



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Frutticoltura mediterranea
Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali
AGR/03

APPLICAZIONE DELLA COLTURA *IN VITRO* E DELLA CRIOCONSERVAZIONE PER LA SALVAGUARDIA DELLA BIODIVERSITA' ITALIANA DI NOCCIOLO (*Corylus avellana* L.)

IL DOTTORE
ALESSANDRA SGUEGLIA

IL COORDINATORE
**Prof.ssa MARIA ANTONIETTA
GERMANA'**

IL TUTOR
**Prof.ssa MARIA ANTONIETTA
GERMANA'**

CO TUTOR
Dr. EMILIA CABONI

*A Joy e alla mia
bellissima famiglia*

INDICE

PARTE PRIMA

PREMESSA	Pag.1
INTRODUZIONE	Pag.3
1. Biodiversità, Agobiodiversità e Risorse Genetiche Vegetali	Pag.3
1.1 Accordi internazionali e quadro normativo di riferimento	Pag.6
1.2 Cause dell'erosione genetica	Pag.8
2. Strategie di Conservazione delle Risorse Genetiche Vegetali	Pag.10
2.1 Conservazione <i>in situ</i> e <i>on farm</i>	Pag.11
2.2 Conservazione <i>ex situ</i>	Pag.12
3. Tecniche di conservazione <i>ex situ</i>	Pag.14
3.1 Conservazione di semi	Pag.14
3.2 Collezioni in campo	Pag.16
3.3 Conservazione per mezzo della coltura <i>in vitro</i>	Pag.17
4. La Coltura <i>in vitro</i>	Pag.18
5. La conservazione mediante crescita rallentata	Pag.21
6. La crioconservazione	Pag.23
6.1 Tecniche di crioconservazione	Pag.26
7. Il nocciolo	Pag.32
7.1 Importanza e diffusione	Pag.32
7.2 Caratteri botanici	Pag.33
7.3 Tecniche di propagazione	Pag.33
7.4 Conservazione del germoplasma	Pag.34

PARTE SECONDA

SCOPO DELLA RICERCA	Pag.36
1. Primo esperimento: conservazione <i>in vitro</i> della cultivar di nocciolo "Tonda Gentile Romana" mediante crescita rallentata	Pag.38

2. Secondo esperimento: ottimizzazione della crioconservazione di gemme ascellari delle cultivar di nocciolo “Tonda Gentile Romana” e “Montebello” mediante la tecnica di incapsulazione-disidratazione	Pag.47
3. Terzo esperimento: crioconservazione di gemme ascellari della cultivar di nocciolo “Tonda Gentile Romana” mediante la tecnica di <i>droplet-vitrification</i>	Pag.56
4. Quarto esperimento: stabilizzazione <i>in vitro</i> di genotipi siciliani di nocciolo	Pag.62
Conclusioni Generali	Pag.71
Ringraziamenti	Pag.73
BIBLIOGRAFIA	Pag.74
Pubblicazioni e Presentazioni	Pag.86

PARTE PRIMA

PREMESSA

La biodiversità vegetale può rappresentare uno strumento efficace per affrontare problemi attuali come i cambiamenti climatici, le nuove esigenze dei consumatori e lo sviluppo economico nelle zone rurali. Essa, inoltre, può assumere un ruolo economico strategico nella predisposizione di programmi di miglioramento genetico delle cultivar, al fine di ottenere varietà resistenti alle principali fitopatie e capaci di adattarsi al cambiamento delle condizioni ambientali.

Le risorse genetiche vegetali comprendono le varietà tradizionali, le moderne cultivar, le colture *wild relative* e altre specie selvatiche (Rao, 2004). La diminuzione di tali risorse ha reso necessario lo sviluppo di diverse metodologie di salvaguardia della biodiversità, basate su tecniche di conservazione *in situ* ed *ex situ*.

La gestione delle risorse genetiche prevede tradizionalmente la conservazione *ex situ*, per mezzo di collezioni di piante in campo, o di semi in *seed banks*.

Al fine di rendere più efficaci e sicuri tali approcci, oggi è possibile integrarli con metodi di conservazione basati su moderne biotecnologie. Tra queste, la coltura *in vitro*, risulta essere di grande interesse per la raccolta, la moltiplicazione e la conservazione del germoplasma vegetale (Engelmann, 1991), e rappresenta uno dei metodi complementari più ricorrenti.

Il termine coltura *in vitro* comprende un ampio *range* di tecniche che implicano la crescita di materiale vegetale (in particolare germogli, meristemi, embrioni somatici e calli embriogenetici) su terreni di crescita artificiali (Paunescu, 2009), in ambiente sterile ed in condizioni ambientali controllate.

Rispetto al tradizionale metodo di conservazione in pieno campo, le colture *in vitro*, presentano alcuni vantaggi in quanto il materiale è protetto da potenziali attacchi di patogeni, condizioni ambientali avverse ed impatto delle attività antropiche. Esse permettono, inoltre, di conservare un gran numero di accessioni in spazi ridotti e a costi contenuti. Le tecniche di conservazione *in vitro* sono, infine, particolarmente utili per la salvaguardia di risorse genetiche appartenenti a specie che producono semi recalcitranti, specie propagate per via vegetativa e specie ritenute rare e ad alto rischio di estinzione (Engelmann, 2011).

Tali tecniche comprendono, oltre alla conservazione per breve periodo di collezioni *in vitro* in condizioni di crescita standard, anche la conservazione a medio termine ottenuta per mezzo della crescita rallentata, e la conservazione a lungo termine tramite la crioconservazione (azoto liquido, -196 °C). Questi ultimi due sistemi di conservazione si basano sull'utilizzo di

temperature basse e ultra basse, e sulle variazioni di luce e composizione del mezzo colturale, in modo da interrompere, nel caso della crioconservazione, e di rallentare, nel caso della crescita rallentata, l'accrescimento dei tessuti vegetali senza, con questo, influenzarne negativamente la funzionalità biologica.

Alla luce del continuo interesse dimostrato nei riguardi di tali tecniche, è auspicabile la messa a punto di protocolli di conservazione applicabili alle diverse specie e varietà vegetali.

INTRODUZIONE

1. Biodiversità, Agrobiodiversità e Risorse Genetiche Vegetali

Per diversità biologica, o biodiversità, si intende “la variabilità degli organismi viventi di ogni origine, compresi, *inter alia*, gli ecosistemi terrestri, marini ed altri ecosistemi acquatici ed i complessi ecologici di cui fanno parte; ciò include la diversità nell’ambito delle specie, e, tra le specie, degli ecosistemi (art. 2 Convenzione sulla Diversità Biologica, 1992). Essa rappresenta per l’uomo una risorsa essenziale quale fonte di beni, risorse e servizi necessari per la sua sopravvivenza.

La diversità biologica in agricoltura, o agrobiodiversità, è la parte della biodiversità che riveste un ruolo importante dal punto di vista dell’alimentazione e della nutrizione della popolazione mondiale. Essa è il risultato dell’interazione tra gli ecosistemi, con i loro processi naturali di selezione, e l’uomo, con la sua conoscenza, coltura e attività, svolta nel corso dei millenni. L’uomo, infatti, per mezzo delle conoscenze tradizionali e intervenendo principalmente tramite selezione massale, ha conservato e coltivato varietà ritenute di una certa utilità, determinando, in questo modo, un aumento netto di diversità (Van de Wouw et al. 2009). È quindi possibile affermare che, l’attività umana, nel passato, ha avuto un ruolo decisivo nella formazione e conservazione di questa biodiversità (FAO, 1999).

L’agrobiodiversità, comprende la varietà e la variabilità di animali, piante e microrganismi che sono necessari per sostenere le funzioni chiave degli agroecosistemi, tra cui la loro struttura ed i loro processi per, e a supporto, della produzione e della sicurezza alimentare (FAO, 1999).

Le risorse genetiche vegetali (RGV), insieme a quelle animali, forestali, acquatiche e i microrganismi, sono considerate una componente dell’agrobiodiversità e sono definite dall’articolo 2 del Trattato Internazionale sulle Risorse Genetiche Vegetali per l’Alimentazione e l’Agricoltura, come “materiale genetico di origine vegetale che abbia un valore effettivo o potenziale per l’alimentazione e l’agricoltura”.

Quando si effettuano attività di conservazione e collezione, all’interno delle RGV, l’entità selezionata prende il nome di “accessione”. All’interno delle banche del germoplasma, il numero delle accessioni conservate per varietà possono essere diverse, e sono comunemente indicate da un nome, un numero o un codice alfanumerico.

Delle risorse genetiche vegetali fanno parte:

- varietà locali (*local varieties, landrace, farmer’s varieties, folk varieties*): varietà che si riproducono per seme o per propagazione vegetativa, e che fanno parte di una

popolazione variabile, comunque ben identificabile e conosciuta usualmente con un nome locale. Queste varietà non sono state oggetto di un programma organizzato di miglioramento genetico, sono caratterizzate da un adattamento specifico alle condizioni ambientali e di coltivazione di una determinata area e sono strettamente associate agli usi, alle conoscenze, alle abitudini, ai dialetti e alle ricorrenze della popolazione umana che le ha sviluppate e/o ha continuato la loro coltivazione (Task Force on the European Cooperative Programme on Plant Genetic Resource - ECPGR). Le varietà locali, conservate e moltiplicate dagli agricoltori nel tempo, sono dotate di un notevole adattamento e rappresentano interessanti fonti di geni per caratteristiche di qualità e produttività in ambienti marginali (resistenza, qualità, adattabilità a stress biotici e abiotici, ecc.). Tuttavia, al di fuori dell'area di origine, le varietà locali spesso non reggono il confronto con le moderne varietà coltivate (Barcaccia e Falcinelli, 2005).

- ecotipi (*ecotypes*): popolazioni spontanee adattate ad un determinato ambiente, di solito geograficamente limitato (Rieger et al. 1976) sviluppatasi indipendentemente dall'intervento umano;
- specie spontanee (*wild species*): specie che non hanno subito la selezione da parte dell'uomo, e che presentano però un utilizzo potenziale. È il caso di molte piante officinali, foraggere e forestali;
- progenitori selvatici delle forme domesticate (*wild relatives*): specie molto vicine a quelle coltivate che comprendono sia i diretti progenitori da cui è partita la domesticazione della forma coltivata, sia altre specie vicine che possono essere utilizzate, in programmi di miglioramento genetico, per le loro potenziali capacità di resistenza a stress biotici ed abiotici;
- varietà migliorate (*bred varieties*): varietà coltivate che derivano da uno specifico programma di miglioramento genetico condotto dai costitutori di nuove varietà. Sono popolazioni prevalentemente omogenee, spesso costituite da un solo genotipo (ibridi, cloni, ecc.), di recente costituzione e per lo più altamente produttive.

Le RGV, appartenenti sia a piante coltivate sia a piante selvatiche, svolgono un ruolo importante nello sviluppo, nell'efficienza e nella sostenibilità delle attività agricole. Esse, infatti, sono alla base di ogni produzione agricola ed industriale di carattere alimentare, e, quindi, consentendo la produzione di cibo, sono alla base dell'approvvigionamento alimentare mondiale.

Per comprendere l'importanza della loro tutela e conservazione, è sufficiente pensare che la

maggior parte dei prodotti agricoli esistenti è stata ottenuta attraverso la selezione e la collezione delle piante (Cohen e Potter, 1993).

Poter disporre di una vasta gamma di risorse fitogenetiche permette di selezionare piante in grado di rispondere alle mutevoli condizioni di vita, più resistenti e con un valore nutrizionale più alto, o anche capaci di adattarsi a nuove aree di coltivazione non utilizzate in precedenza. Al contrario l'utilizzo di un numero ridotto di varietà e il diffondersi delle monocolture, riducendo la diversità a livello del sistema agricolo, diminuisce anche la resistenza ai patogeni e agli insetti (Kameri-Mbote e Cullet, 1999).

L'agrobiodiversità, oltre ad un ruolo economico e alimentare, riveste anche una funzione importante nell'ambito dello sviluppo rurale e del patrimonio culturale e paesaggistico di un determinato territorio, dando risalto alle pratiche locali e tradizionali.

La biodiversità agraria, è oggi rappresentata da una quantità innumerevole di piante che hanno una valenza non solo nutrizionale, ma anche agro-industriale e farmaceutica. Nel complesso, essa comprende più di mille specie, sebbene con una significativa diversità intraspecifica (Kameri-Mbote e Cullet, 1999).

Anche nell'ambito delle risorse geniche di interesse agricolo, però, il rischio di erosione e la conseguente perdita di diversità genetica è molto alta. La popolazione mondiale, infatti, legata ad un'agricoltura che predilige le monocolture e le colture monovarietalmente economicamente più vantaggiose, dipende oramai da un numero sempre più esiguo di prodotti agricoli. Basti pensare che circa 10.000 specie vegetali sono state utilizzate per l'alimentazione umana dall'origine dell'agricoltura, mentre oggi, sono solo circa 150 le specie che entrano a far parte della dieta della maggior parte della popolazione mondiale. Tra queste, 12 specie provvedono da sole al 70% del fabbisogno di cibo, mentre 4 specie – grano, riso, mais e patate – forniscono da sole oltre il 50% della produzione alimentare ed il 90% delle calorie vegetali della dieta umana.

Le RGV sono, quindi, il pilastro su cui si basano la sicurezza alimentare e l'agricoltura mondiale, alla luce dell'espansione della popolazione mondiale (Ogwu et al. 2014). Tutelare tali risorse è, pertanto, essenziale per garantire l'approvvigionamento alimentare, in quanto vengono attenuati i rischi associati ai sistemi di produzione intensiva e ad alta specializzazione, per agevolare i programmi classici e moderni di miglioramento varietale e per fornire componenti alle industrie alimentari e farmaceutiche.

Per le ragioni fin qui illustrate, la tutela e la conservazione della biodiversità compaiono oggi tra le priorità di numerosi Paesi, e per tale ragione risultano regolate da accordi internazionali.

1.1. Accordi internazionali e quadro normativo di riferimento

La Convenzione sulla diversità biologica (CBD), sottoscritta a Rio de Janeiro il 5 giugno del 1992 durante la Conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente e lo sviluppo, ha dato, per la prima volta, risalto alla tutela della biodiversità a livello globale. Questa Convenzione, infatti, ha riconosciuto a livello internazionale, il ruolo insostituibile della biodiversità nella continua evoluzione della vita sulla terra.

Gli obiettivi generali della CBD sono:

- la conservazione *in situ* ed *ex situ* della diversità biologica, quest'ultima da svolgere preferibilmente nel Paese di origine della risorsa genetica;
- l'uso durevole delle sue componenti;
- l'equa ripartizione dei benefici derivanti dall'utilizzazione delle risorse genetiche.

A questo trattato internazionale, considerato ad oggi il più completo dal momento che i suoi obiettivi si applicano a tutti gli esseri viventi della terra, siano essi animali, vegetali o microrganismi, hanno aderito 193 Paesi, inclusa l'Unione Europea e l'Italia. Le Parti contraenti si sono impegnate ad elaborare e applicare strategie nazionali, piani d'azione e programmi per conservare, tutelare e valorizzare la diversità biologica.

L'adesione alla CBD è stata ratificata dall'Italia con Legge n. 124 del 14 febbraio 1994. Al fine di rispettare l'impegno assunto con tale adesione, nel 2010 in Italia è stata elaborata e approvata la Strategia Nazionale per la Biodiversità (SNB). Quest'ultima ha tra gli obiettivi quello di affiancare le esigenze legate alla biodiversità, alle politiche nazionali che regolano i diversi settori, riconoscendo, in questo modo, la necessità di promuovere la conservazione e l'uso sostenibile delle risorse genetiche.

Nel 2002, in occasione della sesta Conferenza delle Parti della CBD tenutasi in Olanda, gli Stati hanno assunto l'impegno di ridurre significativamente la perdita di biodiversità, entro il 2010. Tale risultato non è però stato raggiunto e gli Stati, seppur con risultati discreti registrati per la conservazione di alcuni habitat naturali specifici, non sono riusciti ad arginare il fenomeno di erosione. Nonostante ciò, il lavoro svolto in questi anni ha permesso di intensificare le azioni di conservazione già in essere, e di promuovere nuove iniziative come quelle che hanno condotto alla realizzazione del programma universale di classificazione e descrizione delle caratteristiche delle piante conosciute (Global Strategy for Plant Conservation).

L'obiettivo di ridurre il fenomeno di erosione genetica è stato nuovamente proposto nel corso della decima Conferenza delle Parti della CBD, tenutasi a Nagoya nel 2010.

Il Piano d'Azione Strategico 2011-2020, adottato nel corso della Conferenza, prevede, infatti,

L'adozione di misure volte a fermare la perdita di biodiversità entro il 2020 (anno identificato come tappa intermedia considerando di fatto il 2050 come obiettivo temporale ultimo), l'identificazione delle cause alla base della perdita di biodiversità e la tutela del patrimonio biologico a tutti i livelli. Nel medesimo incontro, inoltre, gli Stati hanno adottato il Protocollo di Nagoya sull'accesso alle risorse genetiche e la giusta ed equa suddivisione dei benefici derivanti dalla loro utilizzazione. Tale protocollo è stato firmato dall'Italia nel giugno 2011. L'accordo, prevede un consenso informato e accordi mutualmente condivisi nell'ottica di una giusta ed equa suddivisione dei benefici, tenendo conto anche l'importante ruolo della conoscenza tradizionale.

L'accordo internazionale che riguarda più da vicino l'agrobiodiversità e le RGV, è il Trattato Internazionale sulle Risorse Fitogenetiche per l'Alimentazione e l'Agricoltura (ITPGRFA), adottato nel 2001 dalla Conferenza FAO con l'astensione di Stati Uniti e Giappone.

Il Trattato, che impegna le parti contraenti a conservare la biodiversità vegetale in agricoltura sia all'interno (anche all'interno delle aziende agricole) che all'esterno degli habitat naturali (art.5 "Conservazione") ed a utilizzare le risorse genetiche in maniera sostenibile (art.6 "Uso sostenibile delle PGRFA"), è stato ratificato dal Parlamento Italiano nell'aprile 2004 con Legge n. 101.

Tale accordo intenzionale, inoltre, promuove e regola l'accesso alla biodiversità e all'informazione ad essa collegata e stabilisce un'equa condivisione dei benefici derivanti dall'utilizzo delle risorse genetiche, in accordo con quanto riportato nella CBD; infine, riconosce formalmente i diritti degli agricoltori (art. 9 "Diritti degli agricoltori"), alla luce del loro contributo alla conservazione e sviluppo delle RGV.

A livello Comunitario, la diversità genetica in ambito agricolo è tutelata in particolar modo attraverso la politica di sviluppo rurale. In tale ambito, infatti, sono promosse misure agroambientali per promuovere la tutela dell'ambiente agricolo e conservare la diversità genetica. Queste misure, offrono agli Stati Membri, la possibilità di individuare pratiche agricole idonee per la conservazione delle risorse genetiche nell'azienda agricola, e prevedono la possibilità di indennizzo nei confronti degli agricoltori per i costi supplementari e la perdita di reddito derivanti da attività di conservazione volte a preservare piante coltivate a rischio di erosione genetica.

Il programma comunitario riguardante la conservazione e l'utilizzo delle risorse genetiche in agricoltura prevede attività di conservazione *in situ* ed *ex situ*. Tali attività hanno migliorato la conoscenza delle risorse fitogenetiche, contribuito alla loro conservazione a livello di azienda agricola e incoraggiato gli agricoltori a preservare le colture locali.

1.2 Cause dell'erosione genetica

La biodiversità vegetale è minacciata dall'erosione genetica, intesa come la perdita di diversità genetica, in una particolare area e per un determinato periodo di tempo, compresa la perdita di singoli geni, e la perdita di particolari combinazioni di geni, come quelli che si manifesta in ecotipi o varietà locali (FAO/IBPGR 2002).

Non è chiaro quando tale termine sia stato coniato, ma, probabilmente, è stato utilizzato per la prima volta negli anni '60 per descrivere il processo di perdita di variabilità genetica all'interno delle colture (Pistorius, 1997).

Da un punto di vista evolutivistico, la scomparsa di una specie può far parte di un processo biologico normale. A riguardo, però, ciò che risulta essere allarmante, è legato al numero delle specie scomparse o a rischio di estinzione, e alla frequenza di tale fenomeno. Come riportato da Sarasan et al. (2006), la biodiversità globale, infatti, sta diminuendo ad un tasso senza precedenti. Tale fenomeno ha assunto un aspetto preoccupante non solo per le specie selvatiche, ma anche per molte specie agrarie e forestali.

La scomparsa di RGV può causare:

- perdita di piante dalle quali la popolazione mondiale dipende per il cibo, le fibre e le medicine;
- perdita di fonti di adattamento ambientale, con una conseguente maggiore vulnerabilità alle malattie e maggiore sviluppo di parassiti e quindi più frequente necessità di trattamenti chimici (fitofarmaci, concimi, ormoni, ecc.);
- perdita di caratteristiche qualitative e organolettiche di alcune varietà locali;
- perdita di culture locali;
- semplificazione degli ecosistemi e banalizzazione dei paesaggi rurali;
- minore opportunità di sviluppo dei sistemi agricoli a basso impatto, meno inquinanti e più ricchi di prodotti tipici locali.

Una delle principali ragioni di erosione genetica è la sostituzione della varietà tradizionali con le moderne varietà, altamente flessibili e geneticamente uniformi (Rosendal, 1995), e la diffusione di un sistema agricolo basato su un numero ridotto di specie e varietà.

Ciò è stato confermato anche dal *Report* sullo stato delle risorse genetiche vegetali mondiali per l'alimentazione e l'agricoltura, redatto dalla FAO nel 1996, in cui, tra le principali cause, si fa riferimento alle moderne tecniche agronomiche con l'eccessivo sfruttamento di alcune specie e la massima diffusione di varietà moderne.

Sono diversi i casi storici critici direttamente legati all'omogeneità genetica delle colture. Il caso più emblematico è forse quello della carestia che colpì l'Irlanda nel 1845, dovuta alla

peronospora (*Phytophthora infestans*), che distrusse intere coltivazioni di patata, causando quasi 2 milioni di morti.

Un'altra importante perdita, in questo caso di tipo economico, si registrò nel 1860 a causa della distruzione dei vigneti da parte della fillossera (*Phylloxera vastatrix*), comportando una profonda crisi per l'industria enologica europea.

Altri fattori che favoriscono l'erosione genetica sono:

- perdita, modificazione o degrado degli habitat; oltre ad una perdita netta di ecosistemi, si assiste ad un loro progressivo degrado dovuto ad una gestione non sostenibile e a fenomeni quali la deforestazione e la desertificazione;
- introduzione negli ecosistemi di specie alloctone; queste specie oltre a rivelarsi forti competitori nei confronti di specie autoctone, introducono, spesso, nuovi patogeni e fitopatie. La loro presenza in natura può essere intenzionale (per coltivazione, scopi amatoriali, ecc.) o accidentale (attraverso il trasporto di merci, ecc.);
- frammentazione degli ecosistemi e cambiamenti nell'uso del suolo; ciò è dovuto ad una crescente urbanizzazione e all'intensificazione delle pratiche agricole, aggravata dalla difficoltà da parte delle specie vegetali spontanee ad adattarsi ad un territorio di ridotte dimensioni;
- disastri naturali e inquinamento delle matrici ambientali (acqua, aria e suolo);
- ipersfruttamento delle risorse vegetali per motivi commerciali o di sussistenza;
- cambiamenti climatici; anno dopo anno aumenta l'evidenza scientifica dell'impatto dei cambiamenti climatici sulla biodiversità, a livello di ecosistema, di specie e genetico (Butchart et al. 2010; Bàlint et al. 2011). Le anomalie legate ai fattori climatici, come i cambiamenti legati alle temperature, possono alterare i processi fisiologici delle piante quali la fotosintesi, la respirazione, l'efficienza di utilizzo dell'acqua, la composizione dei tessuti ed il metabolismo. Per tale ragione i sistemi agricoli sono considerati particolarmente vulnerabili agli impatti dei cambiamenti climatici.

Per ridurre la perdita di diversità genetica è necessario adottare strumenti di tipo indiretto e di tipo diretto.

La prima categoria di intervento si riferisce alla attività volte a ridurre le cause "antropiche" che minacciano la biodiversità, quali, ad esempio, il controllo dei livelli di emissione di sostanze inquinanti o la tutela della qualità delle acque.

Alla seconda categoria appartengono le strategie di conservazione diretta di specie ed ecosistemi, per mezzo di strategie di conservazione *in situ* e/o *ex situ*.

2. Strategie di Conservazione delle Risorse Genetiche Vegetali

Il germoplasma è il materiale vegetale che contiene le informazioni inerenti la composizione genetica delle diverse specie e può essere rappresentato da semi o da porzioni di pianta (gemme, foglie, fusto, polline ecc.), o anche da gruppi di cellule capaci di dare vita ad una nuova pianta con caratteri ereditari identici alla pianta madre di origine.

La conservazione del germoplasma vegetale si realizza attraverso due strategie di intervento: la conservazione *in situ* ed *ex situ*.

Queste due metodiche, distinte principalmente per il luogo dove avviene la conservazione delle risorse genetiche di specie vegetali (di interesse agronomico e facente parte della flora spontanea), presentano caratteristiche differenti e, come previsto dalla CBD, devono essere tra loro complementari.

La differenza fondamentale consiste nel fatto che, mentre la conservazione *in situ* comporta la designazione delle accessioni da preservare e la loro gestione e monitoraggio all'interno dell'ambiente naturale di origine, nel caso della conservazione *ex situ* il materiale vegetale deve essere campionato, trasferito e salvaguardato in apposite strutture e aree di raccolta. Nel caso di varietà a forte rischio di erosione, la conservazione *ex situ* permette quindi una più rapida azione di salvaguardia.

Un'altra differenza riguarda la natura della conservazione *in situ*, definita dinamica, rispetto a quella dell'*ex situ*, definita statica. Mentre, infatti, la strategia *in situ* mira a conservare le dinamiche evolutive delle specie (mutazioni, deriva genetica, selezione, ecc.) per mezzo dell'interazione con l'ambiente naturale, la strategia *ex situ*, punta a conservare l'integrità genetica delle specie e dei genotipi in conservazione.

Se da un lato la conservazione *in situ* favorisce l'insorgenza di nuova variabilità, è pur vero che questo sistema presenta anche degli aspetti negativi legati al difficile accesso al materiale vegetale da parte dei ricercatori e dei *breeder*, la complessa gestione e controllo delle accessioni e la possibile perdita di risorse genetiche dovuta a circostanze impreviste. Per tale ragione, è auspicabile che alla conservazione *in situ* si integrino, se possibile, iniziative complementari di conservazione *ex situ*.

Di norma le accessioni conservate *in situ* riguardano specie selvatiche (*wild*) conservate negli habitat naturali e specie di interesse forestale (*forestry*) protette all'interno di riserve forestali, mentre le specie coltivate e le *crop wild relative* sono conservate per mezzo di tecniche *ex situ* e/o *in situ/on farm*.

Le strategie *ex situ* ed *in situ*, si compongono di diverse metodologie di conservazione, che

includono nel primo caso la conservazione di semi e polline, collezioni *in vivo* ed *in vitro*, mentre nel secondo caso si procede con la creazione di aree protette e con la conservazione *on farm*. La scelta di una metodologia di conservazione rispetto ad un'altra, dipende dalle esigenze, dalle possibilità (per lo più economiche) e dalla tipologia della specie.

2.1 Conservazione *in situ* e *on farm*

La conservazione *in situ* si riferisce alla protezione degli ecosistemi e degli habitat naturali, ed al mantenimento e recupero di popolazioni vitali di specie all'interno del loro ambiente naturale (CBD, 1992). Tale conservazione è utile per conservare i processi evolutivi e di adattamento delle colture all'interno del loro ambiente. In questo modo, infatti, non si preserva solo il germoplasma della varietà in oggetto, ma anche le condizioni che consentono a quella varietà di svilupparsi con dei tratti distintivi.

La modalità di conservazione *in situ* della flora spontanea prevede la designazione, creazione e gestione di aree protette, quali parchi nazionali, parchi naturali, riserve e ecc., e può comprendere sia la salvaguardia degli ambienti naturali e semi-naturali, sia la conservazione della biodiversità agricola.

Nel primo caso l'obiettivo è quello di mantenere la diversità degli ecosistemi e la biodiversità *sensu lato* al suo interno, fornendo in questo modo le condizioni affinché le specie endemiche ed in via di estinzione presenti possano continuare a proliferare. In alcuni casi può accadere che l'interesse sia rivolto alla tutela ed il mantenimento di particolari specie, piuttosto che all'intero ecosistema di origine.

Nel secondo caso si procede con il mantenimento dell'intero agroecosistema, o con la conservazione di varietà locali o coltivate *on farm*.

La conservazione *on farm* riguarda il mantenimento delle specie coltivate (spesso in associazione con i loro parentali selvatici che possono essere presenti nel medesimo campo coltivato) nella medesima area di coltivazione in cui hanno sviluppato le loro caratteristiche intrinseche (Altieri e Merrick, 1987; Jarvis e Hodgkin, 2000) e nella quale continuano ad evolversi grazie al lavoro degli agricoltori (Frankel et al. 1995).

In questa tipologia di conservazione sono quindi gli agricoltori che coltivano, gestiscono e condizionano le popolazioni all'interno degli agroecosistemi. Ciò consente l'integrazione degli agricoltori all'interno di sistemi nazionali di conservazione delle RGV e rappresenta, inoltre, una gestione altamente dinamica delle stesse, dal momento che comprende sia processi di selezione naturale che processi di selezione provenienti direttamente dall'uomo. Secondo quanto riportato nel secondo *Report* sullo stato delle Risorse Genetiche Vegetali del

mondo per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO, 2010) sono stati ottenuti dei risultati significativi nel sostegno e gestione della conservazione *on farm* delle specie coltivate.

La conservazione *in situ* è utile per:

- garantire l'accesso al materiale genetico di alcune specie diffuse solo in particolari luoghi, come nel caso delle specie officinali;
- conservare alcune specie che non possono essere stabilizzate o riprodotte al di fuori del loro ambiente naturale, come nel caso di specie che fanno parte di ecosistemi complessi, dove è presente un alto grado di interdipendenza tra le specie;
- attivare un certo grado di salvaguardia di specie senza alcuna importanza economica apparente ma che svolgono una funzione all'interno dell'ecosistema.

Nonostante numerosi ricercatori abbiano sottolineato la necessità di attuare un tipo di conservazione *in situ* delle RGV e di preservare gli ambienti nei quali tali risorse si trovano (Wilkes e Wilkes, 1972; Iltis, 1974; Nabhan, 1979; Prescott-Allen e Prescott-Allen 1982;), questa strategia di conservazione presenta alcune problematiche quali il difficile accesso al materiale genetico, gli episodi di erosione genetica causati da circostanze imprevedute ed i costi sia diretti che indiretti dovuti al mancato reddito degli operatori locali che avrebbero potuto destinare ad attività produttive le aree destinate alla conservazione.

2.2 Conservazione *ex situ*

Un interesse crescente è rivolto alla conservazione del germoplasma di specie erbacee e arboree, sia selvatiche che coltivate, al di fuori degli ambienti naturali, anche in attuazione agli obblighi previsti dalla CBD. Quest'ultima, infatti, all'articolo 9 "Conservazione *ex situ*", indica una serie di misure da adottare per il recupero, la ricostituzione e la reintroduzione di specie minacciate a completamento della strategia di conservazione *in situ*. Il quarto *Report* dell'Intergovernment Panel on Climate Change (2007) indica la conservazione *ex situ* tra le principali azioni di adattamento degli ecosistemi ai cambiamenti climatici in corso. Questa strategia di conservazione, infatti, oltre ad essere complementare all'*in situ* e all'*on farm*, è spesso l'unica via percorribile per la conservazione di specie rare e a rischio di estinzione (Ramsay et al. 2000), o più in generale, nei casi in cui le altre metodologie, per motivi diversi, sono difficili da realizzare.

In teoria tutte le specie possono essere conservate *ex situ*, ma tradizionalmente questa strategia è utilizzata per le risorse genetiche ritenute a forte rischio di erosione genetica, o importanti per l'alimentazione umana e l'agricoltura, e per le quali è necessario quindi assicurare un facile accesso per il futuro. La conservazione *ex situ* ricopre, infatti, anche un

ruolo indispensabile per la ricerca e il miglioramento genetico delle varietà.

La conservazione della diversità *ex situ* avviene nelle banche genetiche, che a seconda della modalità di conservazione e del tipo di materiale vegetale conservato si possono dividere in:

- banche del seme
- collezioni *in vivo* in pieno campo
- collezioni *in vitro*
- banche del DNA
- banche del polline

Gli ultimi due metodi sono tra i più recenti e riguardano l'estrazione ed il mantenimento del DNA delle piante, e la conservazione dei granelli di polline contenenti i gameti maschili. Il polline, pur riguardando solo il corredo aploide paterno, è facile da preservare e permette, inoltre, di abbassare i costi della conservazione.

La maggior parte delle banche genetiche è nata negli anni '60, quando le problematiche inerenti la perdita di risorse genetiche dovute principalmente alla "Rivoluzione Verde", cominciarono ad apparire preoccupanti.

Negli anni '90 le banche genetiche erano circa 1470 e conservavano circa 6.000.000 accessioni tra piante coltivate e specie *wild relative* (FAO, 1998). Tali numeri erano però destinati a crescere, infatti, già nel 2000 le banche arrivarono a quota 1750 con più 7.000.000 accessioni in conservazione (FAO, 2010).

Le banche più conosciute al mondo sono: i centri del Gruppo Consultivo sulla Ricerca Agricola Internazionale (CGIAR), che conservano circa 650.000 accessioni tra specie agrarie, foraggere e forestali; la Svalbard Global Seed Vault in Norvegia che si occupa della conservazione di semi; la Banca Genetica del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Bari (CNR) che custodisce attualmente circa 65.000 campioni di specie selvatiche e coltivate, in prevalenza cereali e leguminose e altre specie erbacee tipiche del bacino del Mediterraneo.

L'attività nazionale volta a censire ed a conservare le RGV è ripartita tra 30 strutture, tra cui istituzioni di ricerca pubbliche, università, collezioni regionali e private, ecc. Tra gli istituti di ricerca, oltre al CNR, tali attività vengono condotte anche dal Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura (CRA) per mezzo dei suoi Centri ed Unità di Ricerca distribuiti sul territorio italiano, che dal 2004 coordina, inoltre, il Progetto "Inventario Nazionale sulle Risorse Genetiche Vegetali conservate *ex situ* in Italia" (RGV/FAO), finanziato dal Mipaaf, con l'obiettivo di gestire la conservazione *ex situ* e di predisporre un database unico delle accessioni conservate.

