazione in goccia a 2 fasi;

quest'ultima pertanto costituisce la tecnica preferenziale vista la sua maggiore semplicità di applicazione.

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile concludere che la crioconservazione mediante vitrificazione in goccia costituisce una reale alternativa per lo stoccaggio a lungo termine ed in condizioni di stabilità genetica di *Lithodora rosmarinifolia*.

CAPITOLO 10 Comparazione delle tecniche di crioconservazione di canna da zucchero (*Saccharum spp.*) mediante incapsulamento-disidratazione e vitrificazione in goccia

10.1 Introduzione

La canna da zucchero è una pianta coltivata nelle regioni tropicali e subtropicali principalmente per la produzione di zucchero, grazie alla sua capacità di accumulare saccarosio negli internodi degli steli (Willcox *et Al.*, 2000).

La gran parte della produzione è attualmente ottenuta sfruttando degli ibridi interspecifici tra specie del genere *Saccharum*, genere appartenente alle monocotiledoni, alla tribù delle *Andropogoneae* ed alla famiglia delle *Poaceae*. Il genere è caratterizzato da elevati livelli di ploidia e da un frequente sbilanciamento del numero di cromosomi, caratteristiche che rendono difficile la sua classificazione (Daniels e Roach, 1987).

Le piante di canna da zucchero sono erbacee in grado di raggiungere la taglia di 2-3 metri e caratterizzate dalla produzione di steli (o culmi) multipli costituiti da una serie di nodi separati da internodi. Ogni nodo porta una gemma dormiente e da esso normalmente si sviluppa una foglia. Le foglie sono parallelinervie, con margine inferiore pubescente e superiore glabro, e sono disposte in maniera alterna. Gli internodi, che possono raggiungere lunghezze superiori ai 30 cm, comprendono un parenchima di riserva, dove viene accumulato saccarosio, ed un tessuto vascolare. L'apparato radicale è di tipo fascicolato ma sono presenti anche delle radici aeree, con funzione di ancoraggio, e delle radici che riescono a penetrare nel terreno fino a 5-7 m di profondità consentendo l'assorbimento di acqua in condizioni di stress idrico (Bull, 2000). Le piante producono delle infiorescenze di tipo a panicolo, con caratteristiche variabili in funzione della specie, che racchiudono i fiori. La fecondazione è prevalentemente allogama e da essa si originano dei frutti chiamati "fuzz" che rimangono racchiusi all'interno di glumelle, antere e stigma. Tali semi sono recalcitranti e, se non disidratati, mantengono la capacità germinativa per tempi estremamente ridotti, perdendo oltre il 90% della vitalità in 80 giorni a 28°C (Moore e Nuss, 1987).

La coltivazione della canna da zucchero è basata principalmente sull'utilizzo di ibridi commerciali ottenuti dall'incrocio tra *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum*; la prima specie è caratterizzata dalla capacità di accumulare zuccheri negli internodi ma risulta estremamente sensibile ai patogeni, la seconda invece non è in grado di accumulare

zucchero ma è resistente alle fitopatie. Gli ibridi, pertanto, permettono di fondere le caratteristiche produttive di *S. officinarum* con quelle di resistenza alla patologie di *S. spontaneum* (Bull e Glasziou, 1979). Le cultivar commerciali sono propagate vegetativamente mediante l'utilizzo delle gemme presenti sulle plantule o sui polloni restanti in campo successivamente alla raccolta (Willcox *et Al.*, 2000).

La selezione di nuove cultivar richiede la disponibilità di variabilità genetica da poter utilizzare per il miglioramento mediante programmi di incrocio, per tal motivo è di fondamentale importanza la conservazione delle cultivar tradizionali di canna da zucchero. Vista la produzione di semi recalcitranti normalmente la conservazione del germoplasma di canna da zucchero è stata attuata mediante il ricorso a collezioni di piante in campo, le quali però hanno lo svantaggio di essere esposte a fitopatologie e ad eventuali avversità fisiche. A causa di ciò circa il 61 % dei cloni presenti nelle collezioni del germoplasma statunitensi è stato perduto tra il 1957 ed il 1977 (Gonzalez-Arno *et AL.*, 1993^a; Paulet *et AL.*, 1993). La conservazione in vitro del germoplasma consente di far fronte a tali eventi sfavorevoli; per tal motivo molti cloni di canna da zucchero sono stati e continuano ad essere sottoposti a conservazione mediante coltura in crescita rallentata. Tale tipologia di conservazione presenta però elevati costi di gestione e rischi legati all'insorgenza di contaminazioni e di variazioni somaclonali. Per tal motivo lo stoccaggio in azoto liquido mediante le tecniche di crioconservazione appare il mezzo più sicuro per una conservazione a lungo termine dei vari cloni di canna da zucchero (Gonzalez-Arno *et AL.*, 1993^a). Varie ricerche hanno puntato all'ottimizzazione del protocollo di crioconservazione mediante la tecnica dell'incapsulamento-disidratazione, ottenendo degli ottimi risultati su numerosi cloni e definendo, in tal modo, un protocollo largamente applicabile per la conservazione in azoto liquido. Con la presente ricerca si è voluta comparare la tecnica di incapsulamento-disidratazione, messa a punto precedentemente, con l'emergente metodologia di vitrificazione in goccia. Tale confronto è stato effettuato analizzando gli effetti determinanti dalle due tecniche su due differenti cloni di canna da zucchero (H70-144 e CP68-1026).

10.2 Materiali e metodi

10.2.1 Materiale vegetale

Per l'esecuzione delle presenti ricerche è stato utilizzato del materiale vegetale di due varietà: H70-144, di origine Hawaiana, e CP68-1026, originaria di Canal Point (Stati Uniti); tale materiale è stato fornito dal CIRAD di Baillarguet (Francia).

Le piante madri sono state coltivate su mezzo solido MS (1962) mantenuto a pH 5,6 arricchito con 60 g/l di saccarosio e sottoposte a trasferimento con cadenza mensile. Le condizioni di coltura hanno previsto una temperatura di $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ed un fotoperiodo di 12 ore ottenuto mediante illuminazione con tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

Gli espianti utilizzati per gli esperimenti di crioconservazione, prelevati mediante l'ausilio di un microscopio da dissezione all'interno di cappa a flusso laminare, consistevano nel meristema apicale con 1-2 primordi fogliari e la parte basale; essi misuravano mediamente 0,5-1 mm. La dissezione degli apici vegetativi è stata effettuata dopo circa 30-40 giorni dall'ultimo trasferimento delle piante madri. Gli espianti prima di essere sottoposti ai rispettivi protocolli sperimentali di crioconservazione sono stati mantenuti per una notte in condizioni di oscurità a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ su mezzo MS solido (1962) arricchito con 60 g/l di saccarosio e con pH 5,6.

10.2.2 Crioconservazione

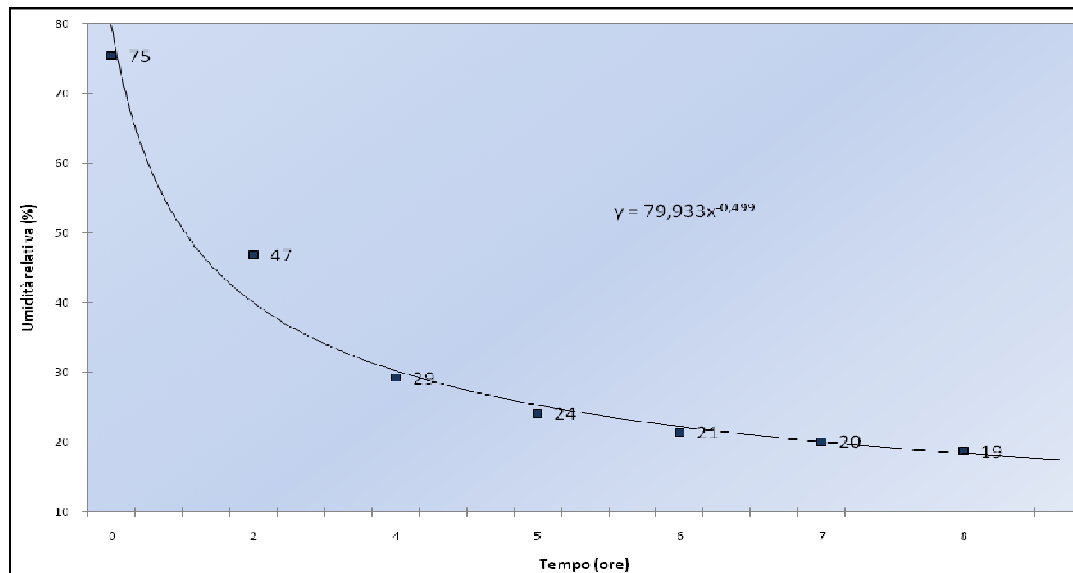
La crioconservazione degli espianti apicali è stata eseguita mediante il ricorso alle tecniche di incapsulamento-disidratazione e vitrificazione in goccia.

Il protocollo per l'incapsulamento-disidratazione ha previsto, successivamente al mantenimento degli espianti per una notte in condizioni di oscurità, la loro inclusione in capsule di alginato di calcio al 3%. Tale incapsulamento è stato realizzato immergendo dapprima gli espianti in un mezzo MS privo di calcio e arricchito in alginato di sodio al 3% e, successivamente, sottoponendoli a gocciolamento in mezzo MS con 0,1 M di cloruro di calcio. In tal modo si è provocata la polimerizzazione dell'alginato in biglie contenenti gli apici vegetativi.

Le capsule contenenti gli espianti sono state sottoposte ad un trattamento di osmoprotezione mediante l'immersione in agitazione (90 oscillazioni/minuto) per 24 ore in un mezzo 0,75 M di saccarosio, condizione risultata ottimale dalle prove sperimentali di incapsulamento-disidratazione attuate da Gonzalez-Arno *et Al.* (1993^b) su sei varietà commerciali di canna da zucchero.

Successivamente alla protezione osmotica gli espianti si trovavano nelle condizioni ottimali per procedere alla successiva fase di disidratazione, la quale è stata attuata all'interno di barattoli del tipo magenta contenenti gel di silice, ponendo 10 biglie di alginato di calcio per contenitore. Le biglie contenenti gli espianti sono state sottoposte a disidratazione fino al raggiungimento di differenti livelli di umidità relativa (20-35%

U.R.). La disidratazione mediante gel di silice è stata preferita alle altre tecniche in quanto consente l'attuazione di condizioni standardizzate e replicabili.



10-1: Curva standard di disidratazione mediante gel di silice di biglie di alginato di calcio 3% sottoposte a pretrattamento con saccarosio 0,75 M per 24 ore.

Il congelamento degli espanti inclusi nelle capsule di alginato di calcio è stato attuato ponendoli in crioprovette da 2 ml e provvedendo alla loro diretta immersione in azoto liquido.

Successivamente alla permanenza delle capsule per almeno 5 minuti in azoto liquido esse sono state scongelate ponendole nelle capsule Petrie contenenti il mezzo di ricrescita all'interno della cappa a flusso laminare.

Il protocollo di vitrificazione in goccia ha previsto, invece, la sottoposizione degli espanti, lasciati per una notte in condizioni di oscurità, al trattamento di immersione in soluzione di loading (2 M glicerolo e 0,4 M saccarosio) per 20 minuti col fine di fornire protezione osmotica nei confronti della successiva fase di disidratazione con soluzione vitrificante.

La disidratazione osmotica è stata attuata mediante immersione degli espanti in soluzione vitrificante (PVS) per differenti durate. Le soluzioni vitrificanti utilizzate sono state PVS A1 (glicerolo 30% p/v, DMSO 15% p/v, EG 15% p/v, saccarosio 13,7 % p/v) e PVS B1 (glicerolo 50% p/v e saccarosio 50% p/v) e i tempi di disidratazione sono stati rispettivamente di 20 - 80 minuti e 20-100 minuti. Mentre la disidratazione con PVS B1 è stata attuata a temperatura ambiente quella con PVS A1, vista la maggiore capacità

penetrante di questa, è stata attuata a 0°C ponendo le capsule Petrie contenenti la soluzione su del ghiaccio.

Il congelamento degli espianti è stato realizzato ponendoli in gocce di soluzione vitrificante poste su strisce di carta alluminio e provvedendo alla loro diretta immersione in azoto liquido, dove gli espianti sono stati lasciati per l'intervallo di 5 minuti.

Gli espianti sono stati quindi scongelati immergendoli in soluzione di unloading a temperatura ambiente dove sono stati lasciati per 20 minuti col fine di ridurre la tossicità dovuta alla soluzione di vitrificazione. Successivamente a ciò è stato possibile porre i campioni sul mezzo di ricrescita.

Il mezzo di ricrescita utilizzato, sia nell'esperienza di incapsulamento-disidratazione che di vitrificazione in goccia, è stato un mezzo solidificato MS (1962) mantenuto a pH 5,6 ed arricchito con 30 g/l di saccarosio, 0,2 mg/l di BAP e 0,1 mg/l di chinetina. I campioni sono stati inizialmente coltivati a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni di oscurità per poi essere sottoposti ad un fotoperiodo di 12 ore attuato mediante illuminazione con tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

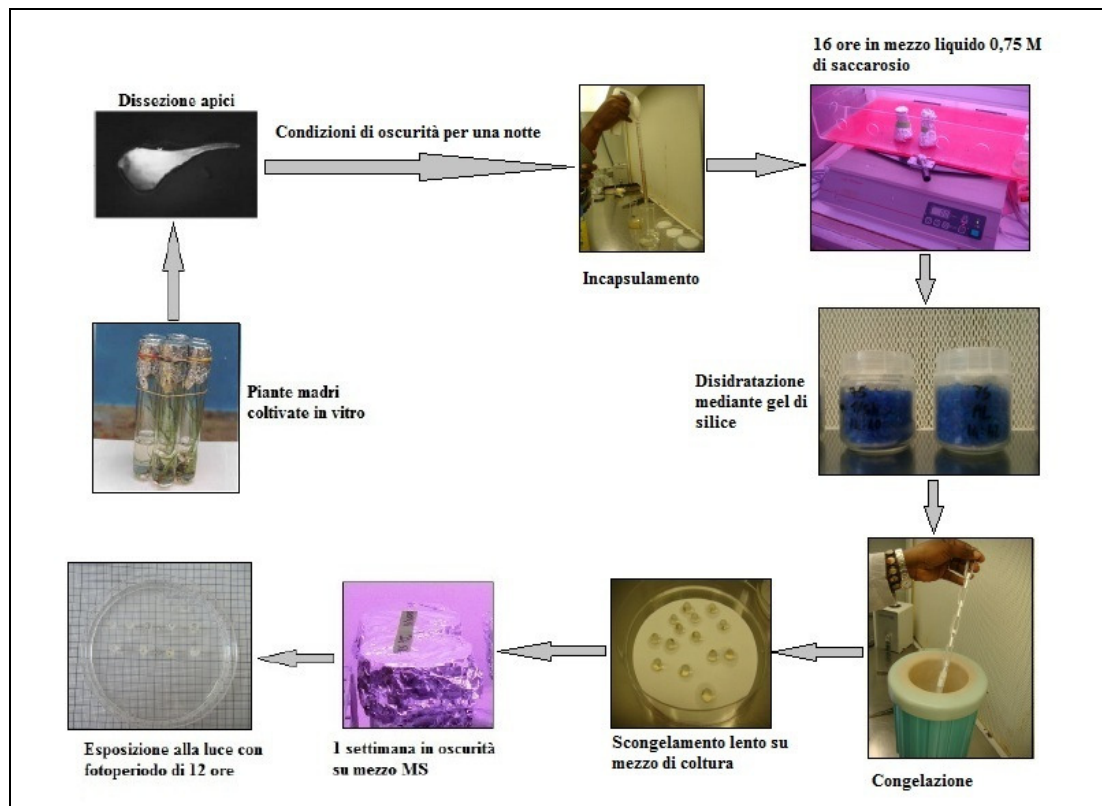


Figura 10-1: Rappresentazione schematica del protocollo di incapsulamento disidratazione utilizzato per la crioconservazione della canna da zucchero.

