

Prove preliminari per lo sviluppo di un protocollo di crioconservazione in carciofo

Anna Taglienti e Marina Barba*

CRA-PAV, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

Preliminary experiments for a cryopreservation protocol in artichoke

Abstract. The application of cryogenics to plant material is a technique for pathogen eradication and preservation of healthy planting germoplasm. "Cryopreservation" is a key issue in the storage of plant biodiversity, allowing long-term storage of plant material at low cost, in a small space and in absolute sanitary and genetic safety. In turn, "cryotherapy" achieves eradication of plant viruses by cryogenic treatment of shoot tips, and stands as an effective alternative to thermotherapy and meristem culture for plant pathogen eradication. Artichoke (*Cynara scolymus*) is considered highly valuable vegetal crop, whose germoplasm characters of the different varieties have to be preserved. The diffusion of virus-infected propagative material represents the main concern for artichoke health status. In this work, the vitrification technique for cryopreservation of artichoke shoot tips was studied. In the procedure, each of the experimental variables has been addressed separately in order to find the best conditions for shoot regrowth.

Key words: cryogenics, biodiversity, artichoke.

Introduzione

La crioconservazione è una tecnica biotecnologica innovativa la cui applicazione nel campo delle colture vegetali *in vitro* permette il mantenimento a lungo termine di germoplasma, (Reed, 2008; Lambardi *et al.*, 2009), e, in alcuni casi, l'eradicazione di agenti patogeni virali mediante crioterapia (Helliot *et al.*, 2002). Scopo della crioconservazione è la raccolta e la conservazione della biodiversità vegetale, esigenza di primaria importanza per la salvaguardia di specie sottoposte a erosione genetica e per il mantenimento di nuove cultivars ottenute tramite miglioramento genetico. La crioconservazione rappresenta una valida alternativa alle tradizionali collezioni di germoplasma,

poiché richiede spazi assai contenuti, bassi costi di gestione (consistenti essenzialmente nel mantenimento del livello di azoto liquido, sostanza facilmente reperibile e relativamente economica), e permette di conservare il materiale vegetale in assoluta sicurezza sia dal punto di vista sanitario, evitando infezioni da virus e inquinamenti da muffe e batteri, che da quello genetico, poiché il trattamento criogenico non influenza la stabilità genetica del materiale (Harding, 2004). La crioterapia, invece, costituisce una recente applicazione della criobiologia, basata sul risanamento da virus vegetali tramite il trattamento di apici di piante infette in azoto liquido; risultati promettenti sono stati ottenuti su diverse specie vegetali e con vari virus (Wang *et al.*, 2006; 2009) fra i quali *Plum Pox Virus* (PPV) e *Potato Virus Y* (PVY). L'utilizzo di germoplasma sano è fondamentale per arginare la diffusione di virus nel materiale micropropagato, che attualmente costituisce una reale minaccia allo stato sanitario di molte colture. Il principio alla base della crioterapia è la disomogeneità della distribuzione del virus nella struttura dell'apice: le cellule più interne del meristema presentano una carica virale nulla o molto bassa, e allo stesso tempo hanno dimensioni minori e rapporto nucleo/citoplasma maggiore rispetto alle cellule situate sugli abbozzi fogliari, che sono invece più infette. Il trattamento criogenico, distruggendo preferenzialmente le cellule a maggior contenuto d'acqua, seleziona quelle più piccole (sane) realizzando quindi il risanamento dell'apice.

Il carciofo (*Cynara scolymus*) è una coltura erbacea poliennale particolarmente interessata ad entrambe le applicazioni della criogenia: esso costituisce una matrice vegetale di pregio, dunque è essenziale conservare le caratteristiche varietali del germoplasma; inoltre, lo stato sanitario attuale del carciofo è seriamente compromesso dalla diffusione di infezioni virali, in particolare i virus *Artichoke Latent Virus* (ALV) e *Artichoke Italian Latent Virus* (AILV) causano perdite rilevanti di produzione in termini quantitativi e qualitativi. Anche da questo punto di vista il trattamento criogenico può costituire una tecnica valida come strategia di risanamento alternativa alla coltura d'apice.

* marina.barba@entecra.it

Nel presente lavoro sono stati analizzati alcuni passaggi e parametri per lo sviluppo di un protocollo di crioconservazione su apici di carciofo mediante la tecnica della vitrificazione (Sakai *et al.*, 1990; 2007). La procedura prevede la precoltura degli apici su substrato arricchito di saccarosio, pretrattamento con soluzione osmoprotettiva, trattamento con soluzione vitrificante, immersione in azoto liquido per almeno 1 ora, successivo rapido scongelamento, lavaggio e messa in coltura degli apici su un opportuno terreno di ricrescita. Il trattamento con la soluzione vitrificante è il passaggio fondamentale del protocollo, ma è stato dimostrato che gli altri steps, precedenti e successivi (precoltura, osmoprotezione, scongelamento, lavaggio, terreno di ricrescita), incidono profondamente sul successo della procedura.

Pertanto tutte queste variabili sono state esaminate separatamente in modo da valutarne gli effetti, e per ogni variabile è stata individuata la condizione (tempo, temperatura, ecc.) che fornisce i migliori risultati in termini di ricrescita degli apici.

Materiali e metodi

Le prove sperimentali su carciofo di tipo Romanesco di provenienza laziale sono state effettuate su germoplasma micropropagato della cv Grato1 (Arsial Regione Lazio). Le piantine sono state sottoposte a successivi cicli di moltiplicazione su substrato solido contenente 0,4 g/l di NH_4NO_3 , 0,8 g/l di KNO_3 , 0,37 g/l di $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,17 g/l di KH_2PO_4 , 0,15 g/l di CaCl_2 (macroelementi); 0,086 g/l di $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,062 g/l di H_3BO_3 , 0,151 g/l di $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0025 g/l di $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,025 g/l di $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00025 g/l di $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (microelementi); 10 ml/l di soluzione 100X FeSO_4 -EDTA; 1 g/l di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,2 g/l di mioinositolo; 0,83 mg/l di KI; 1 mg/l di tiamina; 0,5 mg/l di piridossina HCl; 0,5 mg/l di acido nicotinico; 2 mg/l di glicina; 2,0 mg/l di kinetina; 0,1 mg/l di acido indolbutirrico (IBA); 30 g/l di saccaroso; 7 g/l di agar; pH = 5,8 (terreno di moltiplicazione).