A tal riguardo, nel 2006, presso il Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma, è stato

avviato il Centro Nazionale del Germoplasma Frutticolo (CNGF), nel quale sono conservate circa 6.000 accessioni di specie frutticole anche attraverso tecniche di coltura *in vitro* e di crioconservazione.

3. Tecniche di conservazione *ex situ*

Sono diverse le tecniche di conservazione *ex situ* di germoplasma impiegate per la salvaguardia della biodiversità vegetale. Oltre alla conservazione dei semi e a quella *in vivo*, sono in aumento studi finalizzati all'applicazione delle metodologie di coltura *in vitro* alla salvaguardia della biodiversità, con particolare attenzione alla micropropagazione. Tuttavia, in condizioni *in vitro*, le periodiche subcolture, possono in alcuni casi indurre instabilità genetica mettendo a rischio l'applicazione di questa metodologia per la conservazione ed il mantenimento di alcuni genotipi. Per tale ragione si fa spesso ricorso a tecniche, come la crescita rallentata e la crioconservazione, che diminuendo il numero delle subcolture, assicurano una migliore sicurezza genetico-sanitaria.

3.1 Conservazione di semi

La conservazione dei semi rappresenta, per molte specie, il metodo più efficiente ed economico di stoccaggio del germoplasma. L'idea di conservare semi di diverse specie in strutture capaci di garantire la loro vitalità per lungo termine è nata all'inizio del secolo scorso con lo scienziato Nikolai Vavilov (Koo et al. 2004).

Il procedimento è semplice e consiste principalmente nell'essiccazione dei semi e nel loro impacchettamento e stoccaggio a basse temperature; test di germinazione vengono poi condotti periodicamente per verificarne la vitalità.

I fattori più importanti che influenzano la longevità dei semi così conservati sono: la temperatura, il contenuto di umidità e l'umidità relativa (Ellis e Robert, 1980; Dickie et al. 1990). Un altro aspetto importante da considerare è la modalità di essiccazione dei semi; quest'ultima, infatti, oltre al tipo e allo stato fisiologico dei semi, può condizionare la riuscita della conservazione (Probert et al. 2007; Vodouhe et al. 2008).

Non è, però, sempre possibile attuare questo tipo di conservazione, dal momento che:

- spesso i semi sono colpiti da infezioni causate da patogeni o insetti che ne limitano la sopravvivenza;
- alcuni semi presentano altissimi gradi di eterozigosi e non sono quindi idonei al mantenimento del genotipo (ciò si verifica anche nel caso delle specie da frutto);
- alcune piante non producono semi, come nel caso della noce di cocco e del banano, o producono semi non vitali, e per tale ragione vengono propagate vegetativamente; è il

caso delle specie ortive che si riproducono per tubero o di specie arboree come ad esempio la palma da dattero (Chang et al. 2001; Bekheet et al. 2007);

- alcuni semi rimangono vitali per un periodo di tempo limitato e spesso non sopportano la disidratazione necessaria prima dello stoccaggio a basse temperature.

Per ciò che riguarda quest'ultimo aspetto, è possibile dividere i semi in due categorie: semi ortodossi e semi recalcitranti.

I semi ortodossi possono essere sottoposti a disidratazione spinta e conservati in condizioni di bassa umidità e bassa temperatura per diversi anni. Alcuni semi ortodossi sono molto resistenti alla disidratazione, fino ad un contenuto di acqua pari al 3%, senza alcun danno o riduzione nella vitalità (Uragami et al. 1990; Panis et al. 2001; Engelmann, 2004).

I semi ortodossi sono in genere conservati per breve periodo, a temperature comprese fra 0 e 5 °C, e per lungo periodo, a temperature più basse tra -18 e -20 °C, con un contenuto di umidità che si aggira intorno al 4-6 %.

I semi recalcitranti non tollerano la disidratazione fino ad un livello di umidità tale da permettere la loro esposizione e conservazione a basse temperature. Ciò è dovuto, nella maggior parte dei casi, alla loro conformazione caratterizzata dalla presenza di endosperma carnoso.

Esistono, infine, alcuni semi con caratteristiche simili ad entrambe le categorie precedenti, ossia i semi intermedi. Questa tipologia di semi tollera la disidratazione fino a valori di umidità compresi tra 7 e 20 % (Hong et al. 1998), ma, il più delle volte, una volta essiccati vengono danneggiati dalle basse temperature di conservazione (Piotto e Di Noi, 2001).

I semi possono essere conservati anche mediante immersione di azoto liquido. Tale metodo, è stato inizialmente sviluppato per la conservazione di risorse genetiche di specie importanti nel campo agricolo (Rajasekharan, 2006).

Lo sviluppo di protocolli semplici di crioconservazione di semi ortodossi ha promosso la crioconservazione di un gran numero di specie a costi bassi, riducendo significativamente il deterioramento dei semi durante la conservazione (Stanwood, 1987). Tale metodo, è stato, infatti, messo appunto per molti semi di specie officinali selvatiche a rischio di estinzione (Rajasekharan, 2006).

Nel caso dei semi recalcitranti invece, la crioconservazione viene applicata maggiormente agli embrioni e agli assi embrionali, ed, in questo caso, la sopravvivenza è spesso non uniforme e la rigenerazione si limita alla formazione di callo. Solo in pochi casi, infatti, si è ottenuta rigenerazione completa da questo tipo di materiale sottoposto a crioconservazione (Chin e Pritchard, 1988; Assy Bah e Engelmann, 1992).

La crioconservazione di embrioni zigotici e assi embrionali è stata portata a termine con successo nel caso della noce di cocco (Chin et al. 1989; Assay Bah e Engelmann, 1992 a, b), dell'albero della gomma (Normah et al. 1986) del tè (Chaudury et al. 1991) e del nocciolo (Normah et al. 1994).

Fino a pochi anni fa le banche dei semi si occupavano principalmente della conservazione di varietà agronomiche e delle rispettive specie selvatiche che rivestivano un ruolo importante sotto il punto di vista alimentazione ed economico-commerciale; queste rappresentavano, infatti, quasi il 90% del materiale vegetale posto in conservazione. Di recente è, invece, possibile trovare presso le medesime strutture anche numerose specie rare o a rischio di estinzione.

La prima banca ad entrare in funzione è stata, nel 1958, quella situata presso il laboratorio nazionale per la conservazione dei semi, del campus dell'Università Statale del Colorado (Hartmann e Kester, 1990). Ad oggi, sono milioni le accessioni vegetali conservate nel mondo, grazie all'attività di 1.300 banche dei semi. Si stima, infatti, che 6 milioni di esemplari siano oggi conservate in banche nazionali, regionali, internazionali e private in tutto il mondo (sito IPGRI).

3.2 Collezioni in campo

Le piante per le quali non è possibile conservare i semi o che presentano una propagazione di tipo vegetativa sono tradizionalmente conservate *in vivo* presso banche genetiche in pieno campo (Reed et al. 2004). Tali collezioni consistono in raccolte di piante mantenute in ambiente controllato (giardini botanici, serre, arboreti, giardini alpini, vivai, ecc.). In questo caso, ciascuna accessione in conservazione è rappresentata da un minimo di 2 ad un massimo di 5 piante, a seconda dello spazio e delle risorse finanziarie e umane disponibili. Va da sé che la conservazione di queste accessioni ha bisogno di una vasta area di coltivazione e di alti costi di gestione. Inoltre, le piante in campo sono maggiormente soggette ad infezioni ed infestazioni, a condizioni climatiche avverse e a calamità naturali. Un altro svantaggio, infine, è dato dal fatto che spesso in queste collezioni sono conservati gruppi di specie sessualmente compatibili, con possibilità di ibridazioni.

Le collezioni *in vivo* ricoprono un ruolo importante in tutto il mondo, in particolare per alcune specie da reddito come la gomma, il mango, la patata dolce, e anche per alcune specie spontanee.

In Italia esistono collezioni in campo delle principali specie fruttifere. Le più conosciute sono:

- la collezione di mandorlo mantenuta presso il Museo Vivente del Mandorlo di

Agrigento, che raccoglie oltre 300 cultivar provenienti da tutto il territorio regionale siciliano;

- la collezione di agrumi mantenuta dal Centro di ricerca per l'agrumicoltura e le colture mediterranee (CRA-ACM) di Acireale, in cui sono presenti 310 accessioni di *Citrus* e dei generi affini quali *Poncirus*, *Fortunella*, ecc;
- la collezione di olivo mantenuta dal Consiglio Nazionale delle Ricerche presso l'azienda sperimentale "Santa Paolina" a Follonica;
- la collezione di melo, pero e ciliegio mantenuta presso l'Orto dei frutti dimenticati di Pennabili in Emilia-Romagna.

3.3 Conservazione per mezzo della coltura *in vitro*

I progressi nel campo delle biotecnologie, specialmente nel settore delle tecniche di coltura *in vitro* e della biologia molecolare, hanno fornito importanti metodi per migliorare la conservazione e la gestione delle risorse genetiche vegetali (Ramanatha Rao et al. 1994; Withers, 1995).

In particolare, le tecniche di coltura *in vitro*, rappresentano una valida alternativa per la conservazione di risorse genetiche appartenenti a specie per cui non è possibile ricorrere allo stoccaggio dei semi in *seed bank* (Henshaw, 1975). Esse, inoltre, sono di grande interesse per la collezione, la moltiplicazione e la conservazione del germoplasma (Engelmann, 1991; Bunn et al. 2007), e possono rivestire un importante ruolo nella tutela delle specie a rischio di estinzione e nella protezione di genotipi ritenuti importanti da un punto di vista economico.

La conservazione *in vitro* consente di mantenere il materiale vegetale in condizioni di sterilità ed in ambiente controllato sotto l'aspetto fitosanitario, e permette di evitare l'esposizione delle piante agli stress ambientali (Withers e Engelmann, 1997) e alle infezioni degli insetti e dei patogeni. Gli altri aspetti favorevoli, oltre alla richiesta di poco spazio, riguardano la possibilità di poter disporre di materiale vegetale vitale durante tutti i periodi dell'anno, la facilità e rapidità di moltiplicazione e la più bassa richiesta di manodopera per il mantenimento delle collezioni *in vitro* rispetto a quelle *in vivo*.

Già dagli anni '70 le tecniche legate alla coltura *in vitro* hanno dimostrato grandi potenzialità applicative nel settore della conservazione del germoplasma, a supporto dei sistemi più tradizionali di propagazione di materiale vegetale (Fay, 1994, Withers e Engelmann, 1997).

Le tecniche di colture *in vitro* che riguardano il campo della conservazione delle risorse genetiche vegetali sono:

- la coltura di tessuti a crescita normale

- la coltura di tessuti a crescita rallentata (conservazione a medio-termine),
- la crioconservazione (conservazione a lungo-termine).

Sono diverse le specie conservate mediante queste tecniche, come ad esempio: *Allium* spp., *Cocos nucifera*, *Theobroma cocoa*, *Vitis*, *Prunus*, *Citrus* spp., *Saccharum*, *Solanum* spp., *Musa* spp., *Colocasia esculentum*, *Manihot* spp. e *Ipomaea batatas* (Henshaw, 1975; Zapartan e Deliu, 1994; Withers, 1995; Ashmore, 1997; Withers e Engelman, 1997; Engelman e Engles, 2002; Gonzalez-Benito et al. 2004; Paunescu e Holobiuc, 2005; Sarasan et al. 2006).

4. La Coltura *in vitro*

La micropropagazione, o propagazione *in vitro*, è un metodo di propagazione clonale, che permette di produrre e conservare piante *in vitro* geneticamente identiche tra loro e alla piante madre. Tale tecnica, oltre a rivestire una notevole importanza ai fini della propagazione commerciale delle piante, rappresentando una valida alternativa ai tradizionali sistemi di moltiplicazione per seme o per talea, può avere anche un ruolo strategico nella conservazione *ex situ* della biodiversità vegetale.

La micropropagazione consente, infatti, di mantenere e conservare in condizioni asettiche (assenza di batteri, funghi e altri microrganismi) e in condizioni ambientali controllate (lontano dai fattori climatici, spesso avversi, che caratterizzano la conservazione in pieno campo), collezioni di germogli in spazi ristretti e a costi contenuti.

L'obiettivo della propagazione *in vitro*, è quello di poter disporre di una notevole quantità di individui per ogni singola accessione al fine di allestire una banca del germoplasma partendo da un ridotto numero di piante madri, con cicli di propagazione indipendenti dalla stagionalità, in tempi e spazi ridotti, con garanzia di sanità e di rispondenza genetica del materiale ottenuto (Concezzi et al. 2011).

Il materiale di partenza maggiormente utilizzato per l'allestimento delle colture asettiche è rappresentato principalmente dalle gemme apicali e dalle gemme ascellari, ma è possibile utilizzare anche foglie, organi fiorali, embrioni immaturi e frammenti di cotiledoni (Paunescu, 2009).

La qualità dell'espianto e la successiva risposta *in vitro* sono significativamente influenzate dalla vigoria, dalle condizioni fitosanitarie e fisiologiche delle piante madri (Fay, 1992) e dalla presenza di i patogeni *soil-born* (Withers, 1987). Pertanto, il prelievo del materiale per l'allestimento di specie di cui è necessario conservare il germoplasma, non è sempre facile. Non sempre, infatti, il materiale da stabilizzare *in vitro* proviene da una collezione *in vivo* nella quale le piante madri sono allevate in ambiente controllato, tale da favorirne la crescita e

contenere i fitopatogeni. Ci sono casi in cui è necessario procedere al reperimento di materiale conservato *in situ*, da piante spesso non indenni da patogeni, e sottoposte a stress ambientali di varia natura (stress abiotici).

Solitamente il prelievo viene effettuato in autunno (prima dell'entrata in dormienza) e alla fine dell'inverno (prima della ripresa vegetativa), a seconda della specie.

Il materiale raccolto va conservato in sacchetti di plastica per evitare la disidratazione e, se è conservato per più giorni, va tenuto in frigorifero a 3-4 °C.

Ogni specie richiede specifici protocolli di coltura *in vitro*, ma in linea generale, le fasi della micropropagazione sono: 0) la selezione della pianta madre; I) la disinfezione e messa in coltura; II) la moltiplicazione; III) la radicazione; IV) l'ambientamento.

Le condizioni di crescita durante la coltura e le fasi sopra elencate, possono essere modificate a seconda dell'obiettivo da raggiungere. Se, infatti, si intende mantenere l'accessione all'interno di una collezione *in vitro*, sarà necessario raggiungere la seconda fase e limitarsi a cambiare il terreno di coltura in media ogni 21-30 giorni. Nel caso in cui si voglia ottenere una rapida moltiplicazione e ringiovanimento per il reinserimento dell'accessione nell'ambiente naturale di origine, sarà necessario completare il ciclo delle fasi mettendo a punto anche i protocolli di radicazione e ambientamento.

(I) La disinfezione riguarda la superficie esterna degli espianti ed è necessaria al fine di eliminare le contaminazioni di batteri e funghi che possono pregiudicare la sopravvivenza, la crescita e la proliferazione *in vitro* dei germogli.

Questa fase può essere associata alla termoterapia (coltivazione a 38°C per 15-20 gg), e viene effettuata con l'utilizzo di alcuni detergenti chimici quali: ipoclorito di sodio (NaOCl), ipoclorito di calcio (CaCl₂O₂), cloruro di mercurio (HgCl₂) e alcool etilico (C₂H₅OH). A questi possono essere aggiunte alcune gocce di tensioattivo (Twin '80®) che permette al prodotto chimico utilizzato di penetrare più in profondità all'interno dei tessuti vegetali.

La scelta dell'agente disinfettante e dei tempi di applicazione dipendono dalla specie e dalla condizione del materiale di partenza. In linea generale, le concentrazioni delle soluzioni, ed i tempi di esposizione vanno modulate in relazione alla stagione di prelievo e alla consistenza degli espianti. Più il tessuto è giovane ed erbaceo, più il trattamento previsto nella fase di disinfezione sarà contenuto; al contrario, per tessuti legnosi e gemme dormienti è necessario, di solito, effettuare trattamenti più lunghi. Dopo l'immersione del materiale di partenza nella soluzione disinfettante per i relativi tempi, occorre sempre eseguire almeno due/tre risciacqui con acqua sterile per eliminare

eventuali residui del trattamento chimico, che potrebbero essere dannosi per la successiva crescita dei tessuti vegetali. Questa fase è completata con successo quando gli espianti sono completamente decontaminati e rimangono vitali (Paunescu, 2009).

Dopo la disinfezione, è possibile procedere con il prelievo del meristema o dell'apice vegetativo, sotto cappa a flusso laminare, ed al posizionamento degli stessi all'interno di contenitori contenenti un terreno di crescita che ne permetta la proliferazione e la formazione di nuovi germogli. In caso di specie legnose e semilegnose, in questa fase sono di solito aggiunti al terreno carbone attivo (1-2 g/l) o sostanze antiossidanti come l'acido ascorbico o l'acido citrico (Cadinu, 1998). Queste specie, infatti, possono rilasciare fenoli alla base del germoglio che, ossidandosi, inibiscono il corretto assorbimento dei nutrienti dal terreno colturale e possono portare alla senescenza e alla morte del germoglio. I fitoregolatori utilizzati in questa fase, per lo sviluppo dell'espianto sono le auxine e le citochinine; la loro concentrazione dipende dalla specie e dal tipo di espianto.

Questa prima fase di adattamento alle condizioni di coltura *in vitro* può durare dalle 3 alle 6 settimane.

- (II) Questa fase consiste nel trasferimento dei germogli ottenuti dagli espianti sterili, su terreni cosiddetti di moltiplicazione, caratterizzati da livelli di citochinine più elevati. Il trasferimento dei germogli va effettuato mediamente ogni 3-4 settimane a seconda della specie. Alcune specie possono essere mantenute in collezione in questa fase (Fase II), con subcolture regolari, per una durata di 8-48 mesi. In questo caso gli svantaggi sono dovuti proprio alla breve durata dei cicli, e quindi al numero delle subcolture che, oltre all'alta richiesta di manodopera dovuta alla frequenza dei trasferimenti periodici del materiale su un terreno di coltura fresco, potrebbero indurre variabilità somaclonale. Per tale ragione, sono in corso numerosi studi sperimentali al fine di allungare i tempi tra una subcoltura e l'altra, e permettere in questo modo la conservazione a medio-termine delle colture *in vitro*.
- (III) Questa fase, essenziale nel caso della produzione commerciale di piante provenienti dalle colture *in vitro*, consente, anche in caso della conservazione della biodiversità, di poter produrre un elevato numero di piante da reintrodurre nell'ambiente di origine. Essa consiste nel preparare i germogli, ottenuti nel corso della fase precedente, al trasferimento nel suolo.

La radicazione *in vitro* può essere preceduta da un periodo di 15-20 giorni, detto periodo di allungamento, utile per ottenere germogli ben sviluppati. Il terreno utilizzato

a tal fine è, generalmente, lo stesso usato per la fase di moltiplicazione, ma con una concentrazione ridotta di citochinine, ed una concentrazione più elevata di acido giberellico, in modo da inibire l'attività delle gemme ascellari e di favorire l'allungamento dei germogli.

La radicazione è influenzata dalla formulazione e dalla concentrazione dei sali minerali all'interno del terreno di coltura, dallo zucchero e, principalmente dal tipo e dalla concentrazione dell'auxina utilizzata. Tra i fattori fisici che influenzano la radicazione vi sono, inoltre, l'intensità luminosa ed il fotoperiodo.

(IV) Questa fase, che consiste nel passaggio dalle condizioni di coltura *in vitro* a quelle *in vivo*, è molto delicata, in quanto la pianta è sottoposta a drastici cambiamenti quali l'aumento dell'intensità luminosa e la riduzione dell'umidità. Per tale motivo, nei primi giorni è necessario mantenere alcuni fattori, quali l'umidità e la temperatura, il più possibile simili alle condizioni di coltura *in vitro*. Nei giorni successivi, quest'ultimi vengono poi modificati in modo da arrivare lentamente alle condizioni naturali della coltura *in vivo*.

I protocolli di propagazione *in vitro* sono stati messi a punto per diverse centinaia di specie (Geoge, 1996), incluse numerose specie rare e a rischio di estinzione (Fay, 1992; Sarasan et al. 2006).

5. La conservazione mediante crescita rallentata

La conservazione *in vitro* in condizioni di crescita rallentata (*slow growth storage*), permette il marcato prolungamento dei tempi di subcoltura rispetto alle 3-4 settimane medie (De Carlo et al. 2009). Tale tipologia di conservazione, riducendo il metabolismo cellulare e di conseguenza l'accrescimento dei tessuti e lo sviluppo dei germogli, consente, infatti, di mantenere colture vegetali *in vitro* per diversi mesi senza alcun intervento di subcoltura. Per mezzo di tale tecnica è possibile estendere i periodi tra una subcoltura e l'altra, da un minimo di 12 mesi fino a 4 anni per numerose specie (Ashmore, 1997).

La crescita rallentata consente, inoltre, di limitare i rischi di contaminazione e l'insorgenza di variabilità somaclonale, e permette, di conservare grandi collezioni in spazi relativamente ridotti. La riduzione della crescita è ottenuta generalmente per mezzo della variazione di fattori chimici (modifiche al mezzo colturale) e/o di fattori fisici (modifiche alle condizioni ambientali).

Le modifiche al terreno colturale possono includere la riduzione della concentrazione di elementi minerali e degli zuccheri, il cambiamento della natura e/o della concentrazione dei

regolatori di crescita, l'aggiunta di composti ad azione osmotica (mannitolo, sorbitolo, saccarosio, ecc.) e l'utilizzo di acido abscissico (ABA). In letteratura, infatti, sono presenti vari studi che riportano l'applicazione di regolatori di crescita e/o sostanze osmoticamente attive (sorbitolo, mannitolo, ecc.), al fine di testarne l'influenza sulla qualità della piena ripresa vegetativa e sui tempi massimi di conservazione della coltura.

Le modifiche delle condizioni standard ambientali di coltura ai fini della conservazione, riguardano principalmente, la riduzione della temperatura, combinata o meno con una riduzione dell'intensità luminosa fino alle condizioni di oscurità completa.

Le temperature di mantenimento delle colture in crescita rallentata solitamente si aggirano, in funzione della specie, tra 1 e 10 °C. Le specie tolleranti il freddo come alcuni *Prunus*, possono essere mantenute a temperature comprese tra 0 °C e 4 °C (Reed, 1992); mentre, le specie delle piante tropicali spesso non tollerano il freddo e devono essere conservate ad un *range* di temperatura compreso tra 15-20 °C (Bertrand-De Brunais et al. 1991) o anche più alte, a seconda della sensibilità. Per tale ragione, nel caso di specie sensibili alle basse temperature, le procedure per estendere il periodo di subcoltura sono principalmente focalizzate sulla modifica del terreno colturale.

L'acclimatazione al freddo è basata sull'attivazione di meccanismi biochimici, fisiologici e enzimatici (Hughes e Dunn, 1996) che permettono la protezione delle membrane cellulari, mediante l'aumento dei livelli di zuccheri ed altre sostanze crioprotettive, e di processi che limitano lo stress ossidativo.

Lo stress da freddo può produrre una riduzione dei pigmenti fotosintetici (Arbona et al. 2013) e incremento della produzione di specie reattive (*reactive oxygen species* ROS) (Pastori et al. 2000), il cui accumulo può produrre danno ossidativo cellulare. I meccanismi che la pianta attiva per controllare l'effetto dell'accumulo dei ROS possono essere di natura enzimatica (catalasi, dismutasi e perossidasi) o non enzimatica. Questi ultimi comprendono i carotenoidi, i fenoli e la vitamina E (Hodgson e Raison, 1991).

Per ciò che riguarda l'esposizione alla luce, sebbene la conservazione delle colture in totale oscurità sia la condizione più frequente, sono state occasionalmente utilizzate diverse combinazioni di fotoperiodo ed intensità luminosa (Lambardi e De Carlo. 2003).

La modifica delle condizioni gassose (CO₂ e etanolo) all'interno del vaso di conservazione (atmosfera controllata), la disidratazione dei tessuti, e la riduzione del livello di ossigeno con l'ausilio di un strato di olio minerale, possono rappresentare ulteriori opzioni per il prolungamento dell'intervallo tra le subcolture (Withers et al. 1997; Engelmann et al. 2002).

L'utilizzo di uno o più di queste strategie in combinazione tra di loro, rallenta

consistentemente la crescita dei germogli e, se la procedura di conservazione è stata bene caratterizzata, non ne risulta compromessa la vitalità e la ricrescita quando riportati in condizioni standard di coltura (Lambardi e De Carlo, 2003). Pertanto, una volta ripristinate le condizioni ottimali di crescita *in vitro*, i tessuti vegetali riprendono l'attività di ricrescita e possono rientrare in un nuovo ciclo di conservazione.

Altri parametri da considerare, che possono influenzare l'efficienza della conservazione in crescita rallentata, sono: il tipo di espianto, lo stato fisiologico nel quale si trovano, il volume ed il tipo di chiusura dei contenitori.

Generalmente, la crescita rallentata viene applicata a tessuti vegetali organizzati come i germogli, piuttosto che ai tessuti indifferenziati come nel caso dei calli, dal momento che questi possono essere maggiormente soggetti a variabilità somaclonale.

La conservazione *in vitro* in condizioni di crescita rallentata, è stata sviluppata per un gran numero di specie forestali, da frutto, orticole e per numerose specie tropicali (Shikhamany, 2006). Ad esempio la *Zoysia* è stata conservata con successo alla temperatura di 21 °C per 2 anni (Jarret, 1989), il *Lolium multiflorum* Lam. è stato mantenuto per un anno alla temperatura di 2-4 °C senza alcuna subcoltura (Dale, 1980) ed un'ampia gamma di *Cynodon* sono state conservate in frigo a 4 °C per un periodo di tempo compreso tra 4 mesi ed un intero anno (Aynalem et al. 2002). La conservazione a 4 °C e con un fotoperiodo di 16 h ha permesso la conservazione di *Pyrus communis* e altre specie per un periodo compreso tra 12 e 18 mesi (Bell e Reed, 2002). Le piante *in vitro* di *Musa* possono, infine, essere conservate a 15 °C fino a 13 mesi (Banerjee e De Langhe, 1985).

Nel mondo, circa 37.600 accessioni sono conservate in condizioni di crescita rallentata presso le *gene banks* (FAO, 1996).

La conservazione in crescita rallentata, oltre a rappresentare una biotecnologia importante per la salvaguardia della biodiversità, rappresenta anche una parte importante della filiera produttiva dei laboratori commerciali di micropropagazione, in quanto permette di aumentare l'offerta di specie e varietà del laboratorio, facilitandone la programmazione delle produzioni, e di agevolare il trasferimento di materiale fra i laboratori (Roncasaglia et al. 2009).

6. La crioconservazione

Il termine crioconservazione, o conservazione criogenica, si riferisce allo stoccaggio a temperatura ultra-bassa (-196 °C temperatura dell'azoto liquido o -150 °C temperatura dell'azoto in fase di vapore), di cellule, tessuti e organi vegetali provenienti da colture *in vitro*, o di semi, assi embrionali e gemme dormienti provenienti da colture *in vivo*.

Questa tecnica, sviluppata negli ultimi 25 anni, rappresenta oggi un importante e valido metodo per la conservazione del materiale vegetale (Radha et al. 2012). La crioconservazione, infatti, offre la possibilità di conservare un gran numero di accessioni in spazi contenuti e a costi di gestione ridotti, per un tempo teoricamente infinito.

Questa tecnica, riducendo la manipolazione del materiale vegetale conservato (non sono previste subcolture nel periodo di conservazione), limita, inoltre, la perdita dovuta ad errori umani e assicura la protezione fitosanitaria e una maggiore stabilità genetica evitando l'insorgenza di variabilità somaclonale. Quest'ultimo aspetto è dovuto anche al fatto che, alla temperatura di -196°C , la divisione cellulare, le attività metaboliche e biochimiche della cellula si arrestano (Hardig, 2004; Akdemir et al. 2013). Un ultimo vantaggio, è dato dal fatto che i protocolli di crioconservazione, una volta standardizzati, si presentano semplici da attuare e facilmente replicabili.

Nel processo di crioconservazione risulta essere molto importante il tipo e la dimensione dell'espianto, il contenuto di acqua negli stessi e i pretrattamenti prima dell'immersione in azoto liquido, il tipo e la concentrazione dei crioprotettori utilizzati, il metodo di crioconservazione utilizzato, il processo di raffreddamento e di scongelamento ed, infine, le condizioni in cui gli espienti vengono posti per la ricrescita (Reed, 2001; González-Benito et al. 2004; Bekheet et al. 2007).

Il contenuto di acqua all'interno delle cellule è l'aspetto più importante della conservazione in azoto liquido (Stanwood, 1985). Affinché la crioconservazione abbia successo e i tessuti successivamente riprendano a ricrescere, è necessario, infatti, evitare il danneggiamento cellulare dovuto alla formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari in seguito al forte abbassamento termico. Questi ultimi, infatti, indeboliscono l'integrità strutturale, osmotica e colligativa delle cellule, causando rotture e danni meccanici alle membrane cellulari, al nucleo e agli organelli e, in ultima istanza, conducono alla morte cellulare (Benson, 2008).

Per applicare le tecniche di crioconservazione è, perciò, necessario, diminuire il contenuto di acqua intracellulare, in modo che la soluzione citoplasmatica si concentri diventando più viscosa. Tale soluzione, una volta esposta a temperature ultra-basse, non sarà più sottoposta a congelamento, bensì a vitrificazione. Per vitrificazione si intende la solidificazione di un liquido in uno stato amorfo e vetroso, senza che si verifichi la formazione di cristalli ghiaccio come nel caso del congelamento. Questo stato fisico si innesca quando una soluzione acquosa è talmente concentrata o raffreddata così rapidamente da aumentarne la viscosità e impedirne il riarrangiamento molecolare in forma cristallina (Lambardi e De Carlo 2009).

Al fine di favorire lo stato di vitrificazione è possibile effettuare una criodisidratazione (*freeze*

dehydration), una osmodisidratazione (*osmotic dehydration*) e/o una evaporazione.

Le strategie di crioconservazione si differenziano principalmente dalla metodologia con la quale viene promossa la fuoriuscita dei liquidi dalla cellula e la conseguente concentrazione della soluzione citoplasmatica.

La tecnica conosciuta come *slow-cooling* utilizza un tipo di raffreddamento lento al fine di favorire il congelamento dell'acqua extracellulare con conseguente concentrazione della soluzione residua e fuoriuscita, per osmosi, delle molecole di acqua presenti all'interno della cellula (criodisidratazione).

Le tecniche conosciute con il nome di incapsulazione-disidratazione, vitrificazione, *droplet-vitrification* ed incapsulazione-vitrificazione contemplano l'utilizzo di sostanze crioprotettive di tipo penetrante e non-penetrante (osmodisidratazione).

Sono diversi gli studi che dimostrano che le sostanze crioprotettive aumentano la stabilità della membrana plasmatica sia con una interazione diretta con la stessa che con la modifica della distribuzione dell'acqua internamente ed esternamente la cellula (Uemura et al. 2009).

Le sostanze crioprotettive più utilizzate sono distinte in base alla capacità di penetrare o meno all'interno della cellula; è possibile, quindi, distinguere dei crioprotettori in grado di attraversare le membrane cellulari (glicerolo e dimetilsolfossido - DMSO) e dei crioprotettori non in grado di attraversare le membrane cellulari (polivinilpirrolidone - PVP, glicole polietilenico - PEG, saccarosio).

Infine, la tecnica di incapsulazione-disidratazione prevede anche una disidratazione di tipo fisico per mezzo di un flusso di aria sterile proveniente dalla cappa a flusso laminare o per mezzo di esposizione a gel di silice.

Indipendentemente dalla tipologia di disidratazione realizzata, è, comunque, necessario non scendere al di sotto del limite di tolleranza della cellula. Una disidratazione troppo spinta, infatti, può provocare danni alla membrana cellulare dovuti all'alta concentrazione dei soluti all'interno della cellula e alla denaturazione delle proteine (Kaviani, 2011).

In bibliografia, la percentuale di acqua negli espianti ritenuta più idonea prima dell'immersione in azoto liquido, si aggira intorno al 20% (Uragami et al. 1990; Engelmann, 1997; Gonzales-Benito et al. 2004; Gonzales-Arnao, 2006).

Determinante per il successo del processo è anche la fase di recupero degli espianti successiva all'immersione in azoto liquido. Tale fase è eseguita, la maggior parte delle volte, per mezzo di un bagnetto termostato ad una temperatura di 20-40 °C. Infatti, la temperatura a cui avviene la fase di scongelamento, rappresenta l'aspetto critico per evitare la ricristallizzazione dell'acqua e per assicurare una corretta ripresa del materiale vegetale conservato.

I germogli di *Populus alba*, per esempio, hanno presentato la percentuale di ripresa più alta se scongelati a 40 °C (Panis e Lambardi, 2005).

Possono essere crioconservati differenti tipi di cellule, tessuti e organi vegetali. I protocolli di crioconservazione sono stati sviluppati principalmente per le specie a propagazione agamica. I risultati migliori sono stati ottenuti crioconservando germogli apicali e ascellari provenienti da piante *in vitro*. Questi espianti sono i più adatti perché assicurano una propagazione clonale, sono facili da conservare e presentano bassa percentuale di mutazione (Scowcroft, 1984). Embrioni zigotici e assi embrionali di cocco (Assy-Bah et al. 1992 a, b; Chin et al. 1989), cacao (Chandel et al. 1995), palma da olio (Chabrillange et al. 2000), noce (De Boucaud et al. 1994) sono stati crioconservati con successo.

La crioconservazione, ad oggi, è applicata a più di 80 specie vegetali (Zhao et al. 2005). Il numero delle specie, che può essere crioconservato è aumentato negli ultimi anni grazie allo sviluppo e al progresso di nuove metodologie (Rajasekhara, 2006). Con lo sviluppo di nuovi protocolli di crioconservazione, anche i tessuti di molte piante tropicali, considerate convenzionalmente non crioconservabili, sono stati conservati con successo in azoto liquido (Bajaj, 1995; Towill e Waters, 2000).

6.1 Tecniche di crioconservazione

Durante l'ultimo decennio sono stati sviluppati diversi protocolli di crioconservazione per la conservazione di tessuti vegetali. Le diverse tecniche sono state sviluppate per minimizzare gli effetti dovuti alla disidratazione e al congelamento, al fine di assicurare una sicura conservazione del materiale (Kaviani, 2011). Per scegliere il protocollo più idoneo da applicare, è possibile basarsi sui risultati riportati in bibliografia per la medesima specie o per specie simili. Una volta scelto il protocollo, è possibile modificare alcune fasi critiche al fine di migliorare la risposta del genotipo (Reed, 2009).

Slow-cooling

La tecnica conosciuta come *slow-cooling*, oltre ad essere stata la prima ad avere un protocollo “standard” per la conservazione dei tessuti vegetali (Withers et al. 1980) sviluppato negli anni ‘70, è stata la più utilizzata fino agli anni ‘80 (Kami, 2012).