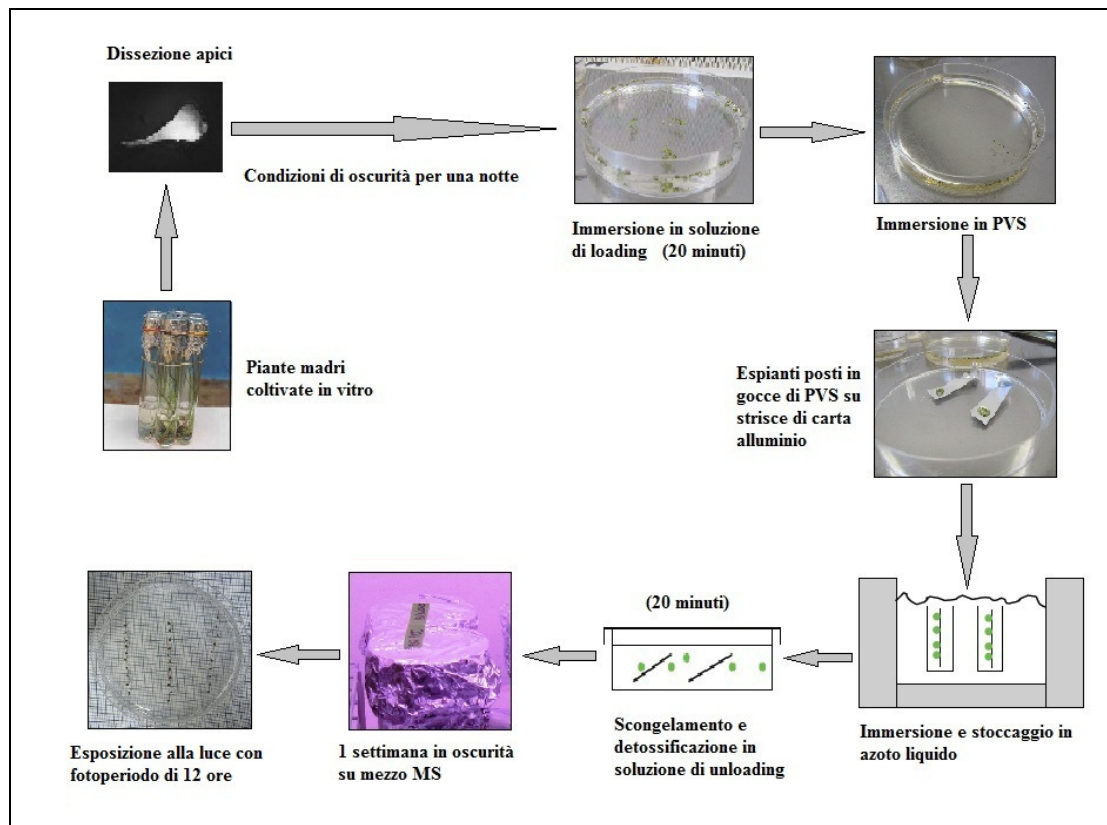


Figura 10-2: Rappresentazione schematica del protocollo di vitrificazione in goccia applicato ad apici vegetativi di canna da zucchero.

10.2.3 Valutazione sopravvivenza e ricrescita

L'effetto dei differenti trattamenti sulla crioconservazione dei due cloni di canna da zucchero è stato analizzato prendendo in esame i parametri sopravvivenza e ricrescita. La sopravvivenza è stata intesa come mantenimento della colorazione verde e osservazione di un aumento del volume, segno di attività vitale. Gli apici morti in seguito all'applicazione del protocollo di crioconservazione hanno normalmente mostrato una colorazione bianco-brunastro. La sopravvivenza è stata valutata dieci giorni dopo lo svolgimento degli esperimenti.

La ricrescita è stata valutata dopo quaranta giorni dall'effettuazione degli esperimenti e con tale parametro si è intesa la produzione di normali germogli da parte degli espianti. Entrambe i parametri sono stati espressi come percentuale sul totale degli espianti trattati; per ciascuna condizione sperimentale le medie sono state eseguite sulla base di 3 repliche di 10 espianti.



Figura 10-3: Plantula di canna da zucchero dopo 40 giorni dal congelamento

I risultati sono stati analizzati mediante il software di analisi statistica SPSS, eseguendo l'analisi della varianza (ANOVA) basata sul test di Duncan; l'ANOVA è stata realizzata sui dati percentuali di sopravvivenza e ricrescita sottoposti a trasformazione con arcoseno.

10.3 Risultati

L'analisi dei risultati ottenuti con l'applicazione della crioconservazione ai due cloni mediante vitrificazione in goccia permette di evidenziare un loro comportamento analogo nei confronti delle due soluzioni vitrificanti. Le due varietà mostrano una buona tolleranza alle due soluzioni manifestata da un decadimento lento della sopravvivenza e della ricrescita con l'aumentare dei tempi di esposizione alle stesse.

Il clone H70-144 ha fatto registrare la migliore capacità di sopravvivenza e ricrescita post-congelamento in gocce di PVS A1 dopo 20 e 40 minuti di disidratazione nella soluzione vitrificante; la sopravvivenza ottenuta è stata rispettivamente del 43 e del 47% (valori non statisticamente differenti tra loro) mentre la ricrescita è stata rispettivamente del 37 e del 33%. CP68-1026 ha mostrato una minore resistenza al congelamento in azoto liquido in seguito ad applicazione del protocollo di vitrificazione in goccia mediante PVS A1; tale clone in tali condizioni sperimentali ha fatto registrare un valore massimo di sopravvivenza del 20% dopo 40 minuti di disidratazione osmotica.

Tabella 10-1: Effetto della vitrificazione in goccia con PVS A1 sulla sopravvivenza di espianti dei due cloni di canna da zucchero sottoposti a congelamento in azoto liquido (+LN) e non (-LN).

| | | Durata trattamento | | | | |
|------------|-----|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 min | 20 min | 40 min | 60 min | 80 min |
| H70-144 | -LN | 87 a | 77 ab | 60 bc | 40 cd | 23 d |
| | +LN | 0 c | 43 a | 47 a | 27 b | 23 b |
| CP 68-1026 | -LN | 77 a | 63 ab | 50 bc | 33 cd | 27 d |
| | +LN | 0 b | 17 a | 23 a | 17 a | 17 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 10-2: Effetto della vitrificazione in goccia con PVS A1 sulla ricrescita di espianti dei due cloni di canna da zucchero sottoposti a congelamento in azoto liquido (+LN) e non (-LN).

| | | Durata trattamento | | | | |
|------------|-----|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 min | 20 min | 40 min | 60 min | 80 min |
| H70-144 | -LN | 80 a | 67 ab | 50 bc | 33 cd | 17 d |
| | +LN | 0 d | 37 a | 33 a | 23 b | 13 c |
| CP 68-1026 | -LN | 73 a | 53 b | 50 b | 27 c | 23 c |
| | +LN | 0 c | 7 b | 20 a | 10 ab | 10 ab |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

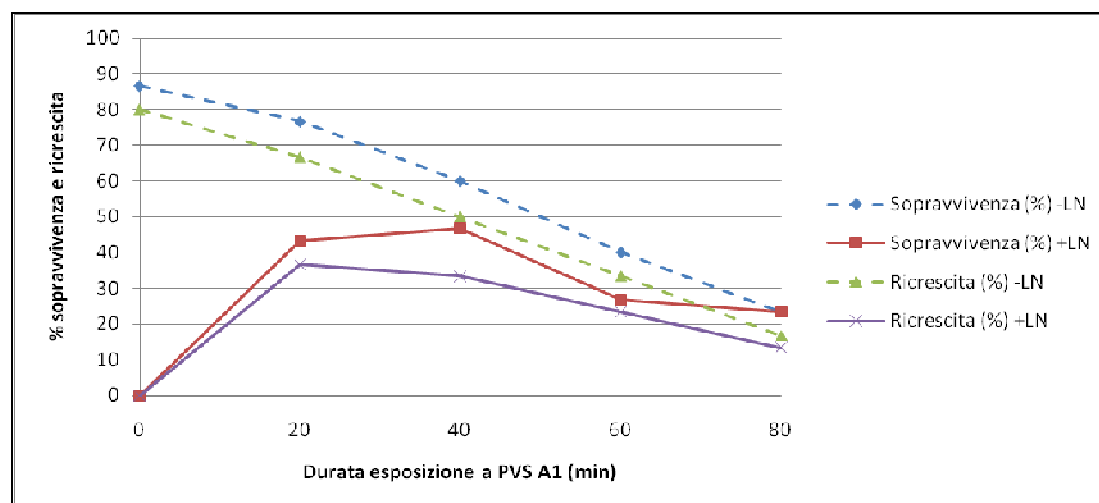


Grafico 10-2: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti del clone H70-144 sottoposti a vitrificazione in goccia mediante PVS A1 e sottoposti (+LN) o meno (-LN) a crioconservazione.

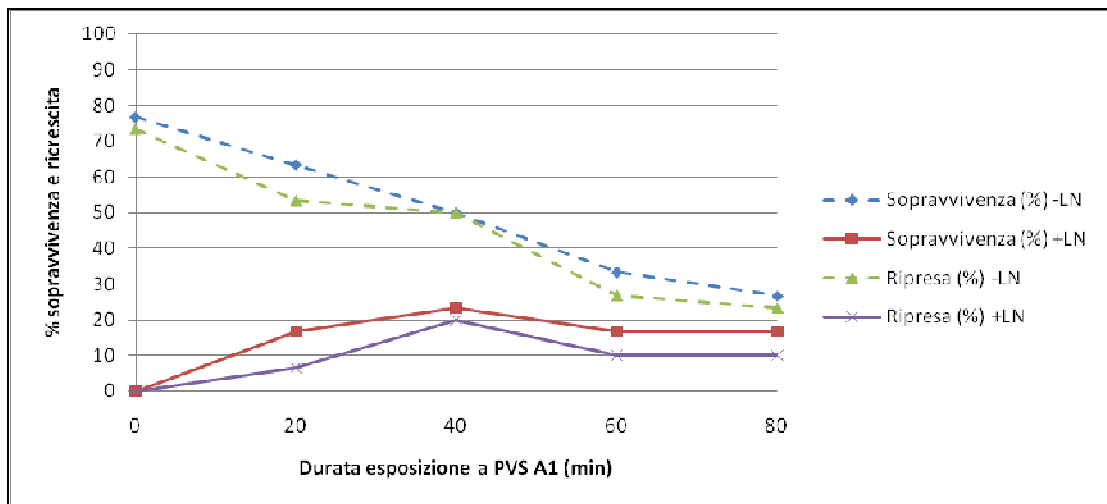


Grafico 10-3: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti del clone CP68-1026 sottoposti a vitrificazione in goccia mediante PVS A1 e e immersi (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido.

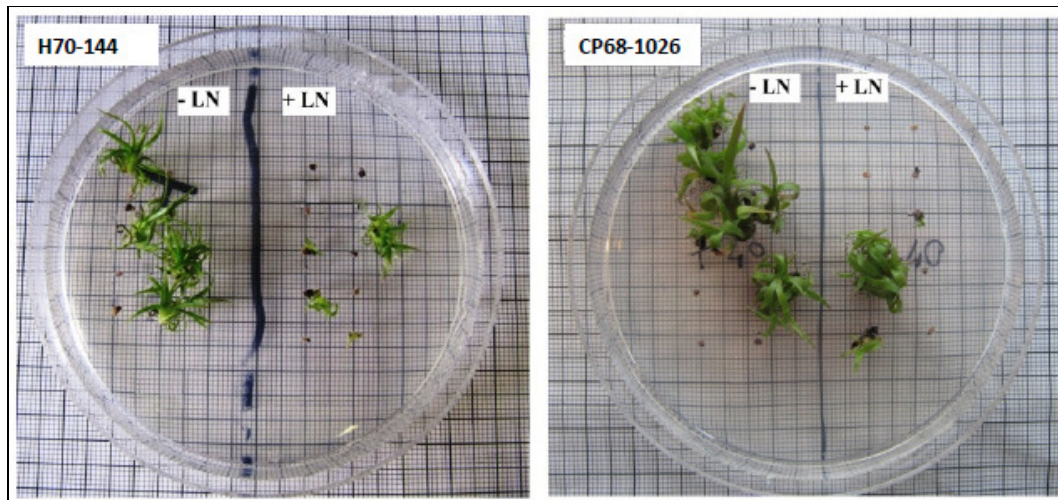


Figura 10-4: Espianti di canna da zucchero dei cloni H70-144 e CP68-1026 sottoposti a protocollo di vitrificazione in goccia utilizzando PVS A1 sottoposti a congelamento (+LN) o meno (-LN) osservati dopo 40 giorni dall'esperimento.

Gli espianti della varietà H70-144 hanno sopportato meglio il processo di congelazione in azoto liquido mediante protocollo di vitrificazione in goccia con PVS B1 qualora immersi in soluzione vitrificante per una durata di 20; in tali condizioni il valore di sopravvivenza è stato del 53%. Nonostante tale elevato tasso di sopravvivenza parte degli espianti non sono stati in grado di riprendere la produzione di germogli, ragion per cui il valore di ricrescita si è attestato soltanto al 33%. Relativamente al clone CP68-1026, i migliori valori di sopravvivenza e ricrescita sono stati osservati con durate di disidratazione osmotica in PVS B1 di 20 e 40 minuti. In tali condizioni la sopravvivenza è stata rispettivamente del 40 e

del 43% (valori non statisticamente differenti) mentre la ripresa dell'accrescimento è stata del 27%.

Tabella 10-3: Effetto della vitrificazione in goccia con PVS B1 sulla sopravvivenza di espianti dei due cloni di canna da zucchero sottoposti a congelamento in azoto liquido (+LN) e non (-LN).

| | | Durata trattamento | | | | | |
|------------|-----|--------------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | | 0 min | 20 min | 40 min | 60 min | 80 min | 100 min |
| H70-144 | -LN | 80 a | 83 a | 50 b | 53 b | 43 bc | 22 c |
| | +LN | 0 c | 53 a | 37 ab | 27 b | 20 b | 3 c |
| CP 68-1026 | -LN | 97 a | 87 ab | 60 bc | 53 bc | 43 c | 27 c |
| | +LN | 0 d | 40 a | 43 a | 30 ab | 20 b | 7 c |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 10-4: Effetto della vitrificazione in goccia con PVS B1 sulla ripresa dell'accrescimento di espianti dei due cloni di canna da zucchero sottoposti a crioconservazione (+LN) e non (-LN).

| | | Durata trattamento | | | | | |
|------------|-----|--------------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | | 0 min | 20 min | 40 min | 60 min | 80 min | 100 min |
| H70-144 | -LN | 63 a | 73 a | 30 b | 37 b | 30 b | 9 c |
| | +LN | 0 c | 33 a | 17 ab | 10 bc | 10 ac | 3 bc |
| CP 68-1026 | -LN | 93 a | 87 a | 37 b | 47 b | 37 b | 20 b |
| | +LN | 0 b | 27 a | 27 a | 17 a | 17 a | 7 ab |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

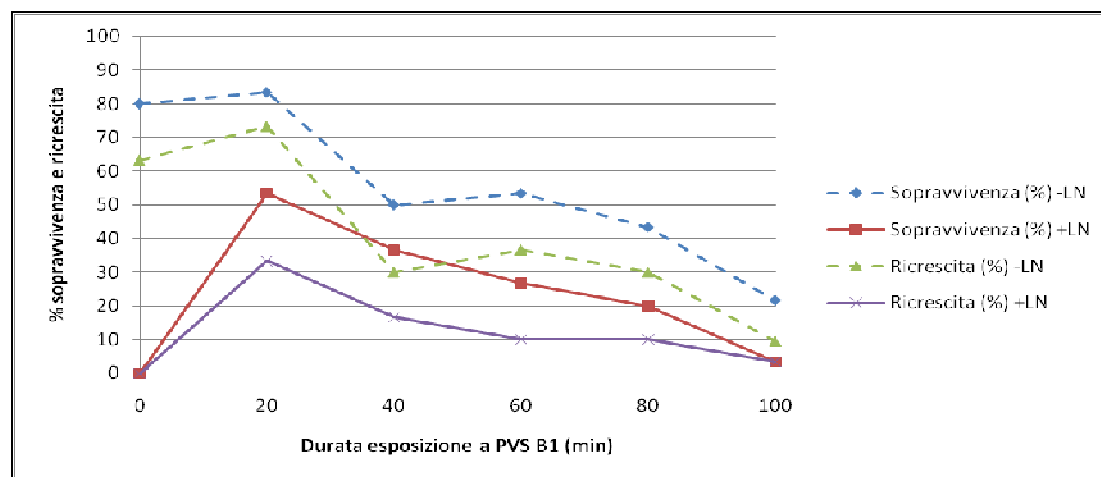


Grafico 10-4: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti del clone H70-144 sottoposti a vitrificazione in goccia mediante PVS B1 e immersi (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido.

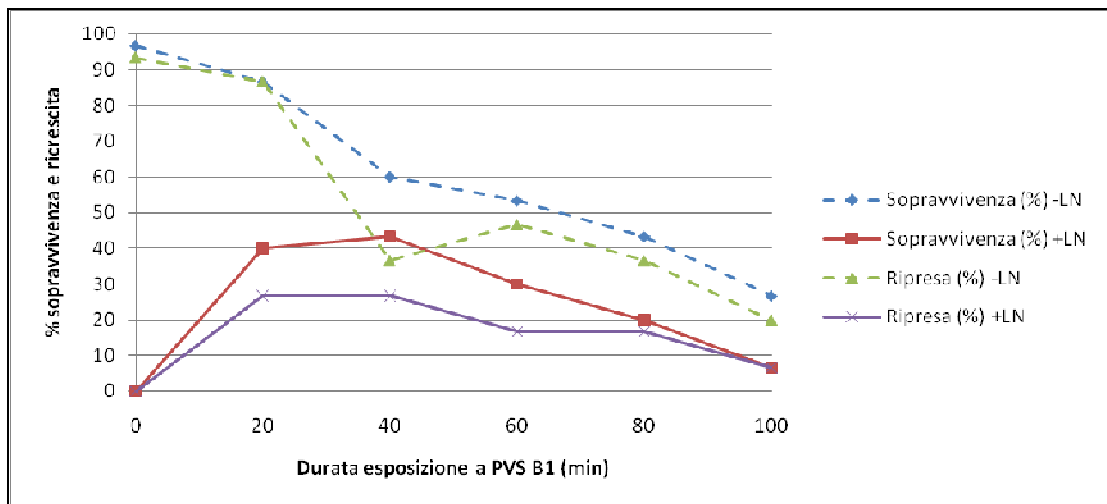


Grafico 10-5: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti del clone CP68-1026 sottoposti a vitrificazione in goccia mediante PVS B1 e immersi (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido.