Dai germogli di carciofo allevati *in vitro* è stato isolato l'apice di dimensione circa 1-1,5 mm, lasciando solo i 3-4 primordi fogliari più interni. Gli apici sono stati in parte avviati direttamente alla procedura di crioconservazione, in parte sono stati posti su terreno solido MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato con saccarosio 0,3 M per 1 o 2 giorni.

Gli apici vegetativi sono poi stati trasferiti in cryovials da 1,8 ml (Sigma-Aldrich, Milano) e trattati a 25 °C per 20 minuti con 1,5 ml di una soluzione osmoprotettiva LS, contenente MS, glicerolo 2 M e sacca-

rosio 0,4 M (Matsumoto *et al.*, 1994).

La soluzione osmoprotettiva è stata poi sostituita con 1,5 ml di soluzione vitrificante PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*) (Sakai *et al.* 1990) e le cryovials sono state immerse in un bagno di ghiaccio (0 °C) per un periodo di 40 o 70 min.

Successivamente la soluzione PVS2 è stata rimossa e sostituita con 0,6 ml di PVS2 fresca e alcune cryovials sono state immerse direttamente in azoto liquido per un periodo di 1 ora, mentre le restanti sono state avviate al lavaggio e poste in terreno di ricrescita (RC: contenente macro e microelementi e vitamine di Murashige e Skoog, saccarosio 30 g/l, acido indolbutirrico (IBA, Micropoli, Milano) 0,1 mg/l, 6-benzilaminopurina (6-BA, Micropoli, Milano) 0,5 mg/l, 6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine (2-ip, Micropoli, Milano) 0,01 mg/l, pH = 5,8.

Lo scongelamento è stato effettuato immergendo le cryovials in un bagno a 40 °C per 50 s, dopodiché la PVS2 è stata rimossa e sostituita con 1,5 ml di soluzione di lavaggio contenente macro e microelementi e vitamine di Murashige e Skoog e saccarosio 1,2 M.

Dopo 20 minuti a 25 °C la soluzione di lavaggio è stata rimossa e gli apici sono stati posti su terreno di ricrescita RC. Gli apici sono stati mantenuti in camera di crescita ad una temperatura di circa 23 °C, luminosità di 3.500-4.000 lux e un fotoperiodo di 16 ore luce. Sono stati effettuati 3 espunti per ogni replica, e il test di vitalità con l'osservazione di ricrescita è stato fatto dopo 1 settimana dal trattamento.

Risultati e discussione

Il primo esperimento ha riguardato il test di tossicità della PVS2 sugli apici espunti, per verificare la possibilità di ricrescita dopo vitrificazione, omettendo il passaggio in azoto liquido. La tabella 1 illustra i parametri utilizzati: in gran parte dei casi si è ottenuta la ricrescita delle piantine, pertanto abbiamo potuto concludere che la soluzione vitrificante PVS2 non determina effetti tossici fatali sul materiale trattato per i tempi da noi applicati.

Tab. 1 - Parametri del trattamento di vitrificazione degli apici omettendo il trattamento criogenico.

Tab. 1 - *Experimental parameters used in the vitrification treatment without liquid nitrogen cooling.*

Entry	Precoltura (g)	t vitrif. (min)
1	-	40
2	-	70
3	1	40
4	1	70
5	2	40
6	2	70

I parametri utilizzati per l'intera procedura criogenica, compreso il trattamento in azoto liquido, sono riportati in tabella 2.

Abbiamo innanzitutto osservato che la precoltura su terreno arricchito in saccarosio è necessaria per il successo della procedura: abbiamo infatti verificato che gli apici vitrificati senza precoltura non hanno dato luogo a ricrescita dopo la crioconservazione. D'altro canto, gran parte degli apici sottoposti a 2 giorni di precoltura hanno mostrato un marcato imbrunimento, che pregiudica il resto della procedura; nei successivi esperimenti ci siamo perciò attestati su un tempo di precoltura di 1 giorno.

Il tempo minimo di trattamento con la soluzione vitrificante PVS2 che ha dato luogo a ricrescita è di 40 min a 0 °C; tale temperatura è stata scelta poiché in gran parte degli studi fin qui effettuati (Lambardi e De Carlo, 2009; Sakai *et al.*, 2000) è riportato che essa consente una più ampia finestra temporale per il trattamento senza riscontrare effetti tossici, mentre a 25 °C tale finestra si restringe molto intorno al tempo target. Lo scongelamento è stato effettuato immergendo le cryovials in un bagno d'acqua termostata a 40 °C per 50 s; tale combinazione di tempi e temperature è riportato indurre in una cryovial da 1,8 ml contenente 0,6 ml di PVS2 un'escursione termica di 250 °C min⁻¹, necessaria ad evitare il fenomeno della ricristallizzazione migratoria.

Dopo lo scongelamento la PVS2 risulta liquida ed a temperatura ambiente, e gli apici in essa sospesi appaiono verdi (fig. 1).

Dopo il trattamento, un certo numero di apici è ricresciuto, mentre si è osservato il solo sviluppo di callo in alcune repliche. Per gli scopi di crioconservazione e allestimento di una criobanca, il solo tessuto indifferenziato non è sufficiente, poiché si mira alla ricostituzione dell'intera pianta (che possa poi dar luogo a semi, frutti, ecc.), al contrario di quanto accade per la produzione di metaboliti secondari, per cui talvolta la sola crescita di callo è sufficiente agli scopi voluti. Pertanto la formazione di callo è indesiderata,

Tab. 2 - Parametri usati per l'intero trattamento di crioconservazione sugli apici.

Tab. 2 - Experimental parameters used for the cryoconservation treatment.

Entry	Precoltura (g)	t vitrif. (min)	t N ₂ (min)
7	-	40	60
8	-	70	60
9	1	40	60
10	1	70	60
11	2	40	60
12	2	70	60

e potrà essere evitata attraverso la riformulazione del terreno di ricrescita (soprattutto per quanto riguarda il rapporto auxina/citochinina) e di coltura.

Conclusioni

In questo lavoro è stata posta una base per lo sviluppo di un protocollo di crioconservazione di apici di carciofo attraverso l'applicazione della vitrificazione, utilizzabile per la conservazione di tale germoplasma, considerato di estremo pregio, in condizioni di sicurezza genetico-sanitaria. Tale protocollo, una volta messo a punto, potrà essere utilizzato, con opportune modifiche, su altre varietà per la costituzione di una criobanca utile alla tutela della biodiversità della coltura in esame; potrà altresì essere verificata l'efficacia del trattamento criogenico per l'eradicazione di patogeni virali da materiale infetto.