Questa tecnica prevede una lenta immersione in azoto liquido (Kartha, 1985). Si procede quindi con l’introduzione degli espianti in *cryovials* contenenti sostanze come il DMSO (ad una concentrazione del 5-15%), il PEG, il saccarosio, il sorbitolo e il mannitolo, separatamente o in combinazione tra di loro. Queste sostanze hanno un’azione osmotica; molte di queste, come il DMSO, entrano all’interno della cellula e proteggono l’integrità della

stessa durante la crioconservazione (Rajasekharan, 2006).

Per il congelamento la temperatura viene abbassata in maniera graduale con una velocità compresa tra -0,5 e -2 °C/min. con l'ausilio di un congelatore programmabile fino a temperature comprese tra -20 e -100 °C, prima dell'immersione in azoto liquido.

Durante il lento congelamento iniziale, fino a circa -40 °C, la soluzione intracellulare diventa talmente concentrata da vitrificare, evitando così lesioni successive dovute all'immersione in azoto liquido (Gonzalez-Arno et al. 2008). Per la maggior parte delle specie, la temperatura da raggiungere gradualmente, prima dell'immersione in azoto liquido, si aggira intorno a -40 °C (Kami, 2012).

A seconda della specie conservata e alla grandezza dell'espianto, la velocità di raffreddamento può comprendere anche un *range* di -0,5 -50 °C/min. Tuttavia, in caso di velocità di congelamento pari a 2 °C/min. o più, la percentuale di ricrescita dopo la conservazione tende a diminuire (Sugawara e Sakai, 1974; Uemura e Sakai, 1980).

Questa tecnica è utilizzata ad oggi per la crioconservazione di tessuti vegetali non organizzati, come i calli e le sospensioni cellulari (Panis e Lambardi, 2005), e gli apici di specie tolleranti il freddo (Reed e Uchendu, 2008). Facendo ricorso a tale tecnica, oltre 1000 linee di callo di specie officinali sono state conservate in Gran Bretagna, e oltre 5000 linee embriogenetiche di conifere in un'unica criobanca in Canada (Engelmann, 2004).

Secondo quanto riportato da Engelmann (1997) questa tecnica non è adatta per la conservazione a lungo termine di apici vegetativi, embrioni zigotici ed embrioni somatici. Anche se Escobar et al. (1997) sono riusciti a crioconservare con successo con questa tecnica germogli di *Cassava*.

La fase di scongelamento viene effettuata per mezzo di immersione in acqua calda per 1-2 minuti e rimuovendo la sostanza crioprotettiva.

Questa tecnica non è applicabile alle specie sensibili alle basse temperature (Pennycooke et al. 2000) e, inoltre, presenta una grande limitazione di utilizzo legata alla necessità di disporre di un congelatore programmabile. Per ovviare a quest'ultimo problema, è stato messo appunto un protocollo chiamato *simple-freezing*, testato per diverse specie negli anni '90, che prevede il mantenimento degli espienti da conservare a temperatura ambiente per 10 minuti, il loro trasferimento ad una temperatura di -30 °C per 30-120 minuti e la successiva immersione in azoto liquido.

Le soluzioni vitrificanti testate per la tecnica di *slow-cooling* e di *simple-freezing* sono state, il glicerolo insieme al saccarosio o il DMSO associato al sorbitolo (Sakai et al. 1990; Niino et al. 1997; Maruyana et al. 2000).

Vitrificazione

La procedura conosciuta con il nome di vitrificazione è stata impiegata in passato sia per la conservazione di tessuti animali che vegetali (Sakai et al. 1990; Brockbank et al. 2000). L'utilizzo delle soluzioni vitrificanti per la conservazione di tessuti vegetali è stato sperimentato per la prima volta nel 1989 da Uragami et al. su colture cellulari di asparago e da Langis et al. su colture cellulari di *Brassica campestris* L.

Durante il processo di vitrificazione, gli espianti vengono immersi in una soluzione chiamata *loading solution* (LS) per circa 20-30 minuti a temperatura ambiente. La LS è formata dal terreno colturale standard modificato con saccarosio (0,4 mol/L) e glicerolo (2.0 mol/L). Dopo l'immersione in LS, gli espianti vengono trattati con una *Plant Vitrification Solution* (PVS) per un periodo di tempo variabile (da 15 a 120 minuti), prima dell'immersione in azoto liquido.

Le PVS sono soluzioni composte da più sostanze crioprotettive di tipo penetrante e non-penetrante. La soluzione vitrificante più comunemente utilizzata è la *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2), composta da 30% di glicerolo, 15% di glicole etilenico, 15% di dimetilsolfossido (DMSO) e da saccarosio 0.4 M (Sakai et al. 1990).

Di seguito sono riportate le composizioni delle principali PVS riportate in letteratura (Uragami et al. 1989; Nishizawa et al. 1993):

Soluzione	PVS1	PVS2	PVS3	PVS4
Componente g/L				
Glicerolo	220,0	300,0	500,0	350,0
Glicole etilenico	150,0	150,0	-	200,0
Glicole polietilenico	150,0	-	-	-
Dimetilsolfossido	70,0	150,0	-	-
Saccarosio	-	136,9	500,0	205,4
Sorbitolo	91,1	-	-	-

La percentuale di sopravvivenza degli espianti trattati con la PVS dipende dalla durata del trattamento, che deve essere lungo abbastanza per garantire una sufficiente disidratazione delle cellule, evitando però gli effetti tossici legati alla soluzione.

L'effetto del tempo di esposizione alle PVS cambia a seconda della temperatura a cui avviene il trattamento. In molti casi, l'esposizione è eseguita a 0°C in modo da minimizzare i rischi legati alla tossicità (Caccavale, 1998).

Dopo lo scongelamento delle *cryovials* prelevate dall'azoto liquido, gli espianti sono immersi in una *unloading solution* (US) per 30 minuti a temperatura ambiente, composta dal terreno colturale standard addizionato, generalmente, con saccarosio 1,2 M.

Ad oggi, questa è la tecnica più ampiamente utilizzata, grazie alla sua semplicità, alta riproducibilità e al fatto che è possibile applicarla ad un ampio *range* di tessuti e specie vegetali (Panis e Lambardi, 2005). Questa tecnica, infatti, risulta essere più appropriata per la conservazione di organi complessi (gemme e embrioni) rispetto la *slow-cooling*.

La PVS2 è stata usata con successo per la crioconservazione di germogli di diverse specie legnose economicamente importanti come *Malus*, *Pyrus*, *Prunus* e *Vitis vinifera* (Panis e Lambardi, 2005). Alte percentuali di sopravvivenza di germogli trattati con la PVS2 (superiori del 90%) sono riportate per *Prunus jamasakura* (Niino et al. 1997) e *Populus alba* (Lambardi et al. 2000).

Incapsulazione-Disidratazione e Incapsulazione-Vitrificazione

I protocolli di incapsulazione-disidratazione e di incapsulazione-vitrificazione si basano sulla tecnica di produzione dei semi sintetici. La differenza principale tra i due metodi è che l'incapsulazione-vitrificazione combina alla fase di incapsulazione, il trattamento con soluzioni vitrificanti.

Nel caso dell'incapsulazione-disidratazione, infatti, gli espianti sono immersi per 20- 30 minuti, in un terreno colturale con aggiunta di saccarosio (0,4 mol/L) e alginato di sodio (0,15 mol/L). Mentre, nel caso dell'incapsulazione-vitrificazione, viene aggiunto al terreno standard di coltura anche il glicerolo (1.0-2.0 mol/L). Gli espianti vengono, quindi, fatti gocciolare in una soluzione contenente cloruro di calcio (0,1 mol/L), formando, dopo circa 30 minuti, capsule di circa 4-5 mm di diametro.

Gli espianti incapsulati vengono trattati con LS a temperatura ambiente per un tempo variabile (da 15 a 120 minuti) nel caso dell'incapsulazione-vitrificazione, e con una soluzione ipertonica di saccarosio (da 0,25 a 1 M) per un periodo da 1 a 7 giorni nel caso dell'incapsulazione-disidratazione. Al termine dei trattamenti, nel primo caso la LS viene rimossa e gli espianti incapsulati vengono trasferiti all'interno di *criovials* con all'interno PVS (Plant Vitrification Solution), mentre, nel secondo caso si procede alla disidratazione delle capsule di alginato mediante esposizione a flusso di aria sterile o a gel di silice per un tempo variabile da 60 a 360 minuti, prima dell'immersione in azoto liquido.

In entrambi i casi, lo scongelamento viene effettuato con acqua a 40 °C per 1-2 minuti. Nel caso dell'incapsulazione-vitrificazione, gli espianti vengono trattati anche con una RS per 30 minuti a 25 °C prima del trasferimento in condizioni standard di coltura.

I vantaggi dell'incapsulazione sono dovuti al fatto che la percentuale di ripresa vegetativa dopo la crioconservazione si presenta alta grazie alla presenza della capsula di alginato. È stato, infatti, osservato che la presenza di una capsula nutritiva promuove la ricrescita degli

espianti dopo la conservazione in azoto liquido (Panis e Lambardi, 2005). Quest'ultima, infatti, garantisce minori danni degli espianti durante la loro esposizione alle soluzioni vitrificanti o alla fase di disidratazione.

Di contro, la fase di incapsulazione tende ad allungare le operazioni e a rendere il procedimento più complicato. Inoltre, nel caso dell'incapsulazione-disidratazione, durante la fase di disidratazione per mezzo del flusso di aria sterile, non è possibile controllare la temperatura e l'umidità; per tale ragione, l'utilizzo del gel di silice rappresenta un metodo più riproducibile (Panis et al. 2001).

La tecnica di incapsulazione-disidratazione è stata elaborata, per la prima volta, per la crioconservazione di germogli di patata da Fabre e Dereuddre nel 1990. Questa tecnica è stata nel tempo applicata agli apici di numerose specie di origine temperata e tropicale, e anche a sospensioni cellulari e a embrioni somatici di diverse specie (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006; Engelmann et al. 2008). Essa, infine, è stata anche applicata con successo a apici di *Malus*, *Pyrus* e *Prunus* (Panis e Lambardi, 2005). È riportato che, per il 50% delle specie conservate con questa tecnica, la sopravvivenza dei germogli è stata pari o maggiore dell'80% (Lambardi e De Carlo, 2003).

La tecnica incapsulazione-vitrificazione, è stata sperimentata per la prima volta da Matsumoto et al. nel 1995, utilizzando apici di *Wasabia japonica*. In seguito è stata applicata ad apici di un gran numero di specie (Sakai e Engelmann, 2007; Sakai et al. 2008).

Droplet-vitrification

Questa tecnica che è stata sviluppata per la prima volta da Schafer-Menuhr et al. nel 1994 utilizzando apici di patata, e implementata successivamente con l'utilizzo di soluzioni vitrificanti altamente concentrate (Panis et al. 2005).

Come illustrato per la vitrificazione, anche in questo caso gli espianti vengono posti a contatto con la LS per circa 20-30 minuti a temperatura ambiente e, successivamente, trattati con una PVS per un periodo di tempo variabile da 15 a 120 minuti. La differenza tra i due metodi consiste però nella modalità di immersione in azoto liquido. Nel caso della *droplet-vitrification*, infatti, una goccia di PVS (10 μ circa) con all'interno l'espianto viene posta su una piccola striscia di alluminio (0,5 x 2 cm), che viene successivamente immersa in azoto liquido.

Dopo la crioconservazione la striscia di alluminio prelevata dall'azoto liquido viene immersa nella RS per 20 minuti.

Questo metodo è stato applicato con successo a cellule, tessuti e organi differenziati (Engelmann, 2000), ed è stata utilizzato con successo per la conservazione di numerose specie

tropicali difficili da crioconservare (Pennycooke e Towill, 2000, 2001; Leunufna e Keller, 2003; Panis et al. 2005). Il vantaggio rispetto alla tecnica di vitrificazione semplice risiede nel fatto che l'immersione in azoto liquido dell'espianto è molto più repentino.

Disidratazione

È il metodo più semplice per diminuire velocemente la percentuale di acqua presente nelle cellule, e consiste nella disidratazione del materiale da conservare mediante un flusso di aria sterile (Shimonishi et al. 1991; Kuranuki e Yoshida, 1996), o gel di silice (Uragami et al. 1990). Dopo essere stati disidratati, gli espiaanti sono posti all'interno di *criovials* ed immersi in azoto liquido. I risultati migliori si ottengono generalmente con un contenuto di acqua compreso tra il 10 e il 20 %.

A seconda del tipo di espiaanto conservato, è possibile attuare un pretrattamento che consiste nella crescita dello stesso in presenza di sostanze crioprotettive.

Questo metodo è stato utilizzato in particolare per la conservazione di semi ortodossi, embrioni zigotici, assi embrionali e polline (Uragami et al. 1990; Engelmann, 2004).

Il vantaggio maggiore rispetto ai protocolli di vitrificazione, oltre alla velocità di esecuzione, consiste nella diminuzione del rischio di perdita di materiale dovuto alla tossicità delle PVS. Lo svantaggio deriva dal fatto che gli espiaanti essiccati sono spesso facilmente danneggiati dalle pinze durante la lavorazione.

7. Il nocciolo

7.1 Importanza e diffusione

Il genere *Corylus* si colloca all'interno della sottofamiglia *Coryloideae*, famiglia *Betulaceae* e ordine *Fagales*, (Chen et al. 1999; Yoo e Wen, 2002), e comprende all'incirca tra le 9 e le 25 specie (Thompson et al. 1996; Erdogan, 1999; Erdogan e Mehlenbacher, 2000a, b). Solo 7 tra queste sono però riconosciute dalla maggior parte dei tassonomisti, ossia: *Corylus avellana* L., *Corylus americana* Marshall, *Corylus heterophylla* Fisch, *Corylus cornuta* Marshall, a portamento arbustivo, e *Corylus colurna* L., *Corylus ferox* Wallich e *Corylus chinensis* L. a portamento arboreo (Thompson et al. 1996).

La specie più importante sotto l'aspetto economico è il *C. avellana* L. Questa, infatti, si trova al quinto posto a livello mondiale per la produzione di frutta in guscio, dopo anacardio (*Anacardium occidentale* L.), mandorlo (*Prunus dulcis* Miller D.A. Webb), noce (*Juglans regia* L.), e castagno (*Castanea* spp) (FAOSTAT, 2010). Tra queste specie, il nocciolo gioca un ruolo importante nell'alimentazione umana per la sua composizione unica in cui predominano gli acidi monoinsaturi, vitamine (vitamina E), minerali (selenio), aminoacidi essenziali, fenoli antiossidanti e altre sostanze bioattive (Alasalvar et al. 2003). Grazie alla sua composizione e alle sue proprietà, il nocciolo, è utilizzato in una grande varietà di alimenti, cosmetici e prodotti nutraceutici.

Il *C. avellana* L. presenta un alto grado di adattabilità, e vegeta in fasce climatiche molto diverse. Esso, però, è soprattutto diffuso nelle regioni temperate, caratterizzate da inverni miti e umidi ed estati fresche, tipiche della costa del Mar Nero della Turchia, le coste mediterranee dell'Italia e della Spagna, e la valle di Willamette dell'Oregon negli USA.

Il primo produttore di nocciole al mondo, è la Turchia con una produzione superiore al 70% del totale di nocciole raccolte, seguita dall'Italia con il 14% (primo produttore europeo), dagli Stati Uniti (Stato dell'Oregon) con il 4% e dalla Spagna con il 3% (FAOSTAT, 2010). In Italia, la coltivazione di questa specie è localizzata principalmente in quattro regioni: Campania (40%), Lazio (33%), Piemonte (14%) e Sicilia (10%). In queste regioni sono presenti numerose varietà di nocciolo legate fortemente al territorio di origine; la maggior parte di esse, presenta però, solo un interesse storico e può rappresentare anche una fonte di variabilità genetica. Tra queste troviamo le varietà: Mortarella, Camponica e San Giovanni in Campania, Nocchione e Rosetta nel Lazio, Carrello, Comune di Sicilia, Ghidara, Locale Piazza Armerina, Minnulara, Montebello in Sicilia. Le varietà italiane maggiormente diffuse, e che presentano le caratteristiche più richieste dal mercato, quali la forma sferica del seme,

sono invece: la Tonda Gentile Trilobata coltivata in Piemonte, la Tonda Gentile Romana diffusa nella zona di Viterbo e la Tonda di Giffoni tipica della zona di Salerno.

7.2 Caratteri botanici

Il nocciolo presenta solitamente un habitus cespuglioso con numerosi polloni nati da un ceppo comune. Alcune piante possono però mostrare habitus di tipo arboreo con altezza compresa tra i 5 e 7 metri. Presenta una chioma densa con rami eretti allungati e flessibili, ed un apparato radicale di tipo espanso e provvisto di micorrize.

Le foglie sono alterne e tondeggianti, acuminate in punta e provviste di nervature pennate ben evidenti, con peluria nella pagina inferiore.

L'infiorescenza maschile, amento, è pendula (lunga 6-8 cm) e ricca di polline a diffusione anemofila, mentre i fiori femminili sono molto piccoli e provvisti di un ciuffetto di stimmi rosso vivo.

I frutti, in gruppi di 2 o 4, sono degli acheni racchiusi in pericarpi legnosi di colore marrone chiaro, e circondati da una cupola di brattee sovrapposte simile a delle foglie.

7.3 Tecniche di propagazione

La tecnica di propagazione clonale maggiormente utilizzata è quella del pollone radicato. Tale tecnica prevede che, alla fine del periodo vegetativo (autunno), dalla pianta vengano rimossi i polloni più vigorosi, con una parte del loro apparato radicale. Ciò risulta di facile applicazione, e permette anche una certa rapidità propagativa a basso costo, ma purtroppo vi è anche l'alto rischio di propagare materiale infetto.

I sistemi propagativi alternativi al pollone radicato sono essenzialmente la ceppaia, la propaggine, e la talea (Avanzato e Bevilacqua, 2009).

Nel caso della ceppaia, a fine periodo vegetativo o poco prima del risveglio vegetativo, si sfoltiscono i polloni in modo da mantenere quelli sani e più vigorosi. Si procede poi con l'anulazione alla base di ogni pollone per mezzo di un anello di metallo, al fine di ostacolare il passaggio della linfa e favorire la radicazione, e alla rincalzatura di 10-15 cm sopra il punto di anulatura. Alla fine del periodo vegetativo le barbatelle formatesi vengono prelevate dalla pianta di origine, al di sotto del palco di radici neoformate.

Nel caso della propaggine, le azioni da compiere sono simili, ma in questo caso, i polloni più vigorosi, a fine estate, vengono curvati ed interrati; in questo modo, l'anno successivo si formano le radici in corrispondenza della curvatura e a fine stagione si ottengono le barbatelle radicate.

Entrambe le tecniche descritte non presentano particolari problematiche di tipo tecnico, anche

se, il rischio sanitario è ugualmente alto come nel caso del pollone radicato.

La tecnica di taleaggio è ancora poco diffusa, e a seconda del periodo nel quale viene prelevato il materiale vegetale, è possibile distinguere talee erbacee, semilegnose e legnose. Le talee una volta prelevate vengono immerse per pochi secondi in una soluzione contenente acido indolbutirrico (IBA) e poste in terriccio a radicare.

Il taleaggio, rispetto alle altre, richiede maggiori investimenti e manodopera specializzata e, inoltre, le esperienze condotte indicano che questa tecnica è influenzata da innumerevoli fattori non facilmente controllabili che danno risultati spesso contrastanti e non sempre ripetibili.

Il sistema di micropropagazione è stato sviluppato per la specie *C. avellana* L. e per alcuni ibridi interspecifici di *C. avellana* L. con *C. colurna*, *C. americana* e *C. heterophylla* (Yu e Reed, 1995; Nas e Read, 2004; Bacchetta et al. 2008; Gao et al. 2008). Tuttavia, tale sistema presenta ancora dei problemi legati alla fase di disinfezione e alla scarsa predisposizione di questa specie ad adattarsi alle condizioni di coltura *in vitro* (Yu e Reed, 1995). Sulle principali cultivar, sono stati, infine, testati terreni con diverse composizioni per ottimizzare la moltiplicazione dei germogli ed il loro allungamento (Messeguer e Mele, 1987; Yu e Reed, 1995; Andres et al. 2002; Damiano et al. 2005).

7.4 Conservazione del germoplasma

Più di 20 paesi conservano accessioni di *Corylus avellana* L. e di specie selvatiche in banche genetiche. Le collezioni più importanti sono quelle mantenute presso: il Dipartimento Agricoltura degli Stati Uniti (USDA), l'Agricultural Research Service (ARS) ed il National Clonal Germplasm Repository (NCGR) negli Stati Uniti (Hummer, 2001; Bassil et al. 2009, Gurcan et al. 2010), l'Hazelnut Research Institute in Turchia, l'Institut de Recerca Y Tecnologia Agroalimentaries (IRTA) in Spagna, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) in Francia, ed infine, l'Università degli Studi di Torino e il Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma (CRA-FRU) in Italia.

Presso queste strutture, ed in altri campi collezione e ortobotanici presenti nel mondo, le accessioni sono mantenute in pieno campo (Mehelenbacher, 1991a; Koksal, 2000; Bacchetta et al. 2009). Dal momento che i semi di nocciolo non possono essere conservati più di un anno senza perdere la vitalità, la conservazione del germoplasma si basa, infatti, principalmente sulle collezioni *in vivo* (Molnar, 2011).

Le piante di nocciolo provenienti da seme, inoltre, presentano un alto grado di eterozigosi e

mostrano variabilità, a livello di habitus e crescita; per tale ragione la propagazione avviene preferibilmente per via vegetativa (Santelices e Palfnerue, 2010).

Il mantenimento delle collezioni in campo comporta però costi proibitivi e nel caso del nocciolo le tecniche di propagazione *in vivo* sono spesso di difficile attuazione. Per tali ragioni è auspicabile che altre strategie di conservazione vengano al più presto sviluppate.

Per ciò che riguarda le tecniche di conservazione *in vitro*, i protocolli di micropropagazione messi a punto per le varietà più diffuse (Bacchetta et al. 2005; Damiano et al. 2005) non sono facilmente applicabili alle cultivar locali essendo, in alcuni casi la risposta legata al genotipo. Nonostante ciò, oltre 30 accessioni sono ad oggi conservate *in vitro* presso il National Clonal Germplasm Repository a Corvallis, Oregon. Queste accessioni sono mantenute in condizioni di crescita rallentata a 4 °C al buio, con una durata di conservazione media di 1,26 anni e un *range* compreso tra 8 mesi e 2,5 anni (Reed e Chang, 1997).

Per la conservazione a lungo termine, sono stati ottenuti dei buoni risultati per mezzo della conservazione in azoto liquido di assi embrionali prelevati da semi posti per un periodo in stratificazione fredda, *prechilling* (Normah et al. 1994; Reed e Normah, 1994). Tale tecnica consiste nell'esposizione dei semi a temperature variabili tra 2-5 °C, in condizioni umide e arieggiate, nudi o mescolati ad un substrato soffice. Sulla base di questo lavoro, assi embrionali di *C. americana*, *C. colurna*, *C. heterophylla* e *C. sieboldiana* sono attualmente conservati presso il National Seed Storage Laboratory di Fort Collins, in Colorado (Reed e Hummer, 2001).

Del nocciolo, infine, è possibile conservare anche il polline (Engel, 1987). A tal riguardo, la collezione di polline più importante, contenente circa 53 accessioni di *C. avellana*, si trova anch'essa presso il National Clonal Germplasm Repository a Corvallis in Oregon.

PARTE SECONDA

Scopo della ricerca

L'obiettivo perseguito nel corso del triennio del Dottorato di Ricerca, è stato quello di studiare metodi alternativi di conservazione *ex situ*, basati sulle tecniche di coltura *in vitro*, per il mantenimento e la salvaguardia di cultivar italiane di nocciolo (*Corylus avellana* L.).

Il lavoro è stato articolato in tre linee di ricerca.

Una prima linea ha previsto la conservazione mediante coltura *in vitro* in condizioni di crescita rallentata, della cultivar di nocciolo (*C. avellana* L.) Tonda Gentile Romana. L'obiettivo dell'esperimento è stato quello di valutare l'effetto di sostanze osmoticamente attive, in particolare saccarosio e sorbitolo, sui risultati della conservazione *in vitro* per diversi periodi e senza alcuna subcoltura, cioè in crescita rallentata (*slow growth*).

Una seconda linea di ricerca è stata finalizzata all'applicazione di due tecniche di crioconservazione, in particolare incapsulazione-disidratazione e *droplet-vitrification*, al nocciolo (*C. avellana* L.).

L'obiettivo dell'esperimento di crioconservazione condotto mediante l'incapsulazione-disidratazione, è stato quello di ottimizzare l'applicazione di questa tecnica sulle cultivar Tonda Gentile Romana e Montebello, definendo il metodo di disidratazione (flusso laminare o gel di silice) più idoneo per ottenere la riduzione del contenuto di acqua all'interno delle capsule di alginato, necessaria per permettere la conservazione degli espianti in azoto liquido. È stato, inoltre, valutato l'effetto della presenza nel terreno di coltura utilizzato dopo la crioconservazione, di due citochinine, benziladenina (BA) o metatopolina (mT), sulla ripresa vegetativa degli espianti crioconservati.

L'obiettivo dell'esperimento di crioconservazione condotto mediante la tecnica di *droplet-vitrification*, è stato quello di valutare l'applicabilità di tale tecnica alla cultivar Tonda Gentile Romana, definendo la *Plant Vitrification Solution* (PVS) più idonea e i tempi di immersione da utilizzare. È stato, inoltre, valutato l'effetto del pretrattamento dei germogli da cui prelevare gli espianti, a 4 °C, per tre mesi al buio, al fine di ottimizzare la risposta alla crioconservazione.

Infine, una terza linea di ricerca è stata rivolta alla stabilizzazione di una collezione *in vitro* di varietà di nocciolo autoctone siciliane. Le varietà oggetto di studio, "Carrello", "Ghidara", "Minnulara" e "Panottara", sono rappresentative dell'area dei Nebrodi (ME), e pur vantando una storica presenza sul territorio necessitano ad oggi di interventi di conservazione e tutela. A tal fine si è proceduto a testare i tempi di disinfezione migliori, l'effetto di tre citochinine,

benziladenina (BA), metatopolina (mT) o *thidiazuron* (TDZ), sulla fase di allestimento e di due citochinine, BA o mT, sulla fase di moltiplicazione. È stato, inoltre, valutato l'effetto, nella fase di radicazione, di due concentrazioni di acido indolbutirrico (IBA).

1. Primo esperimento: conservazione *in vitro* della cultivar di nocciolo “Tonda Gentile Romana” mediante crescita rallentata

Riassunto

È stato valutato l'effetto di due concentrazioni (87,5 mM o 131,2 mM) di due carboidrati, saccarosio o sorbitolo, sul tempo di conservazione in crescita rallentata, a 4 °C, al buio, di germogli di nocciolo (*Corylus avellana* L.), cultivar Tonda Gentile Romana.

I dati rilevati periodicamente, ogni 4, 6, 8 e 10 mesi, durante il periodo di conservazione, hanno riguardato la sopravvivenza dei germogli e la comparsa di aree clorotiche e necrotiche su foglie e fusti, quest'ultima utilizzata per il calcolo dell'indice di Mc Kinney. Sono state, inoltre, effettuate le analisi del contenuto di clorofilla (a e b), dei carotenoidi e dei fenoli totali, al fine di caratterizzare ulteriormente la risposta alle condizioni di conservazione.

È stata dimostrata la possibilità di estendere il tempo di conservazione fino a 10 mesi senza alcuna subcoltura al buio a 4 °C. Fino a 8 mesi non si sono evidenziate differenze tra i trattamenti sia in termini di sopravvivenza (100%), sia per quanto riguarda l'indice di Mc Kinney, ad eccezione del trattamento con 131,2 mM saccarosio che ha indotto, già dopo 6 mesi, una maggior estensione di clorosi e necrosi (Indice di Mc Kinney maggiore del 70%) rispetto agli altri e, dopo 8 mesi, anche una riduzione della sopravvivenza dei germogli. Dopo 10 mesi di conservazione, riguardo la percentuale di sopravvivenza, sia con il trattamento sorbitolo 87,5 mM (100%) e 131,2 mM che con il saccarosio 87,5 mM si sono evidenziati valori significativamente maggiori rispetto a saccarosio 131,2 mM. La concentrazione più elevata di saccarosio, dopo 10 mesi, ha, inoltre, indotto, nei germogli conservati una percentuale più alta di danni, rilevati con il calcolo dell'indice di Mc Kinney, rispetto a entrambe le concentrazioni di sorbitolo, e la maggiore riduzione del contenuto di clorofilla e carotenoidi.

Introduzione

Lo scopo dell'esperimento è stato quello di valutare l'effetto di due concentrazioni (87,5 mM o 131,2 mM) di due carboidrati (saccarosio o sorbitolo), sulla conservazione *in vitro* in condizioni di crescita rallentata (4 °C al buio), della cultivar di nocciolo (*C. avellana* L.) Tonda Gentile Romana.

Materiali e metodi

Germogli di nocciolo (*C. avellana* L.), cultivar Tonda Gentile Romana (TGR), sono stati moltiplicati *in vitro* su un terreno standard di coltura (TM) costituito da sali DKW (Driver e

Kuniyuki, 1984) e modificato secondo Damiano et al. (2005), con benziladenina (BA, 1,5 mg/L), acido giberellico (GA₃, 0,03 mg/L) e acido indolbutirrico (IBA, 0,01 mg/L), saccarosio (30 g/L) e agar (5,7 g/L) (**Fig. 1a**).

Il pH del terreno è stato portato a 5,7 prima della sterilizzazione effettuata in autoclave a 121°C e 104 kPa per 20 minuti. Le colture sono state mantenute a 24 °C con fotoperiodo di 16 h e intensità luminosa di 40 μM m⁻² s⁻¹ PAR (*photosynthetic active radiation*).

Per l'introduzione in conservazione in crescita rallentata, i germogli, lunghi circa 2 cm, provenienti dalla moltiplicazione *in vitro*, sono stati posti in coltura in contenitori (2,4 mm di diametro x 95,8 mm di altezza) contenenti TM modificato con due concentrazioni (87,5 mM o 131,2 mM) di saccarosio o sorbitolo (**Fig. 1b** e **Fig. 1c**) e posti in frigo a 4 °C al buio, al fine di rallentare la crescita e limitare il numero di subcolture, o mantenuti in camera di coltura alle condizioni standard sopra riportate o al buio, ma senza essere subcolturati regolarmente (controlli).

I trattamenti applicati, per quanto riguarda il terreno di coltura, per la prova di crescita rallentata, sono di seguito schematizzati:

- saccarosio 87,5 mM (SAN 87)
- saccarosio 131,2 mM (SAN 131)
- sorbitolo 87,5 mM (SON 87)
- sorbitolo 131,2 mM (SON 131)

La prova sperimentale è stata impostata usando 3 contenitori per trattamento, ciascuno contenente 4 germogli.

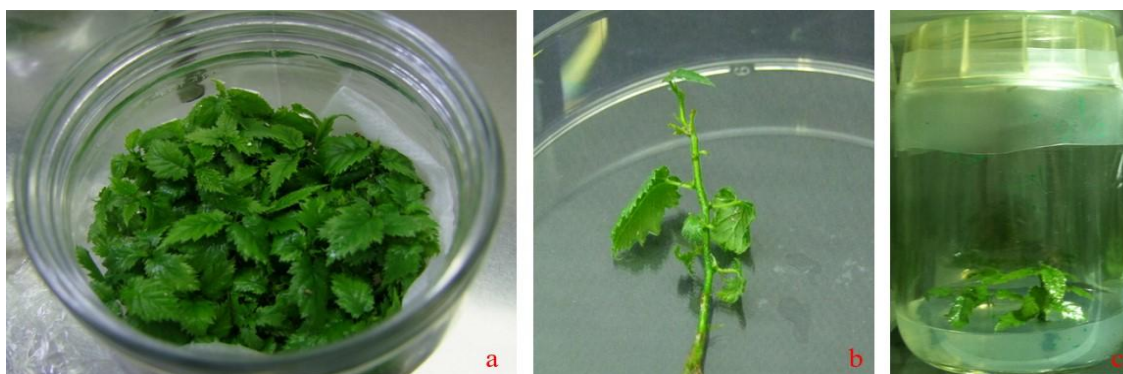


Fig. 1 Moltiplicazione *in vitro* di TGR su sali DKW, BA (1,5 mg/L), GA₃ (0,03 mg/L) e IBA (0,01 mg/L) (**a**). Preparazione dei germogli per l'introduzione in conservazione in crescita rallentata a 4 °C al buio (**b** e **c**).

Valutazione periodica delle condizioni degli espianti e analisi fisiologiche

I rilievi, riguardanti la percentuale di sopravvivenza dei germogli e il calcolo dell'indice di Mc Kinney (1923), che indica la diffusione di clorosi e necrosi sulla pianta, sono stati

effettuati ad intervalli di tempo regolari, dopo 4, 6, 8 e 10 mesi. Ad ogni intervallo, inoltre, sono state effettuate le analisi del contenuto di clorofilla “a” e “b”, di carotenoidi e di fenoli, impiegando 100 mg di campione, comprendente germogli e foglie.

Per ciò che riguarda la valutazione delle condizioni dei germogli in conservazione a 4 °C al buio, sono stati esaminati gli apici e le foglie al fine di valutare la percentuale di area clorotica e necrotica rispetto alla parte verde. L'estensione del danno è stata valutata utilizzando una scala empirica, comprendente le seguenti classi di intensità: 0 = nessuna lesione; 1 = apici necrotici; 2 = 25% di clorosi o necrosi; 3 = 50% di clorosi o necrosi; 4 = 100% di necrosi.

Con i dati rilevati è stato calcolato l'indice di Mc Kinney (1923), mediante la formula:

$$I = [\sum (c \times f) / T_n] \cdot 100$$

dove: c = numero della classe a cui appartiene la pianta esaminata;

f = numero di piante appartenenti ad una determinata classe di intensità;

T_n = totale numero di piante esaminate.

Per quanto riguarda le analisi fisiologiche, le clorofille (a e b) e i carotenoidi sono stati estratti con acetone anidro, dopo aver addizionato il 15% (p/p) di CaCO₃ al campione. Il contenuto in clorofilla “a”, “b” e in carotenoidi totali è stato determinato spettrofotometricamente alle lunghezze d'onda rispettivamente di 664,5 e 647 nm e 450 nm, usando le equazioni riportate da Nagata (1992). I risultati sono stati espressi in mg/g di peso fresco (P.F.).