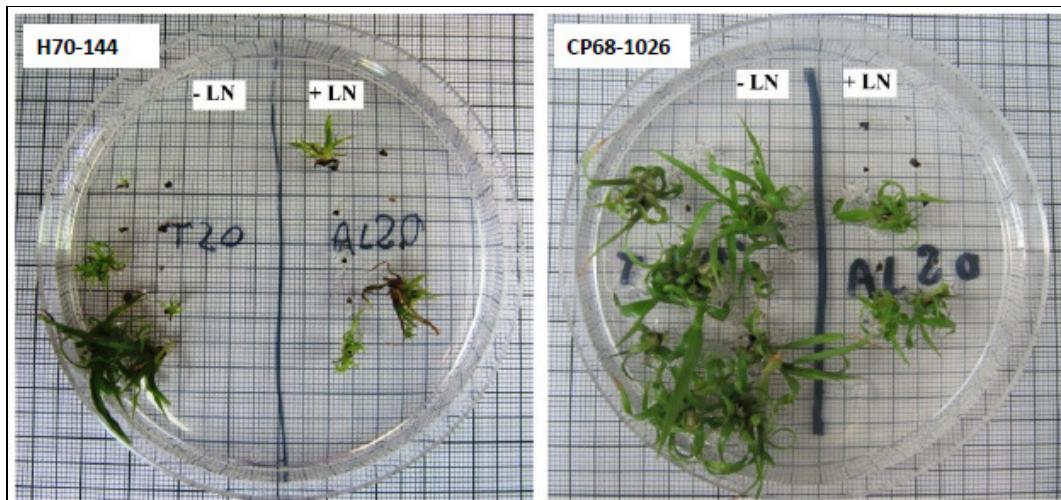


Figura 10-5: Espianti di canna da zucchero dei cloni H70-144 e CP68-1026 sottoposti a protocollo di vitrificazione in goccia utilizzando PVS B1 sottoposti a congelamento (+LN) o meno (-LN) osservati dopo 40 giorni dall'esperimento.

Nel caso dell'applicazione della tecnica di vitrificazione in goccia entrambe i cloni hanno mostrato una maggiore rapidità di accrescimento dei germogli prodotti qualora esposti alle soluzioni vitrificanti per inferiori lassi di tempo, i quali hanno inoltre garantito i migliori tassi di sopravvivenza.

L'applicazione del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione ha permesso di apprezzare la buona resistenza di entrambe i cloni nei confronti della disidratazione fino a livelli del 20% di umidità relativa, ottenuti dopo mantenimento per 7 ore in contenitori con gel di silice. I livelli di sopravvivenza e

ricrescita dei controlli non sottoposti a congelamento si sono mantenuti sostanzialmente costanti nel caso del clone CP 68-1026, non facendo registrare delle differenze significative; nel caso del clone H70-144 la ricrescita e la sopravvivenza hanno fatto registrare un andamento leggermente decrescente con l'aumentare del livello di disidratazione. Entrambe i cloni hanno mostrato una maggiore resistenza al congelamento qualora disidratati fino ai livelli inferiori di umidità relativa. I maggiori livelli percentuali di sopravvivenza e ricrescita per entrambe i cloni sono stati ottenuti mediante disidratazione fino ad un livello di umidità relativa del 20%; in corrispondenza di tale contenuto idrico il clone H70-144 ha fatto registrare una ricrescita del 60% e CP68-1026 del 53%. Nel caso dell'incapsulamento-disidratazione i campioni sottoposti a maggiore disidratazione hanno mostrato una minore velocità di accrescimento dei germogli prodotti, pur non compromettendo le percentuali di sopravvivenza e ricrescita.

Tabella 10-5: Effetto del protocollo di incapsulamento-disidratazione sulla sopravvivenza di espianti dei due cloni di canna da zucchero sottoposti a congelamento in azoto liquido (+LN) e non (-LN).

| | | Umidità relativa | | | | | |
|------------|-----|------------------|------|------|-------|-------|------|
| | | 75% | 35% | 30% | 25% | 22% | 20% |
| H70-144 | -LN | 94 a | 93 a | 87 b | 77 bc | 77 bc | 50 c |
| | +LN | 0 c | 0 c | 10 c | 27 b | 47 ab | 60 a |
| CP 68-1026 | -LN | 79 a | 87 a | 86 a | 86 a | 90 a | 83 a |
| | +LN | 0 c | 0 c | 6 b | 10 b | 43 a | 53 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

Tabella 10-6: Effetto del protocollo di incapsulamento-disidratazione sulla ricrescita di espianti dei due cloni di canna da zucchero sottoposti a congelamento in azoto liquido (+LN) e non (-LN).

| | | Umidità relativa | | | | | |
|------------|-----|------------------|-------|------|-------|-------|------|
| | | 75% | 35% | 30% | 25% | 22% | 20% |
| H70-144 | -LN | 94 a | 90 ab | 80 b | 73 bc | 60 Cd | 47 d |
| | +LN | 0 c | 0 c | 10 c | 23 b | 40 Ab | 60 a |
| CP 68-1026 | -LN | 79 a | 87 a | 86 a | 80 a | 80 A | 83 a |
| | +LN | 0 c | 0 c | 6 b | 7 b | 37 A | 53 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

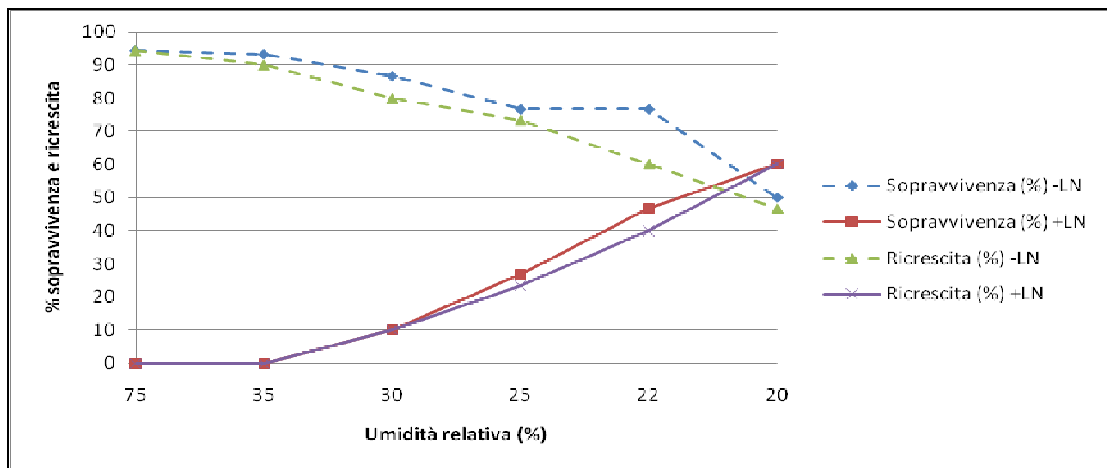


Grafico 10-6: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti del clone H70-144 sottoposti al protocollo di incapsulamento-disidratazione e immersi (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido.

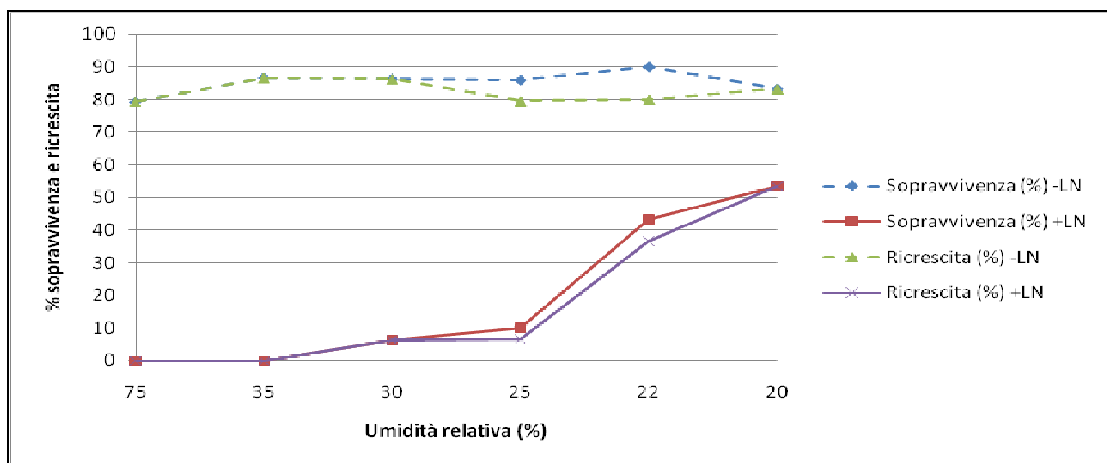


Grafico 10-7: Curve di sopravvivenza e ricrescita di espianti del clone CP68-1026 sottoposti al protocollo di incapsulamento-disidratazione e immersi (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido.

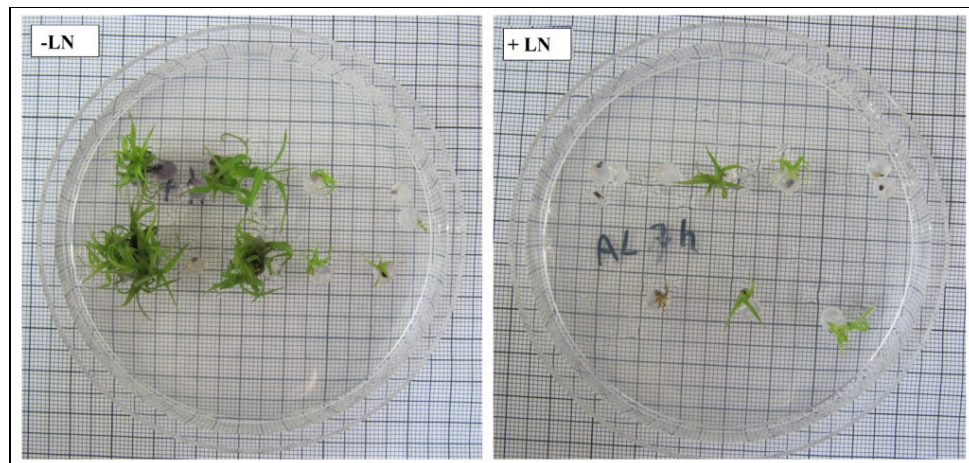


Figura 10-6: Espianti di del clone H70-144 sottoposti a protocollo di incapsulamento-disidratazione sottoposti a congelamento (+LN) o meno (-LN) osservati dopo 40 giorni dall'esperimento.

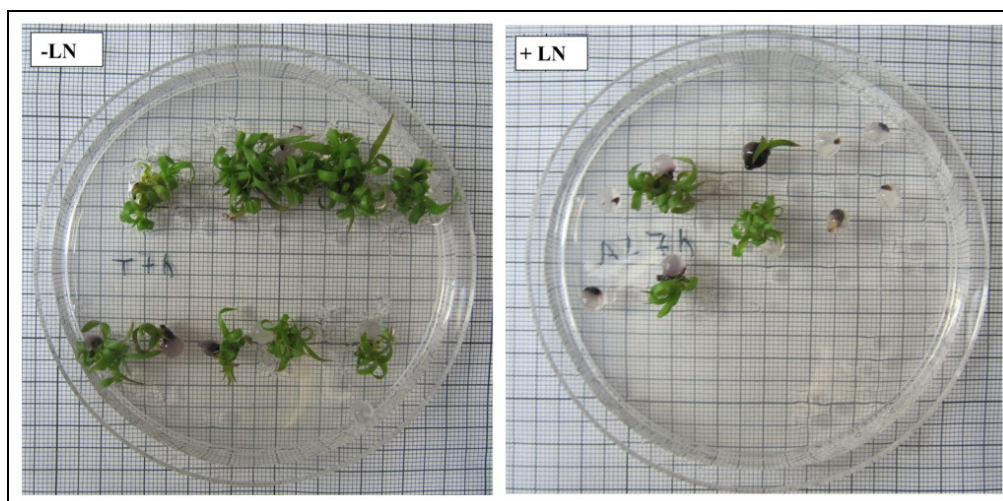


Figura 10-7: Espianti di del clone CP68-1026 sottoposti a protocollo di incapsulamento-disidratazione sottoposti a congelamento (+LN) o meno (-LN) osservati dopo 40 giorni dall'esperimento.

Comparando i tre esperimenti svolti sui due cloni di canna da zucchero è stato possibile apprezzare la superiorità dell'incapsulamento-disidratazione nei confronti delle tecniche di vitrificazione in goccia. La produzione di germogli post-scongelo in entrambe i cloni è stata significativamente maggiore per i campioni sottoposti al protocollo di incapsulamento-disidratazione.

Tabella 10-7: Comparazione di sopravvivenza e ricrescita dei cloni H70-144 e CP68-1026 in seguito a crioconservazione mediante vitrificazione in goccia (PVS A1 e PVS B1) e incapsulamento-disidratazione (E-D).

| Clone | Parametro | PVS A1 | PVS B1 | ED |
|-----------|---------------|--------|--------|------|
| H70 144 | Sopravvivenza | 43 a | 53 a | 60 a |
| | Ricrescita | 37 b | 33 b | 60 a |
| CP68 1026 | Sopravvivenza | 23 b | 40 ab | 53 a |
| | Ricrescita | 20 b | 27 b | 53 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan applicato alla loro trasformazione angolare in arcoseno.

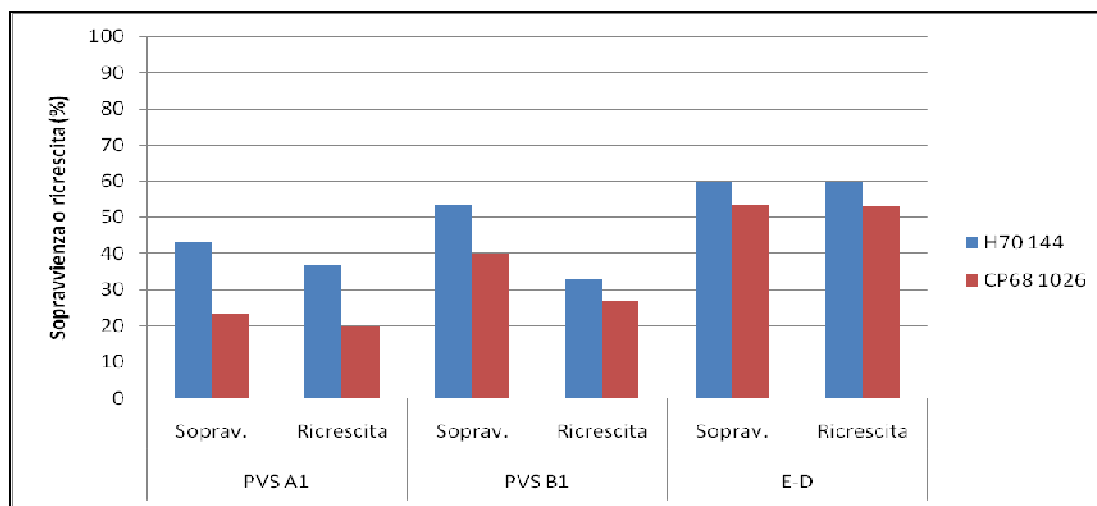


Grafico 10-8: Effetto della vitrificazione in goccia (mediante PVS A1 e PVS B1) e incapsulamento disidratazione (E-D) su sopravvivenza e ricrescita di espianti dei cloni H70-144 e CP68-1026.

10.4 Discussione

Il presente lavoro ha confermato i risultati ottenuti Gonzalez-Arnao e collaboratori (1993^{a,b}) e Paulet e collaboratori (1993) inerenti l'efficacia della crioconservazione per lo stoccaggio a lungo termine di apici vegetativi di canna da zucchero. La crioconservazione di tali organi vegetativi costituisce un mezzo sicuro per la conservazione del germoplasma di canna da zucchero in quanto garantisce prolungata sopravvivenza e stabilità genetica del materiale stoccato.

Le presenti ricerche hanno permesso di evidenziare l'adattabilità di tale specie agraria ad entrambe le tecniche crioconservative (vitrificazione in goccia ed incapsulamento-disidratazione); nonostante ciò dei risultati nettamente superiori in termini di sopravvivenza e ricrescita degli espianti sono stati ottenuti mediante l'applicazione del protocollo di incapsulamento-disidratazione.