Riassunto

Il trattamento criogenico su materiale vegetale è una tecnologia per la conservazione a lungo termine (crioconservazione), e l'eradicazione di agenti patogeni virali, (crioterapia). La crioconservazione può essere utilizzata per l'allestimento di banche del germoplasma, mentre la crioterapia mira al risanamento da virus. Nel presente lavoro si pongono le basi per lo sviluppo di un protocollo per la crioconservazione di apici di carciofo mediante vitrificazione. La procedura è stata analizzata nelle sue variabili sperimentali: tempi di precoltura, osmoprotezione, vitrificazione e scongelamento. Le temperature di vitrificazione e scongelamento ottimizzate hanno permesso di ottenere la ricrescita degli apici dopo trattamento in azoto liquido.

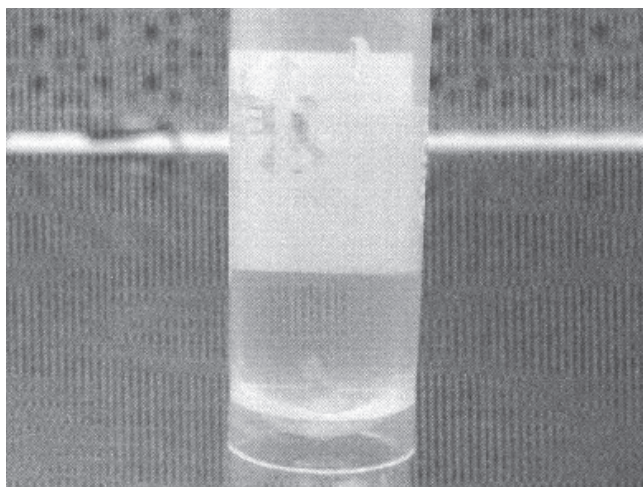


Fig. 1 - Apici di carciofo in sospensione nella cryovial durante il trattamento di vitrificazione.

Fig. 1 - Artichoke shoot tips suspended in PVS2 solution in the cryovial during the vitrification treatment.

Parole chiave: criogenia, biodiversità, carciofo.

Bibliografia

- HARDING K., 2004. *Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review*. *CryoLetters*, 25: 3-22.
- HELLIOT B., PANIS B., POUMAY Y., SWENNEN R., LEPOIVRE P., FRISON E., 2002. *Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa spp.*)*, *Plant Cell Rep.*, 20: 1117-1122.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., 2009. *Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di gemoplasma vegetale*, *Italus Hortus*, 16 (1): 79-98.
- MATSUMOTO T., SAKAI A., YAMADA K., 1994. *Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of Wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration*, *Plant Cell Rep.*, 13: 442-446.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*, *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- REED B., 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, pp. 513.
- 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. MATSUMOTO T., HIRAI D., NIINO T., 2000. *Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation*, *CryoLetters* 21: 53-62.
- SAKAI A., ENGELMANN F., 2007. *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review*. *CryoLetters*, 28(3): 151-172.
- WANG Q.C., LIU Y., XIE Y., YOU M., 2006. *Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato Leafroll Virus (PRLV) and Potato Virus Y (PVY)*, *Potato Res.*, 49: 119-129.
- WANG Q.C., PANIS B., ENGELMANN F., LAMBARDI M., VALKONEN J.P.T. 2009. *Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation*, *Ann. Appl. Biol.* 154: 351-363.

Studio sull'incapsulamento di microtalee *vitro*-derivate di un genotipo siciliano di gelso

Fabrizio Giuseppe Casales, Benedetta Chiancone, Calogero Di Lauria e Maria Antonietta Germanà*
Dipartimento DEMETRA, Università di Palermo

Study on encapsulation of *vitro*-derived microcuttings of a sicilian genotype of morus

Abstract. The mulberry belongs to the genus *Morus*, family *Moraceae*, which includes many species. The foliage of some species of this genus is used as main source of food for silkworms. *Morus alba* and *Morus indica* produce edible fruits. The mulberry tree is usually propagated by cuttings or by grafting. Since some cultivars have difficulty in rooting, these methods can not always be applied. For this reason, the micropropagation and the technology of encapsulation may be valuable tools in terms of efficiency and profitability for its clonal propagation in a short time. Up to date, there are different encapsulation fruit species under investigation, including kiwi, apple, citrus, banana, grapes, mango and pomegranate. In the case of the mulberry tree, studies related to encapsulation of unipolar propagules (microcuttings) are still limited. This work was carried out to evaluate the effect of the two growth regulators, indole-3-butyric acid (IBA) and 6-benzylaminopurine (BAP), on the viability, regrowth and conversion of encapsulated microcuttings of "Fontanarossa Nera", a Sicilian genotype of *Morus nigra* L.. Uninodal microcuttings (3-4 mm long), were excised from *in vitro*-derived shoots and encapsulated in a matrix of calcium alginate with trophic and protective function. The synthetic seeds were prepared and placed in culture media added with different combinations of growth regulators. The results, observed after 45 days from the sowing, were satisfactory in terms of viability and regrowth, while the conversion levels were low. Further studies are therefore required to increase the conversion rates of synthetic seeds of this species.

Key words: growth regulators, mulberry, propagation, synthetic seed.

Introduzione

Il gelso appartiene al genere *Morus* afferente alla famiglia delle *Moraceae*, che comprende molte specie. Esso è originario della regione Indo-Cinese ed è ampiamente distribuito nella bassa regione sub-himalayana fino ad un'altitudine di 2.100 m s.l.m., coprendo sia le regioni temperate che sub-tropicali dell'emisfero settentrionale. Le foglie di alcune specie di questo genere sono utilizzate come cibo per i bachi da seta. *Morus alba* e *Morus indica* producono frutti commestibili (Kamareddi, 2008). Le foglie di *Morus alba* hanno proprietà antiossidanti per la presenza di α -tocoferolo e β -carotene (Yen *et al.*, 1996) ed attività ipoglicemizzante delle foglie è stata riscontrata in *Morus indica* (Kelkar *et al.*, 1996).