I fenoli totali sono stati determinati spettrofotometricamente a 765 nm. Per l'estrazione è stato utilizzato metanolo al 70% ed il pellet è stato mantenuto a contatto con il solvente per 16 ore a -20°C; per la reazione colorimetrica è stato utilizzato il reattivo di Folin-Ciocalteu in ambiente alcalino per carbonato di sodio secondo il metodo Spanson et al. (1990). I risultati sono stati riportati come mg equivalenti di acido gallico/g di peso fresco (mg Gae/g P.F.).

Risultati

La percentuale di sopravvivenza dei germogli è stata pari al 100% fino al sesto mese di conservazione per tutti e quattro i trattamenti (**Fig. 2**), mentre, già al quarto mese, nessuno dei controlli era sopravvissuto. Fino a 8 mesi non si sono evidenziate differenze tra i trattamenti sia in termini di sopravvivenza (100%), sia per quanto riguarda l'indice di Mc Kinney, ad eccezione del trattamento SAN 131 che ha indotto, già dopo 6 mesi, una maggior estensione di clorosi e necrosi (Indice di Mc Kinney maggiore del 70% dopo 6 mesi e maggiore dell'80% dopo 8 mesi) rispetto agli altri trattamenti e, dopo 8 mesi, anche una riduzione della sopravvivenza dei germogli (**Fig. 2** e **Fig. 3**). Dopo 10 mesi di conservazione (**Tab. 1**), riguardo la percentuale di sopravvivenza, sia con il trattamento SON 87 (100%) che con SAN

87 e SON 131, si sono evidenziati valori significativamente maggiori rispetto a SAN 131. L'indice di Mc Kinney è risultato maggiore nei germogli trattati con SAN 131 rispetto a quelli trattati con il sorbitolo, in particolar modo rispetto alla concentrazione più alta.

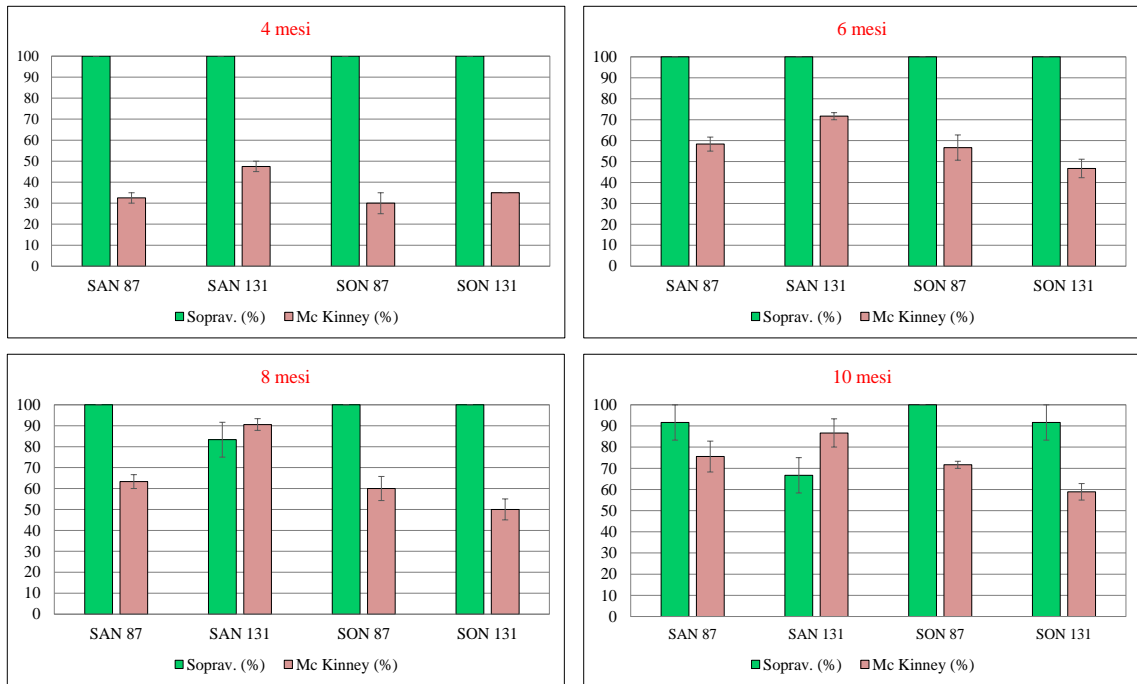


Fig. 2 Sopravvivenza (%) e condizione dei germogli (indice di Mc Kinney) di TGR dopo 4, 6, 8 e 10 mesi di conservazione a 4 °C al buio, con diversi trattamenti: SAN 87 (saccarosio 87,5 mM), SAN 131 (saccarosio 131,2 mM), SON 87 (sorbitolo 87,5 mM) e SON 131 (sorbitolo 131,2 mM).

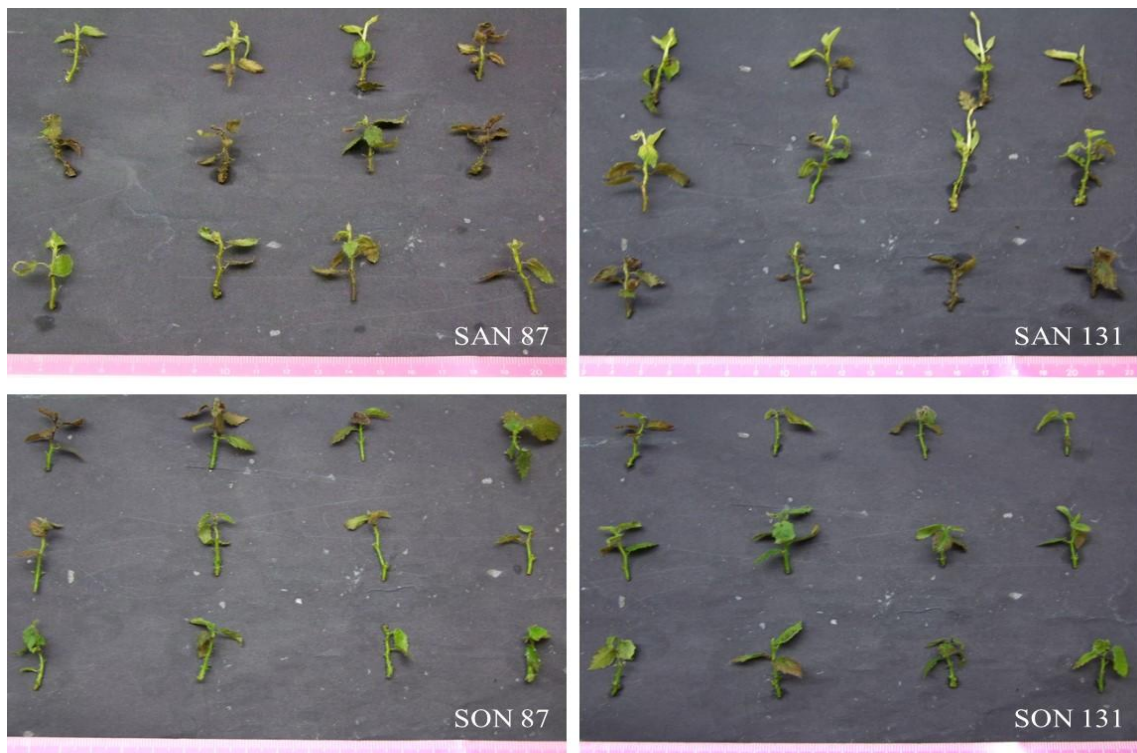


Fig. 3 Germogli di TGR dopo 8 mesi di conservazione a 4 °C al buio con diversi trattamenti: SAN 87 (saccarosio 87,5 mM), SAN 131 (saccarosio 131,2 mM), SON 87 (sorbitolo 87,5 mM) e SON 131 (sorbitolo 131,2 mM).

	Sopravvivenza (%)	Indice di Mc Kinney
SAN 87	92 a	76 ab
SAN 131	67 b	87 a
SON 87	100 a	72 b
SON 131	92 a	59 c

Tab. 1 Sopravvivenza (%) e condizione dei germogli (indice di Mc Kinney) di TGR, dopo 10 mesi di conservazione a 4 °C al buio. Differenti lettere sulla colonna indicano medie significativamente diverse (Anova a una via e l’LSD test $p < 0,05\%$, *software* ‘Statgraphics Centurion’).

I risultati delle analisi della clorofilla (**Fig. 4**) hanno messo in evidenza una riduzione prevedibile del contenuto in clorofilla in tutti i trattamenti al procedere della conservazione in crescita rallentata al buio. Tuttavia, dopo 8 e 10 mesi di conservazione, SAN 131, il trattamento con saccarosio alla concentrazione più elevata, ha indotto una riduzione significativa del contenuto di clorofilla, sia “a” che “b”, rispetto agli altri trattamenti.

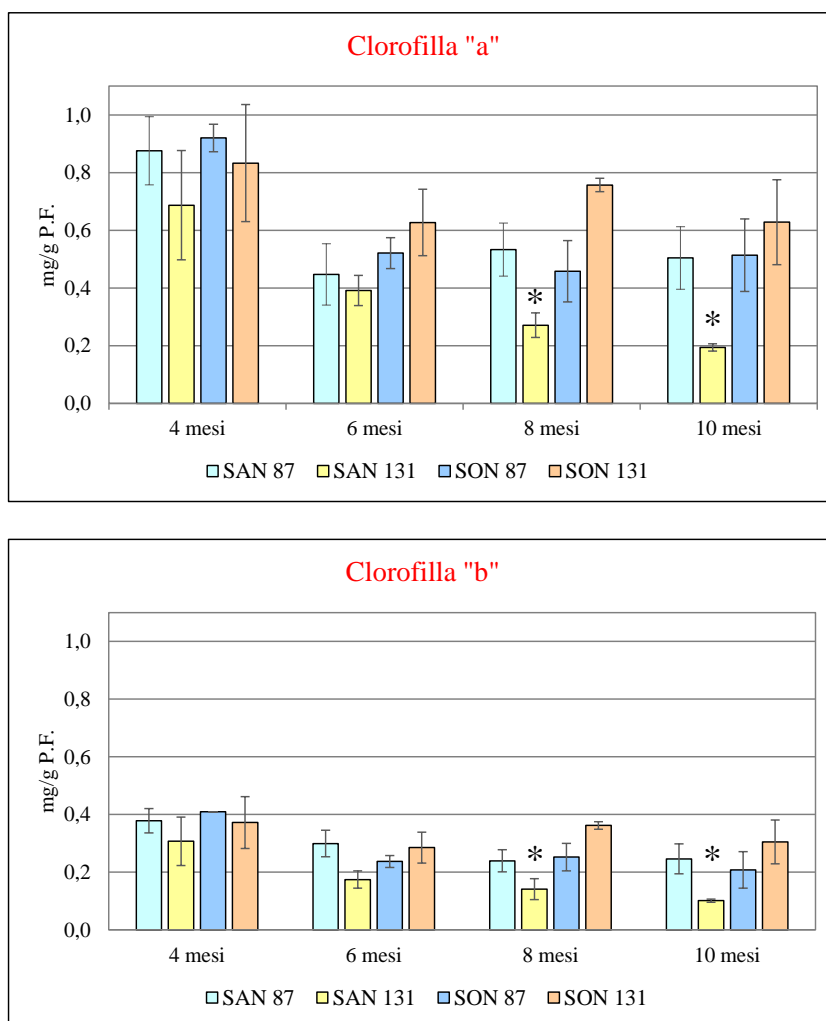


Fig. 4 Contenuti di clorofilla (‘a’ e ‘b’) nei germogli di TGR dopo 4, 6, 8 e 10 mesi di conservazione a 4 °C al buio con diversi trattamenti. * = media significativamente minore di tutte le altre per quel periodo di conservazione (Anova a una via e l’LSD test $p < 0,05\%$, *software* ‘Statgraphics Centurion’).

I risultati delle analisi del contenuto dei carotenoidi (**Fig. 5**) hanno messo in evidenza che, dopo 6, 8 e 10 mesi di conservazione, i germogli trattati con saccarosio alla concentrazione più elevata (SAN 131) hanno un contenuto in carotenoidi significativamente inferiore rispetto agli altri.

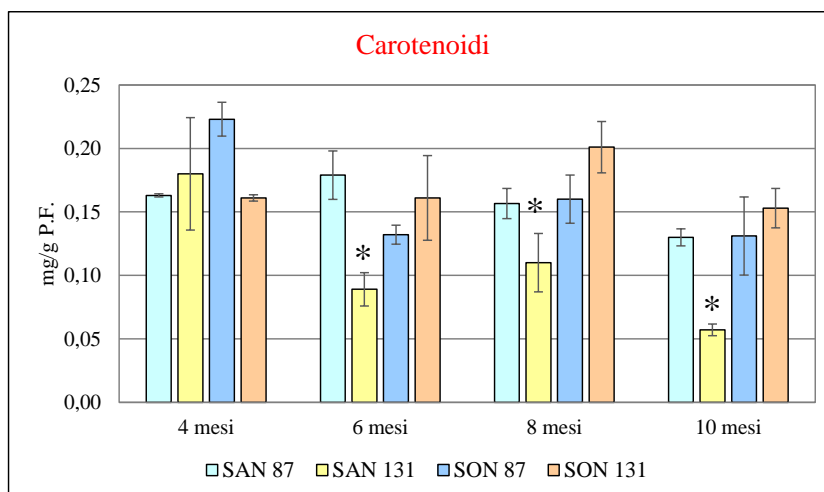


Fig. 5 Contenuti di carotenoidi nei germogli di TGR dopo 4, 6, 8 e 10 mesi di conservazione a 4 °C al buio con diversi trattamenti. * = media significativamente minore di tutte le altre per quel periodo di conservazione (Anova a una via e l'LSD test $p < 0,05\%$, software 'Statgraphics Centurion').

I risultati delle analisi dei fenoli totali sono mostrati in **Fig. 6**. Il contenuto dei fenoli nei germogli dopo 4 mesi era simile con tutti i trattamenti e dopo 6 mesi i germogli trattati con SAN 131 presentavano un contenuto minore rispetto a SAN 87 e SON 87. Dopo 8 mesi i germogli trattati con sorbitolo hanno mostrato il contenuto più elevato, mentre tale risposta non è stata confermata a 10 mesi.

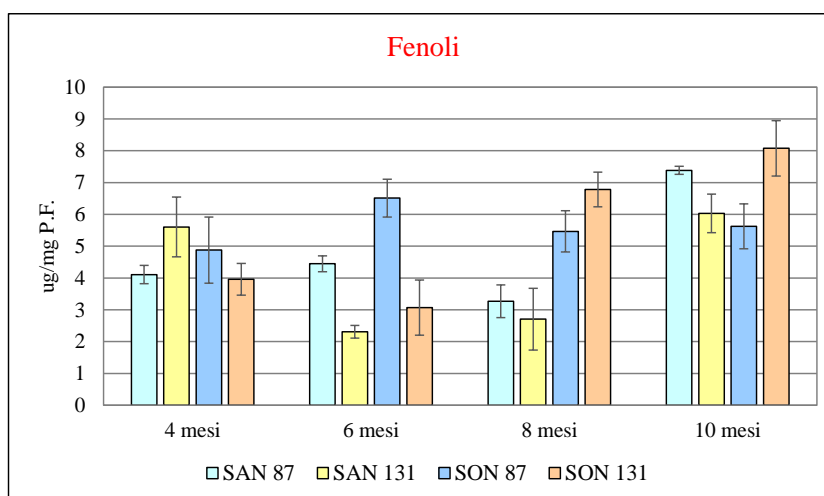


Fig. 6 Contenuto di fenoli nei germogli di TGR dopo 4, 6, 8 e 10 mesi di conservazione a 4 °C al buio con diversi trattamenti. (Anova a una via e l'LSD test $p < 0,05\%$, software 'Statgraphics Centurion').

Discussione

Il principale obiettivo della conservazione *in vitro* del germoplasma è quello di ridurre consistentemente la frequenza delle subcolture ed i rischi di contaminazione e di insorgenza di variabilità somaclonale ad esse connessi. Ciò può essere ottenuto attraverso la conservazione mediante crescita rallentata che consente di estendere i tempi che intercorrono tra una subcoltura e la successiva per un tempo sufficientemente lungo, da alcuni mesi (2-3) a quattro anni per alcune specie, garantendo elevata vitalità e capacità proliferativa degli espianti, una volta riportati in condizioni standard di coltura.

La crescita delle colture *in vitro* può essere ridotto attraverso varie metodologie, principalmente utilizzando basse temperature, oscurità o bassa intensità luminosa e/o modificando il terreno di coltura (soprattutto con composti osmoticamente attivi, come i carboidrati, o con composti ritardanti di crescita).

L'utilizzo delle basse temperature è l'approccio più utilizzato per la conservazione a medio termine delle risorse genetiche vegetali (Jackson e Kennedy, 2009; Rao, 2004). La possibilità di mantenere le colture a bassa temperatura dipende in larga misura dall'ecologia e dall'origine geografica della specie vegetale. In genere, la temperatura impiegata per specie varia tra 0 e 5 °C, ma le piante provenienti da regioni tropicali e subtropicali sono conservate a 15-20 °C. Studi sull'applicazione della conservazione a bassa temperatura ne hanno mostrato l'applicabilità su colture *in vitro* di varie specie di fruttiferi delle regioni temperate tra cui pero (*Pyrus communis* L.) (Ahmed et al. 2010), albicocco (*Prunus armeniaca* L.), (Perez-Tornero et al. 1999), melo (*Malus domestica* Borkh) (Orlikowska, 1992) e lampone (*Rubus spp.*) (Reed, 1993). I nostri risultati evidenziano che l'utilizzo della bassa temperatura è determinante per la conservazione *in vitro* in crescita rallentata del nocciolo in quanto solo le colture mantenute a 4°C sono sopravvissute fino a 10 mesi di conservazione senza interventi di subcoltura, mentre i controlli, mantenuti in condizioni standard di crescita o al buio, non sono sopravvissuti oltre i quattro mesi.

L'utilizzo di agenti osmotici si è dimostrato un metodo efficiente per ridurre la crescita ed incrementare il tempo di conservazione in varie specie cresciute *in vitro* (Wilson et al. 2000). Essi agiscono riducendo il turgore cellulare che è alla base della regolazione della crescita e dell'espansione della cellula.

Nelle piante i carboidrati svolgono numerosi ruoli come fonte di carbonio, di energia e trasferimento del segnale nei processi di differenziamento. Il saccarosio è lo zucchero più diffuso nelle piante, mentre il sorbitolo è la forma utilizzata maggiormente nella traslocazione delle *Rosacee* (Ahmad et al. 2007; Yaseen et al. 2009 e citazioni incluse).

Il saccarosio è il carboidrato più utilizzato per la preparazione dei terreni per le colture *in vitro*. Per la sua funzione di regolazione osmotica è stato utilizzato con successo, a concentrazioni più elevate rispetto al terreno standard di coltura, per ridurre la crescita *in vitro* in patata (Sarkar e Naik, 1998) e pero selvatico (Tahtamouni e Shibli, 1999) conservati in crescita rallentata.

Anche il sorbitolo viene utilizzato nella preparazione dei terreni per le colture *in vitro* dove è stato osservato che promuove la moltiplicazione e la radicazione in alcune specie della famiglia delle *Rosacee* (Ahmad et al. 2007; Yaseen et al. 2009 e citazioni incluse).

Tuttavia è stato osservato che può inibire la crescita di germogli cresciuti *in vitro*, quando aggiunto ai terreni di proliferazione come osservato in *Crysanthemum* (Ballester et al. 1997); il suo utilizzo si è dimostrato efficace nella conservazione in crescita rallentata della patata (*Solanum tuberosum* L.) (Gopal e Chauhan, 2010). I nostri risultati, tuttavia, hanno messo in evidenza che, nel caso del nocciolo, sia il trattamento con sorbitolo e con saccarosio utilizzati alla concentrazione inferiore (87,5 mM) che il sorbitolo a una concentrazione di 131,2 mM hanno permesso di ottenere una conservazione degli espianti fino a 10 mesi con una soddisfacente ricrescita. Invece, l'utilizzo della concentrazione di saccarosio più elevata (131,2 mM) rispetto a quella utilizzata per il terreno di coltura standard, non ha migliorato la conservazione degli espianti rispetto agli altri trattamenti, ma ha indotto maggiori necrosi e clorosi sugli espianti conservati. Questa risposta potrebbe fare ipotizzare che il saccarosio, essendo il principale carboidrato in questa specie con funzioni di trasporto ed energetiche, a questa concentrazione non solo non abbia ridotto la crescita cellulare ma possa anzi aver accelerato il metabolismo degli espianti, rendendoli più vulnerabili alle condizioni di conservazione a bassa temperatura, come dimostrato anche nella riduzione rilevata nel contenuto in clorofilla e carotenoidi.

Infine, nonostante i carotenoidi e i fenoli svolgano un ruolo nella modulazione delle *reactive oxygen species* (ROS) prodotte in condizioni di stress (Beck et al. 2007; Gill e Tuteya, 2010), dai risultati ottenuti nel nostro studio non è stato possibile individuare una risposta che ci suggerisca tale ruolo anche in nocciolo come adattamento alle condizioni di conservazione applicate.

Conclusioni

La coltura *in vitro* in condizioni di crescita rallentata consente di mantenere colture vegetali per intervalli di tempo lunghi (anche oltre 12 mesi) senza alcuna subcoltura, senza interferire sulla vitalità e la successiva capacità proliferativa dei germogli (Engelmann, 2009).

Il lavoro svolto ha dimostrato che è possibile mantenere *in vitro* germogli di nocciolo (*C. avellana* L.) in condizioni di crescita rallentata, conservando la loro vitalità per 10 mesi senza alcuna subcoltura. Risultati soddisfacenti nella riduzione dell'accrescimento dei germogli e nel mantenimento della vitalità, sono stati, infatti, ottenuti modificando il terreno di coltura con l'aggiunta di saccarosio (87,5 mM) e sorbitolo (87,5 mM e 131,2 mM), e variando le condizioni standard di coltura, effettuando cioè la conservazione ad una temperatura di 4 °C ed in assenza di luce.

Sulla base dell'interesse che il nocciolo sta riscuotendo tra le specie frutticole da coltivare e della richiesta da parte dei produttori ad attivare una filiera produttiva di qualità, i risultati ottenuti, oltre a rappresentare una base importante per la conservazione *in vitro* del germoplasma di nocciolo, lasciano ben sperare in un possibile utilizzo della crescita rallentata applicata a tale specie, anche presso laboratori commerciali che riforniscono il comparto vivaistico. Presso tali laboratori, infatti, l'impiego della coltura *in vitro* in condizioni di crescita rallentata, riducendo il numero delle subcolture, permette di abbassare i costi di manodopera, le perdite di materiale dovute alle contaminazioni e di poter disporre di materiale controllato dal punto di vista sanitario durante tutto l'anno.

2. Secondo esperimento: ottimizzazione della crioconservazione di gemme ascellari delle cultivar di nocciolo “Tonda Gentile Romana” e “Montebello” mediante la tecnica di incapsulazione-disidratazione

Riassunto

Al fine di ottimizzare l'applicazione della tecnica di incapsulazione-disidratazione su *Corylus avellana* L., è stato valutato l'effetto di due metodi di disidratazione delle capsule di alginato (flusso laminare o gel di silice) e della presenza di due citochinine (benziladenina o metatopolina) nel terreno di coltura utilizzato dopo il recupero dall'azoto liquido. Gemme ascellari di Tonda Gentile Romana e Montebello, provenienti da coltura *in vitro*, sono state incapsulate in capsule di alginato di sodio al 3%, immerse in una soluzione ipertonica di saccarosio 0,75 M per 1 giorno e disidratate tramite flusso laminare per 6 ore o gel di silice per 6 o 8 ore. Dopo l'immersione in azoto liquido gli espianti sono stati trasferiti su un terreno standard di coltura addizionato con benziladenina (BA, 1,5 mg/L) o metatopolina (mT, 2 mg/L), al buio. Le percentuali di sopravvivenza maggiori sono state ottenute mediante disidratazione con gel di silice per 8 ore nel caso della Tonda Gentile Romana (circa 45%), indipendentemente dalla citochinina presente nel terreno di ricrescita, e con gel di silice per 8 ore con terreno di ricrescita addizionato con mT (2 mg/L) per la Montebello (40%).

Introduzione

Lo scopo dell'esperimento è stato quello di ottimizzare l'applicazione della tecnica di incapsulazione-disidratazione su nocciolo (*C. avellana* L), cultivar Tonda Gentile Romana e Montebello, mediante la definizione del metodo più idoneo di disidratazione (flusso laminare o gel di silice) per ottenere la riduzione del contenuto di acqua all'interno delle capsule prima dell'immersione in azoto liquido. È stato, inoltre, valutato l'effetto della presenza nel terreno di coltura utilizzato dopo la crioconservazione, di due citochinine (benziladenina o metatopolina), sulla ripresa vegetativa degli espianti.

Materiali e metodi

Preparazione degli espianti ed incapsulazione

Dai germogli di nocciolo (*C. avellana* L.), cultivar Tonda Gentile Romana (TGR) e Montebello (MB), proliferati *in vitro* su un terreno standard di coltura (TM) costituito da sali DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) e modificato secondo Damiano et al. (2005), con benziladenina (BA, 1,5 mg/L), acido giberellico (GA₃, 0,03 mg/L) e acido indolbutirrico (IBA, 0,01 mg/L), saccarosio (30 g/L) e agar (5,7 g/L), sono stati isolati segmenti nodali,

costituiti da gemme ascellari private delle foglie e una porzione (0,2-0,4 cm di lunghezza) di fusto. Gli espianti sono stati immersi per 15 minuti in terreno TM liquido con concentrazione dimezzata di sali e addizionato con 50 g/L di saccarosio e 25 g/L di alginato di sodio quale agente incapsulante. Gli espianti sono stati, quindi, fatti gocciolare singolarmente, per mezzo di una pipetta sterile, in una soluzione formata da TM liquido arricchito con 11 g/L di CaCl_2 , quale agente complessante, e lasciati immersi per 30 minuti in modo che si formasse una capsula di alginato di circa 4-5 mm di diametro intorno all'espianto. Le capsule formatesi sono state, infine, sottoposte a due lavaggi con TM liquido.

Valutazione delle condizioni di disidratazione

Al fine di valutare la migliore condizione di disidratazione da applicare alle capsule di alginato prima dell'immersione in azoto liquido e di raggiungere una percentuale di acqua intorno al 20%, ritenuta, in base a precedenti esperimenti e da bibliografia, come la più idonea per la conservazione degli espianti, è stata eseguita una curva di disidratazione. Questa ha permesso di valutare l'acqua residua contenuta nelle capsule di alginato essiccate mediante flusso d'aria sterile, quello di una cappa a flusso laminare (air) o gel di silice (sg), e di stabilire la modalità ed tempi migliori di disidratazione. A tale scopo è stato inizialmente applicato alle capsule di alginato un trattamento con saccarosio 0,75 M per 1 giorno. Le stesse, sono poi state trasferite su carta sterile e sotto flusso laminare (**Fig. 1c**) o all'interno di piastre Petri (9 cm di diametro) contenenti 20 g di gel di silice (**Fig. 1a** e **Fig. 1b**), per un periodo di tempo compreso tra 0 e 8 ore.

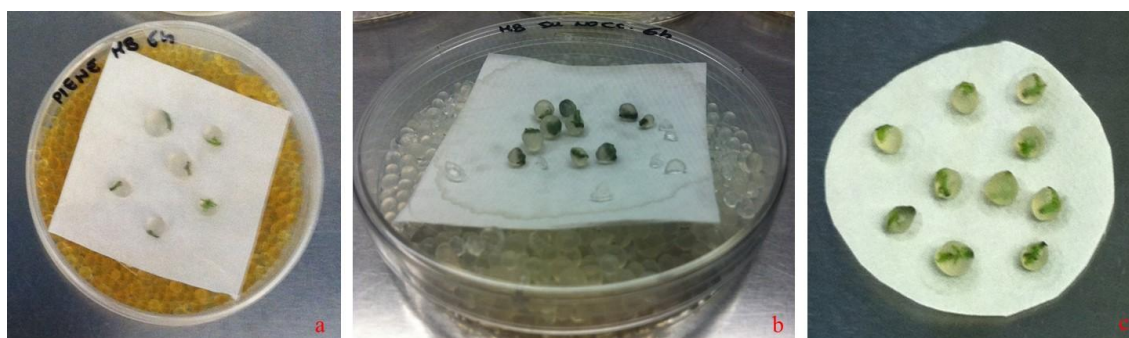


Fig. 1 Capsule di alginato di sodio con all'interno gemme ascellari di TGR e MB disidratate per mezzo di gel di silice (**a** e **b**) o flusso laminare (**c**).

Al termine di ogni periodo di disidratazione, è stato misurato il peso fresco delle capsule (pf), dopodiché queste sono state essiccate in stufa, per 24 ore a 105°C , ed è stata effettuata la misurazione del peso secco (ps). Infine, l'acqua residua contenuta (%) è stata calcolata mediante la formula: $\text{AR}(\%) = (\text{pf}-\text{ps})/\text{pf} \cdot 100$

Valutazione dell'effetto del tipo di disidratazione e del tipo di citochinina sulla ripresa vegetativa degli espianti dopo l'immersione in azoto liquido

La prova di crioconservazione è stata effettuata su TGR e MB, utilizzando i tempi e le modalità di disidratazione migliori, messi in evidenza dai risultati ottenuti con la curva di disidratazione e dalla prova di incapsulazione-disidratazione effettuata in precedenza.

Alla luce dei risultati ottenuti, la disidratazione è stata, quindi, condotta mediante “air” per 6 ore o “sg” per 6 o 8 ore. Alla fine, parte degli espianti è stata introdotta all'interno di *criovials* sterili da 2 ml, e immersa in azoto liquido per 1 ora, e parte direttamente trasferita alla fase di ricrescita (controllo). Gli espianti prelevati dall'azoto liquido sono stati riportati a temperatura ambiente mediante un bagnetto termostato a 40 °C per 90 secondi, e trasferiti sul terreno TM solido addizionato con BA (1,5 mg/L) o mT (2 mg/L), al buio. Dopo 7 giorni, le capsule di alginato sono state aperte sotto cappa sterile, e gli espianti estratti per favorirne la ripresa vegetativa. Questi ultimi, inoltre, sono stati trasferiti alla luce e, dopo 8 settimane, è stata valutata l'influenza del tipo di citochinina (BA o mT) nel terreno calcolando la percentuale di sopravvivenza.

La prova sperimentale è stata impostata usando 4 piastre Petri (9 cm di diametro) per trattamento, ciascuna contenente 10 espianti.

Tutti gli esperimenti hanno seguito uno schema completamente randomizzato; su tutti i dati ottenuti, dove possibile, è stata calcolata la media e l'errore standard (ES), ed è stata applicata l'analisi Anova a una via e l'LSD test ($p < 0,05\%$) per valutare la significatività della differenza tra le medie utilizzando il *software* ‘Statgraphics Centurion’.

Risultati

Sia il trattamento “air” che “sg” per 6 e 8 ore hanno consentito di ottenere percentuali di acqua residua vicini al 20% (**Fig. 2 e Fig. 3; Tab. 1**). Tuttavia, il trattamento di disidratazione sotto cappa a flusso laminare per 8 ore ha ridotto notevolmente la sopravvivenza degli espianti (**Tab. 2**) e non è stato inserito nella successiva prova con l'immersione in azoto liquido.

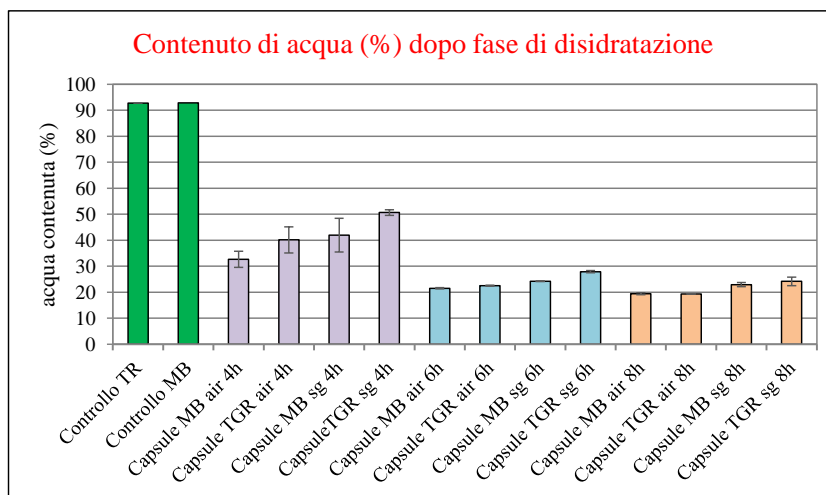


Fig. 2 Contenuto di acqua residua (%) all'interno delle capsule di alginato con all'interno gemme ascellari di TGR e MB dopo disidratazione mediante flusso laminare (air) o gel di silice (sg) per 4, 6 o 8 ore.

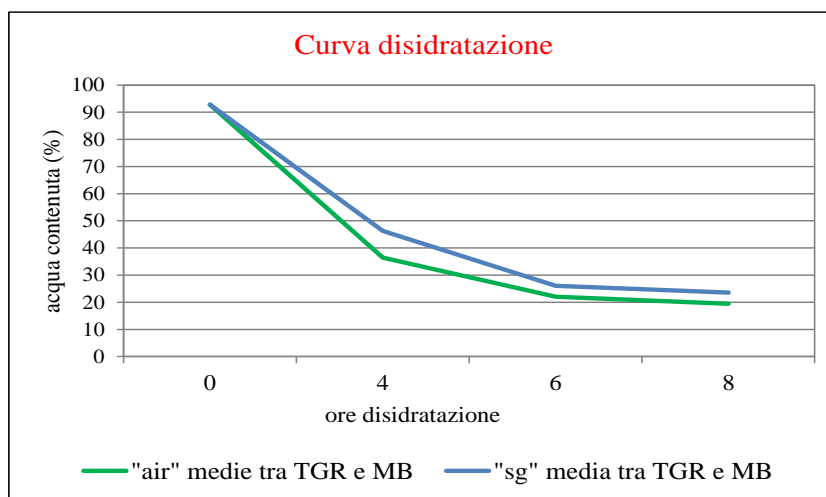


Fig. 3 Curva di disidratazione delle capsule di alginato con all'interno gemme ascellari di TGR e MB disidratate mediante flusso laminare (air) o gel di silice (sg) per 4, 6 o 8 ore.

Curva Disidratazione		
Tempo (ore)	air	sg
	acqua contenuta (%)	acqua contenuta (%)
0	92,8	92,8
4	36,4	46,3
6	22,0	26,1
8	19,4	23,5

Tab. 1 Acqua contenuta (%) all'interno delle capsule di alginato di sodio disidratate mediante flusso laminare (air) o gel di silice (sg).