La canna da zucchero si è mostrata una pianta in grado di sopportare la disidratazione ed il congelamento in azoto liquido, caratteristica messa in evidenza dai notevoli tassi di accrescimento sia dei controlli che dei campioni congelati in azoto liquido. Maggiori tassi di disidratazione hanno comportato una leggera riduzione della velocità iniziale di ricrescita nel caso di applicazione dell'incapsulamento-disidratazione; il minore contenuto idrico non ha però compromesso la vitalità degli espianti. Nell'applicazione del protocollo di vitrificazione in goccia una disidratazione osmotica prolungata ha determinato, invece, sia una riduzione della velocità di crescita che una riduzione della sopravvivenza degli espianti; ciò a causa della tossicità chimica e osmotica determinata dalle soluzioni

vitrificanti. Dall'osservazione di tale comportamento è possibile dedurre la necessità di applicare in maniera estremamente precisa il protocollo di vitrificazione in goccia mentre quello di incapsulamento disidratazione si mostra maggiormente flessibile, anche in virtù dei maggiori tempi di disidratazione richiesti.

Nonostante il variare delle percentuali di sopravvivenza e di ripresa dell'accrescimento ottenute per i differenti cloni, i loro valori massimi sono stati ottenuti con le medesime condizioni applicative; ciò, sulla base del presente lavoro e di ricerche eseguite da altri autori, può fare ritenere il protocollo crioconservativo utilizzabile in maniera pressoché standardizzata per i vari cloni di canna da zucchero.

CAPITOLO 11 Analisi istologica di apici vegetativi di *Dioscorea alata* sottoposti a crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione

11.1 Introduzione

La crioconservazione rappresenta la tecnica più evoluta per lo stoccaggio a lungo termine del germoplasma di specie propagate vegetativamente o producenti semi recalcitranti alla disidratazione. Tale tecnica consente uno stoccaggio del materiale per un tempo praticamente indeterminato in condizioni di sicurezza, con bassi costi di gestione delle collezioni e garantendo stabilità genetica. La lunga conservabilità del materiale stoccato mediante crioconservazione è dovuta all'arresto delle sue funzioni metaboliche grazie al suo mantenimento in condizioni di temperatura ultrabasse (-196°C) ottenute mediante immersione in azoto liquido.

Il successo delle tecniche crioconservative è basato sulla disidratazione degli espianti fino ad un contenuto idrico tale da evitare la formazione di ghiaccio intracellulare durante le fasi di congelamento e scongelamento che comporterebbero danni meccanici al materiale da conservare. Il processo di disidratazione deve essere preceduto da un trattamento di protezione osmotica per evitare dei danni alle proprietà colligative delle cellule. Sia il processo di disidratazione che quello di congelamento in azoto liquido sono dunque stressanti per gli espianti e possono determinare danni permanenti alle membrane cellulari, incapacità di svolgere il trasporto elettronico, interruzione della sintesi di lipidi, proteine, DNA ed RNA; tali fenomeni ovviamente compromettono la crioconservabilità del materiale vegetale. Visto che numerosi sono i fattori che possono impedire il successo della crioconservazione si è ritenuto opportuno attuare una ricerca avente come finalità lo studio dei processi cito-istologici che si verificano durante l'applicazione del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione. Nel corso degli anni sono state attuate diverse ricerche miranti a definire il comportamento di espianti vegetali di vario tipo (cellule, apici meristemati, embrioni) nel corso della crioconservazione ma tali ricerche sono state basate principalmente su un'analisi di tipo qualitativo. Con la presente ricerca si è voluta integrare la tradizionale osservazione microscopica qualitativa con un'analisi quantitativa attuata mediante software specifico (ImageJ), col fine di comprendere i fattori connessi al successo della crioconservazione degli espianti vegetali.

Lo studio è stato attuato utilizzando come pianta modello *Dioscorea alata*, una specie originaria del sud-est asiatico e costituente un'importante fonte alimentare soprattutto in Africa, nelle Isole Caraibiche e in Melanesia (Choi *et Al.*, 2002). *Dioscorea alata* appartiene al genere *Dioscorea*, famiglia delle Dioscoreaceae (monocotiledoni), il quale comprende circa 600 specie lianose, volgarmente chiamate ignami, diffuse nei paesi tropicali e subtropicali. Numerose specie appartenenti a tale genere sono coltivate o raccolte con finalità alimentari o per un'utilizzazione medicinale (Choi *et Al.*, 2002; Ovono *et AL.*, 2007). Tali piante sono in grado di produrre dei tuberi sotterranei, ricchi di amido, che costituiscono la parte della pianta utilizzata come alimento; essi costituiscono anche il materiale normalmente utilizzato, intero od in segmenti, per la propagazione di tali specie (Choi *et Al.*, 2002; Ovono *et AL.*, 2007).



Figura 11-1: Stelo con foglie e tuberi di *Dioscorea alata*.



Figura 11-2: Coltura di igname.

L'applicazione delle tecniche crioconservative agli ignami è stata oggetto di diversi programmi di ricerca e continua ad essere studiata da diversi istituti tra cui l'IRD di Montpellier presso il quale si è svolta la presente attività di studio. Nonostante l'elevato tasso di sopravvivenza ottenuto mediante il perfezionamento dei protocolli di crioconservazione spesso si è riscontrata la difficoltà di tali specie di dare origine ad una vera produzione di germogli successivamente allo scongelamento, considerazione che ha condotto alla decisione di utilizzare tale specie per l'attuazione di uno studio istologico. Il protocollo crioconservativo studiato è quello di incapsulamento-disidratazione visto che tale tecnica è quella prevalentemente utilizzata presso l'IRD di Montpellier per la crioconservazione del germoplasma di *Dioscorea* Spp. Tale ricerca è stata inserita all'interno del programma Cryoveg (IBiSA), volto al miglioramento delle tecniche di crioconservazione delle specie vegetali conservate presso le banche del germoplasma della Francia. Lo studio attuato su *Dioscorea alata*, visto l'elemento innovativo dovuta all'analisi istologica qualitativa, potrebbe inoltre costituire la base per la comprensione e l'ottimizzazione dei protocolli crioconservativi di altre specie.

11.2 Materiali e metodi

11.2.1 Materiale vegetale

Per l'attuazione della presente ricerca sono state utilizzate delle piante di *Dioscorea alata* appartenenti al clone 3746, collezionato in Nigeria, mantenute *in vitro* e propagate su mezzo basale MS (Murashige e Skoog, 1962) arricchito con 30 g/l di saccarosio, 2 g/l di carbone attivo, solidificato mediante l'utilizzo di 7 g/l di agar e mantenuto a pH 5,75. La coltivazione è stata attuata con una temperatura di $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e con un fotoperiodo di 12 ore ottenuto mediante illuminazione con tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

11.2.2 Crioconservazione

Per l'applicazione del protocollo di crioconservazione sono stati utilizzati degli espianti di 1-2 mm contenenti una gemma ascellare. La dissezione è stata effettuata a partire dai germogli sviluppatasi da microtalee precoltivate per una settimana in un mezzo con caratteristiche analoghe a quello utilizzato per le piante madri; tale condizione da prove sperimentali ha dimostrato di consentire il miglior tasso di uniformità degli espianti e la migliore sopravvivenza al congelamento in azoto liquido. Successivamente alla

dissezione gli espianti sono stati coltivati per 24 h in condizioni di oscurità così da consentire una ripresa dallo stress da dissezione prima dell'applicazione del protocollo di crioconservazione. Tale fase di ripresa dallo stress da dissezione è stata attuata su di un mezzo MS solido, definito M1, con un contenuto in saccarosio maggiore rispetto a quello utilizzato per le piante madri (100 g/l), così da fornire agli espianti anche una protezione osmotica nei confronti dei successivi trattamenti di loading e disidratazione.

Successivamente a tale precoltura gli espianti sono stati inclusi in capsule di alginato di calcio al 3%. Tale incapsulamento è stato realizzato immergendo dapprima gli espianti in un mezzo MS privo di calcio e arricchito in alginato di sodio al 3% e, successivamente, sottoponendoli a gocciolamento in mezzo MS con 0,1 M di cloruro di calcio. Le gocce sono state lasciate in tale soluzione per almeno 20 minuti prima di attuare le fasi successive del protocollo; in tal modo si è ottenuta una polimerizzazione sufficiente delle biglie di alginato di calcio contenenti gli apici vegetativi.

Le capsule contenenti gli espianti sono state sottoposte ad un trattamento di osmoprotezione mediante l'immersione in condizione di agitazione (90 oscillazioni/minuto) per 24 ore in un mezzo MS liquido 1,25 M di saccarosio, condizione risultata ottimale dalle prove sperimentali di incapsulamento-disidratazione realizzate presso l'IRD di Montpellier su cloni di *Dioscorea alata*.

Successivamente alla protezione osmotica gli espianti si trovavano nelle condizioni ottimali per procedere alla successiva fase di disidratazione, la quale è stata attuata all'interno di barattoli del tipo magenta contenenti gel di silice, ponendo 10 biglie di alginato di calcio per contenitore. Le biglie contenenti gli espianti sono state sottoposte a disidratazione fino al raggiungimento di umidità relativa di circa il 24%, ottenuto dopo 5 ore di trattamento con gel di silice.

Gli espianti disidratati sono stati posti in crioprovette da 2 ml e immersi direttamente in azoto liquido dove sono state lasciate per almeno 5 minuti. Lo scongelamento è stato attuato a temperatura ambiente ponendo le biglie di alginato di calcio con gli espianti in capsule Petri contenenti il mezzo di ricrescita, un mezzo base MS con caratteristiche analoghe a quello utilizzato per la coltivazione delle piante madri ma arricchito con 2 mg/l di BAP e 0,1 mg/l di NAA. L'inclusione di tali ormoni è risultata necessaria per consentire la ricrescita del materiale successivamente al congelamento. Dopo lo scongelamento gli espianti sono stati coltivati ad una temperatura di $27 \pm 1^\circ\text{C}$ dapprima in condizioni di oscurità per una settimana e successivamente con un fotoperiodo di 12 ore ottenuto

mediante illuminazione con tubi fluorescenti produttori luce bianco-fredda ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

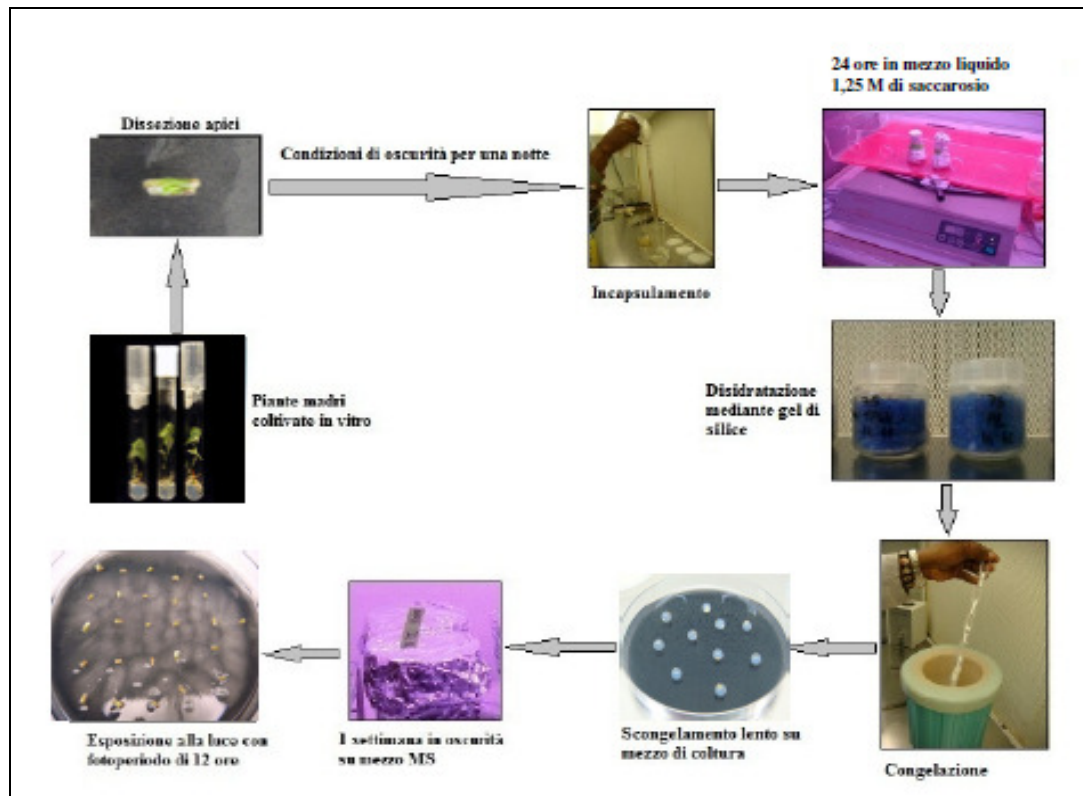


Figura 11-3: Rappresentazione schematica del protocollo di incapsulamento-disidratazione utilizzato per l'igname.

11.2.3 Analisi istologica

Lo studio istologico è stato effettuato su campioni sottoposti al protocollo di crioconservazione dopo differenti intervalli temporali: durante l'applicazione del protocollo, dopo una settimana, dopo 15 giorni, dopo 30 giorni dalla crioconservazione. Durante l'applicazione del protocollo di crioconservazione sono state osservate le seguenti condizioni:

- controllo dopo dissezione;
- controllo dopo una notte in oscurità su mezzo M1;
- pretrattamento di 24 ore in mezzo 1,25M di saccarosio;
- trattamento di disidratazione;
- azoto liquido.

Dopo una settimana dall'applicazione del protocollo sono stati osservati:

- pretrattamento di 24 ore in mezzo 1,25M di saccarosio;
- trattamento di disidratazione;
- azoto liquido.

Le condizioni analizzate dopo 15 e 30 giorni dalla sottoposizione degli espanti ad incapsulamento-disidratazione sono state invece:

- trattamento di disidratazione;
- azoto liquido.

I rilievi effettuati durante l'applicazione del protocollo sono stati sia di tipo qualitativo che di tipo quantitativo mentre nelle fasi successive si è proceduti alla sola osservazione qualitativa.

Gli espanti utilizzati per l'analisi istologica sono stati fissati mediante l'utilizzo di un tampone fosfato (pH 7,2) contenente il 2% di paraformaldeide, l'1% di gluteraldeide e l'1% di caffeina. Per la fissazione dei campioni della condizione successiva a trattamento con saccarosio 1,25 M si è provveduti anche all'aggiunta di saccarosio al fissatore (1,25 M) così da non determinare uno stress osmotico ai campioni. Il processo di fissazione ha previsto dapprima una fase di trattamento degli espanti immersi nel fissatore in condizioni di vuoto per la durata di 30 minuti ed il successivo stoccaggio di tale materiale a 4°C per 48 ore. I campioni fissati sono successivamente stati sottoposti a disidratazione mediante immersione in soluzioni contenenti alcol etilico con concentrazioni progressivamente crescenti (50, 70, 90, 95 e 100%) per una durata di 2 ore per ogni condizione. Successivamente alla disidratazione gli espanti sono stati immersi in butanolo (dapprima 50% per una notte, poi 80% per 2 ore ed infine 100% per una notte) prima di essere sottoposti ad impregnazione con resina (Technovit resin, Heraeus, Kulzer, Wehrheim, Germania), la quale è stata attuata in due tempi, dapprima in resina al 50% per 2 giorni e poi in resina 100% per 3 giorni. Successivamente a tale fase è stato possibile includere gli espanti in blocchi di resina e, successivamente al raggiungimento di un grado di essiccazione sufficiente, provvedere al taglio dei blocchi in sezioni da 3,5 µM di spessore. Tale sezionamento è stato attuato mediante il ricorso ad un microtome rotativo (Microm HM 355 S). Le sezioni così ottenute, fissate su vetrini, sono state sottoposte a colorazione con Acido periodico-Schiff (Sigma-Aldrich, Lione, Francia) e Naphthol blue black (NBB, Sigma-Aldrich, Lione, Francia). Tale tipologia di doppia colorazione consente di evidenziare i polisaccaridi, che assumono colorazione rossastra e le proteine non solubili che prendono un colore bluastro. I campioni sono stati osservati mediante un microscopio ottico Leica DM-6000 equipaggiato con camera Retiga 2000R mediante la quale sono state

catturate le immagini a due ingrandimenti (10x e 40x). Le immagini sono state elaborate mediante il software Volocity (Improvision).

11.2.4 Ottenimento dati quantitativi e loro elaborazione

Le immagini ottenute mediante osservazione al microscopio ottico con fattore di ingrandimento 40x sono state utilizzate per l'analisi di tipo quantitativo. Tale analisi è stata effettuata utilizzando il programma open source ImageJ. I parametri osservati sono stati:

- la riduzione di volume citoplasmatico (%) dovuta a plasmolisi;
- il rapporto nucleo/citoplasma;
- l'area del nucleo;
- mean citoplasma, rappresentante il valore medio della scala dei grigi relativo al citoplasma;
- mean nucleo, costituente il valore medio della scala dei grigi relativo al nucleo.

La riduzione di volume citoplasmatico dovuta a plasmolisi è stata calcolata mediante la seguente formula:

$$\text{Riduzione di volume} = (\text{volume parete} - \text{volume citoplasma}) / \text{volume parete} * 100$$

Il valore mean, visto che la colorazione del nucleo e del citoplasma è dovuta principalmente alle tonalità blu assunte dalle proteine non solubili in seguito a trattamento con Naphthol blue black, può essere ritenuta come un'importante indicatore del contenuto in proteine del citoplasma e del nucleo.