La propagazione del gelso avviene, di solito, per talea o per innesto. Poiché alcune cultivar presentano difficoltà nella radicazione, non sempre questi metodi possono essere applicati (Rai *et al.*, 2009). Per tale motivo, la micropropagazione e la tecnologia dell'incapsulamento potrebbero essere un valido strumento, in termini di efficienza e redditività, per la sua propagazione clonale in tempi rapidi (Kavyashree *et al.*, 2006). Fino ad oggi, diverse sono le specie frutticole oggetto di ricerche sull'incapsulamento, tra cui l'actinidia (Gardi *et al.*, 1999), il melo (Micheli *et al.*, 2002), gli agrumi (Germanà *et al.*, 1999), l'olivo (Micheli e Standardi, 2005), il banano (Ganapathi *et al.*, 2001; Suprasanna *et al.*, 2001), la vite (Wang *et al.*, 2002, 2004; Das *et al.*, 2006), il mango (Wu *et al.*, 2003) e il melograno (Naik e Chand, 2006). Nel caso del gelso, le ricerche relative all'incapsulamento di propaguli unipolari (microtalee) sono ancora limitate (Bapat *et al.*, 1987; Pattnaik e Chand, 2000; Chiancone *et al.*, 2009).

L'obiettivo di questo lavoro è stato valutare l'effetto di diverse combinazioni dei regolatori di crescita acido indol-3-butirrico (IBA) e 6-benzilaminopurina (BAP), sulla conversione di microtalee incapsulate di "Fontanarossa Nera", un genotipo siciliano di *Morus nigra*.

* mariaantionietta.germana@unipa.it

Materiali e metodi

Dai germogli proliferati *in vitro* di “Fontanarossa Nera”, un genotipo siciliano di *Morus nigra*, sono state prelevate microtalee (propaguli uninodali) di 3-4 mm di lunghezza, private delle foglie e dotate di gemme ascellari. Per l’incapsulamento è stato seguito il protocollo di Micheli e Standardi (2005) utilizzando un endosperma artificiale composto da metà concentrazione di sali minerali e di vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), con 50 g/l di saccarosio. Le capsule sono state seminate in scatole Petri contenenti 15 ml di substrato di crescita (sali minerali e vitamine MS, 30 g/l di saccarosio, 8,5 g/l agar, pH 5.8). Sono state esaminate tre tesi in cui sia l’endosperma artificiale che il substrato di semina contenevano gli stessi regolatori di crescita. In particolare, le combinazioni di regolatori di crescita provate sono state le seguenti: M1: 1,5 mg/l di IBA + 1,5 mg/l di BAP; M2: 1,0 mg/l di IBA + 1,5 mg/l di BAP; M3: 1,0 mg/l di IBA (Kamareddi, 2008). Per ciascuna tesi sono state utilizzate 50 microtalee incapsulate (5 per scatola Petri) (fig. 1). Le colture sono state incubate in una camera di crescita a 26 ± 1 °C con 16 ore di luce e 8 di buio ed una densità di flusso fotonico fotosintetico di $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I dati sono stati rilevati per 45 giorni a partire dalla semina e con cadenza settimanale. In particolare, sono stati registrati: la vitalità (espunti di aspetto verde, senza necrosi o ingiallimenti), la ripresa vegetativa (microtalee incapsulate che producono germogli $>$ di 4 mm) e la conversione (emergenza di germogli e radici lunghi almeno 4 mm, dalle microtalee incapsulate). Inoltre, sono stati registrati il numero di germogli per espianto, il numero di radici per espianto radicato, la lunghezza dei germogli e la lunghezza delle radici.

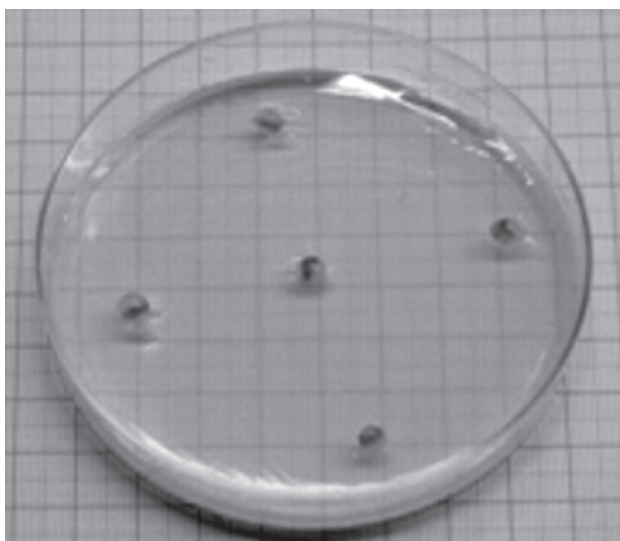


Fig. 1 - Capsule di gelso in coltura.
Fig. 1 - *Morus* capsules in culture.

I dati sono stati elaborati ricorrendo all’ANOVA a una via e la separazione delle medie è stata effettuata mediante test di Tukey ($p\leq 0,05$).

Risultati e discussione

Le microtalee di “Fontanarossa Nera”, come già riportato in studi precedenti (Chiancone *et al.*, 2009), hanno risposto in maniera positiva all’incapsulamento. Infatti, esse hanno mantenuto il colore verde e un buon turgore dei tessuti, anche se la vitalità è passata dal 100% della prima settimana al 64-84% della sesta settimana. La ripresa vegetativa (fig. 2), iniziata già alla prima settimana, ha raggiunto, dopo 45 giorni dalla semina, valori tra il 64% (M1) e l’84% (M2). Il numero più alto (2,3) di germogli per microtalea germogliata è stato osservato sul mezzo M2 (fig. 3).



Fig. 2 - Ripresa vegetativa in microtalee di gelso incapsulate.
Fig. 2 - Regrowth of encapsulated *Morus* microcuttings..

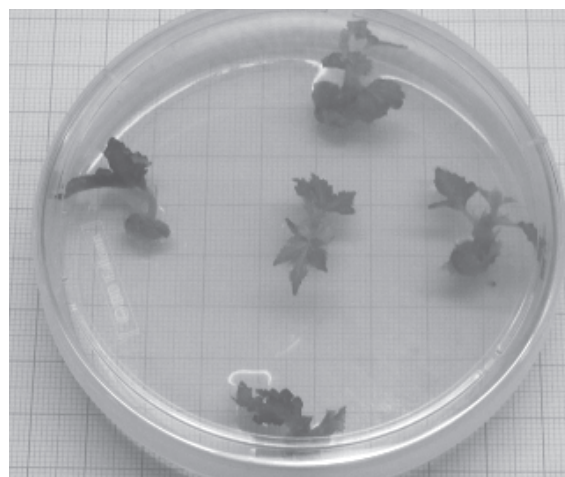


Fig. 3 - Microtalee incapsulate di gelso germogliate *in vitro*.
Fig. 3 - Encapsulated microcuttings sprouted *in vitro*

L'emissione di radici è cominciata già durante la prima settimana nelle microtalee incapsulate e seminate su mezzo M2.