Metodo disidratazione	Sopravvivenza (%)	E.S.
TGR air 6 h	75,0	± 8,3
MB air 6 h	58,3	± 8,3
TGR sg 6 h	83,3	± 0,0
MB sg 6 h	91,7	± 8,3
TGR air 8 h	25,0	± 8,3
MB air 8 h	33,3	± 0,0
TGR sg 8 h	50,0	± 0,0
MB sg 8 h	63,3	± 3,3

Tab. 2 Sopravvivenza (%) gemme ascellari di TGR e MB incapsulate in alginato di sodio e disidratate per mezzo di flusso laminare (air) o gel di silice (sg) per 6 o 8 ore. Dati espressi come medie ± Errore Standard (E.S.).

In TGR, nella prova con immersione in azoto liquido, le percentuali di sopravvivenza più elevate (intorno al 45%) sono state ottenute applicando la disidratazione con “sg” per 8 h indipendentemente dalla citochinina presente nel terreno di coltura utilizzato per la ricrescita (**Fig. 4**). Mentre in MB la percentuale di sopravvivenza maggiore (40%) è stata ottenuta mediante disidratazione con “sg” per 8 h su terreno di ricrescita contenente mT come citochinina (**Fig. 5**).

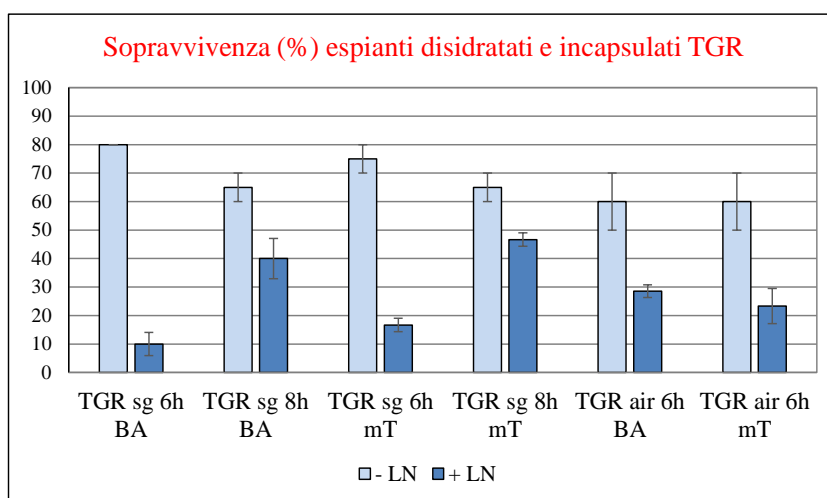


Fig. 4 Sopravvivenza (%) gemme ascellari di TGR, incapsulate in alginato di sodio, trattate con saccarosio 0,75 M per 1 giorno e disidratate per mezzo di flusso laminare (air) o gel di silice (sg) per 6 o 8 ore e immerse (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido. La ricrescita è stata effettuata su terreno contenente BA o mT.

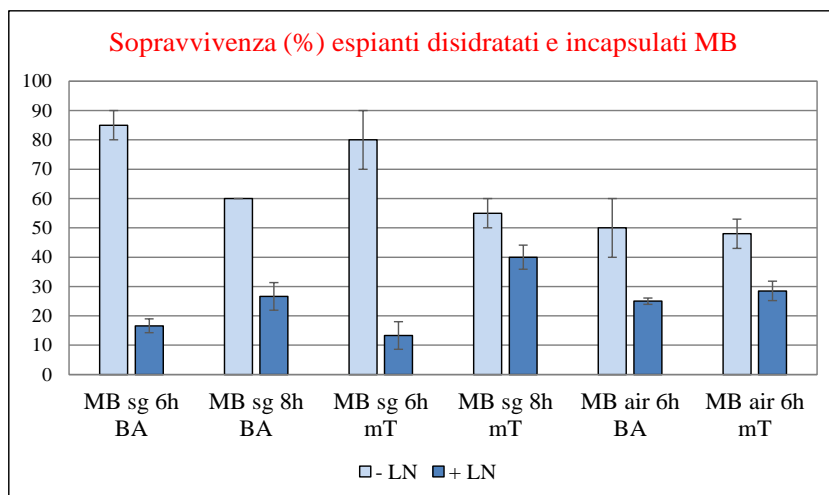


Fig. 5 Sopravvivenza (%) gemme ascellari di MB, incapsulate in alginato di sodio, trattate con saccarosio 0,75 M per 1 giorno e disidratate per mezzo di flusso laminare (air) o gel di silice (sg) per 6 o 8 ore e immerse (+LN) o meno (-LN) in azoto liquido. La ricrescita è stata effettuata su terreno contenente BA o mT.

Varietà	Trattamento disidratazione (air o sg)	Durata trattamento disidratante (ore)	Citochinina terreno ricrescita (BA o mT)	Sopravvivenza (%)	E.S.
TR	sg	6	BA	10,0 c	± 4,1
TR	sg	8	BA	40,0 a	± 7,1
TR	sg	6	mT	16,7 c	± 2,4
TR	sg	8	mT	46,7 a	± 2,4
TR	air	6	BA	28,6 b	± 2,2
TR	air	6	mT	23,3 bc	± 6,1
MB	sg	6	BA	16,6 c	± 2,4
MB	sg	8	BA	26,7 b	± 4,7
MB	sg	6	mT	13,3 c	± 4,7
MB	sg	8	mT	40,0 a	± 4,1
MB	air	6	BA	25,0 b	± 1,1
MB	air	6	mT	28,6 b	± 3,3

Tab. 3 Gemme ascellari di TGR e MB, sopravvivenza (%) dopo disidratazione con gel di silice (sg) o flusso laminare (air), trattate con saccarosio 0,75 M per 1 giorno ed immersione in azoto liquido. Differenti lettere sulla colonna indicano medie significativamente diverse (Anova a una via e l'LSD test $p < 0,05\%$, software 'Statgraphics Centurion').

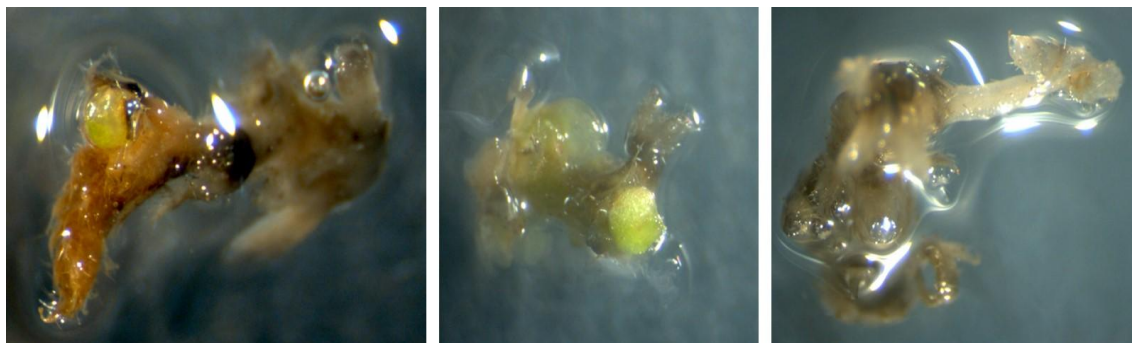


Fig. 5 Gemme ascellari di Montebello sopravvissute dopo immersione in azoto liquido, trattate con saccarosio 0,75 M, disidratate con gel di silice per 8 h e poste su terreno contenente mT.

Discussione

Alla percentuale di acqua presente nelle cellule dei materiali da crioconservare è legata la formazione dei cristalli di ghiaccio intracellulari che non permettono la sopravvivenza delle cellule. Nell'incapsulazione-disidratazione, la riduzione del contenuto di acqua viene ottenuto mediante il trattamento delle capsule di alginato con soluzioni ipertoniche di saccarosio, e la loro successiva esposizione ad un flusso di aria sterile (Shimonishi et al. 1991; Kuranuki e Yoshida, 1996) o a del gel di silice (Uragami et al. 1990; Condello et al. 2009; Arias Padrò et al. 2012).

Da un nostro studio condotto precedentemente, riguardante la fase di pretrattamento delle capsule di alginato, è emerso che la concentrazione di saccarosio più efficace ai fini della crioconservazione del nocciolo è di 0,75 M per un periodo di tempo di 24 ore (Sgueglia et al. 2012). Le concentrazioni più alta, pari a 1 M, o tempi di esposizione più lunghi, si sono infatti rivelati non idonei, facendo osservare percentuali di sopravvivenza basse, sia nel caso dei controlli, che degli espianti immersi in azoto liquido. Il medesimo trattamento prima della fase di disidratazione, è stato ritenuto il più opportuno anche da Gonzalez-Arnao et al. in *Saccharum* spp. (1993) e in *Citrus* spp. (2003).

Ricerca la concentrazione di saccarosio ottimale e la durata dell'esposizione degli espianti incapsulati a quest'ultima è di notevole importanza per mettere appunto un protocollo di incapsulazione-disidratazione. Il saccarosio, infatti, ha due effetti: riduce il contenuto di acqua all'interno dell'espianto, per mezzo della sua azione osmotica, e viene anche assorbito dall'espianto aumentando la concentrazione dei soluti al suo interno (Gonzalez-Aranao et al. 2006).

I nostri risultati hanno, inoltre, mostrato che il nocciolo tollera bene l'incapsulazione in alginato di sodio, mantenendo percentuali di sopravvivenza molto alte (maggiori nel 90% sia per TGR che MB). Come riportato da Dereuddre (1992) in numerose specie, l'incapsulazione ha indotto, infatti, solo un ritardo nello sviluppo del meristema vegetativo. Questo risultato lascia ben sperare in una possibile applicazione dell'incapsulazione anche per la conservazione del germoplasma di questa specie mediante la crescita rallentata *in vitro* applicata ai semi sintetici.

Infine, anche se non risulta sempre necessario estrarre gli espianti dalle capsule di alginato, come dimostrato in pero (Dereuddre et al. 1990), la rimozione di queste ultime dopo 7 giorni dall'immersione in azoto liquido, ha favorito, nel caso del nocciolo, una più veloce ripresa delle attività vegetative delle gemme ascellari. Ciò è in accordo con quanto riportato in vite e in mora (Plessis et al. 1991; Niino et al. 1992).

Per la fase di disidratazione, i risultati ottenuti, evidenziano che l'utilizzo di gel di silice nella fase di disidratazione degli espianti di nocciolo, consente una maggiore sopravvivenza rispetto al flusso laminare. Questi dati confermano quanto riportato da altri autori in pistacchio (Akdemir et al. 2013), in canna da zucchero (Gonzalez-Arno et al. 2006) e gelso (Arias et al. 2012). Il gel di silice, infatti, che è stato ampiamente utilizzato con successo per disidratare gli espianti di varie specie prima dell'immersione in azoto liquido, secondo alcuni autori garantirebbe una più omogenea e graduale disidratazione rispetto ad altri metodi (Kaviani, 2011). Questo sistema, inoltre, offre un metodo maggiormente riproducibile e permette di mantenere costanti alcuni fattori quali la temperatura e l'umidità.

La composizione del terreno in cui vengono posti gli espianti dopo la crioconservazione riveste un ruolo importante nella ripresa vegetativa degli stessi. In particolar modo, la parte della composizione dei regolatori di crescita, se ben costituita può promuovere la ripresa vegetativa degli espianti crioconservati. La BA, è la citochinina sintetica più ampiamente utilizzata nella colture *in vitro* (George, 2008). Negli ultimi anni, tuttavia, le topoline, un gruppo di citochinine aromatiche, sono state studiate come alternative alla BA, e alcuni autori ne hanno mostrato la efficacia in protocolli di micropropagazione di varie specie (Aremu et al. 2012 e referenze incluse). In particolare, è stato dimostrato che la metatopolina (mT) (6-3hydroxybenzylaminopurina) può migliorare il tasso di moltiplicazione ed essere efficace nel controllo dell'iperidricità degli espianti e nel rallentamento della senescenza fogliare in varie specie (Aremu et al. 2012). I nostri dati, tuttavia, nonostante sia stato precedentemente messo in evidenza in altre specie il ruolo delle citochinine nel terreno di coltura per la ripresa vegetativa degli espianti dopo la crioconservazione (Condello et al. 2011), evidenziano che la presenza di due diverse citochinine nel terreno di coltura, alle concentrazioni utilizzate, non influenza significativamente la ripresa vegetativa delle gemme dopo l'immersione in azoto liquido.

Conclusioni

La tecnica di incapsulazione-disidratazione è ad oggi utilizzata con successo per la crioconservazione di numerose specie vegetali (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006).

A riguardo, la ricerca di un nuovo protocollo, prevede l'ottimizzazione di alcune fasi critiche di tale tecnica di crioconservazione, come al esempio la disidratazione, al fine di migliorare la risposta delle varie specie, e all'interno delle stesse dei diversi genotipi. I risultati ottenuti nel corso di questo studio, rappresentano un passo in avanti nella messa a punto di un protocollo di crioconservazione mediante la tecnica di incapsulazione-disidratazione, per la salvaguardia

delle risorse genetiche di nocciolo (*Corylus avellana* L.). Tale studio, infatti, fornisce indicazioni sull'importanza della scelta della modalità e dei tempi di disidratazione, nell'applicazione di tale tecnica al nocciolo, evidenziando la maggiore sopravvivenza degli espianti disidratati per 8 ore mediante gel di silice. I risultati ottenuti, inoltre, hanno mostrato che con una percentuale di acqua all'interno delle capsule maggiore del 25% (disidratazione per 6 ore in gel di silice) è possibile ottenere valori di sopravvivenza alti negli espianti non immersi in azoto liquido, ma al contrario, tale percentuale di acqua, nel caso del nocciolo, non consente una protezione efficace durante l'immersione in azoto liquido. Infine, i risultati ottenuti con l'utilizzo di benziladenina e metatopolina nel terreno di ricrescita dopo immersione in azoto liquido, richiedono un futuro approfondimento di tale aspetto, variando la concentrazione delle tue citochinine, al fine di ottimizzare la composizione del terreno nella fase di ripresa vegetativa dopo l'immersione in azoto liquido.

3. Terzo esperimento: crioconservazione di gemme ascellari della cultivar di nocciolo “Tonda Gentile Romana” mediante la tecnica di *droplet-vitrification*

Riassunto

La tecnica di *droplet-vitrification* è stata applicata a gemme ascellari di nocciolo (*Corylus avellana* L.), cultivar Tonda Gentile Romana. Gli espianti, prelevati da germogli moltiplicati *in vitro* in condizioni standard o da germogli mantenuti a 4 °C al buio per tre mesi senza alcuna subcoltura, sono stati trattati con una *loading solution* e quindi immersi in PVS2 o in PVS3 per un tempo di 60 o 90 minuti. Gli espianti, all'interno di gocce di *Plant Vitrification Solution* (PVS), sono stati poi trasferiti in parte su strisce di alluminio ed immersi in azoto liquido e in parte trasferiti direttamente alla fase successiva. Tutti gli espianti sono stati trattati con una *unloading solution* per 15 minuti e piastrati sul terreno per la ricrescita. Il pretrattamento a 4 °C non ha migliorato la sopravvivenza degli espianti trattati con la PVS2, mentre tale trattamento ha agito positivamente sulla ripresa vegetativa degli espianti trattati con PVS3 per 60 e 90 min. Per le gemme ascellari immerse in azoto liquido dopo il trattamento con le PVS, la percentuale di sopravvivenza più elevata è stata ottenuta applicando la PVS3 per 60 minuti agli espianti provenienti da condizioni standard di coltura, o la PVS2 e la PVS3, rispettivamente per 60 e 90 minuti, agli espianti provenienti dal pretrattamento a 4 °C al buio per tre mesi.

Introduzione

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità della tecnica di *droplet-vitrification* al nocciolo (*C. avellana* L.), cultivar Tonda Gentile Romana, definendo la *Plant Vitrification Solution* (PVS) più idonea ed i tempi di immersione da utilizzare. È stato, inoltre, valutato, l'effetto del pretrattamento dei germogli da cui prelevare gli espianti, a 4 °C, per tre mesi al buio, al fine di ottimizzare la risposta alla crioconservazione.

Materiali e metodi

Valutazione dell'effetto del pretrattamento al freddo e al buio e del tipo di PVS

Al fine di valutare l'effetto del pretrattamento al freddo dei germogli utilizzati per il prelievo sulla crioconservazione mediante *droplet-vitrification*, germogli di nocciolo (*C. avellana* L.), cultivar Tonda Gentile Romana (TGR), cresciuti *in vitro* su un terreno standard di coltura (TM) costituito da sali DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) e modificato secondo Damiano et al. (2005), con benziladenina (BA, 1,5 mg/L), acido giberellico (GA₃, 0,03 mg/L) e acido

indolbutirrico (IBA, 0,01 mg/L), saccarosio (30 g/L) e agar (5,7 g/L), sono stati mantenuti a 4 °C al buio (FRIGO) per tre mesi senza alcuna subcoltura o in condizioni standard di coltura, e subcolturati regolarmente ogni 3 settimane (CondST).

Preparazione degli espianti

Dopo tre mesi, dai germogli di TGR mantenuti in CondST o provenienti dal pretrattamento FRIGO sono stati prelevati segmenti nodali, comprendenti gemme ascellari con una porzione (0,2-0,4 cm di lunghezza) di fusto. La foglia è stata rimossa da ogni segmento nodale al fine di rendere il peso e la misura degli espianti più idonea possibile alle fasi successive di crioconservazione (Condello et al. 2011).

Loading

Gli espianti sono stati trasferiti in 20 ml di LS a temperatura ambiente al buio per 20 minuti (**Fig. 1a**). La LS era costituita da TM liquido, glicerolo 2M e saccarosio 0,4M (pH 5,7), ed è stata sterilizzata per filtrazione.

Disidratazione degli espianti per mezzo della PVS2 o della PVS3 e immersione in azoto liquido

Negli espianti, provenienti sia da CondST che da FRIGO, la LS è stata sostituita dalla soluzione PVS2 o dalla PVS3, alla temperatura di 0 °C (**Fig. 1b**). La soluzione PVS2 era composta da TM liquido, 30% di glicerolo, 15% di glicole etilenico, 15% di DMSO e 0,4 M saccarosio (Uragami et al. 1989). Mentre, la soluzione PVS3 era costituita da 50% di glicerolo e 50% di saccarosio disciolti in TM liquido (Nishizawa et al. 1993). I tempi di immersione applicati sono stati 60 o 90 minuti per entrambe le soluzioni. Successivamente, gli espianti sono stati trasferiti singolarmente in una goccia della corrispondente PVS su fogli di alluminio (0,5 cm x 2 cm) sterili, e mantenuti ad una temperatura di 0 °C nel corso del trattamento mediante l'ausilio di elementi refrigeranti (**Fig. 2a**). Infine, le strisce di alluminio con sopra gli espianti sono state immerse direttamente in azoto liquido (LN) per 1 ora. Per l'immersione in azoto liquido sono state utilizzate 3 piastre Petri con 10 gemme ascellari per trattamento. Inoltre, ulteriori dieci gemme ascellari (2 capsule petri con 5 espianti) per ogni trattamento non sono state immerse in azoto liquido (-LN) ma direttamente immerse nella *unloading solution* (US) per 15 minuti e piastrate sul terreno di ricrescita con le modalità sotto riportate.

Prelevamento dall'azoto liquido e unloading

Le strisce di alluminio prelevate dall'azoto liquido sono state immerse a temperatura ambiente per 15 minuti, in 20 ml di US composta da TM con saccarosio 1,2 M e sterilizzata per filtrazione. Successivamente, gli espianti sono stati posti su carta sterile all'interno di piastre

Petri (9 cm di diametro) contenente TM senza fitoregolatori e con saccarosio 0,3 M, per 24 ore al buio (**Fig. 2b**). Gli espianti sono stati quindi trasferiti su piastre Petri (9 cm di diametro) contenenti TM modificato con BA 1,35 μ M e IBA 0,25 μ M, per sette giorni al buio. Al termine dei sette giorni gli espianti sono stati trasferiti sul terreno TM e posti in condizioni di coltura standard.

Raccolta dati e analisi statistica

I dati riguardanti la sopravvivenza sono stati rilevati 4 settimane dopo il trasferimento al terreno di ricrescita rilevando il numero di espianti che si presentavano verdi e/o avevano prodotto callo. Tutti gli esperimenti hanno seguito uno schema completamente randomizzato; sui dati ottenuti, dove possibile, è stata calcolata la media e l'errore standard (ES), ed è stata applicata l'analisi Anova a una via e l'LSD test ($p < 0,05\%$) per valutare la significatività della differenza tra le medie utilizzando il *software* 'Statgraphics Centurion'.



Fig. 1 Gemme ascellari di TGR immerse nella *loading solution* (a) per 15 minuti e in PVS2 o PVS3 per 60 o 90 minuti in ghiaccio (b).

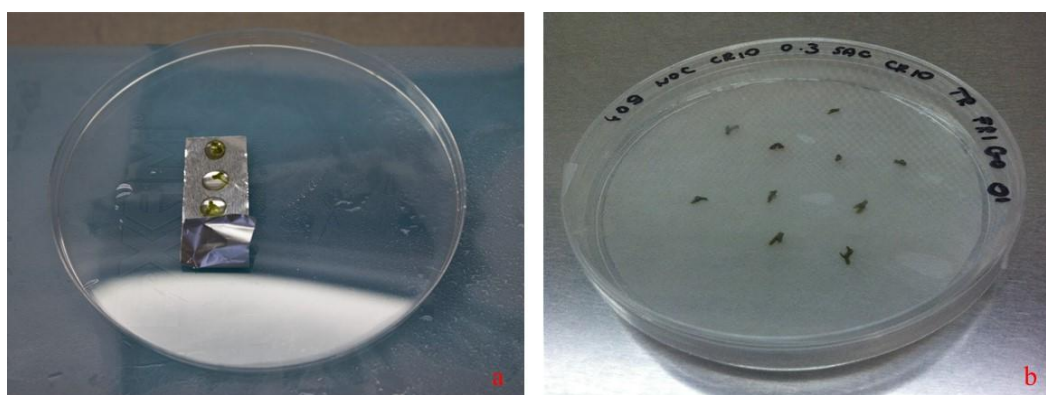


Fig. 2 Espianti di TGR all'interno di gocce di PVS2 e posti su una striscia di alluminio (a) e piastrati su terreno TM senza fitoregolatori e con saccarosio 0,3 M, dopo la fase di *unloading* (b).

Risultati

La PVS3 (60 o 90 minuti di trattamento) ha permesso la più elevata sopravvivenza degli espianti di controllo, non immersi in azoto liquido, provenienti da germogli mantenuti al freddo per tre mesi. La PVS2 ha permesso di ottenere una sopravvivenza maggiore, rispetto alla PVS3, quando il trattamento è stato applicato per 60 minuti agli espianti prelevati da germogli mantenuti in condizioni standard di coltura (**Tab. 1**).

Negli espianti immersi in azoto liquido la sopravvivenza più elevata (**Fig. 3; Tab. 2**) è stata ottenuta utilizzando la PVS3 per 60 minuti su espianti provenienti da germogli mantenuti in coltura standard o la PVS2 e la PVS3 rispettivamente per 60 minuti e per 90 minuti su espianti provenienti da FRIGO.

Trattamento 4 °C buio (gg)	Trattamento disidratante (PVS)	Durata trattamento disidratante (min)	Sopravvivenza (%)
0	PVS2	60	100
0	PVS2	90	60
90	PVS2	60	80
90	PVS2	90	60
0	PVS3	60	80
0	PVS3	90	70
90	PVS3	60	100
90	PVS3	90	100

Tab. 1 Sopravvivenza (%) gemme ascellari di TGR provenienti da condizioni standard di coltura (0 gg) o da pretrattamento a 4 °C al buio per tre mesi (90gg), dopo trattamento con PVS2 o PVS3 per 60 o 90 minuti. Gli errori standard sono risultati < al 10%.

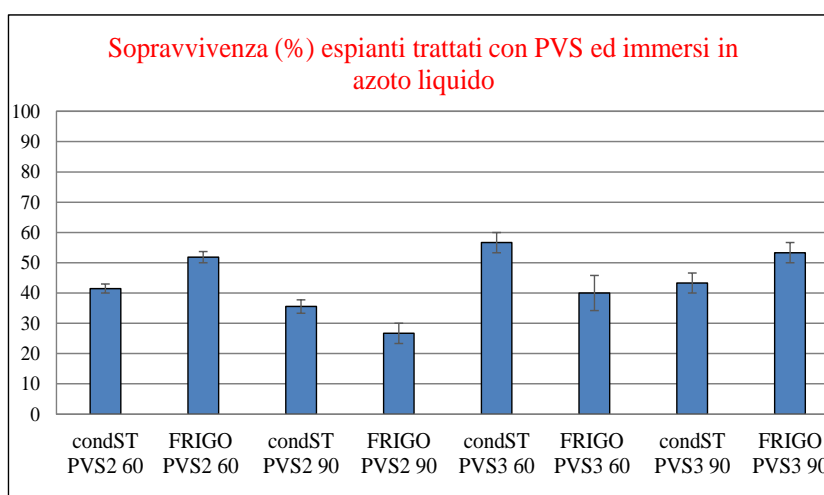


Fig. 3 Sopravvivenza (%) di gemme ascellari di TGR trattate con PVS2 o PVS3 per 60 o 90 minuti, con (FRIGO) o senza (condST) pretrattamento al freddo e al buio, dopo immersione in azoto liquido.

Trattamento 4 °C buio (gg)	Trattamento disidratante (PVS)	Durata trattamento disidratante (min)	Sopravvivenza (%)	E.S.
0	PVS2	60	41,5 b	± 1,5
0	PVS2	90	35,6 c	± 2,2
90	PVS2	60	51,9 a	± 1,9
90	PVS2	90	26,7 d	± 3,3
0	PVS3	60	56,7 a	± 3,3
0	PVS3	90	43,3 b	± 3,3
90	PVS3	60	40,0 bc	± 5,8
90	PVS3	90	53,3 a	± 3,3

Tab. 2 Sopravvivenza (%) espianti di TGR provenienti da condizioni standard di coltura (0 gg) o da pretrattamento a 4 °C al buio per tre mesi (90gg), dopo trattamento con PVS2 o PVS3 per 60 o 90 minuti, e successiva immersione in azoto liquido. Differenti lettere sulla colonna indicano medie significativamente diverse (Anova a una via e l’LSD test $p < 0,05\%$, software ‘Statgraphics Centurion’).

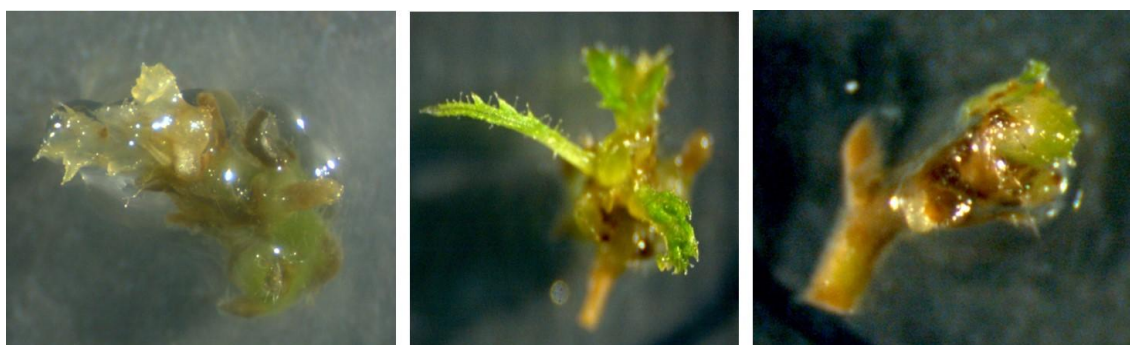


Fig. 4 Gemme ascellari di TGR provenienti da pretrattamento a 4 °C al buio per tre mesi, trattate con PVS3 per 90 minuti e sopravvissute dopo l’immersione in azoto liquido.

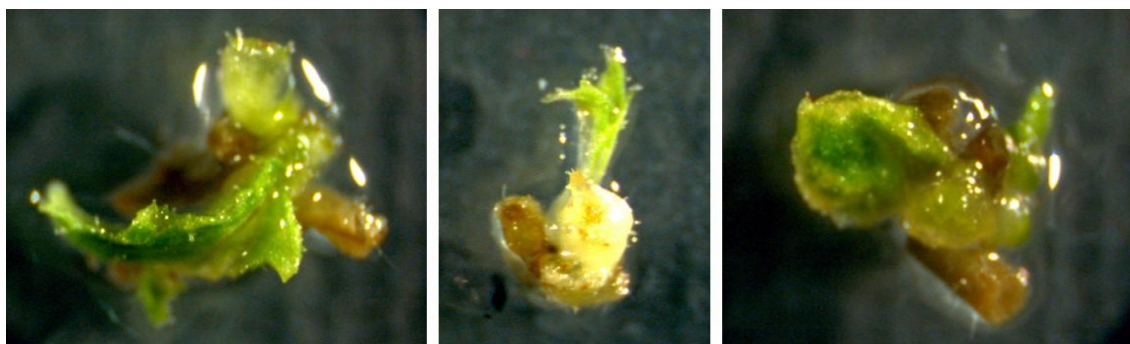


Fig. 5 Gemme ascellari di TGR provenienti da pretrattamento a 4 °C al buio per tre mesi, trattate con PVS2 per 60 minuti e sopravvissute dopo l’immersione in azoto liquido.

Discussione

Nella definizione dei protocolli di crioconservazione mediante vitrificazione per i fruttiferi sono state usate sia la PVS3 che la PVS2 e i tempi di applicazione sono stati definiti in funzione della specie (Zhao et al. 2008 e referenze incluse). Il nostro studio riporta per la prima volta l’applicazione della *droplet-vitrification* su nocciolo e valuta l’effetto delle PVS2 e della PVS3 sulla sopravvivenza con o senza immersione in azoto liquido. Nel nostro esperimento il prolungamento a 90 minuti del trattamento con PVS2 degli espianti di

controllo ha ridotto la sopravvivenza degli espianti rispetto al trattamento di 60 minuti, indipendentemente dal pretrattamento, mentre questa risposta non è stata osservata nella PVS3 che ha garantito una buona sopravvivenza quando applicata per 90 minuti agli espianti provenienti dal pretrattamento in FRIGO. Inoltre, i dati di sopravvivenza dopo l'immersione in azoto liquido mostrano che sia la PVS2 con il pretrattamento dei germogli in frigo, che la PVS3 per gli espianti provenienti da germogli mantenuti in condizioni di coltura standard, possono essere utilizzate per garantire una buona sopravvivenza degli espianti se applicate per 60 minuti, mentre prolungando il trattamento a 90 minuti solo la PVS3 permette di ottenere una buona sopravvivenza e solo in espianti provenienti dal pretrattamento a 4 °C. Questo risultato è probabilmente attribuibile al DMSO presente all'interno della PVS2, che, come riportato da Hooi et al. (2010) può causare danni a livello cellulare. La tossicità di questa sostanza crioprotettrice varia con la specie (Urbani et al. 2007), e i risultati ottenuti suggeriscono che per il nocciolo 90 minuti di esposizione alla PVS2 interferiscano e possano essere dannosi alla ripresa vegetativa delle gemme ascellari. Nel caso della PVS3 solo gli espianti da FRIGO hanno mostrato una buona risposta in termini di sopravvivenza al prolungamento a 90 minuti dell'immersione nella soluzione. Questo risultato, pur evidenziando che il trattamento con la PVS3 per 90 minuti non permette di ottenere maggiore sopravvivenza rispetto a quello per 60 minuti, permette di ipotizzare un ruolo del pretrattamento a 4° C nella risposta all'immersione prolungata in PVS3 e suggerisce che la minore tossicità della PVS3 sia legata non solo alla specie ma anche allo stato fisiologico dell'espianto.

Conclusioni

La tecnica di *droplet-vitrification* è molto recente e per tale motivo è stata applicata, fino ad ora, ad un numero limitato di specie vegetale (Sakai e Engelmann, 2007). Lo studio condotto rappresenta il primo contributo sull'applicazione della tecnica della *droplet-vitrification* in *Corylus*. Per le gemme ascellari crioconservate, la percentuale di sopravvivenza più elevata è stata ottenuta applicando la PVS3 per 60 minuti agli espianti provenienti da condizioni standard di coltura, o la PVS2 e la PVS3, rispettivamente per 60 e 90 minuti, agli espianti provenienti dal pretrattamento a 4 °C al buio per 3 mesi. In merito a quest'ultimo aspetto, in futuro saranno condotti degli studi al fine di meglio valutare lo stato fisiologico dell'espianto sulla risposta alla crioconservazione mediante *droplet-vitrification*.

4. Quarto esperimento: stabilizzazione *in vitro* di genotipi siciliani di nocciolo

Riassunto

In questo lavoro sono riportate le fasi di allestimento della coltura *in vitro* e della micropropagazione delle seguenti varietà siciliane di nocciolo (*Corylus avellana* L.): Carrello, Ghidara, Minnulara e Panottara. Per la fase di disinfezione sono stati testati due tempi di esposizione delle gemme all'ipoclorito di sodio e al sodio mertiolato (35 o 40 minuti). Al fine di ricercare terreni efficienti per il protocollo di micropropagazione, è stato studiato l'effetto di tre citochinine, benziladenina, metatopolina e *thidiazuron* sulla fase di stabilizzazione delle colture *in vitro*, e di due citochinine, benziladenina e metatopolina, per quella di moltiplicazione. Infine, per la fase di radicazione sono state confrontate due concentrazioni (2 o 4 mg/L) di acido indolbutirrico (IBA) nelle varietà Carrello e Panottara. Sia la benziladenina che la metatopolina sono risultate citochinine idonee per la fase di stabilizzazione e moltiplicazione delle varietà autoctone siciliane considerate. La radicazione è stata più elevata utilizzando 4 mg/L di acido indolbutirrico per 7 giorni e trasferendo quindi le microtalee su un terreno privo di fitoregolatori. I risultati ottenuti nella micropropagazione delle varietà autoctone siciliane hanno permesso di definire un protocollo di micropropagazione utilizzabile non solo al fine della loro diffusione ma anche per successivi sviluppi di strategie di conservazione.

Introduzione

L'obiettivo perseguito nel corso della ricerca è stato quello di stabilizzare *in vitro* una collezione di varietà di nocciolo (*C. avellana* L.) autoctone siciliane, rappresentative dell'area dei Nebrodi (ME). A tal fine sono stati testati due tempi di disinfezione in ipoclorito di sodio e sodio mertiolato (35+35 o 40+40 minuti), l'effetto di tre citochinine (benziladenina, metatopolina o *thidiazuron*) sulla fase di stabilizzazione, di due citochinine (benziladenina o metatopolina) sulla fase di moltiplicazione e di due concentrazioni (2 o 4 mg/L) di acido indolbutirrico sulla fase di radicazione.