Le osservazioni sono state eseguite su 3 apici per condizione e per ognuno di essi sono state analizzate 3 fotografie. Sono state analizzate 3 tipologie di aree cellulari:

- L1-3, costituita da nove cellule equamente ripartite tra L1, L2 ed L3 (3 cellule per strato);
- L1, costituita da nove cellule appartenenti allo strato L1 del *tunica* dell'apice meristemato;
- L7-9 costituita da nove cellule poste più internamente all'interno dell'apice meristemato e ripartite equamente tra gli strati L7, L8 e L9 (3 cellule per strato).

I valori ottenuti mediante le predette osservazioni sono stati analizzati statisticamente mediante analisi della varianza (ANOVA), attuata mediante il software SPSS. Si è eseguita un'analisi ANOVA one way per comparare l'effetto dei trattamenti crioconservativi sulle cellule delle tre zone di riferimento e per verificare la presenza di eventuali reazioni

differenziate tra le tre aree. La significatività delle differenze esistenti tra le medie è stata calcolata sulla base del Test di Duncan utilizzando un livello di significatività $P \leq 0,05$.

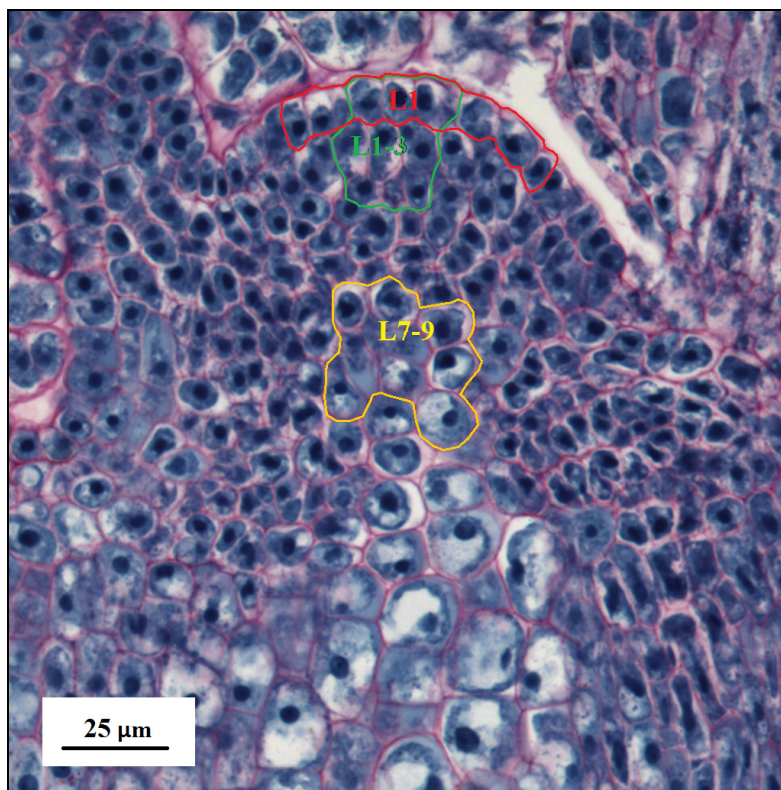


Figura 11-4: Rappresentazione schematica delle aree considerate per l'analisi istologica di tipo quantitativo.

11.3 Risultati

11.3.1 Cambiamenti cito-istologici durante l'applicazione del protocollo di crioconservazione

L'osservazione qualitativa delle sezioni successivamente alla dissezione permette di evidenziare la presenza di un lieve stress, messo in risalto dalla presenza di una leggera plasmolisi interessante gli strati più esterni degli apici meristemati. Le cellule facenti parte dell'apice sono caratterizzate da ridotta vacuolizzazione ed elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, tipica delle cellule meristematiche soggette a frequente divisione cellulare. All'interno del nucleo è riscontrabile la presenza di nucleolo ben evidente.

La coltivazione su mezzo M1 per una notte consente di recuperare lo stress da dissezione e per tal motivo gli apici non presentano plasmolisi in tale stadio. La coltivazione in tale mezzo arricchito in saccarosio permette inoltre l'accumulo di amido a partire dalle cellule immediatamente al ridosso del meristema, nei primordi fogliari e nel procambio,

consentendo in tal modo un preadattamento alle sollecitazioni osmotiche tipiche degli stadi successivi. Anche tali cellule presentano un nucleo ben visibile, non condensato e dotato di nucleolo ben evidente.

L'immersione per 24 ore in mezzo liquido 1,25 M in saccarosio, attuata per determinare un incremento della resistenza cellulare alla fase di disidratazione, mostra come reazione cellulare più evidente un'intensa plasmolisi, con livelli paragonabili a quelle visibili in seguito a disidratazione e azoto liquido. Durante tale fase dunque la presenza di una soluzione altamente concentrata in saccarosio fa sì che si determini la fuoriuscita di acqua dall'interno delle cellule verso gli spazi intercellulari e l'esterno dell'apice. Allontanandosi dall'apice meristematico è riscontrabile una plasmolisi molto più intensa vista la maggiore vacuolizzazione delle cellule. Conseguentemente allo stress determinato dall'esposizione all'elevata concentrazione di saccarosio è inoltre riscontrabile una pigmentazione del nucleo, dovuta a condensazione della cromatina, e la scomparsa del nucleolo. Tale fenomeno interessa principalmente le cellule di *tunica* e *corpus* mentre i nuclei più lontani dall'apice mantengono delle caratteristiche analoghe a quelle degli stadi precedenti.

Durante la fase di disidratazione mediante gel di silice si determina la fuoriuscita dell'acqua dagli spazi intercellulari e dalle biglie, visto che il livello di plasmolisi interessante le cellule non cambia in maniera sostanziale. È possibile evidenziare come alcune cellule siano soggette a rottura del plasmalemma ed a fuoriuscita di materiale citoplasmatico nello spazio a ridosso della parete cellulare creato dalla plasmolisi; tale fenomeno è evidenziato dalla presenza di una colorazione bluastra in tale zona. I nuclei in tale fase sono interessati da una pigmentazione ancora più intensa ed interessante tutte anche le cellule più lontane dal meristema.

L'osservazione degli apici immersi in azoto liquido permette di evidenziare un livello di plasmolisi simile a quello delle fasi precedenti. Fenomeno più importante rilevato è la notevole quantità di cellule che hanno subito la rottura del plasmalemma ed il riversamento di materiale citoplasmatico negli spazi creati dalla plasmolisi. Tale fenomeno, allontanandosi dall'apice interessa praticamente tutte le cellule.

L'analisi qualitativa relativa all'andamento della plasmolisi nel corso dell'applicazione del protocollo crioconservativo consente di rilevare una contrazione del citoplasma interessante gli strati più esterni a causa dello stress da dissezione, così come evidenziato dall'analisi qualitativa. L'analisi di tale parametro, inoltre, conferma il raggiungimento del massimo livello di plasmolisi in seguito a immersione degli espianti in mezzo liquido arricchito con saccarosio 1,25 M. Per le tre zone cellulari analizzate i livelli

di plasmolisi sono risultati leggermente inferiori in seguito a disidratazione e congelazione, ciò è stato dovuto probabilmente alla necessità di attendere l'incremento di volume da parte delle biglie di alginato e lo scongelamento, nel caso della condizione crioconservata, prima di poter provvedere all'estrazione degli apici da queste. Tale intervallo temporale è stato sufficiente per ottenere una parziale reidratazione degli espanti. Come facilmente prevedibile la plasmolisi successivamente alla dissezione interessa esclusivamente gli strati più esterni in quanto maggiormente sottoposti a stress. Il livello di plasmolisi risulta analogo per le tre zone in seguito a esposizione al mezzo arricchito in saccarosio mentre successivamente a disidratazione si registrano dei valori maggiori per la zona L1-3 seguita da quella L7-9. Gli espanti sottoposti ad immersione in azoti liquido mostrano, invece, un maggiore livello di plasmolisi negli strati più interni (L7-9), probabilmente dovuta alla perdita della funzionalità delle membrane di tali cellule.

Tabella 11-1: Effetto dei differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione sulla plasmolisi nelle differenti zone cellulari analizzate. Le differenti zone sono analizzate statisticamente in maniera separata.

| Cellule analizzate | Plasmolisi (%) | | | | |
|--------------------|----------------|------------|------------|----------------|---------|
| | 24 ore 1,25M | | | | |
| | Dissezione | 1 notte M1 | saccarosio | Disidratazione | LN |
| L1-3 | 4,62 c | 0,00 d | 26,92 a | 23,53 a | 18,93 b |
| L1 | 8,23 c | 0,00 d | 26,12 a | 20,45 b | 18,68 b |
| L7-9 | 0,00 d | 0,00 d | 28,87 a | 22,47 c | 25,02 b |
| Media | 4,54 c | 0,00 d | 27,30 a | 22,15 b | 20,88 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Tabella 11-2: Comparazione della plasmolisi indotta sulle differenti zone analizzate dai vari trattamenti del protocollo di crioconservazione.

| Trattamento | Plasmolisi (%) | | |
|--------------------|----------------|---------|----------|
| | L1-3 | L1 | L7-9 |
| Dissezione | 4,62 b | 8,23 a | 0,00 c |
| 1 notte M1 | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a |
| 24 ore 1,25M sacc. | 26,92 a | 26,12 a | 28,87 a |
| Disidratazione | 23,53 a | 20,45 b | 22,47 ab |
| LN | 18,93 b | 18,68 b | 25,02 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

L'applicazione del protocollo crioconservativo, come notato durante l'osservazione qualitativa delle immagini microscopiche, ha una significativa influenza sulla superficie nucleare. Le condizioni di stress portano ad una riduzione della superficie nucleare, che per le tre zone analizzate raggiunge la minima dimensione successivamente all'immersione in azoto liquido. In tutte le situazioni la massima dimensione media del nucleo si ha nella zona L7-9 mentre quella inferiore nello strato L1 del *tunica*.

Tabella 11-3: Effetto dei differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione sulle dimensioni del nucleo nelle differenti zone cellulari analizzate. Le differenti zone sono analizzate statisticamente in maniera separata.

| Cellule analizzate | Area nucleo (μm^2) | | | | |
|--------------------|---------------------------------|------------|------------|----------------|---------|
| | 24 ore 1,25M | | | | |
| | Dissezione | 1 notte M1 | saccarosio | Disidratazione | LN |
| L1-3 | 19,24 b | 21,51 a | 13,39 c | 12,98 c | 13,16 c |
| L1 | 20,26 a | 19,35 a | 12,95 b | 12,27 bc | 10,73 c |
| L7-9 | 21,23 a | 21,87 a | 17,19 b | 14,03 c | 12,58 c |
| Media | 20,24 a | 20,91 a | 14,51 b | 13,10 c | 12,16 c |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Tabella 11-4: Comparazione della superficie nucleare nelle differenti zone analizzate in seguito ai differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione.

| Trattamento | Area nucleo (μm^2) | | |
|--------------------|---------------------------------|---------|---------|
| | L1-3 | L1 | L7-9 |
| Dissezione | 19,24 a | 20,26 a | 21,23 a |
| 1 notte M1 | 21,51 a | 19,35 b | 21,87 a |
| 24 ore 1,25M sacc. | 13,39 b | 12,95 b | 17,19 a |
| Disidratazione | 12,98 a | 12,27 a | 14,04 a |
| LN | 13,16 a | 10,73 b | 12,58 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Analizzando il rapporto nucleo-citoplasmatico è inoltre possibile evidenziare una tendenza alla riduzione di tale parametro spostandosi verso le fasi più avanzate del protocollo di incapsulamento-disidratazione; il valore minimo del rapporto per tutte le zone analizzate è

stato ottenuto per gli espianti sottoposti a congelamento in azoto liquido. Tale considerazione fa comprendere come la riduzione di volume del citoplasma successivamente alla plasmolisi sia accompagnata da una riduzione di maggiore entità nelle dimensioni del nucleo. Comparando la reazione delle tre differenti aree durante le varie fasi del protocollo è possibile evidenziare che mentre inizialmente il rapporto nucleo-citoplasmatico non sia significativamente differente nelle fasi successive si ha la tendenza ad avere dei valori minori per la zona L7-9, significando una minore riduzione della superficie citoplasmatica in tale area.

Tabella 11-5: Effetto dei differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione sul rapporto nucleo/citoplasma nelle differenti zone cellulari analizzate. Le differenti zone sono analizzate statisticamente in maniera separata.

| Cellule analizzate | Rapporto Nucleo - citoplasma | | | | |
|--------------------|------------------------------|------------|------------|----------------|--------|
| | 24 ore 1,25M | | | | |
| | Dissezione | 1 notte M1 | saccarosio | Disidratazione | LN |
| L1-3 | 0,28 b | 0,30 a | 0,25 c | 0,23 d | 0,22 d |
| L1 | 0,32 a | 0,28 ab | 0,25 bc | 0,20 cd | 0,18 d |
| L7-9 | 0,25 a | 0,24 a | 0,20 b | 0,18 b | 0,18 b |
| Media | 0,28 a | 0,27 a | 0,23 b | 0,20 c | 0,19 c |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Tabella 11-6: Comparazione del rapporto nucleo/citoplasma tra le differenti zone di cellule analizzate in funzione del trattamento al quale egli espianti sono stati sottoposti.

| Trattamento | Rapporto nucleo - citoplasma | | |
|--------------------|------------------------------|--------|--------|
| | L1-3 | L1 | L7-9 |
| Dissezione | 0,28 a | 0,32 a | 0,25 a |
| 1 notte M1 | 0,30 a | 0,28 b | 0,24 c |
| 24 ore 1,25M sacc. | 0,25 a | 0,25 a | 0,20 b |
| Disidratazione | 0,23 a | 0,20 b | 0,18 c |
| LN | 0,22 a | 0,18 b | 0,18 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Il contenuto in proteine nel citoplasma, rappresentato dal valore mean citoplasma, ha un andamento analogo tra le tre zone analizzate, mostrando i valori massimi dopo dissezione e dopo azoto liquido, mentre i valori minimi sono riscontrabili dopo coltura per una notte su M1 e dopo trattamento con saccarosio 1,25 M; gli espanti della condizione post-disidratazione mostrano dei valori intermedi. Il contenuto in proteine nel citoplasma mostra delle differenze tra le tre aree analizzate in tutte le condizioni sperimentali analizzate, risultando nettamente superiore nelle cellule facenti parte della zona L7-9.

Tabella 11-7: Effetto dei differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione sul valore mean citoplasma nelle differenti zone cellulari analizzate. Le differenti zone sono analizzate statisticamente in maniera separata.

| Cellule analizzate | Mean citoplasma | | | | |
|--------------------|-----------------|------------|------------|----------------|----------|
| | 24 ore 1,25M | | | | |
| | Dissezione | 1 notte M1 | saccarosio | Disidratazione | LN |
| L1-3 | 110,05 a | 99,90 bc | 94,61 c | 103,94 ab | 109,77 a |
| L1 | 110,32 ab | 99,33 c | 95,65 c | 103,26 bc | 111,99 a |
| L7-9 | 128,96 a | 108,10 c | 112,77 bc | 117,02 b | 127,03 a |
| Media | 116,44 a | 102,44 c | 101,01 c | 108,07 b | 116,26 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Tabella 11-8: Comparazione del valore mean citoplasma tra le differenti zone di cellule analizzate in funzione del trattamento al quale espanti sono stati sottoposti.

| Trattamento | Mean citoplasma | | |
|--------------------|-----------------|----------|----------|
| | L1-3 | L1 | L7-9 |
| Dissezione | 110,05 b | 110,32 b | 128,96 a |
| 1 notte M1 | 99,90 b | 99,33 b | 108,10 a |
| 24 ore 1,25M sacc. | 94,61 b | 95,65 b | 112,77 a |
| Disidratazione | 103,94 b | 103,26 b | 117,02 a |
| LN | 109,77 b | 111,99 b | 127,03 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

L'analisi del contenuto proteico del nucleo, rappresentato dal valore mean nucleo, mostra una netta riduzione in seguito a immersione degli espanti in mezzo 1,25M di saccarosio mentre dei valori leggermente superiori sono osservati per le successive fasi di

disidratazione e post scongelamento. Il contenuto in proteine nucleari risulta differenziato tra le tre zone successivamente a dissezione, trattamento per 24 ore con saccarosio 1,25 M e dopo scongelamento. In tali condizioni, così come per quanto osservato relativamente al contenuto in proteine del citoplasma, il contenuto maggiore in proteine è riscontrabile delle cellule dell'area L7-9.