L'analisi effettuata sui dati rilevati alla sesta settimana non ha mostrato differenze statisticamente significative per i parametri vitalità e ripresa (tab. 1). Per quanto riguarda la conversione, invece, essa è risultata statisticamente superiore per le capsule seminate su mezzo M2, anche se il valore è piuttosto basso (6%) (fig. 4).

Come riportato in studi precedenti (Chiancone *et al.*, 2009), la risposta alla coltura *in vitro*, è altamente genotipo-dipendente. Infatti, il mezzo di coltura M3 contenente solo IBA, che in altri genotipi aveva indotto un'elevata rizogenesi (Kamareddi, 2008), su "Fontanarossa Nera" non ha dato risultati altrettanto positivi, anche se su questo mezzo sono stati registrati i valori più elevati per quanto riguarda la lunghezza dei germogli, il numero di radici per espianto radicato e la lunghezza delle radici (tab. 1). Invece, in questo studio, risultati migliori per quanto riguarda la vitalità, la ripresa, il numero di germogli per espianto germogliato e, soprattutto, la conversione sono stati ottenuti nel mezzo M2, contenente sia l'IBA che il BAP.

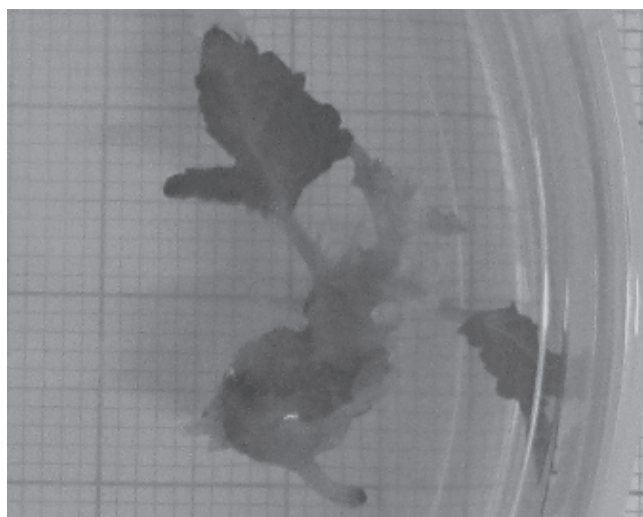


Fig. 4 - Conversione di microtalea di gelso incapsulata.
Fig. 4 - Conversion of an encapsulated microcutting.

Tab. 1 - Influenza del mezzo colturale su alcuni parametri vegetativi, rilevati, dopo 45 giorni di coltura, su semi sintetici di *Morus nigra*, genotipo "Fontanarossa Nera".

Tab. 1 - Effect of medium composition on several parameters observed after 45 days of culture, in synthetic seeds of *Morus nigra*, genotype "Fontanarossa Nera".

Mezzo	Vitalità (%)	Ripresa (%)	Germogli / espianto germogliato (n)	Lunghezza germogli (cm)	Conversione (%)	Radici / espianto radicato (n)	Lunghezza radici (cm)
M1	66	64	1,4b	1	0c	0	0
M2	84*	84*	2,3a	0,9*	6a	1*	0,3*
M3	64	64	1,0b	1,4	2b	5	1

Nell'ambito di ciascuna colonna, valori seguiti da lettere differenti sono statisticamente diversi per $p < 0,05$, (ANOVA a una via, test di Tukey, $p < 0,05$). *: indica caratteri non significativi.

M1: 1.5 mg/l di IBA + 1.5 mg/l di BAP; M2: 1.0 mg/l di IBA + 1.5 mg/l di BAP; M3: 1.0 mg/l di IBA (Kamareddi, 2008).

Conclusioni

Dal presente studio risulta che la tecnologia dell'incapsulamento può risultare uno strumento valido per propagare il germoplasma del gelso, anche se il protocollo adottato deve essere oggetto di perfezionamento ed ottimizzazione. Ulteriori studi saranno effettuati al fine di conseguire valori più elevati di conversione delle microtalee incapsulate.

Riassunto

Il gelso (*Morus* spp. - *Moraceae*) riveste un'elevata importanza economica nell'industria della seta, ma viene utilizzato anche per i suoi frutti e per il legname. Il gelso viene propagato usualmente per talea o per innesto. Poiché alcune cultivar presentano difficoltà nella radicazione, la micropropagazione e la tecnologia dell'incapsulamento potrebbero essere un valido strumento per la sua propagazione clonale in tempi rapidi. Il presente studio è stato condotto per valutare l'effetto di due regolatori di crescita: IBA (acido indol-3-butirrico) e BAP (6-benzilaminopurina), sulla ripresa e sulla conversione di microtalee incapsulate di "Fontanarossa Nera", un genotipo siciliano di *Morus nigra* L. Dal presente studio risulta che la tecnologia dell'incapsulamento può risultare uno strumento valido per propagare il germoplasma del gelso, anche se il protocollo adottato deve essere oggetto di perfezionamento ed ottimizzazione. Ulteriori studi sono necessari al fine di conseguire valori più elevati di conversione delle microtalee incapsulate.

Parole chiave: gelso, regolatori di crescita, propagazione, seme sintetico.

Bibliografia

BAPAT V.A., MHATRE M., RAO P.S., 1987. *Propagation of Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. *Plant Cell Reports* 6:393-395.