Materiali e metodi

Disinfezione degli espianti, prelievo degli apici e allestimento delle colture axeniche

Come espianti iniziali sono state utilizzate gemme apicali e gemme ascellari di nocciolo (*C. avellana* L.), delle varietà Carrello (CR), Ghidara (GH), Minnulara (MN) e Panottara (PN), prelevate da rami di un anno di piante adulte coltivate in pieno campo (**Fig. 1**).

Gli agenti decontaminanti utilizzati sono stati: alcool etilico al 70%, ipoclorito di sodio (NaOCl) 0,8% cloro attivo, e sodio mertiolato (C₉H₉HgNaO₂S) 0,05%.

Per la fase di disinfezione degli espianti si è proceduto con:

- lavaggio delle gemme con sapone Lysoform per 30 minuti in agitazione (**Fig. 2a**);
- risciacquo sotto acqua corrente per 10 minuti (**Fig. 2b**);
- immersione in alcool etilico al 70% per 2 minuti in Magenta® sterile;
- risciacquo con acqua sterile;
- immersione in ipoclorito di sodio + 2 gocce di bagnante Tween-80® in Magenta® sterile;
- due risciacqui con acqua sterile;
- immersione in sodio mertiolato + 2 gocce di bagnante Tween-80® in Magenta® sterile (**Fig. 2c**);
- tre risciacqui con acqua sterile.

Il prelievo degli apici, della lunghezza di 2-3 mm, per l'allestimento delle colture, è stato effettuato con l'ausilio di un microscopio da dissezione, sotto cappa sterile (**Fig. 3a e Fig. 3b**).

Sono stati messi a confronto due tempi di immersione degli espianti in ipoclorito di sodio e sodio mertiolato (35+35 o 40+40 minuti). Gli apici vegetativi prelevati in ambiente asettico sono stati posti all'interno di flaconi contenenti terreno DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) addizionato con carbone attivo (1 g/L) per contrastare il rilascio di fenoli (**Fig. 3c; Tab. 1**), ed allevati in camera di vegetazione a 24 °C con fotoperiodo di 16 h e intensità luminosa di 40 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (*photosynthetic active radiation*). Per l'esperimento sono stati prelevati 30 espianti per varietà.



Fig. 1 Gemme apicali e ascellari di nocciolo (*C. avellana* L.) autoctono siciliano, varietà "Carrello", prelevate da rami di un anno di piante *in vivo*, in pieno campo.



Fig. 2. Disinfezione delle gemme apicali e ascellari di nocciolo (*C. avellana* L.) autoctono siciliano, varietà “Carrello”, lavaggio con sapone Lysoform (a), risciacquo sotto acqua corrente (b), immersione in Na metilato + 2 gocce di Tween-80® (c).



Fig. 3 Prelievo dell’espianto di nocciolo (*C. avellana* L.) autoctono siciliano, varietà “Carrello”, per l’avvio della coltura *in vitro* mediante l’ausilio di uno stereomicroscopio, sotto cappa sterile (a e b), e suo posizionamento su terreno DKW contenente diverse citochinine (c).

Stabilizzazione della coltura asettica e moltiplicazione dei germogli

Dopo 4 settimane dalla fase di allestimento, i germogli avviati alla coltura *in vitro* e non inquinati, sono stati trasferiti in flaconi contenenti terreno standard di coltura (TM) (**Fig. 4; Tab. 1 e Tab. 2**) costituito da sali DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) e modificato, secondo Damiano et al. (2005), con GA₃ (0,03 mg/L), acido indolbutirrico (IBA 0,01 mg/L), saccarosio (30 g/L), e agar (5,7 g/L) e benziladenina (BA), metatopolina (mT) o *thidiazuron* (TDZ), come citochinina. Dopo 3 settimane, i germogli sono stati avviati alla fase di moltiplicazione su terreno TM con BA (1,5 mg/L) o mT (2 mg/L) (**Tab.1**).

Radicazione

Germogli singolarizzati, delle varietà CR e PN, provenienti dalla fase di moltiplicazione in presenza di mT (2 mg/L), sono stati indotti a radicare su un terreno MS (Murashige e Skoog, 1962), con concentrazione di sali dimezzata, contenente IBA (2 mg/L o 4 mg/L) per 7 giorni.

In seguito, le piante sono state trasferite su terreno MS con metà concentrazione di sali, senza ormoni e con aggiunta di vermiculite (50% v/v), per 4 settimane.

Risultati

La fase di disinfezione ha presentato notevoli difficoltà. Ciò è stato dimostrato anche dalle basse percentuali di sopravvivenza rilevate negli espianti di tutte le 4 varietà introdotte *in vitro*. Il tempo di immersione in ipoclorito di sodio e sodio mertiolato che ha permesso una percentuale di sopravvivenza più alta è stato di 35 minuti per le varietà CR e PN (33,3% e 23,3%), e di 40 minuti per le varietà GH e MN (20% e 26,7%) (**Fig. 4; Tab. 2**). Nel complesso, l'esposizione agli agenti sterilizzanti per 40 minuti ha permesso di ridurre la percentuale di inquinamento in tutte le varietà, ma ha anche innalzato la percentuale di espianti necrotici, soprattutto nel caso della varietà CR, nella quale tale percentuale è passata dal 6,7% al 50% (**Tab. 2**).

Per ciò che riguarda la fase di stabilizzazione delle colture *in vitro* (**Fig. 5; Tab. 3**), l'utilizzo del TDZ (terreno c1) ha indotto una notevole proliferazione di callo alla base dei germogli in tutte le 4 varietà, e, in alcuni casi, sono stati rilevati anche tessuti iperidrici. Il tasso di moltiplicazione (calcolato come numero di germogli finale su quello iniziale per espianto) ottenuto non è stato differente con l'utilizzo della BA o del mT nel terreno di stabilizzazione dimostrando che entrambe le citochinine possono essere idonee per questa fase della micropropagazione.

Per quanto riguarda la fase di moltiplicazione (**Tab. 4**), tutte le varietà hanno mostrato una buona capacità proliferativa, indipendentemente dalla citochinina presente nel terreno. Per le varietà CR e PN, tuttavia, il terreno contenente la BA ha causato spesso una leggera produzione di callo e di tessuti iperidrici suggerendo la necessità di ottimizzare in questa fase la concentrazione da utilizzare di questa citochinina.

Le varietà CR e PN hanno radicato con IBA (**Tab. 5**). Per entrambe le varietà, la percentuale maggiore di germogli radicati è stata ottenuta con la concentrazione più alta di IBA (4 mg/L) (**Fig. 6**).

Componenti	ALLESTIMENTO	STABILIZZAZIONE			MOLTIPLICAZIONE		RADICAZIONE	
		a1	b1	c1	a2	b2	a3	b3
MACRO	DKW	DKW	DKW	DKW	TM	TM	MS/2	MS/2
MICRO	DKW	DKW	DKW	DKW	TM	TM	MS	MS
Vitamine	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Ca pantotenato	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Biotina	0,1	-	-	-	-	-	-	-
Acido folico	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Ac. paraminobenzoico	1	-	-	-	-	-	-	-
Riboflavina	0,1	-	-	-	-	-	-	-
IBA (mg/L)	-	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2	4
GA3 (mg/L)	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	-
BA (mg/L)	1	1	-	-	1,5	-	-	-
mT (mg/L)	-	-	1,3	-	-	2	-	-
TDZ (mg/L)	-	-	-	1,5	-	-	-	-
Saccarosio (g/L)	20	30	30	30	30	30	20	20
Carbone attivo (mg/L)	2	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 1 Composizione terreni delle fasi di propagazione *in vitro* di 4 varietà siciliane di nocciolo (*C. avellana* L.): **MS**= Murashige & Skoog, **DKW**= Driver e Kuniyuki, **TM**= terreno con sali DKW modificato secondo Damiano et al. (2005).

Varietà e durata esposizione agenti sterilizzanti (min)	Soprav. (%)	Inqu. (%)	Necr. (%)
CARRELLO 35 min	33,3	56,7	6,7
CARRELLO 40 min	16,7	23,3	50,0
GHIDARA 35 min	10,0	76,7	3,3
GHIDARA 40 min	20,0	56,7	10,0
MINNULARA 35 min	10,0	83,3	3,3
MINNULARA 40 min	26,7	46,7	16,7
PANOTTARA 35 min	23,3	50,0	20,0
PANOTTARA 40 min	10,0	33,3	46,7

Tab. 2 Percentuale di sopravvivenza, inquinamento e necrosi in espianti introdotti *in vitro* di 4 varietà di nocciolo siciliano, in relazione ai tempi di esposizione (35 o 40 min) a NaOCl e Na mertiolato.

Varietà	Terreno fase di STABILIZZAZIONE					
	a1 (BA)	E.S.	b1 (mT)	E.S.	c1 (TDZ)	E.S.
CARRELLO	2,7	± 0,9	3,3	± 0,7	0,0	± 0,0
GHIDARA	2,0	± 0,0	1,7	± 0,3	0,3	± 0,3
MINNULARA	1,7	± 0,7	1,0	± 0,0	0,7	± 0,7
PANOTTARA	2,3	± 0,9	3,0	± 0,6	0,3	± 0,3

Tab. 3 Tasso di moltiplicazione di germogli *in vitro* durante la fase di stabilizzazione, di varietà di nocciolo siciliane, su terreno con diverse citochinine.

Varietà	Terreno fase di MOLTIPLICAZIONE			
	a2 (BA)	E.S.	b2 (mT)	E.S.
CARRELLO	2,80	± 0,8	3,20	± 0,4
GHIDARA	2,40	± 0,5	1,40	± 0,5
MINNULARA	2,80	± 0,8	1,80	± 0,4
PANOTTARA	3,20	± 0,4	2,60	± 0,5

Tab. 4 Tasso di moltiplicazione di germogli *in vitro* di varietà di nocciolo siciliani, su terreno di moltiplicazione standard (TM) addizionato con diverse citochinine.

Varietà	Terreno fase di RADICAZIONE							
	a3 (2 g/L IBA)				b3 (4 g/L IBA)			
	Radicazione (%)	E.S.	n. radici	E.S.	Radicazione (%)	E.S.	n. radici	E.S.
CARRELLO	41,7	± 8,3	2,4	± 0,5	75,0	± 8,3	1,5	± 0,7
PANOTTARA	50,0	± 0,0	4,3	± 0,3	66,7	± 0,0	2,6	± 0,4

Tab. 5. Effetto della concentrazione di IBA sulla radicazione (%) e sul numero (n.) di radici prodotte in varietà siciliane di nocciolo, “Carrello” e “Panottara”, dopo 4 settimane.

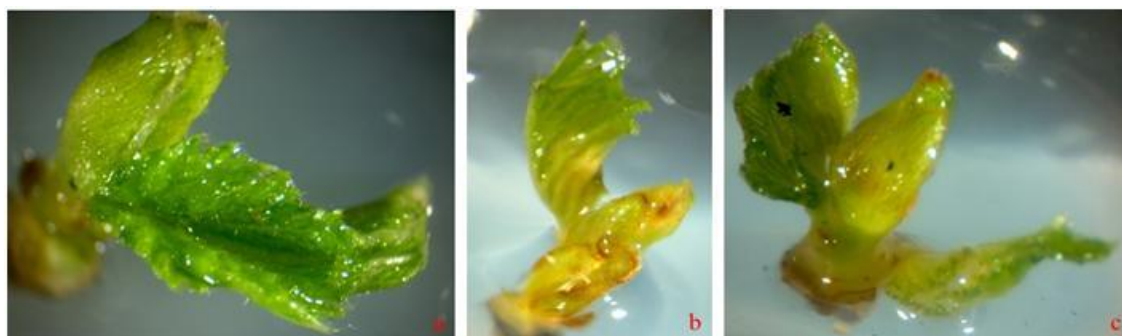


Fig. 4. Crescita di germogli nocciolo (*C. avellana* L.) autoctono siciliano, varietà “Carrello” (a), “Minnulara” (b) e “Panottara” (c), in flaconi contenenti terreno standard di coltura (TM).



Fig. 5 Germogli sviluppati da gemme ascellari di quattro varietà siciliane di nocciolo (*C. avellana* L.) in flaconi contenenti terreno di coltura standard (TM).



Fig. 6. Radicazione delle varietà di nocciolo siciliano, “Carrello” (contenitore di sinistra) e “Panottara” (contenitore di destra). Le micro talee sono state indotte a radicare con 4 mg/L IBA per 7 giorni e sono state trasferite su terreno senza ormoni con vermiculite.

Discussione

La propagazione *in vitro*, oltre a rappresentare una valida alternativa ai sistemi di propagazione vegetativa tradizionali, riveste, da qualche tempo, un ruolo strategico nella conservazione *ex situ* delle risorse genetiche vegetali. Essa, infatti, permette di realizzare e mantenere, partendo da una pianta madre, collezioni clonali di germogli in condizioni fitosanitarie e ambientali controllate, in spazi ristretti e a costi contenuti.

Il materiale vegetale di partenza per l’allestimento delle colture asettiche è solitamente rappresentato da apici vegetativi o da meristemi apicali di 0,2-0,5 mm prelevati con l’ausilio di uno stereomicroscopio. È possibile, inoltre, utilizzare foglie, organi fiorali, embrioni immaturi e frammenti di cotiledoni (Paunescu, 2009).

La propagazione *in vitro* del nocciolo (*C. avellana*) è stata ottenuta con successo la prima

volta da Radojevic et al. (1975) utilizzando embrioni somatici. Successivamente, sono stati sviluppati studi riguardanti l'utilizzo di frammenti cotiledonari (Pérez et al. 1983) e assi embrionali provenienti da embrioni zigotici immaturi (Berros et al. 1992). Attualmente, pur essendo disponibili alcuni protocolli per la propagazione *in vitro* da gemma ascellare (Damiano et al. 2005; Bacchetta et al. 2008), per le principali cultivar tra cui la Tonda Gentile Romana, ulteriori studi sono necessari per ottimizzare le varie fasi del processo e, in particolare, per la radicazione.

Nel caso del nocciolo, come in molte altre specie, lo stato fisiologico e sanitario delle gemme e dei meristemi apicali di partenza, influenzano il successo dell'introduzione delle stesse in condizioni *in vitro*. Il materiale vegetale proveniente da piante giovani tendono, infatti, a meglio adattarsi alle caratteristiche della coltura *in vitro*, rispetto a quello prelevate da piante adulte. Ciò può anche essere dovuto al fatto che i tessuti vegetali maturi sono spesso caratterizzati da una presenza massiccia di patogeni quali funghi e batteri. Nel caso della conservazione del germoplasma, questi due aspetti risultano spesso essere alquanto limitanti. Il materiale da preservare non proviene, infatti, sempre da piante madri giovani mantenute in condizioni fisiologiche e sanitarie ottimali. A tal riguardo, quindi, appare di fondamentale importanza ricercare protocolli di disinfezione efficaci e terreni di stabilizzazione e moltiplicazione idonei a supportare le prime fasi di avvio della coltura *in vitro*. Per la fase di disinfezione sono stati precedentemente definiti alcuni protocolli: immersione in ipoclorito di sodio (6% cloro attivo) con qualche goccia di Tween-80® per un tempo da 10 a 30 minuti, seguita da due o tre risciacqui con acqua sterile (Bassil et al. 1992; Nas, 2004; Yu e Reed, 1995), immersione in etanolo (70-95%) per un tempo da 5 secondi a 5 minuti con o senza trattamento preventivo in ipoclorito di sodio (Bacchetta et al. 2008).

Nel corso dell'esperimento condotto è emerso che la risposta ai tempi di esposizione alle soluzioni decontaminanti può variare, all'interno della stessa specie, anche tra le varietà. Ciò conferma che, a parità di tolleranza da parte di una specie agli agenti sterilizzanti i tempi di immersione possono variare ed essere cruciali nella percentuale di sopravvivenza nella fase di disinfezione, e che la propagazione *in vitro* del nocciolo è di difficile attuazione per via delle risposte spesso differenti tra le diverse varietà.

Nel corso degli anni numerosi studiosi hanno tentato di migliorare la combinazione dei regolatori di crescita del terreno per ottimizzare le fasi della propagazione *in vitro* del nocciolo (Anderson et al 1984; Pérez et al 1985; Bassil et al 1992; Diaz Sala et al. 1990; Yu e Reed, 1995; Nas, 2004; Thomson e Deering, 2011).

La BA è una citochinina di origine sintetica ampiamente utilizzata nella colture *in vitro* di vari

genotipi (George, 2008) incluso il nocciolo (Damiano et al. 2005; Bacchetta et al. 2008), mentre la mT, ancora non utilizzata sul nocciolo, è una citochinina di origine naturale il cui impiego nella fase di moltiplicazione può migliorare il tasso di moltiplicazione e essere efficace nel controllo dell'iperidricità degli espianti e nel rallentamento della senescenza fogliare in varie specie (Aremu et al. 2012 e referenze incluse). I risultati ottenuti nel nocciolo hanno messo in evidenza che oltre alla BA, il cui utilizzo è riconosciuto come principale tra le citochinine fino ad ora testate, la mT ad una concentrazione di 1,3 mg/L nella fase di stabilizzazione e di 2 mg/L in quella di moltiplicazione, ha un effetto positivo sulla proliferazione dei germogli e sulla crescita degli stessi.

La radicazione nelle specie arboree rappresenta la fase della micropropagazione più critica per ottenere espianti di qualità trasferibili in ombraio nel minor tempo possibile. Tra i fattori critici per il successo di questa fase c'è la scelta del tipo e della concentrazione dell'auxina (George, 2008). I risultati ottenuti hanno evidenziato l'importanza della scelta della concentrazione dell'auxina (IBA) al fine di indurre una soddisfacente radicazione anche con le varietà di nocciolo studiate.

Conclusioni

La micropropagazione permette di produrre e conservare, in spazi ridotti e a costi contenuti, piante *in vitro* geneticamente identiche tra loro, in condizioni asettiche e in ambiente controllato. Applicare tecniche di coltura *in vitro* al nocciolo (*Corylus avellana* L.) risulta, però, spesso estremamente difficile. Questa specie, infatti, presenta bassa attitudine ad adattarsi alle condizioni *in vitro*, in qualsiasi fase della micropropagazione, e presenta, inoltre, alti tassi di contaminazione microbica specialmente nel materiale proveniente da piante adulte. I risultati da noi ottenuti nella micropropagazione delle varietà autoctone siciliane hanno permesso di definire un protocollo di micropropagazione utilizzabile non solo al fine della loro diffusione ma anche per successivi sviluppi di strategie di conservazione.

Conclusioni Generali

Le prove scientifiche condotte nel corso del triennio di dottorato hanno permesso, di ottenere indicazioni sulle modalità di conservazione *in vitro* del nocciolo (*Corylus avellana* L.) a medio e a lungo termine, e sulla propagazione *in vitro* di tale specie, che risulta in molti casi ancora di difficile attuazione.

Per ciò che riguarda la conservazione a medio-termine, gli studi condotti hanno evidenziato l'importanza della conservazione dei germogli *in vitro* di nocciolo a basse temperature e il ruolo degli zuccheri nell'ottimizzazione del tempo di conservazione. La presenza di saccarosio alla concentrazione di 87,5 mM e di sorbitolo alle concentrazioni di 87,5 e 131,2, hanno, infatti, permesso la conservazione dei germogli fino a 10 mesi, al buio a 4 °C. La percentuale minore dei danni calcolata per mezzo dell'indice di Mc Kinney è stata infine rilevata con la concentrazione più alta di sorbitolo. Le indicazioni ottenute in merito alla crescita rallentata risultano essere rilevanti non solo al fine dell'utilizzo di tale tecnica come strategia per la conservazione del germoplasma del nocciolo, ma anche per un suo possibile utilizzo nei i laboratori commerciali.

Per quanto riguarda la conservazione a lungo termine, i risultati ottenuti con la crioconservazione danno indicazioni sull'importanza della scelta della modalità e dei tempi di disidratazione nell'applicazione della tecnica di incapsulazione-disidratazione e, inoltre, rappresentano il primo contributo sull'applicazione della tecnica della *droplet-vitrification* in *Corylus*.

Nel caso della tecnica di incapsulazione-disidratazione, abbiamo rilevato che la disidratazione mediante gel di silice per una durata di 8 ore permette una migliore risposta degli espianti dopo l'immersione in azoto liquido e che una percentuale di acqua contenuta all'interno delle capsule di alginato intorno al 25%, non consente una protezione efficace durante l'immersione in azoto liquido degli espianti.

Nella prova di *droplet-vitrification*, la percentuale di sopravvivenza più alta è stata ottenuta negli espianti provenienti da germogli mantenuti in coltura standard trattati con PVS3 per 60 minuti e in quelli provenienti dalla conservazione in frigo a 4 °C per tre mesi trattati con PVS2 o con PVS3, rispettivamente per 60 minuti e per 90 minuti.

I risultati ottenuti in entrambi gli esperimenti di crioconservazione, rappresentano dei contributi validi per la messa a punto di protocolli idonei per la conservazione a lungo termine del nocciolo. A tal fine, in futuro, saranno rivalutati gli aspetti legati alle citochinine all'interno del terreno di ricrescita ed il ruolo dei pretrattamenti a cui sottoporre il materiale

prima della crioconservazione nel caso della *droplet-vitrification*.

Infine, le ricerche condotte nell'ambito della coltura *in vitro* del nocciolo, hanno permesso di definire un protocollo di micropropagazione utile non solo al fine di una rapida moltiplicazione e reinserimento delle varietà oggetto di studio nelle aree di origine, ma anche per successivi sviluppi di strategie di conservazione *in vitro*, quali crescita rallentata e crioconservazione. Nel caso del nocciolo, la realizzazione di protocolli idonei per la moltiplicazione *in vitro* rappresenta, inoltre, un'alternativa ai tradizionali metodi propagativi, influenzati da innumerevoli fattori non facilmente controllabili e che forniscono spesso risultati contrastanti e non sempre ripetibili.

Nel complesso, il lavoro svolto nel triennio di dottorato, ottimizzando la fase di disidratazione per la tecnica di incapsulazione-disidratazione, realizzando un protocollo efficace di propagazione *in vitro* e applicando per la prima volta un protocollo di *droplet-vitrification* al nocciolo, ha permesso di evidenziare e valorizzare la potenzialità dell'applicazione di tecniche *in vitro* per la conservazione delle risorse genetiche vegetali di questa specie, fornendo indicazioni sui metodi da usare e sui protocolli da applicare.

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro, ringrazio di cuore tutti i Colleghi del laboratorio di “colture *in vitro* e propagazione” del Centro di ricerca per la frutticoltura di Roma, che mi hanno ospitato nel corso dei tre anni, facendomi sentire ogni giorno, parte integrante del loro gruppo di ricerca. Desidero in particolare modo ringraziare Emilia Caboni che con spirito critico mi ha fornito preziose indicazioni e supporto, trasmettendomi l’esperienza, la fiducia, l’entusiasmo e la perseveranza necessaria a svolgere questo dottorato. Un particolare ringraziamento va anche a Elisa Catenaro, Andrea Frattarelli e Paolo Nota per il supporto tecnico-operativo fornito durante lo svolgimento delle prove scientifiche e delle analisi effettuate. Un ringraziamento sentito va a Marcella Agostinelli, Adele Gentile, Simona Monticelli, e Emiliano Condello, persone con le quali ho avuto la fortuna di condividere le esperienze di laboratorio e che mi sono state sempre accanto, trovando spesso una parola di conforto nei momenti difficili. Ringrazio sinceramente il mio *Tutor*, Maria Antonietta Germanà, per non avermi fatto mai mancare il suo appoggio nel mio percorso di ricerca ed avermi seguito nella realizzazione della tesi di dottorato. Infine, sono grata a mio marito e ai miei genitori, per il loro infinito sostegno e costante incoraggiamento, senza il quale non avrei potuto completare questa tesi di dottorato.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad T., Abbasi N.A., Hafiz I.A., Ali A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. *Pakistan Journal of Botany*, 39:1269-1275.
- Ahmed M., Anjum M.A., Shah A.H., Hamid A. (2010). *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. *Pakistan Journal of Botany*, 42(3):1639-1650.
- Akdemir H., Süzerer V., Tilkat E., Yildirim H., Onay A., Çiftçi Y.O. (2013). *In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm. *Journal of Plant Biochemistry Biotechnology*, 22:43-51.
- Alasalvar C., Shahidi F., Liyanapathirana C.M., Ohshima T. (2003). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). Compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:3790-3796.
- Altieri M.A., Merrick L.C. (1987). *In situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming system. *Economic Botany*, 41(1):86-96.
- Anderson W.C. (1984). Micropropagation of filber, *Corylus avellana* L. *International Plant Propagators Society*, 33:132-137.
- Andres H.B., Fernandez R., Rodrigez R., Rodrigez, A. (2002). Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and the developmental process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70:173-180.
- Arbona V., Manzi M., Carlos de Ollas C., Gómez-Cadenas A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal Molecular Sciences*, 14(3):4885-4911.
- Aremu A.O., Bairu M.W., Dolezal K., Finnie J.F., Van Staden J. (2012). Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108:1-16.
- Arias Padrò M.D., Frattarelli A., Sgueglia A., Condello E., Damiano C., Caboni E. (2012). Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108:167-172.
- Ashmore S.E. (1997). Status report on the development and application on *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. *International Plant Genetic Resources Institute, Rome*.
- Assay Bah B., Engelmann F. (1992 a). Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *CryoLetters*, 13:67-74.
- Assay Bah B., Engelmann F. (1992 b). Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *CryoLetters*, 13:117-126.
- Aynalem H.M., Baker R.E., Reed B.M. (2002). Cold storage of micropropagated Bermudagrass. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 38:77A.
- Avanzato D., Bevilacqua D. (2009). Problematiche sulla propagazione del nocciolo. *Atti del convegno di Giffoni (Valle Piana, 13 dicembre)*.
- Bacchetta L., Bernardini C., Di Stefano G., Pelliccia O., Cavicchioni G., Di Bonito R. (2005). Molecular characterization by RAPDs markers and micropropagation of Italian hazelnut cultivars. *Acta Horticulturae*, 686:99-104.

- Bacchetta L., Aramini M., Bernardi C. (2008). *In vitro* propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources. *HortScience*, 43:562-566.
- Bacchetta L., Avanzato D., Botta R., Boccacci P., Drogoudi P., Metzidakis I., Rovira M., Silva A.P., Solar A., Spera D., Aramini M., Di Giovanni B. (2009). First result of "Safenut": a European project for the preservation and utilization of hazelnut local genetic resources. *Acta Horticulturae*, 845:55-60.
- Bajaj Y.P.S. (1995). Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry cryopreservation of plant germplasm*. Springer-Verlag, pp. 3-18.
- Bàlint, M., Ujvárosi, L., Theissinger, K., Lehrian, S., Mészáros N., Pauls, S.U. (2011). The Carpathians as a major diversity hotspot in Europe. In: Habel (eds) *Biodiversity hotspots in Europe*. Springer, pp. 189-205.
- Ballester A., Janeiro L.V., Vieitez A.M. (1997). Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. *Scientia Horticulturae*, 71:67-78.
- Banerjee N., De Langhe E. (1985). A tissue culture method for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Report*, 4:351-354.
- Barcaccia G., Falcinelli M. (2005). Genetica e genomica. In: Liguori (eds) *Genetica generale*, 2:539.
- Bassil N., Mock D.W.S., Mok M.C., Rebhuhn B.J. (1992). Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Acta Horticulturae*, 300:137-140.
- Bassil N.V., Postman J., Hummer K. (2009). SSR fingerprinting panel verifies identities of clones in backup hazelnut collection of USDA genebank. *Acta Horticulturae*, 845:95-98.
- Beck E.H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal Biosciences*, 32(3):501-510.
- Bekheet S.A., Taha H.S., Solliman M.E., Hassan N.A. (2007). Cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 736:283-291.
- Bell R.L., Reed B.M. (2002). *In vitro* tissue culture of pear: advances in technique for micropropagation and germplasm preservation. *Acta Horticulturae*, 596.
- Benson E.E. (2008). Cryopreservation theory. In: Reed (eds) *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*. Springer, pp. 15-32.
- Berros B., Rey M., Albuérne M., Rodríguez R., (1992). Characterization of somatic embryo induction in seed of filbert: effect of maturation. *Acta Horticulturae*, 351:341-352.
- Bertrand-Desbrunais A., Noirot M., Charrier A. (1991). Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Influence of low concentration of 6-benzyladenine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27:333-339.
- Brockbank K.G.M., Song Y.C., Khirabadi Y.C., Lightfoot L.G., Boggs J.M., Taylor M.J. (2000). Storage of tissues by vitrification. *Transplant Proceedings*, 32:3-4.
- Bunn E., Turner S., Panaia M., Dixon K.W. (2007). The contribution of *in vitro* technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants. *Australian Journal of Botany*, 55:345-355.

- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baillie, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, G.M., Chanson, J., Chenery, A.M., Csirke, J., Davidson, N.C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J.N., Genovesi, P., Gregory, R.D., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J.-F., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M.A., McRae, L., Minasyan, A., Hernández Morcillo, M., Oldfield, T.E.E., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T.D. Vié, J.-C., Watson, R. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328(5892):1164-1168.
- Caccavale A., Lambardi M., Fabbri A. (1998). Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. *Acta Horticulture*, 457:79-83.
- Cadinu M., Repetto A., Beneventis S. (1998). Trattamento induttivo della rizogenesi in piantine di mirto micropropagate. *Giornate scientifiche SOI (Sanremo, 1-3 aprile)*.
- Chabrillange N., Aberlenc-Bertossi F., Noirot M., Duval Y., Engelmann F. (2000). Cryopreservation of oil palm embryogenic suspension. In: Engelmann, Takagi (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current research progress and application*. International Plant Genomic Resources Institute, Rome.
- Chandel K.P.L., Chaudhury R., Radhmani J., Malik S.K. (1995). Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. *Annals of Botany*, 76:443-450.
- Chang Y., Reed B.M. (2001). Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. *HortScience*, 36(7):1329-1333.
- Chaudhury R., Radhainani J., Chandel K.P.S. (1991). Preliminary observations on the cryopreservation of desiccated embryonic axes of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seeds for genetic conservation. *CryoLetters*, 12:31-36.
- Chen Z., Manchester S.R., Sun H. (1999). Phylogeny and evolution of the *Betulaceae* as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany. *American Journal Botany*, 86:1168-1181.
- Chin H.F., H.W. Pritchard (1988). Recalcitrant seeds, a status report. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Chin H.F., Krishnapillay B., Hor Y.L. (1989). A note on the cryopreservation of embryos of coconut (*Cocos nucifera* L. var. *Mawa*). *Pertanika*, 12:183-186.
- Cohen J.I., Potter C.S. (1993). Conservation of biodiversity in natural habitats and the concept of genetic potential. In: Potter, Cohen, Janczewshi (eds) *Perspectives on biodiversity: Case studies of genetic resource conservation and development*. AAAS Press, pp. 19-22.
- Concezzi L., Desantis F., Gramaccia M., Micheli M., Gardi T., Raggi L., Albertini E., Falcinelli M. (2011). Effetti della conservazione alle basse temperature e controllo della stabilità genetica su germoplasma locale di melo in collezione presso la Banca del Germoplasma *in vitro* della Regione Umbria. Riassunti del secondo convegno nazionale sulla Micropropagazione (Sanremo, 7-9 novembre).
- Condello E., Palombi M.A., Tonelli M.G., Damiano C., Caboni E. (2009). Genetic stability of wild pear (*Pyrus pyraster*, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration. *Agricultural and Food Science*, 18:136-143.
- Condello E., Caboni E., Andrè E., Piette B., Druart P., Swennen R., Panis B. (2011). Cryopreservation of *in vitro* axillary buds of apple following the droplet-vitrification method. *CryoLetters*, 32(2):175-185.

- Craddock W.J.H. (1987). Cryopreservation of pollen. Thesis. Oregon State University, Corvallis, OR.
- Dale P.J. (1980). A method for *in vitro* storage of *Lolium multiflorum* Lam. *Annals of Botany*, 45:497-502.
- Damiano C., Catenaro E., Giovinazzi J., Frattarelli A., Caboni E. (2005). Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Acta Horticulturae*, 686:221-226.
- De Boucaud M.T., Brison M., Negrier P. (1994). Cryopreservation of walnut somatic embryos. *CryoLetters*, 15:151-160.
- De Carlo A., Benelli C., Lambardi M. (2009). La micropropagazione per la salvaguardia della biodiversità vegetale: esperienze condotte presso il CNR-IVALSA. *Italus Hortus*, 16(2):175-179.
- Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. (1990). Resistance of alginate-coated shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen. *Comptes Rendus de l'Académie des Science*, 310(3):317-323.
- Dereuddre J. (1992). Cryopreservation of *in vitro* cultures of plant cells and organs by vitrification and dehydration. In: Dattée, Dumas, Gallais (eds) *Reproductive biology and plant breeding*. Springer-Verlag, pp. 291-300.
- Diaz-Sala C., ReY M., Rodriguez R. (1990). *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segment and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23:151-157.
- Dickie J.B., Ellis R.H., Kraak H.L., Ryder K., Tompsett P.B. (1990). Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany*, 65:97-204.
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19:507-509.
- Ellis R.H., Roberts, E.H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45:13-30.
- Engelmann F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica*, 57:227-247.
- Engelmann F. (1997). *In vitro* Conservation Methods. In: Ford-Lloyd, Newbury (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources, Conservation and Use*. CAB International, pp. 119-161.
- Engelmann F. (2000). Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann, Takagi (eds). *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. International Plant Genomic Resources Institute, Rome, pp. 8-20.
- Engelmann F., Engles J.M.M. (2002). Technology and strategies for *ex situ* conservation. In: Ramanatha Rao, Brown, Jackson (eds) *Managing plant genetic diversity*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp. 89-104.
- Engelmann F. (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 40:427-433.
- Engelmann F., Gonzalez-Arno M.T., Wu W.J., Escobar R.E. (2008). Development of encapsulation-dehydration. In: Plant Reed (eds) *Cryopreservation: a practical guide*. Springer, pp. 59-76.

- Engelmann F., 2009. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Horticulturae*, 812.
- Engelmann F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 47(1):5-16.
- Erdogan V. (1999). Genetic relationships among hazelnut (*Corylus*) species. Thesis. Oregon State University, Corvallis, OR.
- Erdogan V., Mehlenbacher S.A. (2000a). Interspecific hybridization in hazelnut (*Corylus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125:489-497.
- Erdogan V., Mehlenbacher S.A. (2000b). Phylogenetic relationships of *Corylus* species (*Betulaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS region and chloroplast matK gene sequences. *Systematic Botany*, 25:727-737.
- Escobar R.H., Mafla G., Roca W.M. (1997). A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Repots*, 16:474-478.
- Fabre J., Dereuddre J. (1990). Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters*, 11:413-426.
- Fay M.F. (1992) Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 28:1-4.
- Fay M.F. (1994). In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*, 3:176-183.
- FAO (1996). Report on the state of world's plant genetic resources - International technical conference on plant genetic resources. FAO, Rome.
- FAO, 1998. The state of world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.
- FAO (1999). Agricultural biodiversity, multifunctional character of agriculture and land conference. FAO, Rome.
- FAO/IPGRI (2002). Review and development of indicators for genetic diversity, genetic erosion and genetic vulnerability (GDEV): summary report of a joint FAO/IPGRI workshop (Rome, 11–14 September).
- FAO (2010). Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.
- Frankel O.H, Brown A.H.D., Burdon J.J. (1995). The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, UK.
- Gao X.H., Liu J.N., Ling Q. (2008). Tissue culture propagation of hybrid hazelnut (*Corylus heterophylla* X *C. avellana*). *Acta Horticulturae*, 771:207–211.
- George E. (2008). Plant tissue culture procedure. In: George, Hall, De Klerk (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, pp. 1-28.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.
- Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F., Huet C., Urra, C. (1993). Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters*, 14:303-308.