Tabella 11-9: Effetto dei differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione sul valore mean nucleo nelle differenti zone cellulari analizzate. Le differenti zone sono analizzate statisticamente in maniera separata.

| Cellule analizzate | Mean nucleo | | | | |
|--------------------|--------------|------------|------------|----------------|---------|
| | 24 ore 1,25M | | | | |
| | Dissezione | 1 notte M1 | saccarosio | Disidratazione | LN |
| L1-3 | 73,25 b | 80,87 a | 53,52 e | 66,07 c | 59,88 d |
| L1 | 74,98 a | 77,90 a | 56,10 c | 65,15 b | 62,75 b |
| L7-9 | 86,84 a | 79,52 b | 65,64 c | 70,95 c | 70,52 c |
| Media | 78,36 a | 79,43 a | 58,42 d | 67,39 c | 64,38 b |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

Tabella 11-10: Comparazione del valore mean nucleo tra le differenti zone di cellule analizzate in funzione del trattamento al quale egli espianti sono stati sottoposti.

| Trattamento | Mean nucleo | | |
|--------------------|-------------|---------|---------|
| | L1-3 | L1 | L7-9 |
| Dissezione | 73,25 a | b b | 86,84 a |
| 1 notte M1 | 80,87 a | 77,90 a | 79,52 a |
| 24 ore 1,25M sacc. | 53,52 b | 56,10 b | 65,64 a |
| Disidratazione | 66,07 a | 65,15 a | 70,95 a |
| LN | 59,88 b | 62,75 b | 70,52 a |

In ogni riga le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per $p \leq 0,05$ secondo il test di Duncan.

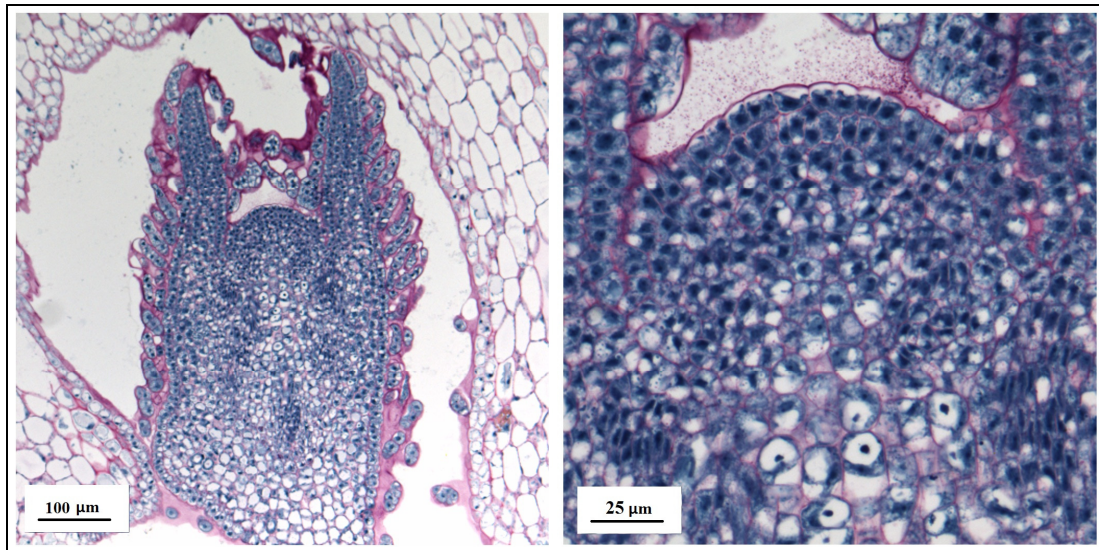


Figura 11-5: Sezione trasversale di apice meristematico nello stadio post-dissezione visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile notare la plasmolisi dovuta a stress da dissezione interessante lo strato L1 del *tunica*.

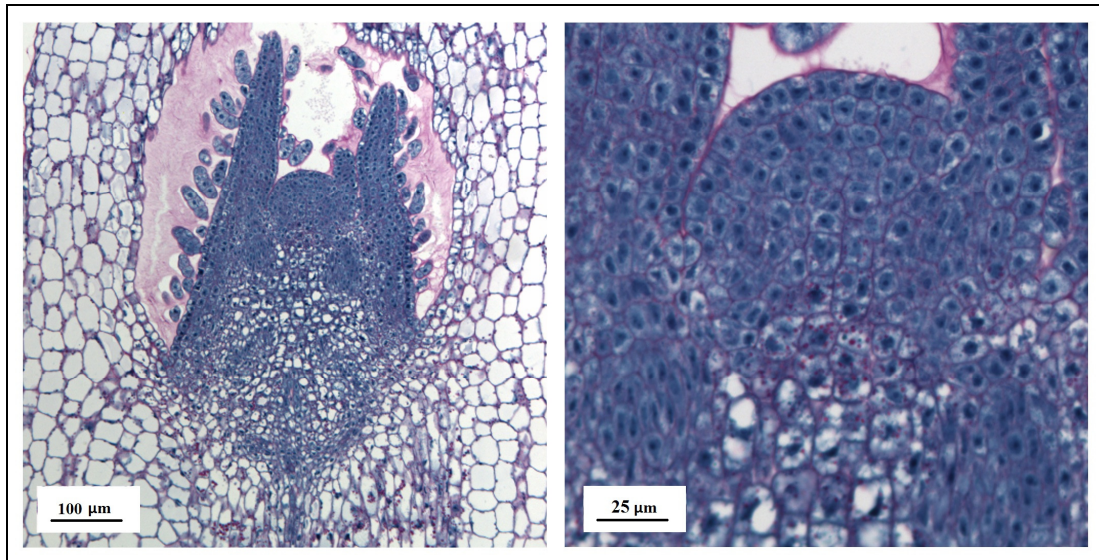


Figura 11-6: Sezione trasversale di apice meristematico successivamente alla coltivazione per una notte su mezzo M1 visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare la presenza di amiloplasti (visibili nell'immagine come granuli rossi) nella zona immediatamente al di sotto del meristema, nel procambio e nei primordi fogliari.

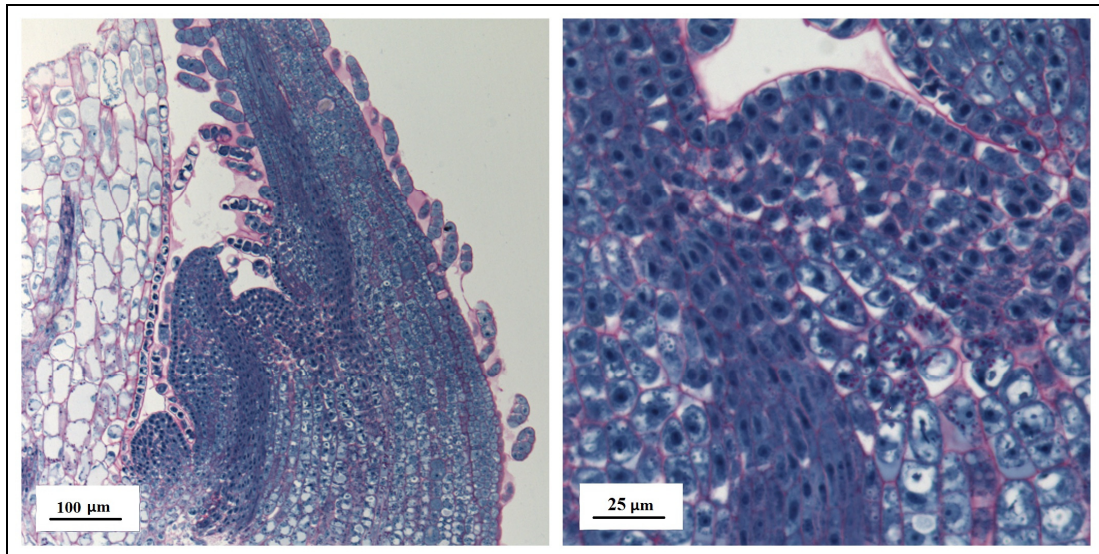


Figura 11-7: Sezione trasversale di apice meristemico sottoposto a trattamento con soluzione 1,25M di saccarosio per 24 ore visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare la plasmolisi generalizzata delle cellule che interessa in misura inferiore le cellule apicali. E' inoltre visibile l'accumulo di amido all'interno di amiloplasti (visibili nell'immagine come granuli rossi) nella zona immediatamente al di sotto del meristema e nel procambio.

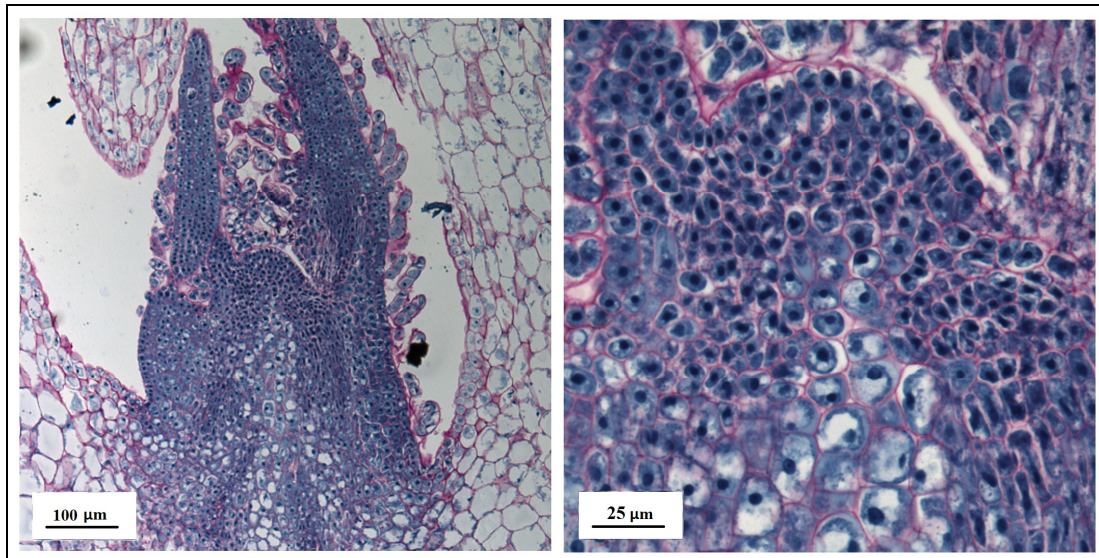


Figura 11-8: Sezione trasversale di apice meristemico sottoposto a trattamento di disidratazione visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare la plasmolisi generalizzata delle cellule, che interessa in misura inferiore le cellule apicali, ed il danneggiamento della membrana plasmatica delle cellule più lontane dall'apice, evidenziato dall'assunzione di colorazione bluastra dello spazio creato dalla plasmolisi. E' inoltre visibile l'elevato grado di degradazione delle cellule più differenziate.

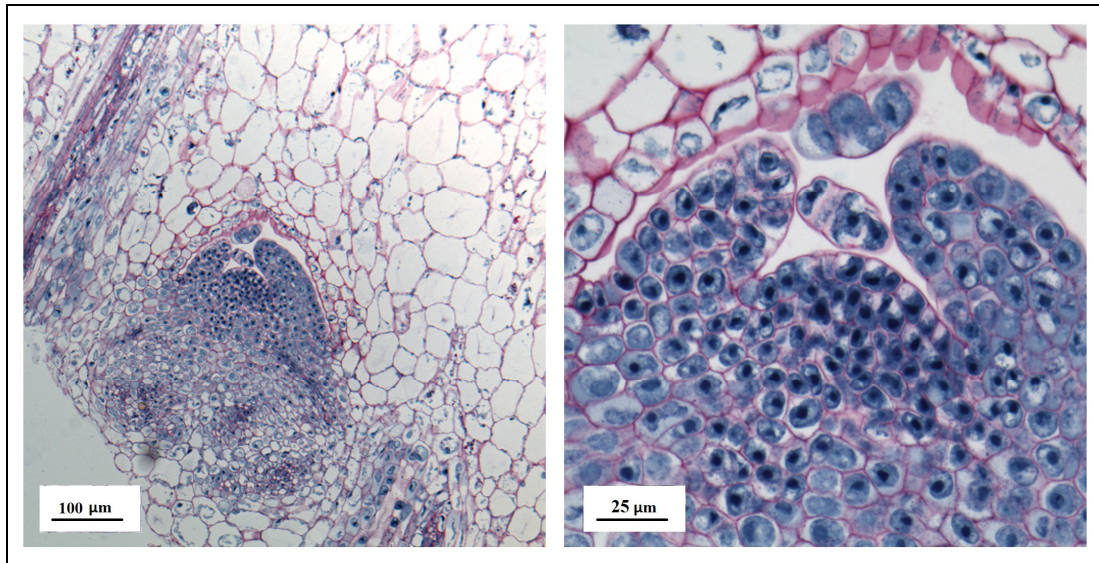


Figura 11-9: Sezione trasversale di apice meristematico sottoposto a crioconservazione visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare il danneggiamento generalizzato della membrana plasmatica delle cellule più lontane dall'apice, evidenziato dall'assunzione di colorazione bluastra dello spazio creato dalla plasmolisi. E' inoltre visibile l'elevato grado di degradazione delle cellule più differenziate che risultano completamente svuotate dal loro citoplasma.

11.3.2 Caratteri cito-istologici caratterizzanti le fasi post applicazione del protocollo di crioconservazione

Gli apici posti su mezzo di ricrescita ed osservati una settimana dopo l'applicazione del protocollo mostrano, nel caso della condizione sottoposta a 1,25 M di saccarosio, una ripresa dell'accrescimento e la sostanziale assenza di aree necrotizzate.

Anche i controlli sottoposti a disidratazione evidenziano una sostanziale ripresa dell'accrescimento ma è possibile riscontrare la presenza di aree costituite da cellule morte ed in necrosi all'esterno dell'apice meristemato; in tale condizione, dunque, la ripresa dell'accrescimento e la sopravvivenza interessano esclusivamente le cellule facenti parte dell'apice.

Gli apici sottoposti a crioconservazione mostrano la presenza di cellule con caratteristiche normali, che hanno ripreso le divisioni cellulari, con nucleo non pigmentato all'interno del quale è presente il nucleolo. Sono presenti anche delle cellule, soprattutto più lontane dall'apice vegetativo e nei primordi fogliari, che seppur sopravvissute presentano delle caratteristiche anomale. Tali cellule che evidentemente hanno subito dei danni in grado di inibire la ripresa delle normali attività cellulari mostrano un elevato grado di vacuolizzazione e un notevole accumulo di amido al loro interno, dovuto probabilmente all'incapacità di utilizzare tale prodotto di riserva. Anche successivamente a crioconservazione le cellule più lontane dall'apice meristemato hanno subito la morte ed appaiono prive di citoplasma. In gran parte delle cellule i nuclei hanno ripreso un aspetto non pigmentato ed è riapparso il nucleolo.

Dopo 15 giorni e 30 di coltivazione sul mezzo di ricrescita è possibile visualizzare il proseguimento dell'accrescimento da parte degli espianti. Il fenomeno più importante riscontrato, sia nella condizione dopo disidratazione che in quella dopo crioconservazione, è la presenza di alcuni espianti che perdono l'aspetto organizzato tipico degli apici meristemati e ne assumono uno completamente disorganizzato con presenza di spazi lacunari molto ampi tra le cellule. Tali espianti mostrano, inoltre, un notevole accumulo di amido segno della loro anomalia e della conseguente incapacità di utilizzare tale prodotto di riserva per lo svolgimento delle normali funzioni cellulari.

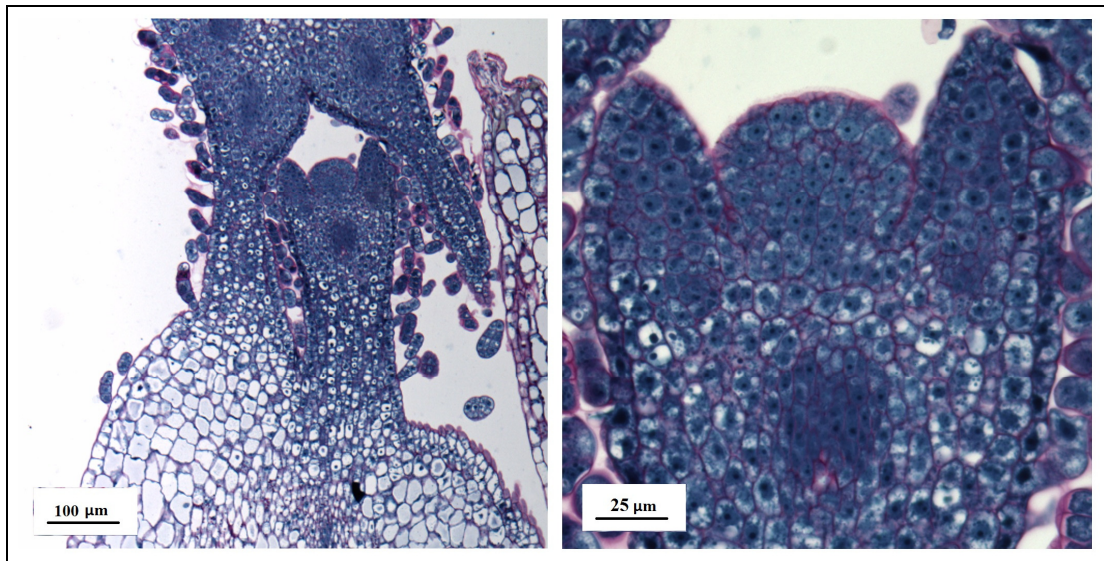


Figura 11-10: Sezione trasversale di apice meristemico del controllo 1,25M saccarosio dopo una settimana di coltivazione su mezzo di ripresa, visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare La ripresa dell'accrescimento da parte dell'apice meristemico.