CHIANCONE B., GERMANÀ M.A., MICHELI M., PATRICOLO G., STANDARDI A., 2009. *Le potenzialità delle colture in vitro*

- nella conservazione e diffusione di germoplasma di *Morus* spp. Italian Journal of Agronomy. 4 (4):297-302.
- DAS D.K., NIRALA N.K., REDDY M.K., SOPORY S.K., UPADHYAYA K.C., 2006. Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): an efficient way for storage and propagation of pathogen-free plant material. *Vitis* 45:179-184.
- GANAPATHI T.R., SRINIVAS L., SUPRASANNA P., BAPAT V.A., 2001. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*Musa* spp. AAB group). In *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 37:178-181.
- GARDI T., PICCIONI E., STANDARDI A., 1999. Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcutting of different woody species. *Journal of Microencapsulation* 16(1):13-25.
- GERMANÀ M.A., PICCIONI E., STANDARDI A., 1999. In vitro and ex vitro conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Mandarino Tardivo di Ciaculli. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 88: 117-120.
- KAMAREDDI S., 2008. Development of synthetic seed in Mulberry (*Morus indica* L.) cv. M-5 and evaluation under controlled conditions. Dep. Agronomy College of Agriculture, Dharwad. University of Agricultural Sciences, Dharwad-580 005.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M.C., REVANASIDDAIAH H.M., 2006. Propagation of mulberry variety-S₅₄ by synseeds of axillary buds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84:245-249.
- KELKAR S.M., BAPAT V.A., GANAPATHI T.R., KAKLIJ G.S., RAO P.S., HEBLE M.R., 1996. *Morus indica* L. shoot cultures: detection of hypoglycemic activity. *Current Science* 71:71-72.
- MICHELI M., STANDARDI A., 2005. Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (cv. Moraiolo). In: Effect of pretreatments, their size and the coating. *Current Topics in Biotechnology* 2: 81-86.
- MICHELI M., PELLEGRINO S., PICCIONI E., STANDARDI A., 2002. Effect of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion of M.26 apple rootstock. *J. of Microencapsulation* 19(3): 347-356.
- MURASHIGE T., SKOOG F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- NAIK S.K., CHAND P.K., 2006. Nutrient-alginate encapsulation of in vitro nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germoplasm distribution and exchange. *Science Horticulturae* 108:247-252.
- PATNAIK S., CHAND P.K., 2000. Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 60:177-185.
- RAI M.K., ASTHANA P., SINGH S.K., JAISWAL V.S., JAISWAL U., 2009. The encapsulation technology in fruit plants- A review. *Biotechnology Advances* 27:671-679.
- SUPRASANNA P., ANUPAMA S., GANAPATHI T.R., BAPAT V.A., 2001. In vitro growth and development of encapsulated shoot tips of different banana and plantain cultivars. *Journal New Seeds* 3:19-25.
- WANG Q.C., GAFNY R., SAHAR N., SELA I., MAWASSI M., TANNE E., 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions and subsequent plant regeneration by encapsulation-dehydration. *Plant Sci.* 162: 551-558.
- WANG Q.C., MAWASSI M., SAHAR N., LI P., VIOLETA C.T., GAFNY R., et al, 2004. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77:267-275.
- WU Y.J., HUNAG X.L., XIAO J.N., LI X.J., ZHOU M.D., ENGELMANN F., 2003. Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. *Cryo-Lett* 24(5):303-314.
- YEN G.C., WU S.C., DUH P.D., 1996. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of mulberry (*Morus alba* L.). *J. Agr. Food Chem.* 44:1687-1690.

Coltura *in vitro* per lungo tempo del portinnesto della vite Kober 5 BB

Massimo Gardiman* e Daniele Migliaro

CRA - VIT, Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano (TV)

Long-term *in vitro* culture of grapevine rootstock Kober 5 BB

Abstract. *In vitro* shoot culture of the grapevine rootstock Kober 5 BB (*Vitis berlandieri* X *Vitis riparia*) were established in 1998 and maintained for 12 years through a total of 96 subculture cycles. The cultures showed a constant behavior in terms of multiplication rate, shoot length and root formation during the long period of *in vitro* culture. Vines derived from *in vitro* culture after 1, 4 and 10 years showed no morphological differences (based on 20 OIV characters and 26 phyllometric measures) from the original mother plant. DNA profile of the shoots maintained *in vitro* for 12 years, the vines derived from *in vitro* culture after 1, 4 and 10 years, and the original mother plant was the same at all the 20 SSR loci tested. These results indicate that, under the conditions used, a very long period of permanence *in vitro* did not induce significant changes in the plant material. This is interesting for commercial micropropagation and in general for the conservation of grapevine germplasm. Further molecular analyses are underway to evaluate the possible occurrence of genetic and epigenetic changes, that cannot be excluded.

Key words: micropropagation, *Vitis*, SSR.

Introduzione

L'utilizzo delle colture *in vitro* ai fini della propagazione delle piante si basa sul presupposto che gli individui ottenuti siano copie esatte della pianta madre. In alcuni casi però è possibile che insorgano delle modificazioni fenotipiche di varia intensità, che possono essere riconducibili a modificazioni genetiche, variazioni epigenetiche o segregazione chimerica (Kaepler *et al.*, 2000; Rani e Raina, 2000; Bairu *et al.*, 2011; Miguel e Marum, 2011; Smulders e De Klerk, 2011).

Per la produzione di materiali di moltiplicazione della vite l'utilizzo della tecnica della micropropagazione è attualmente consentita solo per i materiali di

categoria "base" di varietà portainnesto (DM del 22 dicembre 1997), purché non vengano effettuate più di otto subcolture esclusa la fase di stabilizzazione iniziale. Questo al fine di ridurre al minimo la possibilità di insorgenza di modificazioni che potrebbero sorgere a causa dei forti stress a cui sono sottoposti i germogli durante la coltura *in vitro*, che potrebbero indurre alterazioni fenotipiche nelle piante ottenute.

Questo lavoro riporta le osservazioni effettuate su colture del portinnesto della vite Kober 5 BB moltiplicate e mantenute *in vitro* per un periodo di 12 anni e su piante ambientate ottenute dopo vari periodi di coltura *in vitro*.

Materiali e metodi

Talci legnosi di una pianta del portinnesto della vite K5 BB (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*) clone ISV 1 sono stati prelevati nel mese di gennaio 1998 e fatti germogliare in ambiente controllato. I germogli sviluppati sono stati disinfettati con soluzione al 5% di ipoclorito di sodio commerciale, risciacquati due volte con acqua distillata sterile e porzioni contenenti una gemma sono state poste in coltura in condizioni aseptiche in provette di vetro su mezzo di coltura MS-E (tab. 1). Dopo circa 40 giorni i nuovi germogli formati sono stati trasferiti su substrato MS-M (tab. 1) in vasi di vetro da 500 ml. Le colture sono state poste in cella climatica a 25°C, con fotoperiodo di 16 ore di luce a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornita da tubi fluorescenti.