- Gonzalez-Arno M.T., Juarez J., Ortega C., Navarro L., Duran-Vila N. (2003). Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 24:85-94.
- Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. (2006). Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique; review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27:155-168.
- Gonzalez-Arno M.T., Panta A., Roca W.M., Escobar R.H., Engelmann F. (2008). Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92:1-13.
- González-Benito M.E., Clavero-Ramirez I., López-Aranda J.M. (2004). The use of cryopreservation for germplasm conservation on vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(3):341-351.
- Gopal J., Chauhan N.S. (2010). Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. *Potato Research*, 53:141-149.
- Gurcan K., Mehlenbacher S.A., Erdongan V. (2010). Genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from Black Sea countries assessed using SSR markers. *Plant Breeding*, 129(4):222-234.
- Harding K. (2004). Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters*, 25:3-22.
- Hartmann H.T., Kester D.E. (1990). Propagazione della piante. Edagricole (eds) Bologna.
- Henshaw G.G. (1975). Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. In: Frankel, Hawkes (eds) *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press, UK, pp. 349-358.
- Hodgson R.A.J., Raison J.K (1991). Superoxide production by thylakoids during chilling and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. *Planta*, 183:222-228.
- Hong T.D., Linington S., Ellis R.H. (1998). Seed storage behaviour: a compedium. In: Hong, Linington, Ellis (eds) *Handbook for genebanks*. International Plant Genetic Resources Institute, Roma.
- Hooi T.H., James J., Julkiflee A., Poobathy R., Gnasekaran P., Subramaniam S. (2010). A Novel Approach for preliminary PVS2 vitrification optimisation parameters of *Dendrobium Sonia-28* Orchid with Evans blue staining. *Advances in Environmental Biology*, 4(2):284-290.
- Hughes M.A., Dunn M.A. (1996). The molecular physiology of plant acclimation to temperature. *Journal Experimental Botany*, 47:291-305.
- Hummer K.E. (2001). Hazelnut genetic resources at the Corvallis repository. *Acta Horticulturae*, 556:21-24.
- Iltis H.H. (1974). Freezing the genetic landscape – the preservation of diversity in cultivated plants as an urgent social responsibility of the plant geneticist and plant taxonomist. *Maize Genetics Cooperation Newsletters*, 48:199-200.
- Jackson P.W., Kennedy K. (2009). The Global Strategy for Plant Conservation: a challenge and opportunity for the international community. *Trends in Plant Science*, 14(11):578-580.

- Jarvis D.I., Hodgkin T. (2000). Farmer decision making and genetic diversity: linking multidisciplinary research to implementation on-farm. In: Brush (eds) *Genes in the field: on-farm conservation of crop diversity*. Lewis Publishers, pp. 261-278.
- Jarret R.L. (1989). *In vitro* maintenance of zoysiagrass (*Zoysia* spp.). *Plant Genetic Resources*, 88/89:21-22.
- Kameri-Mbote P., Cullet P. (1999). Agrobiodiversity and international law. *Journal of Environmental Law*, 11(2): 257-279.
- Kami D. (2012). Cryopreservation of Plant Genetic Resources. In: Katkov (eds). *Current frontiers in cryopreservation*. Intech, pp. 439-456.
- Kartha K.K (1985). Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha (eds) *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, pp. 115-134.
- Kaviani B. (2011). Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, 5:778-800.
- Koksal A.Y. (2000). Inventory of hazelnut research, germplasm and references. Reu technical series 56. FAO, Rome.
- Koo B., Pardey P., Wright B. (2004). *Saving seeds: the economics of conserving genetic resources at the CGIAR Centers*. Cabi Publishing.
- Kuranuki, Y., Yoshida S. (1996). Differential responses of embryogenic axes and cotyledons from tea seeds to desiccation and cryoexposure. *Breeding Science*, 46(2):149-154.
- Lambardi M., Fabbri A., Caccavale A. (2000). Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tips. *Plant Cell Reports*, 19:213-218.
- Lambardi M., De Carlo A. (2003). Application of tissue culture to the germoplasm conservation of temperate broad-leaf tree. In: Jain, Ishii (eds) *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Academic Publications, pp. 815-840.
- Lambardi M., De Carlo A. (2009). Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale. *Italus Hortus*, 16(1): 79-98.
- Langis R., Schabel B., Earle E.D., Steponkus P.L. (1989). Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *CryoLetters*, 10:421-4238.
- Leunufna S., Keller E.R.J. (2003). Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Discorea* spp.). *Plant Cell Reports*, 21(12):1159-1166.
- Maruyama E., Tanaka T., Hosoi Y., Ishii K., Morohoshi N. (2000). Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Plant Biotechnology*, 17(4):281-296.
- Matsumoto T., Sakai A., Takahashi C., Yamada K. (1995). Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters* 16:189-196.
- McKinney H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26:195-218.
- Mehlenbacher S.A. (1991a). Hazelnut. In: Moore, Ballington (eds) *Genetic resources in temperate fruit and nut crops*. *Acta Horticulturae*, 290.
- Mehlenbacher S.A. (1991b). Chilling requirements of hazelnut cultivars. *Scientia Horticulturae*, 47: 271-282.

- Messeguer J., Mele. E. (1987). *In vitro* propagation of adult material and seedlings of *Corylus avellana* L. Acta Horticulturae, 212:499-503.
- Molnar J.T. (2011). *Corylus*. In: Kole (eds) Wild crop relatives: genomic and breeding resources, forest trees. Springer-Verlag.
- Muraschige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant physiology, 15:473-497.
- Nabhan G.P. (1979). Cultivation and culture. Ecologist, 9:259-263.
- Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. International Review of Cytology, 132:1-30.
- Nas M.N., Read P.E. (2004). Improved rooting and acclimation of micropropagated hazelnut shoots. HortScience, 39:1688–1690.
- Niino T., Sakai A. (1992). Cryopreservation of alginate-coated *in vitro* grown shoot tips of apple, pear and mulberry. Plant Science, 87:119-206.
- Niino T., Tashiro K., Suzuki M., Ohuchi S., Magoshi J., Akihama T. (1997). Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. Scientia Horticulturae, 70:155-163.
- Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzaka T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science, 91(1):67-73.
- Normah M.N., Chin H.F., Hor Y.L (1986). Dessication and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell., Pertanica, 9:299-303.
- Normah M.N., Reed B.M., Yu X. (1994). Seed storage and cryoexposure behavior in hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Barcelona). CryoLetters, 15:315-322.
- Ogwu M.C., Osawaru M.E., Ahana C.M. (2014). Challenges in conserving and utilizing plant genetic resources (PGR). International Journal of Genetics and Molecular Biology, 6(2):16-22.
- Orlikowska T. (1992). Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31:1-7.
- Panis B., Swennen R., Engelman F. (2001). Cryopreservation of plant germplasm. Acta Horticulturae, 650:79-86.
- Panis B., Lambardi M. (2005). Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: Ruane, Sonnino (eds) The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. FAO, Rome.
- Panis B., Piette B., Swennen R. (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Science, 168(1):45-55.
- Pastori G., Foyer C.H., Mullineaux P. (2000). Low temperature-induced change in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. Journal Experimental Botany, 51:107-113.
- Paunescu A., Holobiuc I., 2005. Preliminary researches concerning micropropagation of some endemic plants from Romanian flora. Acta Horticulturae, 32:103-108.
- Paunescu A. (2009). Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. Romanian Biotechnological Letters, 14(1):4095-4103.

- Pennycooke J.C., Towill L.E. (2000). Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19:733-737.
- Pennycooke J.C., Towill L.E. (2001). Medium alternations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 22(4):381-389.
- Pérez C., Fernández B., Rodríguez R. (1983). *In vitro* plantlet regeneration through asexual embryogenesis in cotyledonary segments of *Corylus avellana* L. *Plant Cell Report*, 2:226-228.
- Pérez C., Rodríguez R., Tames R.S. (1985). *In vitro* filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segment. *Plant Cell Report*, 4:137-139.
- Pérez-Tornero O., Ortín-Párraga F., Egea J., Burgos L. (1999). Medium-term storage of apricot shoot tips *in vitro* by Minimal Growth Method. *HortScience* 34(7):1277-1278.
- Piotto B., Di Noi A. (2001). Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. In: Beti Piotta, Doi Noi (eds). *Manuale AMPA, Settore Aree Naturali e Protette, Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali*.
- Pistorius R. (1997). Scientists, plants and politics: a history of the plant genetic resources movement. In: Friis-Hansen, Sthapit (eds) *Participatory approaches to the conservation and use of plant genetic resources*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Plessis P., Leddet, C., Dereuddre, J. (1991). Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate-coated shoot tips of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 313(3): 373-380.
- Prescott-Allen R., Prescott-Allen C. (1982). The case for *in situ* conservation of crop genetic resources. *Natural Resources*, 23:5-20.
- Probert R.J., Adams J., Coneybeer J., Crawford A.D., Hay, F.R. (2007). Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany*, 55:326-335.
- Radha R.K., William S., Decruse S., Krishnana P.N. (2012). Plant Cryopreservation, Current frontiers in cryopreservation. Katkov (eds) *Current frontiers in cryopreservation*. Intech, pp. 431-438.
- Radojevic, L.J., Vujicic R., Neskovic M. (1975). Embryogenesis in tissue culture of *Corylus avellana* L. *Z Pflanzenphysiol Bd*, 77:33-41.
- Rajasekharan P.E. (2006). Seed cryoservation: problems and prospects. Paper presented at the ICAR short course on *in vitro* conservation and cryopreservation-new options to conserve horticultural genetic resources, (Banglore, 21-30 September).
- Ramanathan Rao V., Riley R. (1994). The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources*, 97:3-20.
- Ramsay K.A., Smuts M., Els H.C. (2000). Adding value to South African landrace breeds conservation through utilization. *Animal Genetic Resources*, 27:9-15.
- Rao N.K. (2004). Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3(2):136-145.
- Reed B.M. (1992). Cold storage of strawberries *in vitro*: a comparison of three storage system. *Fruit Varieties Journal*, 46:98-102.

- Reed B.M. (1993). Improved survival of *in vitro* stored *Rubus* germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(6):890-895.
- Reed B.M., Normah M.N. (1994). Stratification is necessary for successful cryopreservation of axes from stored hazelnut seed. *CryoLetters*, 15:377-384.
- Reed B.M., Chang Y, 1997. Medium and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops. In: Razdan, Cocking (eds) *Conservation of plant genetic resources in vitro*. Science Publishers, pp. 67-105.
- Reed B.M. (2001). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters*, 22:97-104.
- Reed B.M., Hummer K.M. (2001). Long-term storage of hazelnut embryonic axes in liquid nitrogen. *Acta Horticulturae*, 556:177-180.
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. (2004). Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. In: Reed, Engelmann, Dulloo, Engels (eds) *International Plant Genetic Resources*, Rome.
- Reed B.M., Uchendu E. (2008). Controlled rate cooling. In: Reed (eds) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, pp. 77-92.
- Reed B.M. (2009). Choosing and applying cryopreservation protocols to new species or tissue. Paper presented at the first International symposium on cryopreservation in horticultural species (Leuven, 5-9 April).
- Rieger R., Michaelis A., Green M.M. (1976). *Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular*. Springer-Verlag.
- Roncasaglia R., Benelli C., De Carlo A., Dradi G., Lambardi M., Ozudogru E.A. (2009). Fattori che influiscono sulla conservazione in crescita rallentata di specie da frutto. *Italus Hortus*, 16:234-238.
- Rosendal G.K. (1995). Genebanks - conservation of biodiversity. In: Stenseth, Paulsen, Karlsen (eds) *Africa-nature, society and development assistance*, pp. 375-392.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-33.
- Sakai A., Engelmann F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 28:151-172.
- Sakai A., Hirai D., Niino T. (2008). Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed (eds) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, pp. 33-58.
- Sarkar D., Naik P.S. (1998). Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica*, 102:275-280.
- Santelices R., Palfner G. (2010). Controlled rhizogenesis and mycorrhization of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cutting with black truffle (*tuber melanosporum* vitt.). *Chilean Journal Agricultural Research*, 70(2):204-2012.
- Sarasan V.A., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., Mc Michen M., Prendergast G., Rowntree J.K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 42:206-214.

- Schäfer-Menuhr A., Schumacher H.M., Mix-Wagner G. (1994). Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff. *Landbauforschung Völkenrode*, 44(4):301-313 (versione inglese on line).
- Scowcroft W.R. (1984). Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, Rome.
- Sgueglia A., Condello E., Frattarelli A., Arias Padrò M.D., Nota P., Caboni E. (2012). Crioconservazione di cultivar italiane di nocciolo. *Acta Italus Hortus*, 6:290-292.
- Shikhamany S.D. (2006). Horticultural genetic resources: role of *ex situ* conservation. Paper presented at the ICAR short course on *in vitro* conservation and cryopreservation-new options to conserve horticultural genetic resources, (Banglore, 21-30 September).
- Shimonishi M., Ishikawa M., Suzuki S., Oosawa K. (1991). Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *Japanese Journal of Breeding*, 41(2):347-351.
- Spanson G.A., Wroldtad R.E., Heatherbell D.A. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:1572-1579.
- Stanwood P.C. (1985). Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Kartha (eds). *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, pp. 115-134.
- Stanwood P.C. (1987). Survival of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed at the temperature of liquid nitrogen (-196°C). *Crop Science*, 27:327-331.
- Sugawara Y., Sakai A. (1974). Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiology*, 74(5):722-724.
- Tahtamouni R.W., Shibli R.A. (1999). Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (*Pyrus syriaca*). *Advances in Horticultural Science*, 13:156-160.
- Thompson M.M., Lagerstedt H.B., Mehlenbacher S.A. (1996). Hazelnuts. In: Janick, Moore (eds) *Fruit breeding, Nuts*. Hardcover, pp. 125-184.
- Thomson G., Deering T. (2011). Effect of cytokinin type and concentration on *in vitro* shoot proliferation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Crop and Horticultural Science*, 39(3):209-213.
- Towill L.E., Waters C. (2000). Cryopreservation of pollen. In: Engelmann, Takagi (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current research progress and application*. International Plant Genomic Resources Institute, Rome pp. 115-129.
- Uemura M., Sakay A. (1980). Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. *Plant and Cell Physiology*, 21(1):85-94.
- Uemura M., Minami A., Kawamura Y. (2009). Effect of low temperature and cryoprotectants on plant plasma membranes. Paper presented at the first International symposium on cryopreservation in horticultural species (Leuven, 5-9 April).
- Uragami A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T. (1989). Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports*, 8(5):418-421.
- Uragami A., Sakai A., Nagai M. (1990). Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Report*, 9:328-331.

- Van de Wouw M., Kik C., Van Hintum T., Van Treuren R., Visser B. (2009). Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 8(1):1-15.
- Vodouhe R., Avohou T.H., Grum M., Bellon M., Obel-Lawson, E. (2008). Connaissances endogènes et gestion durable de l'agrobiodiversité à la ferme: expériences des paysans sahéliens. Actes d'un atelier regional (Bamako, 18-20 Février) (versione inglese on line).
- Wilkes H.G., Wilkes S. (1972). The green revolution. *Environment*, 14(8):32-39.
- Wilson S.B., Rajapakse N.C., Young, R.E. (2000). Media composition and light affect storability and post storage recovery of micropropagated hosta plantlets. *HortScience*, 35(6):1159-1162.
- Withers L.A., King P.J. (1980). A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *CryoLetters*, 1:213-220.
- Withers L.A. (1987). *In vitro* methods for germplasm collecting in the field. *Plant Genetic Resources*, 69:2-6.
- Withers L.A. (1995). Collecting *in vitro* for genetic resources conservation. In: Guarino, Rao, Reid (eds) *Collecting plant germplasm diversity, technical guideline*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Withers L.A., Engelmann F. (1997). *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: Alman (eds) *Biotechnology in agriculture*. Marcel Dekker, pp. 57-88.
- Yaasen M., Ahmed T., Abbassi N.A., Hafiz I.A. (2009). *In vitro* shoot proliferation competence of apple rootstocks M 9 and M 26 on different carbon sources. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4):1781-1795.
- Yoo K., Wen J. (2002). Phylogeny and biogeography of *Carpinus* and subfamily Coryloideae (*Betulaceae*). *International Journal Plant Sciences*, 163:641–650.
- Yu X., Reed B.M. (1995). A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus* species). *HortScience*, 30:120-123.
- Zapartan M., Deliu C. (1994). Conservation of endemic rare and endangered species in Romanian flora using *in vitro* methods. Paper presented at eighth National symposium industrial microbiology and biotechnology, (Bucharest).
- Zhao M.A., Dhital S.P., Fang Y.L. Khu D.M., Song Y.S., Park E.J., Kang C.W., Lim H.T. (2005). Application of slow-freezing cryopreservation method for the conservation of diverse potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *Plant Biotechnology Journal*, 7(3):183-186.
- Zhao Y., Wu Y., Chang Y., Reed B.M. (2008). Cryopreservation of Fruit and ornamental trees. In: Reed (eds) *Plant Cryopreservation: a practical guide*. Springer, pp. 387-420.

Siti internet consultati:

European cooperative programme for plant genetic resources:

www.ecpgr.cgiar.org

FAO:

www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/seeds-pgr/sow/en

www.faostat.fao.org

Intergovernmental Panel on Climate Change:

www.ipcc.ch

Pubblicazioni e presentazioni

- Aria Padrò M.D., Frattarelli A., Sgueglia A., Condello E., Damiano C., Caboni E. (2012) Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108:167-172.
- Gentile A., Sgueglia A., Frattarelli A., Catenaro E., Caboni E. Strategie per il miglioramento della radicazione *in vitro* di noce, cv Sorrento, e di nocciolo, cv Tonda Gentile Romana". *Colture in vitro: Note di laboratorio*. Edito dalla SOI (accettato ed in Pubblicazione).
- Sgueglia A., Condello E., Frattarelli A., Arias Padrò M.D., Nota P., Caboni E. (2012). Crioconservazione di cultivar italiane di nocciolo. *Acta Italus Hortus*, 6:290-292.
- Sgueglia A., Monticelli S., Gentile A., Germanà M.A., Forni C., Frattarelli A., Caboni E. (2014). La conservazione *ex situ* dei fruttiferi mediante coltura *in vitro*: applicazione della crescita rallentata e della crioconservazione al nocciolo e al ciliegio". X Convegno Nazionale sulla Biodiversità (Roma 3-5 settembre). Poster.

Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification

Maria Dolores Arias Padrò · Andrea Frattarelli ·
Alessandra Sgueglia · Emiliano Condello ·
Carmine Damiano · Emilia Caboni

Received: 15 April 2011 / Accepted: 5 August 2011 / Published online: 18 August 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Shoot apices of in vitro-grown plantlets of white mulberry, *Morus alba* L. cv Florio, were cryopreserved using either encapsulation-dehydration or vitrification. For encapsulation-dehydration, alginate beads containing apices were dehydrated for 1, 3, 5 or 7 days in a liquid medium containing various sucrose concentrations (0.5, 0.75, 1.0 or 1.25 M). Bead desiccation was performed using silica gel for either 0, 4, 6, 8, 9 or 14 h. For vitrification, apices were directly immersed for either 5, 15, 30 or 60 min in a vitrification solution (PVS2). Following encapsulation-dehydration, treatment of alginate beads with 0.75 M sucrose was more effective in promoting re-growth of explants after immersion in liquid nitrogen than in the presence of 0.5 M sucrose for either 1 or 3 days. Re-growth of explants was also observed following vitrification and this reached 47% with increasing duration of the PVS2 treatment from 5 to 30 min. Overall, the highest frequency of explant re-growth was obtained when explants were subjected to encapsulation-dehydration in the presence of 0.75 M along with a 3 day sucrose dehydration pre-treatment and followed by desiccation for 9 h in silica gel.

Keywords Alginate beads · Germplasm conservation · PVS2 · Re-growth · Silica gel · Sucrose

Abbreviations

BA 6-Benzyladenine
DMSO Dimethylsulphoxide

LN Liquid nitrogen
LS Loading solution
MS Murashige and Skoog basal medium
PVS2 Plant vitrification solution number 2
US Unloading solution

Introduction

Plant biodiversity is essential for classical and modern plant breeding programmes and provides a source of compounds to the pharmaceutical, food and crop protection industries. Preservation in field collections is risky, as valuable germplasm can be lost because of pests, diseases, adverse weather conditions and the maintenance of collections is labour-intensive and costly (Panis and Lambardi 2005).

Advances in biotechnology have generated new opportunities for genetic resources conservation and utilization and maintenance of plant materials at cryogenic temperatures (cryopreservation) is now a suitable option for long-term storage (Kameswara Rao 2004; Kong and Von Aderka 2010; Reed 2008; Reed et al. 2000).

Cryopreservation protocols prevent formation of intracellular ice crystals, which can cause cell death and destruction of cell organelles during the freezing process, by inducing vitrification, an amorphous glassy state of water in cells, by applying dehydration and desiccation treatments and/or cryoprotectant combinations (Benson 2008).

In the encapsulation-dehydration procedure, originally described for cryopreservation of *Solanum* shoot tips (Fabre and Dereuddre 1990), shoot apices are encapsulated in alginate beads, dehydrated in liquid medium enriched with sugar for several hours or days and partially desiccated

M. D. A. Padrò · A. Frattarelli · A. Sgueglia · E. Condello ·
C. Damiano · E. Caboni (✉)
Agricultural Research Council (CRA), Fruit Tree Research
Centre, Via di Fioranello, 52, 00134 Rome, Italy
e-mail: emilia.caboni@entecra.it

prior to immersion in LN. This protocol has been developed for shoot apices of various species including apple, pear, grape and cassava (Engelmann et al. 2008 and references within reported).

Vitrification methods are based on the use of cryoprotective solutions (Sakai et al. 1990) which are viscous and easily supercooled leading to vitrification and avoiding intracellular ice crystal formation (Sakai et al. 2008). In the encapsulation-vitrification, a combination of the above methods, explants are encapsulated in alginate beads and treated with vitrification solutions before immersion in LN (Matsumoto et al. 1995; Sakai and Matsumoto 1996).

White mulberry (*Morus alba* L.) is native of East Asia and is extensively naturalized in eastern North America; its leaves are the sole food source of the silkworm, but mulberry is also cultivated for ornamental, commercial and pharmaceutical uses (Lee et al. 2011). The fruits of some varieties have a pleasant flavour and Stewart et al. (2003) reported that the mature fruit contains significant amounts of resveratrol, a strong antioxidant and putative anti-cancer agent. Mulberry is also a rustic plant with a deep root apparatus. For this reason it can grow at various altitudes, in lime-rich, dry and saline soils, in hot or cold areas and consequently can be planted for the reforestation of marginal zones (Tang et al. 2010). Interest in mulberry cultivation for the production of biomass is also increasing (Lu et al. 2009).

Morus alba was probably introduced in Italy between the ninth and twelfth century and its diffusion was related to the development of the sericulture. In Italy are either present plants derived from spontaneous hybridisation or selected varieties, reproduced by vegetative propagation (Cappelozza 2002).

The conservation of mulberry (*Morus* spp.) biodiversity is a priority and large ex situ in field germplasm collections are present in China, Japan and India (Atmakuri et al. 2009; Sohn 2003). Cryopreservation of *Morus* spp. have been developed using winter-dormant buds (Atmakuri et al. 2009; Niino et al. 1992b) and in vitro-grown shoot apices or buds in *Morus bombycis* (Niino 1995; Niino et al. 1992a; Niino and Sakai 1992; Yakuwa and Oka 1988).

The main aim of this study, was to establish the most suitable protocol for cryopreservation of shoot apices of *Morus alba* L. optimizing various steps involved in the process.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

In vitro-grown shoots of mulberry (*Morus alba* L.), cultivar Florio (Fig. 1a), originated from axillary buds excised from

one-year-old plant, were cultured on MS (Murashige and Skoog 1962) basal medium supplemented with 4.4 μM benzyladenine (BA), 87.6 mM sucrose (Eridania, Italy) and 5.5 g L^{-1} agar (B & V—Italy) and pH-adjusted to 5.7. Cultures were grown at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, under a 8 h photoperiod with a light intensity of $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (standard light conditions) and were sub-cultured every 21 days. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, except where differently specified.

Shoot apices (2–3 mm long), excised from the micro-propagated plantlets (Fig. 1b) and cold-hardened for 3 days at 5°C in darkness, were used for cryopreservation experiments. After recovery, explants from the optimal cryopreservation treatment were multiplied on the standard culture medium and rooting was performed on an MS basal medium supplied with 4.9 μM indole-3-butyric acid.

Encapsulation-dehydration

Apices were encapsulated in 3% alginate beads (Dereuddre et al. 1990) and treated in liquid MS medium with various sucrose concentrations (0.5 or 0.75 M) for 1, 3 or 5 days or 1.0 M for 1 day. Desiccation was performed by placing the beads in air-tight vessels of 50 ml (5 beads for each) with 8 g silica gel for 0, 4, 6, 8, 9, 14 or 20 h. Afterwards, beads were placed in 2 mL sterile polypropylene cryo-tubes (10 beads/tube) and immersed in LN for 24 h. In order to follow the desiccation process, beads pre-cultured under optimal conditions (0.75 M sucrose for 3 days) were used to measure residual water content.

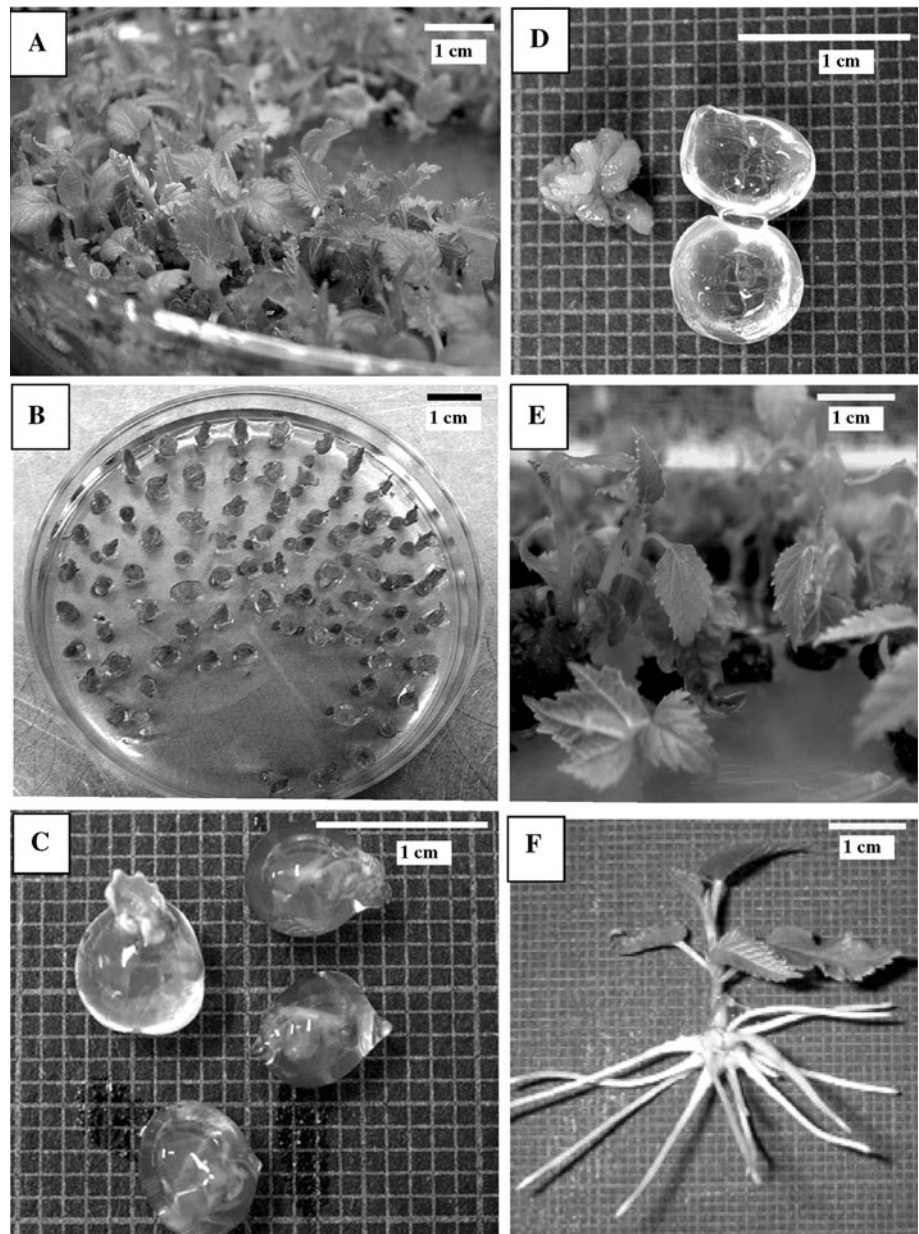
Re-warming was performed by placing the cryotubes in the current air of a laminar flow cabinet. For each treatment, 10 explants were directly transfer to re-growth conditions for the control. Recovery was performed by transferring beads in Petri dishes containing an MS medium supplied with 1.0 mg L^{-1} BA. Explants were placed in darkness for 1 week then under low light conditions ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for other 15 days and finally cultured in standard light condition.

Vitrification

Shoot apices were transferred to 2 mL sterile polypropylene cryotubes and suspended for 20 min in 2 ml of loading solution (LS): 2 M glycerol + 0.4 M sucrose in MS liquid medium at 25°C .

In the standard vitrification protocol the LS was removed and replaced with 2 ml of full strength vitrification solution, PVS2, consisting in 30% glycerol, 15% ethylene glycol, 15% dimethylsulphoxide (DMSO) and 0.4 M sucrose in liquid MS medium (Sakai et al. 1990). According to Matsumoto and Sakai (2000), in the three-step vitrification, LS was replaced with 2 ml of half-strength PVS2 solution for

Fig. 1 Mulberry (*Morus alba* L.), cultivar Florio, cryopreservation process by encapsulation-dehydration. **a** In vitro grown shoots of mulberry. **b** Preparation of apices for cryopreservation **c** Re-growth starting 2 weeks after immersion in LN with encapsulation dehydration, 0.75 M sucrose for 3 days and 9 h silica gel. **d** Apices re-growth 4 weeks after cryopreservation. **e** In vitro multiplication and rooting (f) of recovered shoots



30 min. and finally with the full strength PVS2. When 5% DMSO pretreatment (Yamada et al. 1991) was applied shoot tips were immersed for 2 days on MS basal medium containing 5% DMSO, 87.6 mM sucrose and 0.3 g L⁻¹ gelrite (Scott Laboratories Inc., Carson, CA, USA). Shoot apices were then transferred to the LS for 20 min and to the full strength PVS2.

For encapsulation-vitrification (Matsumoto et al. 1995), shoot apices were encapsulated in alginate beads, immersed for 20 min in LS and finally plunged in PVS2.

All the treatments with full strength PVS2 were performed in 2 ml cryo-tubes at 0°C for 5, 15, 30 or 60 min. The PVS2 solution was renewed 5 min before the time

was over. Then cryotubes were directly plunged in LN and kept there for 24 h. For each treatment, 10 explants were directly transfer to re-growth conditions (control). Unloading was performed by immersing the cryotubes in a water bath at 40°C for 80 s. Then PVS2 was removed and apices were washed with the unloading solution (US) consisting in basal culture medium supplemented with 1.2 M sucrose for 15 min. For regrowing apices were placed on growth regulators free MS solid medium containing 0.4 M sucrose in darkness. After 2 days the apices were transferred to the standard culture medium for 1 week in darkness and then cultured in standard light condition.

Table 1 Encapsulation-dehydration in *Morus alba* L.

DES (h)	BM (% FW)	Length and concentrations of sucrose treatment						
		1 day			3 days		5 days	
		0.5 M	0.75 M	1 M	0.5 M	0.75 M	0.5 M	0.75 M
<i>LN</i>								
0		0	0	0	0	0	0	0
4		0	0	0	0	0	0	0
6		12 gh	30 e	0	10 h	30 e	10 h	0
8		25 ef	43 c	25 ef	33 de	60 b	30 e	20 f
9		33 de	55 b	30 e	58 b	67 a	30 e	30 e
14		35 d	43 c	23 ef	35 d	45 c	25 ef	20 f
20		10 h	18 fg	17 g	10 h	13 g	12 gh	10 h
<i>Control</i>								
0	77	100 a	100 a	97 a	97 a	93 a	77 b	73 b
4	33	100 a	97 a	93 a	97 a	93 a	73 b	77 b
6	21	100 a	97 a	97 a	93 a	93 a	70 b	67 b
8	20	97 a	93 a	97 a	97 a	93 a	67 b	67 bc
9	19	93 a	90 a	77 b	83 ab	80 ab	43 c	40 cd
14	18	90 a	87 a	77 b	80 ab	73 bc	47 c	43 c
20	17	47 c	43 c	37 cd	20 d	13 d	3 e	7 e

Effect of duration (days) and concentration (M) of treatment with sucrose and desiccation (DES) with silica on re-growth (%) of apices after cryopreservation (LN) and without immersion in LN (Control)

MC: bead moisture

Data marked by the same letter are not significantly different according to Duncan's test after arcsin transformation ($P < 0.05$); LN: n = 60; control: n = 30

Assessment of re-growth and statistical analysis

Re-growth was evaluated 6 weeks after re-warming. Apices which resumed normal development (production of new leaves and/or expansion of a new shootlet) were considered re-growing. Results of cryopreservation are means of 20 apices for three replications for each experimental condition. Ten apices for three replications were used for controls. A completely randomized design was used for the experiments. Analysis of variance (one way ANOVA) was carried out (Statgraphics Centurion software) and Duncan's multiple range test was applied to determine the significance of differences among means ($P < 0.05$).

Results and discussion

Encapsulation-dehydration

Osmoprotection treatment with 0.75 M sucrose was more effective in allowing re-growth of explants after LN immersion than 0.5 M sucrose either for 1 or 3 days; longer treatments (5 days) did not increase recovery or were even detrimental. Recovery in the control explants

was not significantly affected till 3 days-treatment (Table 1).