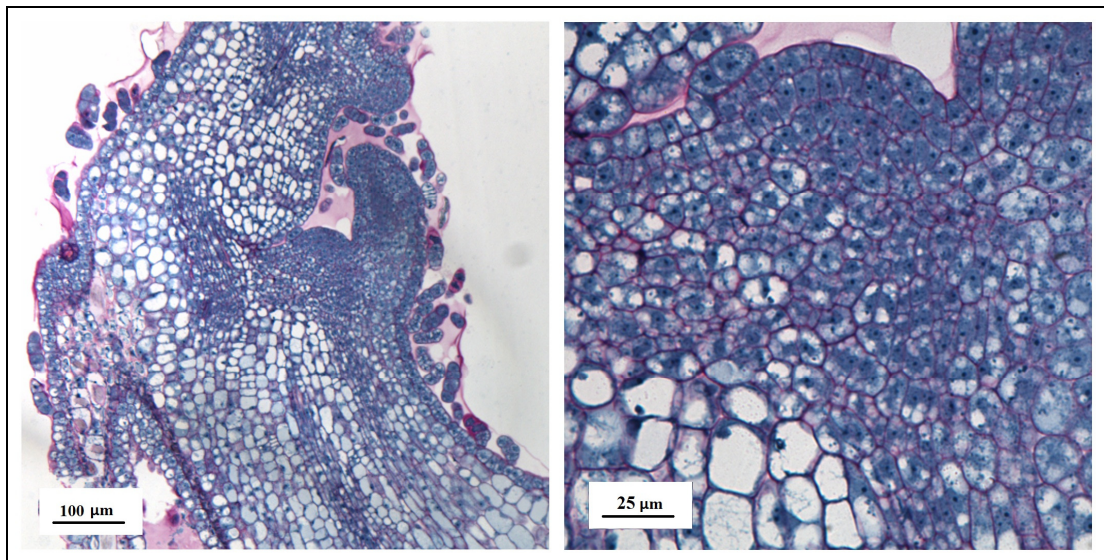


Figura 11-11: Sezione trasversale di apice meristemico del controllo dopo disidratazione coltivato per una settimana su mezzo di ripresa, visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare la ripresa dell'accrescimento da parte dell'apice meristemico. E la morte delle cellule posizionate a maggiore distanza dal meristema.

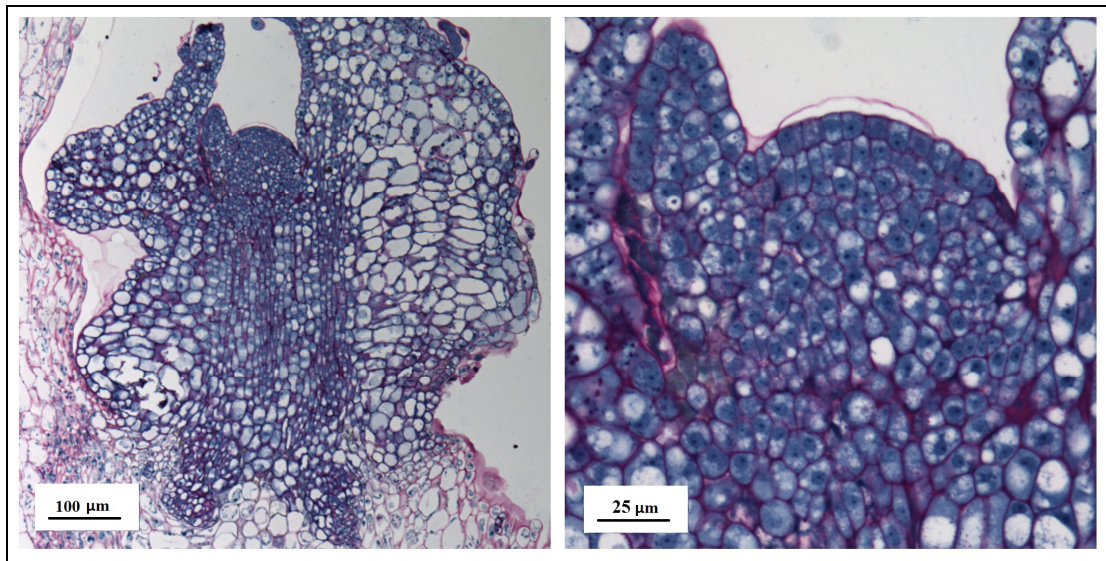


Figura 11-12: Sezione trasversale di apice meristemico sottoposto a crioconservazione dopo una settimana di coltivazione su mezzo di ripresa, visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). E' possibile osservare la ripresa dell'accrescimento da parte dell'apice meristemico ma anche la crescita disorganizzata dei primordi fogliari. Le parti di tessuto esterne all'apice meristemico sono state completamente distrutte durante la crioconservazione.

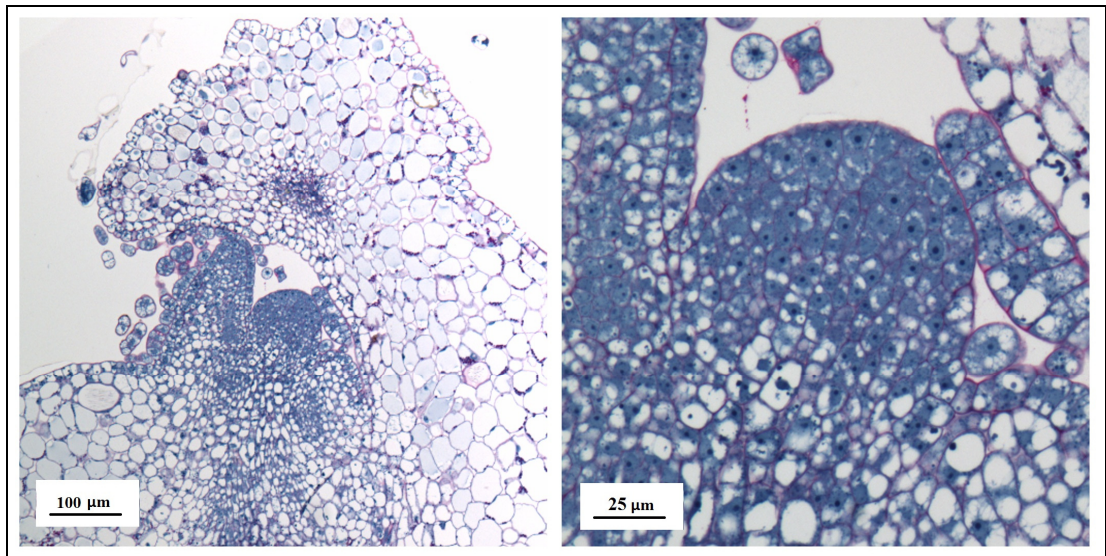


Figura 11-13: Sezione trasversale di apice meristemico sottoposto a crioconservazione dopo una 30 giorni di coltivazione su mezzo di ripresa, visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). Tale apice mostra un accrescimento normale dell'apice meristemico.

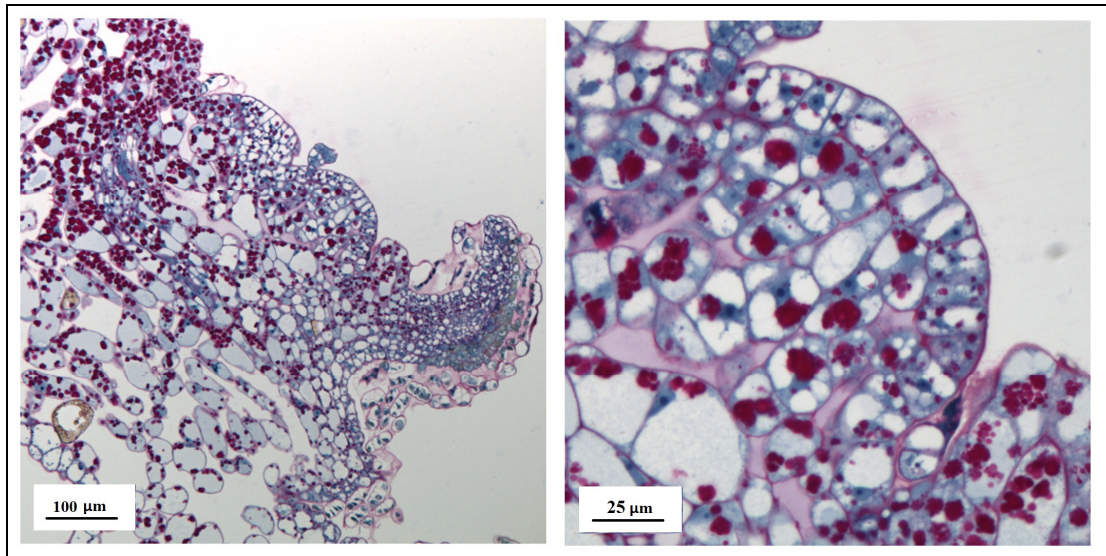


Figura 11-14: Sezione trasversale di apice meristematico sottoposto a crioconservazione dopo una 30 giorni di coltivazione su mezzo di ripresa, visualizzato a due differenti ingrandimenti (10x a sinistra e 40x a destra). Tale apice mostra un accrescimento anormale, disorganizzato, con un apice praticamente irriconoscibile, ricco di amiloplasti e con ampi spazi lacunari.

11.4 Discussione

L'analisi critica dei risultati forniti dall'analisi microscopica degli apici di *Dioscorea alata* del clone 3746 ha permesso di evidenziare quelli che sono i comportamenti cito-istologici che si verificano durante e successivamente alla crioconservazione mediante incapsulamento-disidratazione. Il trattamento con saccarosio 1,25 M per 24 ore, insieme alla precedente coltivazione su M1, risulta fondamentale per fornire agli espianti una maggiore capacità di resistenza alla disidratazione ed al successivo congelamento. Da prove sperimentali è, infatti, emerso come la disidratazione ed il congelamento attuati senza il passaggio dalla fase di loading comportino la morte degli espianti. Il trattamento con soluzione concentrata consente l'accumulo di saccarosio nelle cellule, e comporta anche la formazione di amiloplasti nelle cellule a ridosso dell'apice meristemato, come evidenziato dalle osservazioni delle immagini microscopiche. Il saccarosio risulta di notevole importanza nel mantenimento della stabilità del plasmalemma in quanto localizzato all'interno delle cellule o legato mediante ponti a idrogeno ai componenti della membrana cellulare consente di stabilizzare le proteine e il doppio strato lipidico durante le fasi di disidratazione e congelamento (Bagniol *et Al.*, 1992; Qiaochum *et Al.*, 2005) . Il trattamento di loading con saccarosio 1,25 M oltre a fornire una protezione nei confronti di disidratazione e crioconservazione ha determinato la fuoriuscita di acqua dalle cellule verso gli spazi intercellulari e verso l'esterno degli espianti, consentendo il raggiungimento del livello massimo di plasmolisi, come evidenziato dall'analisi quantitativa. La successiva fase di disidratazione mediante gel di silice consente dunque la rimozione dell'acqua dai soli spazi intercellulari e dalle biglie di alginato di calcio.

Le fasi di disidratazione e la successiva fase di crioconservazione del materiale vegetale sono caratterizzate inoltre da un incremento del contenuto in proteine citoplasmatiche, caratteristica che, analogamente a quanto fatto da Qiaochum *et Al* (2005), può essere ritenuta come una prima reazione fisiologica allo stress osmotico. Tale variazione del contenuto in proteine può essere correlata all'incremento della resistenza al congelamento. Le modifiche durante l'applicazione del protocollo hanno interessato anche le caratteristiche del nucleo che è stato caratterizzato da una significativa riduzione di superficie e rapporto nucleo-citoplasmatico nelle fasi più avanzate del protocollo per tutte e tre le zone osservate. La variazione del contenuto in proteine del nucleo fa registrare un andamento opposto a quello rilevato nel citoplasma, probabilmente a causa della variazione del livello di condensazione della cromatina. Le condizioni di stress hanno portato inoltre alla scomparsa del nucleolo. Il processo di congelamento e scongelamento

degli apici, ed in minor misura il processo di disidratazione, determinano sulle cellule più lontane dall'apice meristemico notevoli danni alla membrana cellulare, evidenziati dalla fuoriuscita di materiale citoplasmatico all'esterno della cellula. Tale fenomeno assume intensità maggiore allontanandosi dall'apici, raggiungendo una mortalità del 100% nelle cellule più lontane. Ciò conferma quanto osservato in studi precedenti (Bagniol *et Al.*, 1992; Volk e Caspersen, 2007; Kaczmarczyk *et Al.*, 2008) relativamente alla maggiore capacità di sopravvivenza delle cellule meristematiche, indifferenziate, e caratterizzate da minore vacuolizzazione. Le cellule poste in posizione più distante dall'apice vegetativo ed alla base degli espianti sono normalmente soggette a mortalità durante disidratazione e congelamento, ciò a causa della loro maggiore vacuolizzazione che comporta maggiore difficoltà nella disidratazione o la presenza di una minore tolleranza al livello di disidratazione necessario per evitare danni durante l'immersione in azoto liquido e lo scongelamento (Bagniol *et Al.*, 1992; Helliott *et Al.*, 2003). Le considerazioni relative alla differente capacità di sopravvivenza ai trattamenti crioconservativi in funzione della localizzazione cellulare possono essere messe in relazione anche con la diversificazione delle reazioni ai differenti trattamenti del protocollo di crioconservazione da parte delle cellule dell'area L7-9 rispetto a quelle delle altre due zone (L1-3 ed L1), le quali sono localizzate in corrispondenza dell'apice meristemico. Tali differenza si sono comunque rivelate ridotte visto che l'area L7-9 è comunque relativamente vicina al meristema e poco differenziata.

L'osservazione delle immagini microscopiche ha inoltre permesso di rilevare la presenza di un'elevata frazione di cellule meristematiche che mostrano evidenti danni successivamente ai processi disidratazione fisica o di congelamento e riscaldamento. Soltanto ridotte porzioni localizzate nell'area esterna del meristema sono in grado di superare la crioconservazione mantenendo la propria capacità funzionale e riprendendo il normale ciclo cellulare; tale considerazione trova supporto in quanto affermato da Helliott *et Al.* (2003) sulla base di ricerche relative all'analisi istologica di apici meristematici di banano (*Musa spp.*) sottoposti a crioconservazione mediante vitrificazione. In alcuni casi le cellule seppure danneggiate sono in grado di sopravvivere ma incapaci di dare origine ad uno sviluppo organizzato ed alla produzione di germogli. Ciò consente di fornire una spiegazione al fenomeno riscontrato per gli apici di igname crioconservati i quali, pur mostrando un elevato tasso di sopravvivenza alla crioconservazione, soltanto per percentuali ridotte sono in grado di dare origine a produzione di germogli.

Tale ricerca consente di esplicitare i processi implicati nel successo del protocollo crioconservativo e di analizzare le reazioni cellulari ai differenti trattamenti e può costituire un importante strumento per l'ottimizzazione della tecnica di conservazione del germoplasma mediante crioconservazione. E' comunque auspicabile l'integrazione di tale studio con ricerche inerenti il comportamento ultracellulare degli espianti per meglio comprendere quanto si verifica durante la crioconservazione di apici meristematici.

CAPITOLO 12 Conclusioni

Le differenti ricerche precedentemente descritte hanno permesso di evidenziare l'efficacia delle tecniche di coltura *in vitro*, mediante micropropagazione e crioconservazione, per la conservazione delle risorse genetiche vegetali.

Le ricerche inerenti la micropropagazione hanno mostrato la possibilità di ottenere degli elevati tassi di moltiplicazione ed una facile radicazione di *Erica multiflora*, consentendo in tal modo la conservazione della specie *in vitro* a partire da un quantitativo esiguo di materiale di partenza, caratteristica fondamentale per le specie a rischio di estinzione. Tale tecnica inoltre ha confermato la sua importanza per un'eventuale valorizzazione ornamentale di *Erica multiflora*, specie dotata di notevole valore estetico e quindi rappresentante un'opportunità per l'innovazione di prodotto nel settore floricolo.

Le ricerche relative alla crioconservazione hanno mostrato l'adattabilità a tale tecnica sia di specie tropicali che mediterranee ma, allo stesso tempo, la necessità di un attento studio preventivo alla conservazione su larga scala per la definizione delle condizioni ottimali.

L'osservazione istologica ha consentito la comprensione delle reazioni cellulari ai differenti trattamenti facenti parte del protocollo di crioconservazione e dei fenomeni legati al successo della tecnica crioconservativa. Si è osservata la maggiore capacità delle cellule meristematiche di superare gli eventi stressanti legati al processo di crioconservazione e di produrre nuovi germogli successivamente allo scongelamento.

Le differenti ricerche inerenti la crioconservazione hanno permesso di evidenziare l'efficacia delle tecniche ma l'importanza di definire in modo oculato le varie fasi del protocollo crioconservativo. In tal modo è possibile incrementare il tasso di sopravvivenza e di ripresa dell'accrescimento degli espianti successivamente al congelamento in azoto liquido ma anche, riducendo gli stress, favorire un accrescimento normale, in assenza di callo e di eventuali variazioni genetiche.