Ogni 40-50 giorni circa è stata effettuata una subcoltura, mantenendo un numero minimo di 7 vasi contenenti 10 microtalee con due nodi. Alla fine di ogni subcoltura, su 5 vasi ed un totale di 50 germogli, sono

Tab. 1 - Composizione dei substrati utilizzati.

Tab. 1 - Culture media composition.

Parametri	MS-E (Espianto)	MS-M (Moltiplicazione)	MS-R (Radicazione)
Minerali e vitamine	MS	MS/2	MS/2
BAP (mg/l)	1	0	0
IBA (mg/l)	0,1	0	1
Saccarosio (g/l)	30	25	20
Agar (g/l)	8	8	8
pH	5,7	5,7	5,7

* massimo.gardiman@entecra.it

stati determinati il tasso di proliferazione (numero di microtalee con due nodi prodotte per germoglio di partenza), la lunghezza del germoglio principale ed il numero di radici formate. Escluse le prime 4 subcolture di stabilizzazione, sono state considerate un totale di 96 subcolture, con una media di 7-8 subcolture l'anno. I dati di tasso di proliferazione, lunghezza del germoglio e numero di radici sono stati sottoposti ad analisi della varianza.

In marzo 1990, marzo 2002 e marzo 2008 (rispettivamente dopo uno, quattro e dieci anni di permanenza in coltura *in vitro*) alcuni germogli sono stati posti su substrato MS-R per 30 giorni e quindi trasferiti su vasetti con torba, le piantine sono state ambientate e successivamente sono state trasferite in pieno campo.

Nel 2011 sulla pianta madre originaria e su quelle ambientate sono stati rilevati 20 caratteri ampelografici relativi al germoglio, foglia giovane e foglia adulta, previsti dal metodo internazionale di codifica dell'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV, 2009) ed è stata effettuata la misura di 26 parametri fillometrici sulla foglia adulta (Costacurta *et al.*, 2003).

Dai germogli *in vitro* in coltura da 12 anni, dalla pianta madre originaria e da piante ambientate dopo uno, quattro e dieci anni di permanenza in coltura *in vitro*, sono state prelevate delle foglie da cui, previa polverizzazione mediante un Tissue Lyser (Qiagen), è stato estratto il DNA genomico secondo il protocollo Genomic DNA from Plant (Nucleospin, Macherey-Nagel). L'analisi molecolare dei campioni in oggetto è stata condotta con 20 marcatori microsatelliti: i sei loci selezionati nell'ambito del progetto europeo Genes 081: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAg62 e VrZAG79 (This *et al.*, 2004), VMC6E1, VMC6F1, VMC6G1, VMCNG4b9 (Crespan, 2003), VVMD28 (Bowers *et al.*, 1996) e nove altri marcatori SSR utilizzati in progetti in fase di pubblicazione.

Le analisi SSR degli 11 marcatori noti in letteratura sono state realizzate come multiplex-PCR e le concentrazioni dei primers sono state modulate al fine di bilanciare l'intensità dei segnali per ogni singolo locus, mentre gli altri 9 sono stati utilizzati singolarmente in ogni reazione di PCR. Le reazioni PCR sono state condotte in volumi finali di 12,5 μ L contenenti 10 ng di DNA genomico, 0,2 mM di ciascun deossinucleotide (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), concentrazione di primers variabile (da 0,10 μ M a 0,40 μ M), 1X PCR buffer (10mM Tris.Cl pH 8,3, 50 mM KCl, 0,1% v/v Triton X-100) e 1 unità di Taq polimerasi (Ecogen). I frammenti amplificati sono stati separati mediante un DNA Genetic Analyzer ABI 3130xl (Applied Biosystems) e sono stati analizzati con il

software GeneMapper 4.0, utilizzando come standard interno di riferimento il GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems).

Risultati e discussione

Le colture di Kober 5 BB durante tutto il lungo periodo di moltiplicazione e mantenimento *in vitro* hanno mostrato un comportamento piuttosto costante e regolare. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le diverse subcolture nei principali parametri rilevati (tasso di proliferazione, lunghezza dei germogli e numero di radici) e nessuno di questi ha manifestato particolari trend durante i 12 anni di coltura, mantenendo le oscillazioni tra le varie subcolture entro valori non elevati.

Il tasso di moltiplicazione nella media delle 96 subcolture è stato di 3,1 e compreso tra un minimo di 2,7 alla 2^a e 87^a subcoltura ed un massimo di 3,3 alla 79 subcoltura (fig. 1). La lunghezza media dei germogli è stata di 6 cm con un minimo di 5,5 alla 42^a subcoltura ed un massimo di 6,6 alla 79^a subcoltura (fig. 2). Il numero medio di radici per germoglio è stato di 3,98 con un minimo di 3,70 alla 45^a subcoltura ed un massimo di 4,28 alla 43^a subcoltura (fig. 3).

Questa sostanziale costanza di comportamento contrasta con quanto riportato da altri autori: in *Vitis vinifera* (Peros *et al.*, 1999) con l'aumentare del periodo di coltura *in vitro* sono stati osservati un aumento del numero di radici prodotte ed un aumento iniziale del numero dei nodi e della lunghezza dei germogli poi seguito da una diminuzione. Anche in colture di *Prunus avium* e portinnesto del melo M9 è

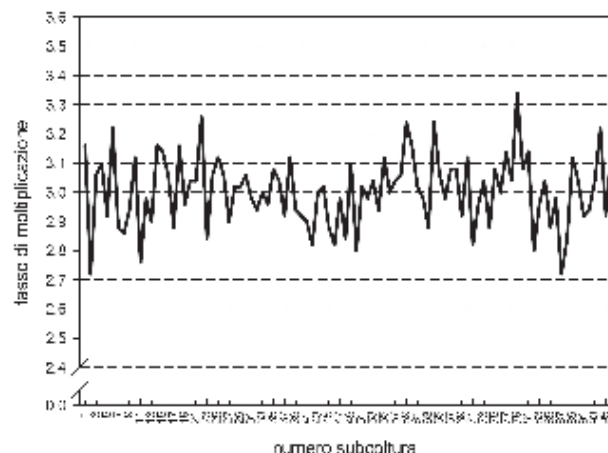


Fig. 1 - Tasso di moltiplicazione medio (numero di microtalee con due nodi prodotte per germoglio di partenza) ottenuto durante le 96 subcolture. Subcoltura n.1: 3-nov-1998, subcoltura n. 96: 20-ott-2011.