Our findings showed that the application of a correct exposure time and concentration of sucrose is critical to insure re-growth in *Morus alba* as previously shown in cryopreservation of shoot apices of temperate and tropical species and embryogenic tissue of *Dioscorea bulbifera* and *Pinus nigra* (Engelmann et al. 2008 and references within reported; Ming-Hua and Sen-Rong 2010; Salaj et al. 2011).

Optimal desiccation time is related to the species and to the type of explant; for instance 32% of final moisture content was suitable for protocorm-like bodies of *Phalaenopsis bellina* (Khoddamzadeh et al. 2011) while 18–28% was optimal for *Sabal* embryos (Wen and Wang, 2010). However, water content of about 20% is reported to induce best recovery in several species including *Picea* (Hazubska-Przybyl et al. 2010), *Pyrus* (Condello et al. 2009) and *Morus bombycis* (Niino et al. 1992b). In *Morus alba* no re-growth after cryopreservation was obtained applying a physical desiccation treatment in silica gel for 4 h which reduced bead moisture to 33%. Increasing re-growth frequencies were observed with silica treatments that lowered bead moisture till 19% (9 h), while desiccation treatments longer than 14 h significantly decreased explant recovery (Table 1).

Table 2 Vitrification (Vitr.), three-step vitrification (TS Vitr.), pre-treatment with 5% DMSO and encapsulation-vitrification (E Vitr.) in *Morus alba* L.

PVS2 (min)	LN				Control			
	Vitr.	TS Vitr.	5% DMSO	E Vit.	Vitr.	TS Vitr.	5% DMSO	E Vit.
0	0	0	0	0	88 a	87 a	85 a	87 a
5	10 e	23 d	17 de	17 de	88 a	87 a	85 a	85 a
15	25 c	23 d	23 d	27 c	85 a	85 a	82 a	82 a
30	47 a	38 b	28 c	38 b	87 a	85 a	83 a	80 a
60	43 a	35 b	27 c	37 b	82 a	83 a	82 a	82 a

Effect of duration of the PVS2 treatment (min.) on re-growth (%) of shoot apices after cryopreservation (LN) and without immersion in LN (Control)

Data marked by the same letter within LN and control data are not significantly different according to Duncan's test after arcsin transformation ($P < 0.05$); LN: n = 60; control: n = 30

The overall highest re-growth after cryopreservation (67%) was obtained with an osmoprotection of shoot apices in 0.75 M sucrose for 3 days, followed by a physical desiccation in silica gel for 9 h (Table 1, Fig. 1c, d). Recovered shoots were easily multiplied and rooted (Fig. 1e, f).

Vitrification

Effects of the application of the vitrification protocols on cryopreservation of mulberry shoot apices are reported in table 1. Re-growth after immersion in LN increased with the increasing of the duration of PVS2 treatment from 5 to 30 min and explants treated for 30 min with the standard vitrification protocol showed the highest recovery (47%). A PVS2 treatment of 60 min did not further increase re-growth, regardless the method applied. Accurate control of dehydration is critical for prevention of tissue damage by chemical toxicity and strong osmotic stress during PVS2 treatment (Sakai et al. 2008). However, increasing PVS2 exposures did not significantly reduce re-growth in control mulberry shoot apices (Table 1) suggesting that this species is relatively resistant to PVS2, as previously shown for apple (Condello et al. 2011). Modified vitrification protocols did not produce significant improvements with respect to the standard vitrification protocol (Table 2).

Encapsulation-vitrification has been successfully applied to several species including apple (Sakai and Engelmann 2007 and references therein) and grapevine (Wang et al. 2004). However, we found that this protocol was less effective than standard vitrification for cryopreservation of shoot apices of *Morus alba*. This response was also previously found in apple cultivars and it was attributed to the physical protection of the alginate on the explants, reducing damage from manipulation during the cryopreservation process (Paul et al. 2000).

Overall, the most effective protocol was encapsulation-dehydration which gave higher re-growth frequencies than the vitrification-based ones.

Cryopreservation of *Morus alba* L. was previously reported using winter-dormant buds by Atmakuri et al. (2009). Dormant buds successful cryopreservation is related to the cold-hardy state of explants and consequently to the temperature fluctuation of the year (Towill and Ellis 2008). In addition, a slow freezing method is required. The protocol presented in this paper, based on the use of shoot apices excised from in vitro-grown shoots, can represent an improvement for cryopreservation of the species since it is not season-dependent for collection of explants and the direct immersion of explants in LN can facilitate its application.

In conclusion, we believe that this protocol can be an useful option for cryopreservation management of *Morus alba* germplasm.

Acknowledgments This work was supported by the National Project RGV—FAO financed by the Italian Agricultural Ministry.

References

- Atmakuri AR, Chaudhury R, Malik SK, Kumar S, Ramachandran R, Qadri SMH (2009) Mulberry biodiversity conservation through cryopreservation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45:639–649
- Benson E (2008) Cryopreservation theory. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, Berlin, pp 59–73
- Cappelozza L (2002) Mulberry germplasm resources in Italy. In: Sanchez MD (ed) *Mulberry for animal production*. Fao animal production and health paper, FAO, Roma, pp 97–101
- Condello E, Palombi MA, Tonelli MG, Damiano C, Caboni E (2009) Genetic stability of wild pear (*Pyrus pyraster*, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration. *Agr Food Sci* 18(2):136–143
- Condello E, Caboni E, Andrè E, Piette B, Druart P, Swennen R, Panis B (2011) Cryopreservation of in vitro axillary buds of apple following the droplet-vitrification method. *CryoLetters* 32(2): 175–185
- Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M (1990) *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Paris, Série III 310:317–323
- Engelmann F, Gonzalez-Arnao MT, Wu Y, Escobar R (2008) The development of encapsulation-dehydration. In: Reed BM (ed)

- Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, USA, pp 59–73
- Fabre J, Dereuddre J (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11:413–426
- Hazubaska-Przybyl T, Chmielarz P, Michalak M, Bojarczuk K (2010) Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce). *Plant Cell Tiss Org Cult* 102:35–44
- Kameswara Rao N (2004) Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *Afr J Biotechnol* 3:136–145
- Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Lynch P, Kadir MA, Kadzimin SB, Mahmood M (2011) Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration. doi:10.1007/s11240-011-9997-4
- Kong L, Von Aderkas P (2010) A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106:115–125
- Lee Y, Lee DE, Lee HS, Kim SK, Lee VS, Kim SH, Kim MW (2011) Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 105:9–19
- Lu L, Tang Y, Xie JS, Yuan YL (2009) The role of marginal agricultural land-based mulberry planting in biomass energy production. *Renew Energy* 34:1789–1794
- Matsumoto T, Sakai A (2000) Cryopreservation of in vitro-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification. *Acta Hort* 538:177–181
- Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K (1995) Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters* 16:189–196
- Ming-Hua Y, Sen-Rong H (2010) A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101:349–358
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Niino T (1995) Cryopreservation of germplasm of mulberry (*Morus* spp.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 32. Springer, Berlin, pp 102–113
- Niino T, Sakai A (1992) Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci* 87:199–206
- Niino T, Sakai A, Enomoto S, Magosi J, Kato S (1992a) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters* 13:303–312
- Niino T, Sakai A, Yakuwa H (1992b) Cryopreservation of dried shoot tips of mulberry winter buds and subsequent plant regeneration. *CryoLetters* 13:51–54
- Panis B, Lambardi M (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). International workshop: the role of biotechnology for the characterisation and conservation of crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources, pp 44–54
- Paul H, Daigny G, Sangwan-Norreel BS (2000) Cryopreservation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Rep* 19:768–774
- Reed BM (2008) Cryopreservation-practical consideration. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, USA, pp 3–13
- Reed BM, De Noma J, Chang Y (2000) Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank. JIRCAS/IPGRI joint international workshop: cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications. IPGRI, Rome, pp 246–250
- Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. *CryoLetters* 28:151–172
- Sakai A, Matsumoto T (1996) A novel cryogenic procedure for cryopreservation of in vitro grown meristems of temperate crops—encapsulation-vitrification. In: Proceedings of international workshop on In Vitro conservation of plant genetic resources, 4–6 July 1995 Kuala Lumpur, Malaysia
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9:30–33
- Sakai A, Hirai D, Niino T (2008) Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, USA, pp 421–426
- Salaj T, Matusikova I, Fraterova L, Pirsellova B, Salaj J (2011) Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106:55–61
- Sohn KW (2003) Conservation status of mulberry (*Morus* spp.) In: Conservation status of sericulture germplasm resources in the world genetic resources. World Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Stewart JR, Artime MC, O'Brian CA (2003) Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr* 133(7):2440S–2443S
- Tang Y, Xie JS, Geng S (2010) Marginal land-based biomass energy production in China. *J Integr Plant Biol* 52(1):112–121
- Towill LE, Ellis DD (2008) Cryopreservation of dormant buds. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, USA, pp 421–426
- Wang Q, Mawassi M, Sahar N, Li P, Violeta CT, Gafny R, Sela I, Tanne E, Perl A (2004) Cryopreservation of Grapevine (*Vitis* spp.) Embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77(3):267–275
- Wen B, Wang R (2010) Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of Sabal embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 102(2):237–243
- Yakuwa H, Oka S (1988) Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen. *Ann Bot* 62(1):79–82
- Yamada T, Sakai A, Matsumura T, Higuchi S (1991) Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Sci* 78:81–87

Strategie per il miglioramento della radicazione *in vitro* di noce, cv Sorrento, e nocciolo, cv Tonda Gentile Romana

Adele Gentile, Alessandra Sgueglia, Andrea Frattarelli, Elisa Catenaro, Emilia Caboni*

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per la Frutticoltura, CRA-FRU, Roma

*Autore corrispondente: emilia.caboni@entecra.it

Parole chiave: *Corylus avellana*, *Juglans regia*, vermiculite

PREMESSA

Poiché nello sviluppo e ottimizzazione della filiera corilicola e nocicola particolare importanza riveste l'utilizzo di materiale vivaistico che risponda a requisiti di identità varietale, assenza di virus e omogenità di materiale, l'interesse per l'utilizzo di materiale micropropagato sta crescendo anche in questi settori. Nel caso del nocciolo, pur essendo disponibili alcuni protocolli per la propagazione *in vitro* (Damiano *et al.*, 2005; Bacchetta *et al.*, 2008; Caboni *et al.*, 2009a), per le principali cultivar, tra cui la 'Tonda Gentile Romana', ulteriori studi sono necessari per ottimizzare le varie fasi del processo e, in particolare, la radicazione. Il noce, infatti, presenta ancora, sia nella radicazione tradizionale, sia nella micropropagazione, numerose difficoltà. Precedenti studi, tesi a migliorare la radicazione di questa specie recalcitrante, hanno messo in evidenza il ruolo determinante svolto da alcuni fattori quali la scelta e il tempo di applicazione dell'auxina (Reverberi *et al.*, 2001; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011 e referenze incluse).

MIGLIORAMENTO METODOLOGICO

Fase di coltura

La radicazione nelle specie recalcitranti come il noce e, in minor misura, il nocciolo, rappresenta la fase della micropropagazione più critica per ottenere espianti di qualità, trasferibili in ombraio nel minor tempo possibile. L'utilizzo della vermiculite nella fase di espressione della radicazione *in vitro* si è mostrato utile sia nel migliorare la risposta rizogena, sia la capacità di ambientamento in specie arboree quali sorbo e azzeruolo (Caboni *et al.*, 2009b e 2010) e alcune cultivar americane di noce (Vahdati *et al.*, 2004). L'effetto dell'utilizzo della vermiculite è stato pertanto valutato anche nel nocciolo, cv Tonda Gentile Romana, e nel noce, cv Sorrento, al fine di ottimizzarne la fase di radicazione. Inoltre, nella fase di radicazione del noce si è anche voluto valutare l'effetto della concentrazione dei sali, della presenza dell'agar nel terreno di radicazione e della lunghezza del periodo di crescita dei germogli in condizioni di buio.

Esperienza di laboratorio

Per il nocciolo, microtalee di 'Tonda Gentile Romana' sono state trasferite per 15 giorni su un terreno di allungamento solido DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), modificato secondo Damiano *et al.* (2005), con BA alla concentrazione di 0,5 mg/L. Le microtalee sono state, quindi, indotte a radicare immergendone la base in una soluzione contenente 80 mg/L di IBA per 24 h e trasferendole successivamente su un terreno di coltura senza ormoni e solidificato con 6 g/L di agar (B&V, Parma) in presenza o assenza di vermiculite (1:1, v/v). Il trattamento con agar più vermiculite ha permesso di ottenere la percentuale di radicazione e il numero di radici per microtalea più elevati (**Fig. 1A**) e ha favorito il successivo ambientamento (**Tab. 1**). I risultati ottenuti rappresentano un contributo all'ottimizzazione della micropropagazione della cv Tonda

Gentile Romana e alla diffusione di tale tecnica nella produzione di materiale vivaistico di nocciolo.

Le microtalee di noce (cv Sorrento), provenienti da una subcoltura di allungamento con 0,2 mg/L BA, sono state indotte a radicare su un terreno DKW (con macrosali a concentrazione intera o dimezzata), liquido o solidificato con 6 g/L di agar (Sigma Aldrich) e contenente 2 mg/L di IBA. Gli espianti, dopo 10 giorni, sono stati trasferiti su un terreno simile al precedente ma senza IBA (fase di espressione) e solidificato con agar. Le microtalee sono state mantenute per 1, 7 o 12 giorni al buio. L'utilizzo del terreno solido contenente macrosali ½ DKW nella fase di induzione e un periodo di buio di 7 giorni ha permesso di ottenere la più elevata percentuale di radicazione e una migliore qualità dell'apparato radicale (Caboni e Damiano, 2006) (**Tab. 2**). In un successivo esperimento, microtalee di noce indotte a radicare con il miglior trattamento di induzione sono state trasferite su terreno agarizzato (privo di IBA), con o senza vermiculite (Coarse, 0,5–2 mm grain; Packaging industries LTD) (1:1, v/v). L'utilizzo della vermiculite nella radicazione *in vitro*, durante la fase di espressione, ha permesso di incrementare del 20% la percentuale di espianti radicati (**Tab. 3**). Anche il numero di radici per espianto è risultata maggiore (**Fig. 1B**) e le microtalee così radicate hanno mostrato una migliore capacità di ambientamento.

	% rad.	n° rad.	% amb.
Agar	67±6	2,3	55±8
Agar Ver	80±2	5,4	97±3

Tab. 1. Nocciolo, cv Tonda Gentile Romana: radicazione di microtalee in agar, con o senza vermiculite (Ver), ed effetti sull'ambientamento.

	% rad.	n° rad.
DKW solido	46	1,1
DKW liquido	26	1,0
½ DKW solido	58	3,3
½ DKW liquido	28	2,1

Tab. 2. Noce, cv Sorrento: radicazione di microtalee con fase di induzione su un terreno liquido o solidificato con agar.

	% rad.	n° rad.	% amb.
Agar	58±5	2,7	45±7
Agar Ver	70±5	4,8	65±7

Tab. 3. Noce, cv Sorrento: radicazione di microtalee in agar, con o senza vermiculite (Ver).

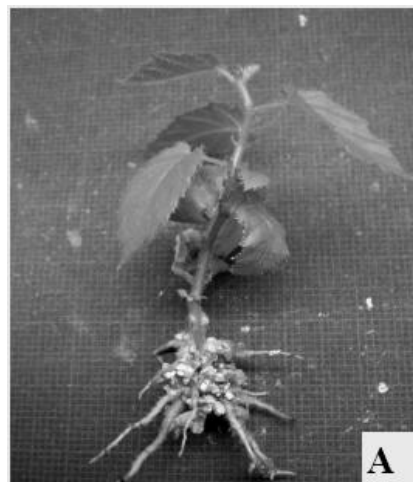


Fig. 1. Radicazione delle microtalee di Tonda Gentile Romana (**A**) e Sorrento (**B**) con agar e vermiculite.

Letteratura citata

BACCHETTA L., ARAMINI M., BERNARDINI C., RUGINI E., 2008. *In vitro propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources*. HortScience, 43: 562-566.

CABONI E., DAMIANO C., 2006. *In vitro propagation of walnut (Juglans regia L.): Critical factors for the induction of the rooting response*. Acta Horticulturae., 705 329-333.

CABONI E., FRATTARELLI A., GIORGIONI M., MENEGHINI M., DAMIANO C., 2009a. *Improving micropropagation of hazelnut Italian cultivars through temporary immersion system*. Acta Horticulturae, 845: 255-260.

CABONI E., MENEGHINI M., TONELLI M., 2010. *Improved micropropagation of azarole (Crataegus azarolus L.)*. Propagation of Ornamental Plants, 10: 9-13.

CABONI E., TONELLI M., DAMIANO C., 2009b. *In vitro rooting and acclimatisation of service tree (Sorbus domestica L.)*. Acta Horticulturae, 812: 563-567.

DAMIANO C., CATERNARO E., GIOVINAZZI J., FRATARELLI A., CABONI E., 2005. *Micropropagation of hazelnut (Corylus avellana L.)*. Acta Horticulturae, 686: 221-226.

DRIVER J.A., KUNIYUKI A.H., 1984. *In vitro propagation of Paradox walnut rootstock*. HortScience, 19: 507-709.

PAYGHAMZADEH K., KAZEMITABAR S.K., 2011. *In vitro propagation of walnut - A review*. African Journal of Biotechnology, 10: 290-311.

REVERBERI M., FALASCA G., ALTAMURA M.M., LAURI P., CABONI E., 2001. *Indoleacetic acid induces xylem formation instead of rooting in walnut (Juglans regia L.) microcuttings*. Plant Biosystems, 135: 71-77.

VAHDATI K., LESLIE C., ZAMANI Z., MCGRANAHAN G., 2004. *Rooting and acclimatization of in vitro grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars*. HortScience, 39: 324-327.

Crioconservazione di cultivar italiane di nocciolo

Alessandra Sgueglia, Emiliano Condello, Andrea Frattarelli, Maria D. Arias Padrò, Paolo Nota e Emilia Caboni*

CRA - FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Cryopreservation of Italian cultivar of hazelnut (*Corylus avellana* L.)

Abstract. A protocol was developed for *in vitro* cryopreservation of shoot tips and lateral buds, excised from *in vitro* grown plantlets, of hazelnut cultivars Tonda Gentile Romana and Montebello, using the encapsulation-dehydration technique. The highest regrowth was obtained treating alginate beads containing explants for 1 day with a medium enriched with 0.75M sucrose and with a desiccation for 8 hours in silica-gel to a bead moisture content of 20%. Lower contents of chlorophylls and higher of carotenoids and total phenols than the controls were also determined on regrowing explants after cryopreservation. The response could be probably related to the stress effects induced by the cryopreservation process.

Key words: carotenoids, chlorophyll, *Corylus avellana* L., encapsulation-dehydration, phenols, genetic resources, liquid nitrogen, markers of stress.

Introduzione

Le colture *in vitro* possono rappresentare un valido sistema per la propagazione di specie recalcitranti e per programmi di conservazione del germoplasma vegetale e della biodiversità. Inoltre, la possibilità di coltivare le piante in condizioni asettiche e in condizioni di temperatura e luce controllate artificialmente permette alle colture di essere svincolate dalle condizioni ambientali avverse e da patologie. Per questi motivi la conservazione del germoplasma vegetale anche *in vitro*, in condizioni controllate, è una valida alternativa e/o un complemento alle collezioni mantenute in pieno campo (Panis e Lambardi, 2005)

I metodi di conservazione basati sulle colture *in vitro* prevedono l'utilizzo di basse temperature (espunti in crescita rallentata) o la disidratazione degli espunti con metodi fisici e/o chimici e l'utilizzo di temperature ultra-basse come quelle dell'azoto liquido (-196 °C). In quest'ultimo caso si parla di con-

servazione a lungo termine e la tecnica impiegata è la crioconservazione. Con l'immersione in azoto liquido, infatti, i processi metabolici e la divisione delle cellule si arrestano garantendo una più lunga conservazione del materiale.

La crioconservazione è ormai ampiamente utilizzata per molte specie da frutto, in particolare la tecnica dell'incapsulazione-disidratazione, la prima ad essere stata messa a punto, prevede l'inclusione degli espunti in sfere di alginato. Con questa tecnica sono stati crioconservati con successo vari genotipi del genere *Malus* (Paul *et al.* 2000), *Pyrus* (Bell e Reed, 2002; Condello *et al.*, 2009), *Prunus* (Shatnawi *et al.*, 1999; De Carlo *et al.*, 2000), *Quercus* e vite (Zhao *et al.*, 2001). Riguardo al nocciolo, nei precedenti lavori è stato utilizzato l'asse embrionale come espunto di partenza (Reed *et al.*, 1994; González-Benito e Pérez, 1994).

Scopo di questa ricerca è stato quello di mettere a punto un protocollo sperimentale di crioconservazione per apici e gemme ascellari di due cultivar italiane di nocciolo basate sulla tecnica dell'incapsulazione-disidratazione. Inoltre, è stato analizzato il contenuto in clorofilla, carotenoidi e fenoli per effettuare una valutazione preliminare dello stress indotto dalla crioconservazione sugli espunti in relazione alla ricrescita dopo il trattamento.

Materiali e metodi

Apici e gemme ascellari di nocciolo cv Tonda Gentile Romana (TGR) e Montebello (M) sono stati prelevati da germogli coltivati *in vitro* su terreno (MED) costituito da sali DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), modificato secondo Damiano *et al.* (2005), addizionato con BA (2 mg/l), GA₃ (0,03 mg/l) e IBA (0,01 mg/l) come fitoregolatori. Le colture sono state mantenute a 24 °C con fotoperiodo di 16 ore e intensità luminosa di 40 µmol m⁻² s⁻¹.

Crioconservazione

Gli apici e le gemme ascellari sono stati crioconservati con la tecnica dell'incapsulazione-disidratazione. Gli espunti sono stati incapsulati in alginato di sodio al 3% e poi trattati con soluzioni ipertoniche di

* emilia.caboni@entecra.it

saccarosio (0,5; 0,75 o 1,0 M) per 1 o 3 giorni. La disidratazione è stata eseguita con silica gel per 4, 6, 8 o 10 ore. Successivamente parte degli espianti sono stati immersi in azoto liquido per 30 min e il resto direttamente trasferiti alla fase di ricrescita (controllo). Gli espianti immersi in azoto liquido sono stati riportati a temperatura ambiente e trasferiti sul terreno di crescita MED, al buio. Dopo 7 giorni tutte le sfere di alginato sono state aperte per favorire la ricrescita e poste a bassa intensità luminosa ($5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) per altri 7 giorni. Infine, gli espianti sono stati trasferiti alle condizioni standard di crescita.

Valutazione contenuto clorofilla, carotenoidi e fenoli

Le analisi delle clorofilla a e b sono state effettuate sugli espianti (apici e gemme) in ricrescita (45° giorno) trattati con 0,75 M saccarosio per 1 giorno e disidratati per 8 ore (20% acqua contenuta) con silica gel. Il campionamento è stato effettuato sia per i campioni trattati con azoto liquido sia per i controlli. Sono state utilizzati 150 mg di materiale per ogni campione e sono state effettuate 3 repliche sia per il materiale crioconservato che per il controllo.

Le clorofille sono state determinate secondo il metodo Inskeep e Bloom (1985), effettuando l'estrazione in acetone 80% e la misurazione spettrofotometrica a λ 647 o 664,5 nm, rispettivamente per la clorofilla a e b. I valori ottenuti sono riportati come mg/g peso fresco.

I carotenoidi sono stati determinati con il metodo di Jensen (1973), effettuando un'estrazione per 24 ore in acetone assoluto in presenza di CaCO_3 e una lettura spettrofotometrica a λ 450 nm. I valori ottenuti sono riportati come mg/g peso fresco.

I fenoli sono stati determinati spettrofotometricamente a λ 765 nm dopo un'estrazione con metanolo al 70%, seguendo il metodo di Singleton e Rossi (1965) e Waterman *et al.* (1994). I risultati sono

riportati come mg equivalenti di acido gallico/g di peso fresco (mg GAE/g P.F.).

Risultati e discussione

Dopo la crioconservazione, la più alta percentuale di ricrescita è stata ottenuta in ambedue le cultivar in espianti trattati con 0,75 M saccarosio per 1 giorno e disidratati per 8 ore (20% acqua residua contenuta) con silica gel. Trattamenti che hanno portato il contenuto di acqua negli espianti superiore al 23% o inferiori al 18% non hanno permesso la ricrescita. La ricrescita è stata maggiore nella cv Montebello (54%) rispetto alla cv Tonda Romana (37%) ed in ambedue le cultivar è stata superiore negli apici rispetto alle gemme. La ricrescita è stata osservata dopo 3 settimane (apici) e 5 settimane (gemme) nella cultivar Montebello, 4 settimane (apici) e 5 settimane (gemme) in Tonda Romana.

Dalle analisi delle clorofille, carotenoidi e fenoli effettuate 45 giorni dopo il trasferimento degli espianti sul terreno di ricrescita è stato messo in evidenza che il contenuto in clorofille era minore negli espianti crioconservati rispetto al controllo (tab. 1). Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Hitmi *et al.* (1997) che hanno messo in evidenza una riduzione di clorofilla in sospensioni cellulari di *C. cinerariaefolium* in seguito a crioconservazione. Una riduzione della capacità fotosintetica indotta dalla crioconservazione è stata anche messa in evidenza in semenzali ottenuti da embrioni zigotici di *Amaryllis belladonna* da Sershen Berjak e Pammenter (2010). Al contrario, il contenuto in carotenoidi è risultato superiore negli espianti provenienti dall'immersione in azoto liquido rispetto al controllo. Anche il contenuto di fenoli totali è risultato maggiore negli espianti crioconservati rispetto al controllo in ambedue i tipi di espianto. L'aumento del contenuto di fenoli e carote-

Tab. 1 - Ricrescita e marcatori di stress in apici (A) e gemme (G) di nocciolo crioconservato (+LN) e non (-LN). Medie seguite da lettere diverse non sono significativamente differenti secondo il test di Duncan ($P < 0,05$). Percentuali analizzate dopo la trasformazione arcsen.
 Tab. 1 - Regrowth and "stress markers" in apices (A) and buds (G) after cryopreservation (+LN) and in the control (-LN). Data marked by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ($P < 0,05$) (% data were analysed after arcsin transformation).

Parametro	Tonda Romana				Montebello			
	-LN		+LN		-LN		+LN	
	A	G	A	G	A	G	A	G
Ricrescita (%)	82	77	37	18	88	69	54	25
Clorofilla totale (mg/g p. f.)	1,73a	1,67a	1,35b	1,08c	1,77a	1,70a	1,48ab	1,19c
Clorofilla "a" (mg/g p. f.)	1,15a	1,12a	0,81b	0,72c	1,19a	1,09a	1,06a	0,80c
Clorofilla "b" (mg/g p. f.)	0,58a	0,55a	0,54a	0,36b	0,57a	0,53a	0,42b	0,39b
Carotenoidi (mg/g p. f.)	0,18c	0,22bc	0,26b	0,34°	0,12d	0,17c	0,25b	0,30a
Fenoli (mg GAE/g p. f.)	1,54a	1,46a	0,66c	0,24e	1,44a	1,41a	0,87b	0,41d

noidi può essere attribuibile al loro coinvolgimento nei meccanismi di protezione dagli stress ossidativi indotti dalla crioconservazione (Johnston *et al.*, 2007).

Riassunto

In questo lavoro apici vegetativi e gemme di due cultivar italiane di nocciolo sono stati crioconservati con la tecnica della incapsulazione-disidratazione. Gli espianti sono stati inclusi in sfere di alginato di sodio, disidratati per 1 o 3 giorni in terreno contenente varie concentrazioni (0,5, 0, 75 o 1,0 M) di saccarosio e poi trasferiti su silica gel per 4, 6, 8 o 10 ore. Il protocollo più efficace è stato quello che prevedeva una pre-coltura degli espianti in un terreno contenente 0,75 M di saccarosio per 1 giorno e un successivo trattamento su silica-gel per 8 ore. Negli espianti in ricrescita provenienti dalla crioconservazione sono stati messi in evidenza contenuti di clorofilla inferiori e di carotenoidi e fenoli totali superiori rispetto al controllo, probabilmente attribuibili alla risposta degli espianti, allo stress indotto dall'immersione in azoto liquido.

Parole chiave: azoto liquido, carotenoidi, clorofilla, *Corylus avellana* L., fenoli, incapsulazione-disidratazione, marcatori dello stress, risorse genetiche

Bibliografia

- BELL R.L., REED B.M., 2002. *In vitro Tissue Culture of Pear: Advances in Techniques for Micropropagation and Germplasm Preservation*. International Pear Congress 2000. Acta Hort. 596: 412-418.
- CONDELLO E., PALOMBI M.A., TONELLI M.G., DAMIANO C., CABONI E., 2009. *Genetic stability of wild pera (Pyrus pyraster, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration*. Agric. and Food Sci. 18 (2): 136-143.
- DAMIANO C., CATENARO E., GIOVINAZZI J., FRATTARELLI A., CABONI E., 2005. *Micropropagation of hazelnut (Corylus avellana L.)*. Acta Hort. 686: 221-226.
- DE CARLO A., BENELLI C., LAMBARDI M., 2000. *Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (Prunus domestica L.) cryopreservation*. CryoLett. 21: 215-222.
- DEVI S., KISHOR K., 1999. *Genetic manipulation of antioxidative defense system and transgenic plants*. In: Plant Tissue Culture and Biotechnology: Emerging Trends. P.B. Kavi Kishor ed. pp 52-55.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., PÉREZ C., 1994. *Cryopreservation of embryonic axes of two cultivars of hazelnut (Corylus avellana L.)*. CryoLett. 15 (1): 41-46.
- HITMI A., SALLANON H., BARTHOMEUF C., 1997. *Cryopreservation of Chrysanthemum cinerariaefolium Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability*. Plant Cell Rep. 17(1) 60-64.
- INSKEEP W.P., BLOOM P.R., 1985. *Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% acetone*. Plant Physiol. 77: 483-485.
- JENSEN A., 1973. *Handbook of physiological methods: physiological and biochemical methods*. In: Helle-bust, J. A. Craigie J. S. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 59-71.
- JOHNSTON J.W., HARDING K., BENSON E.E., 2007. *Antioxidant status and genotypic tolerance of Ribes in vitro cultures to cryopreservation*. Plant Sci. 172:524-534.
- SERSHEN BERJAK P., PAMMENTER N.W., 2010. *Effects of cryopreservation of recalcitrant Amaryllis belladonna zygotic embryos on vigor of recovered seedlings: a case of stress 'hangover'?*. Physiol. Plant. 139: 205-219.
- PANIS B., LAMBARDI M., 2005. *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)*. International Workshop: The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources" 44-54.
- PAUL H., DAIGNY G., SANGWAN-NORREEL B.S., 2000. *Cryopreservation of apple (Malus x domestica Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification*. Plant Cell Rep. 19: 768-774.
- REED B.M., NORMAN M.N., YU X.L., 1994. *Stratification is necessary for successful cryopreservation of axes from stored hazelnut seed*. CryoLett. 15 (6): 377-384.
- SHATNAWI M., ENGELMANN F., FRATTARELLI A., DAMIANO C., 1999. *Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of almond (Prunus dulcis Mill.)*. CryoLett. 20: 13-20.
- SINGLETON V.L., ROSSI J.A., 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Vitic. 16:144-158.
- WATERMAN P.G., MOLE S., 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. ISBN 0-632-02969-2 Oxford, Blackwell Scientific Publication, pp 83-85.
- ZHAO Y., WU Y., ENGELMANN F., ZHOU M., 2001. *Cryopreservation of axillary buds of grape (Vitis vinifera) in vitro plantlets*. CryoLett. 22: 321-328.

Poster presentato al X Convegno Nazionale sulla Biodiversità (Roma, 3-5 settembre, 2014).

“La conservazione *ex situ* dei fruttiferi mediante coltura *in vitro*: applicazione della crescita rallentata e della crioconservazione al nocciolo e al ciliegio”

Sgueglia A., Monticelli S., Gentile A., Germanà M.A., Forni C., Frattarelli A., Caboni E.

La moderna agricoltura, privilegiando la diffusione di un numero ridotto di specie e varietà più rispondenti alle esigenze di produzione elevata, ha causato una notevole riduzione della variabilità genetica. La stringente richiesta di salvaguardia della biodiversità trova nella coltura *in vitro* un valido strumento per la conservazione delle risorse genetiche, anche nell’ottica della riduzione dei costi di gestione e del rischio di perdita di materiale, rispetto alla conservazione *ex situ* in pieno campo (Gonzalez-Arno & Engelmann 2006). Presso il CRA-FRU di Roma da diversi anni vengono condotti studi finalizzati all’applicazione di tecniche di conservazione a medio (crescita rallentata) e lungo termine (crioconservazione), al fine di mantenere la biodiversità frutticola di varietà antiche, moderne e autoctone. Tali tecniche sono state applicate principalmente a cultivar di melo, pero, mandorlo e pesco. Più recentemente l’attenzione si è concentrata sul nocciolo e il ciliegio, con l’obiettivo di definire protocolli che possano essere utilizzati per la conservazione, mediante coltura *in vitro*, di cultivar antiche e di *wild relatives* presenti nel Centro Nazionale di Conservazione del germoplasma frutticolo del CRA-FRU di Roma. Per la crioconservazione è stata utilizzata la tecnica dell’incapsulamento-disidratazione, che prevede l’inclusione degli espianti in sfere di alginato e la loro successiva disidratazione, fino a circa il 20-30% di umidità, prima dell’immersione in azoto liquido. I risultati preliminari riguardano anche l’applicazione di soluzioni di saccarosio 0.75M o 1M per 1-3 giorni su apici di nocciolo (*Corylus avellana* L.), cv Tonda Gentile Romana e Montebello, e di tre ibridi di ciliegio, Gisela 6 (*P. cerasus* x *P. canescens*), CAB 11E (*P. cerasus*) and MaxMa Delbard 14 Brokforest (*P. mahaleb* x *P. avium*), provenienti da colture *in vitro* in moltiplicazione (Damiano et al. 2012) o frigoconservate a 4 °C (solo per il ciliegio). Nel ciliegio il preconditionamento a 4 °C sembra favorire la ripresa degli espianti crioconservati con ricrescita del 35% in Gisela 6. In nocciolo è stata ottenuta ricrescita con il trattamento osmotico in saccarosio 0.75M per 1 giorno in entrambe le cultivar. Per la crescita rallentata, in nocciolo, è stato valutato l’effetto di sostanze osmoticamente attive (saccarosio e sorbitolo) e della loro concentrazione sulla conservazione *in vitro* della Tonda Gentile Romana e sono in corso valutazioni su parametri fisiologici per caratterizzare la risposta alle condizioni di conservazione. Ulteriori prove sono in corso per ottimizzare le risposte delle varietà alle diverse tecniche di conservazione e per estendere i protocolli al più ampio numero di varietà.