CAPITOLO 13 Bibliografia

- AA.VV., 2001 – *La biodiversità nella regione biogeografica mediterranea* – ANPA, Dipartimento Stato dell'ambiente, Controlli e Sistemi informativi
 - Aidoud, 1997 – *Fonctionnement des écosystèmes méditerranéens*. Recueil des Conférences. Lab. Ecol. Vég. Univ. Rennes 1. France
- Alessandrini e F. Bonafede, 1996 – *Atlante della flora protetta della Regione Emilia-Romagna* – Regione Emilia-Romagna, Bologna
- J.B. Amo-Marco e M.R. Ibanez, 1998 – *Micropropagation of Limonium cavanillesii Erben, a threatened static, from inflorescence stems* – *Plant growth regulation* 24: 49-54, Kluwer Academic Publisher, Olanda
- W.C. Anderson, 1984 – *A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron* – *Journal of the America Society for Horticultural Science*, 109: 343-347
- G. Bacchetta, A. Bueno Sanchez, G. Fenu, B. Jiménez-Alfaro, E. Mattana, B. Piotto e M. Virevaire (a cura di), 2008 – *Conservacion ex situ de plantas silvestres* – Principado de Asturias, Spagna
- G. Bacchetta, G. Fenu, E. Mattana, B. Piotto e M. Virevaire (a cura di), 2006 – *Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma* – Manuali e linee guida APAT 37/2006, APAR, Roma, Italia
- S. Bagniol, F. Engelmann e N. Michax-Ferrière, 1992 – *Histo-cytological study of apices from in vitro plantlets of date palm(Phoenix dactylifera L.) during a cryopreservation process* – *Cryoletters* 13: 405-412
- L. Barandalla, I. Sanchez, E. Ritter e J.I. Ruiz de Galarreta, 2003 – *Conservation of potato (Solanum tuberosum L.) cultivars by cryopreservation* – *Spanish Journal of Agricultural Research* 1 (4): 9-13
- A. Barbero, M., Quezel, P., 1982 – *Classifying Mediterranean ecosystem in the Mediterranean rim countries and southwestern U.S.A* – Gen. Tech. Rep. PSW-58. Berkeley, CA: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S Department of Agriculture.
- E.E. Benson, 1990 – *Free radical damage in stored plant germplasm* – International Board for Plant Genetic Resources, Rome

- E.E. Benson, 2008 – *Cryopreservation theory* – da B.M. Reed, *Plant cryopreservation a practical guide*, Springer, Olanda
- W. Block, 2003 – *Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germoplasma* – *Cryobiology* 47: 59-72
- J. Blondel, J. Aronson, 1995 – *Biodiversity and ecosystem function in the Mediterranean Basin : human and non-human determinants* – Da: *Mediterranean-type ecosystems: the function of biodiversity* . *Ecological studies*, vol 109: 43-119. Springer-Verlag, Berlin
- J. Blondel, J. Aronson, 1999 – *Biology and wildlife of the Mediterranean Region* – Oxford University Press, New York.
- T.A. Bull e K.T. Glasziou, 1979 – *Sugarcane* – da J.V. Lovett e A. Lazenby, *Australian field crops*, Angus and Robertson Publisher.
- T.A. Bull, 2000 – *The sugar cane plant* – da M. Hogarth e P. Allsopp, *Manual of cane growing*, Boureau of Sugar Experiment Stations, Indooroopilly, Australia.
- G. Burchi, 2002 – *Piante mediterranee ad elevate variabilità genetica e potenzialità commercial: il caso del Limonium* – Atti VI Giornate Scientifiche SOI (Spoleto, 23-25 aprile 2002), volume Workshop: 9-14
- M.W. Callmander, G.E. Schatz e P.P. Lowry, 2005 – *IUCN Red List assessment and the global strategy for plant conservation: taxonomist must act now* – *Taxon* 54 (4): 1047-1050
- N.R.F. Castillo, N.V. Bassil, S. Wada e B.M. Reed, 2010 – *Genetic stability of cryopreserved shoot tips of Rubus germoplasm* – *in Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 56: 246-256
- A. Ceballos, J. Martinez-Fernandez, M.A. Luengo-Ugidos, 2004 – *Analysis of rainfall trends and dry periods on pluviometric gradient rapresentative of Mediterranean climate in the Duero Basin, Spain* – *Journal of Arid Environments* 58: 214-232.
- C. Cervelli, C., 2005 – *Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare* – Regione Siciliana, Dipartimento Azienda Regionale Foreste Demaniali, Palermo.
- I.Y. Choi, J.K. Lee, H.J. Goo, J.H. Park, N.S. Kim, C.H. Park e K.J. Chang, 2002 – *Gentic diversity and relationships among Dioscorea alata L., and related Dioscorea species revealed by AFLP analysis* – *Korean J. Genetics* 24 (3): 305-312, The genetics Society of Corea

- D. Commodari, C. Di Chiara e G. Scalzo, 2005 – *Biosfera* – da Annuario dei dati ambientali 2005, Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente Sicilia, Palermo
- F. Cote, O. Goue, R. Domergue, B. Panis e C. Jenny, 2000 – *In-field behaviour of banana plants (Musa AA sp) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions* – *Cryoletters* 21 (1): 19-24
- J. Daniels e B.T. Roach, 1987 – *Taxonomy and evolution* – da D.J. Heinz, Sugarcane improvement through breeding, Vol. 11: 7-84, Elsevier, Amsterdam, Olanda.
- J.G. Day, K.C. Harding, J. Nadarajan e E.E. Benson, 2008 – *Cryopreservation: conservation of bioresources at ultra low temperature* – da *Molecular biometrics* 2nd edition, Humana Press, Totowa, Stati Uniti
- G.D. De Dato, 2004 – *Effetti dei cambiamenti climatici sulla vegetazione arbustiva mediterranea: risultati della manipolazione ambientale nell'area sperimentale di Porto Conte (SS)* – Tesi dottorato in Ecologia Forestale, Università della Tuscia, Viterbo
- D. Desonie, 2008 – *Biosphere: Ecosystem and biodiversity loss* – Chelsea House Publisher, New York, Stati Uniti
- F. Engelmann, M.T. Gonzalez-Arno, Y. Wu e R. Escobar, 2008 – *The development of encapsulation-dehydration* – da B.M. Reed, *Plant Cryopreservation: a practical guide*, Springer, Olanda
- J.M.M. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown e M.T. Jackson, 2002 – *Managing plant genetic diversity* – CAB Publishing, Oxford, Gran Bretagna
- FAO/ IPGRI, 1994 – *Genebank standards* - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- C. Federico, 1999 – *Guida illustrata della flora dello Zingaro* – L'EPOS Società Editrice, Palermo
- G. Fierotti, 1997 – *I suoli della Sicilia: con elementi di genesi, classificazione, cartografia e valutazione dei suoli* – Dario Flaccovio Editore, Palermo
- J. Fuller, 2004 – *Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in frozen state* – *Cryoletters* 25 (6): 375-388
- K.J. Gaston e J.I. Spicer, 2004 – *Biodiversity an introduction* – Blackwell Science, Oxford, Gran Bretagna

- M.T. Gonzalez-Arno, F. Engelmann, C. Urrea e P. Lynch, 1993^a – *Crioconservation de meristemos apicales de plantas in vitro de cana de azucar mediante el metodo de encapsulation/deshidratacio* – Biotecnologia Aplicada Vol.10 n. 3: 225-228.
- M.T. Gonzalez-Arno, F. Engelmann, C. Huet e C. Urrea, 1993^b – *Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology* – Cryoletters 14: 303-308
- M.T. Gonzalez-Arno, C. Udrara, F. Engelmann, R. Ortiz e C. de la Fe, 1999 – *Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage temperature and storage duration* – Cyoleters 20: 347-352
- M.T. Gonzalez-Arno e F. Engelmann, 2006 – *Cryopreservation of plant germoplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugar cane* – Cryoletters 27 (3): 155-168
- M.T. Gonzalez-Arno, A. Panta, W.M. Roca, R.M. Escobar e F. Engelmann, 2008 – *Development of large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops* – Plant cells tissues organs culture 92: 1-13, Springer, Olanda
- K. Goubanova, L. Li, 2007 – *Extremes in temperature and precipitation around the Mediterranean basin in an ensemble of future climate scenario simulations* – Global Planetary Change 57:27-42
- L. Gratani e L. Varone, 2004 – *Leaf key traits of Erica arborea L., Erica multiflora L. and Rosmarinus officinalis L. co-occurring in the Mediterranean maquis* – Flora 199: 58-69, Elsevier
- Y.J. Hao, C. X. You e X. X. Deng, 2002 – *Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation* – Cryoletters 23: 37-46
- J.G. Hawkes, N. Maxted e B.V. Ford-Lloyd, 2000 – *The ex situ conservation of plant genetic resources* – Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Paesi Bassi
- A. Helliot, R. Swennen, Y. Poumay, E. Frison, P. Lepoivre e B. Panis, 2003 – *Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (Musa spp.) highly proliferating meristems* – Plant Cell Report 21: 690-698
- R.J. Henry, 2005 – *Importance of plant diversity* – da R.J. Henry, Plant diversity and evolution: Genotypic and phenotypic variation in higher plants, CAB International, Oxfordshire, Gran Bretagna

- L. Hens e E.K. Bonn, 2003 – *Causes of biodiversity loss: a human ecological analysis* – Multiciencia
- A. Huxley, M. Griffiths e M. Levy, 1997 – *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening* – The Royal Horticultural Society, Gran Bretagna
- G. Iapichino, 2007 – *In vitro propagation of Lithodora rosmarinifolia (Ten.) Johmst., a rare endemic Sicilian shrub with potential as ornamental plant* – Propagation of Ornamental Plants Vol. 7 n. 4: 184-189
- S. Jaramillo e M. Baena, 2007 – *Ex situ conservation of plant genetic resources* – Biodiversity International, Roma, Italia
- A. Kaczmarczyk, T. Rutten, M. Melzer e E.R.J. Keller, 2008 – *Ultrastructural changes associated with cryopreservation of Potato (Solanum tuberosum L.) shoot tips* – CryoLetters 29(2): 145-156
- A. Kaity, S.E. Ashmore, R.A. Drew e M.E. Dulloo, 2008 – *Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya* – Plant Cell Rep 27: 1529-1539
- H.H. Kim, Y.G. Lee, S.U. Park, S.C. Lee, H.J. Baek, E.G. Cho e F. Engelmann, 2009¹ – *Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures* – Cryoletters 30 (3): 291-299
- H.H. Kim, Y.G. Lee, D.J. Shin, H.C. Ko, J.G. Gwag, E.G. Cho e F. Engelmann, 2009² – *Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures* – Cryoletters 30 (5): 320-334
- M.F. Lavery, E.J. Sterling, A. Chiles e G. Cullmann, 2008 – *Biodiversity 101* – Greenwood press, Londra, Gran Bretagna
- M. Kottek, J. Grieser, C. Beck, B. Rudolf, F. Rubel, 2006 – *World map of the Koppen-Geiger climate classification updated* – Meteorologische Zeitschrift, vol.15 n.3: 259-263
- L. Llorens, J. Penuelas e M. Estiarte, 2003 – *Ecophysiological responses of two Mediterranean shrubs, Ericam multiflora and Globularia alypum, to experimentally drier and warmer conditions* – Physiologia Plantarum 119: 231-243
- B.B. Mandal, K.P.S. Chandel e S. Dwivedi, 1996 – *Cryopreservation of yam (Dioscorea spp.) shoot apices by encapsulation-dehydration* – Cryoletters 17: 165-174, Cambridge, Gran Bretagna

- T. Matsumoto, C. Takahashi, A. Sakai e Y. Nako, 1998 – *Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures* – Scientia Horticulturae 76: 105-114, Elsevier
- N. Maxted, F.M. Irondo, M.E. Dulloo e A. Lane – *Introduction: the integration of PGR conservation with protected area management* – da J.M. Irondo, N. Maxted e M.E. Dulloo, Conserving plant genetic diversity in protected areas: population management of crop wild relatives, CAB International, Oxfordshire, Gran Bretagna
- A. Minelli, 2008 – *La macchia mediterranea. Formazioni sempreverdi costiere* – Quaderni habitat
- P. H. Moore e K.J. Nuss, 1987 – *Flowering and flower synchronization* – da D.J. Heinz, Sugarcane improvement through breeding, Vol. 11: 7-84, Elsevier, Amsterdam, Olanda.
- N. Myers, R.A., Mittermeier, C. G Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, 2000 – *Biodiversity hotspots for conservation priorities* – Nature Vol. 403: 853-858
- T. Murashige e F. Skoog, 1962 – *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures* – Plant Cell, Tissue and Organ culture, 3: 163-168
- D.S. Naur e B.R. Reghunath, 2009 – *Cryoconservation of axillary shoot meristems of Indigofera tinctoria (L.) by encapsulation-dehydration technique* – In Vitro Cell. Dev. Biology-plant 45: 565-573, Springer, Olanda
- I.C. Onwueme, 1978 – *The tropical tuber crops : yams, cassava, sweet potato, and cocoyams* – Wiley and Sons, New York, Stati Uniti.
- P.O. Ovono, C. Kevers e J. Dommès, 2007 – *Axillary proliferation and tuberisation of Dioscorea cayenensis-D. rotundata complex* – Plant. Cell. Tiss. Organ Culture 91: 107-114
- L.M. Padovani, P. Carrabba, B. Di Giovanni e F. Mauro (a cura di), 2009 – *Biodiversità, risorse per lo sviluppo* – Enea, Roma, Italia
- A. Palacios e F. Gonzalez-Candelas, 1997 – *Lack of genetic variability in the rare and endangered Limonium cavanillesii (Plumbaginaceae) using RAPD markers* – Molecular Ecology 6: 671-675, Blackwell Science
- F. Paulet, F. Engelmann e J.C. Glaszmann, 1993 – *Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (Saccharum sp. hybrids) using encapsulation/dehydration* – Plant Cell Report 12: 525-529.

- A. Paunescu, 2009 – *Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview* – Romanian Biotechnological Letters Vol. 14 N°1: 4095-4103, Bucarest, Romania
- L. Peredo, R. Arroyo-Garcia, B.M. Reed e M.A. Revilla, 2008 – *Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold stored hops (*Humulus lupulus* L.)* – Cryobiology 57: 234-241
- S. Pignatti, 1982 – *Flora d'Italia* – Edagricole, Verona
- A. Piotta e A. Di Noi (a cura di), 2001 – *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea* – Manuale ANPA, Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, Roma
- A. Piotta, V. Giacanelli e S. Ercole (a cura di), 2010 – *La conservazione ex situ della biodiversità delle specie spontanee e coltivate in Italia. Stato dell'arte, criticità e azioni da compiere* – Manuali e linee guida ISPRA 54/2010, ISPRA, Roma, Italia
- P. Quezel, 1999 – *Les grandes structures de végétation en région méditerranéenne: facteur déterminants dans leur mise en place post-glaciaire* – Geobios vol.32 n.1 : 19-32.
- P. Ravichandran e V. Manimekalai, 2006 – *Plant biotechnology and conservation of biodiversity* – National conference of biodiversity, India
- A. Sakai e F. Engelmann, 2007 – *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review* – Cryoletters 30 (3): 291-299
- A. Sakai, D. Hirai e T. Niino, 2008 – *Development of PVS based vitrification and encapsulation-vitrification protocols* – da B.M. Reed, Plant Cryopreservation: a practical guide, Springer, Olanda
- G. Scarascia-Mugnozza, H. Oswald, P. Piussi, K. Radoglou, 2000 – *Forests of the Mediterranean region: gaps in knowledge and research needs* – Forest Ecology and Management 132:97-109
- A. Schafer-Menuhr, E. Muller e G. Mix-Wagner, 1996 – *Cryopreservation: an alternative for long-term storage of old potato varieties* – Potato Research 39: 507-513
- R.A. Shibli, M.A. Shatnaw, W.S. Subaim e M.M. Ajlouni, 2006 – *In vitro conservation of plant genetic resources: a review* – World Journal of Agricultural Sciences 2 (4): 372-382

- United Nations Environment Program (UNEP), 2008 – *State and trends of the environment 1987-2007, Biodiversity* – UNEP, Nairobi, Kenya
- M. Urbanova, E. Cellarova e K. Kimakova, 2002 – *Chromosome number stability and mitotic activity of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. meristems* – Plant Cell Rep 20: 1082-1086
- M. Vilà e J. Terradas, 1998 – *Neighbour effects on *Erica multiflora* (Ericaceae) reproductive performance after clipping* – Acta Oecologica 19 (2): 139-145, Elsevier, Parigi, Francia
- G.M: Volk e A.M. Caspersen, 2007 – *Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita** – Protoplasma 231: 215-226
- T. Willcox, A. Garside e M. Braunack, 2000 – *The sugarcane cropping system* – da M. Hogarth e P. Allsopp, Manual of cane growing, Bureau of Sugar Experiment Stations, Indooroopilly, Australia.
- D.H. Yaalon, 1997 – *Soil in the Mediterranean region: what makes them different?* – Catena 28: 157-169
- R. Zarghami, M. Pirseyedi, S. Hasrak e B.P. Sardrood, 2008 – *Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Solanum tuberosum** – African Journal of Biotechnology, 7 (16): 2798-2802
- Z. Zhai, Y. Wu, F. Engelmann, R. Chen e Y. Zhao, 2003 – *Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved in vitro cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD* – Cryoletters 24: 315-322