Fig. 1 - Average multiplication rate (number of two nodes micro-cuttings per shoot) during the 96 subcultures. Subcoltura no. 1: 3-nov-1998, subcoltura no. 96: 20-oct-2011.

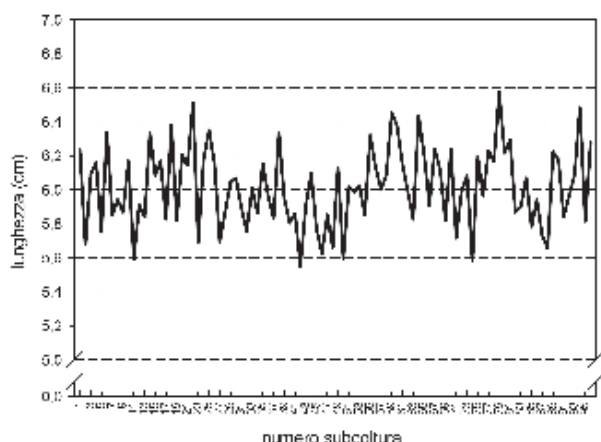


Fig. 2 - Lunghezza media dei germogli (cm) al termine di ogni subcultura.

Fig. 2 - Average shoot length (cm) at the end of each subculture.

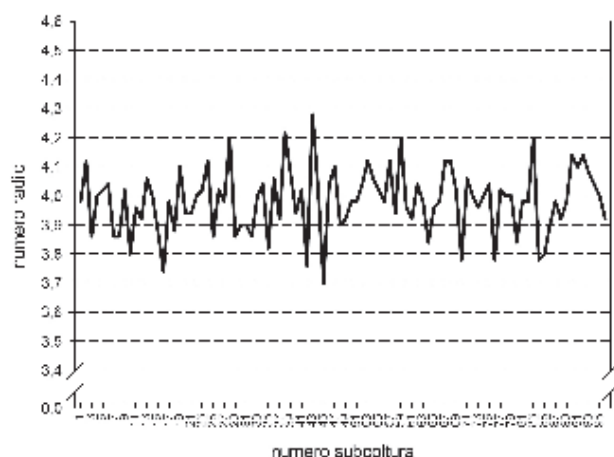


Fig. 3 - Numero medio di radici per germoglio prodotte al termine di ogni subcultura.

Fig. 3 - Average number of roots per shoot at the end of each subculture.

stato riportato che la produzione di germogli e radici aumentano con l'aumentare del tempo trascorso *in vitro* (Grant e Hammatt, 1999). La differenza può essere imputata al particolare genotipo ed alla mancanza di fitoregolatori aggiunti al mezzo di coltura.

Nessuna differenza significativa è stata rilevata nell'espressione dei 20 caratteri ampelografici e nel confronto delle 26 misure fillometriche rilevate tra la pianta madre originaria e le piante ambientate dopo uno, quattro e dieci anni di coltura *in vitro*. Tutti i campioni hanno presentato i tipici caratteri varietali relativi al giovane germoglio, giovani foglie e foglie adulte. Nel caso della vite nelle piante ottenute da micropropagazione sono riportate alcune modificazioni fenotipiche, principalmente a livello fogliare in *Vitis vinifera* (Grenan, 1984; Deloire *et al.*, 1995; Gribaudo *et al.*, 2000; Gheorghe *et al.*, 2009) ma che tendono a scomparire dopo alcuni anni, mentre nei

portinnesti non sono state segnalate differenze rilevanti (Deloire *et al.*, 1995).

Le analisi molecolari condotte con i 20 marcatori SSR hanno fornito un singolo profilo genetico per i germogli *in vitro* in coltura da 12 anni, la pianta madre originaria e le piante ambientate dopo uno, quattro e dieci anni di permanenza in coltura *in vitro*. In molte specie un elevato grado di stabilità è stato dimostrato (con analisi ISSR, citometria, analisi in campo) anche dopo diversi anni di moltiplicazione *in vitro*: ad esempio in *Platanus acerifolia* (Huang *et al.*, 2009), in *Curcuma longa* (Nayak *et al.*, 2010) e in portinnesti del melo (Pathak e Dhawan, 2011). Nella vite differenze a livello genetico sono state riscontrate (con AFLP e MASP) in piante rigenerate da antere (Popescu *et al.*, 2002) ed embrioni somatici (Schellenbaum *et al.*, 2008). Baranek *et al.* (2009; 2010) con studi su *V. vinifera* micropropagata per segmenti nodali suggeriscono che lo stress durante la moltiplicazione *in vitro* induce dei cambiamenti dello stato di metilazione del DNA, ma sembra che l'impatto di questi sia relativamente debole e il livello di uniformità del genoma nelle piante micropropagate attraverso coltura di nodi sia alto. E' molto probabile che l'utilizzo di condizioni e tecniche di coltura maggiormente stressanti (rigenerazione avventizia, embriogenesi somatica, uso di elevate concentrazioni di fitoregolatori, ecc.) possa portare ad un maggior grado di variazione somaclonale / epigenetica.

Conclusioni

Il comportamento regolare del materiale durante il lungo periodo di coltura *in vitro*, la stabilità morfologica delle piante ambientate ed i risultati dell'analisi SSR indicano che, nelle condizioni di coltura utilizzate, un periodo molto lungo di permanenza *in vitro* non ha indotto importanti modificazioni nel portinnesto della vite Kober 5 BB. Questo risultato si rivela interessante ai fini dell'utilizzo commerciale della micropropagazione nel vivaismo e più in generale della conservazione del germoplasma viticolo. Ulteriori analisi molecolari più approfondite (AFLP, MSAP e REMAP) sono comunque in corso per la valutazione dell'eventuale insorgenza di variazioni genetiche ed epigenetiche che non si possono comunque escludere.

Riassunto

Germogli del portinnesto della vite Kober 5 BB originati da espanti nodali posti in coltura nel 1998 sono stati mantenuti *in vitro* attraverso un totale di 96 cicli di subcultura, pari a 12 anni. Il tasso di moltiplicazio-

ne, la lunghezza dei germogli e il numero di radici per espianto, rilevato durante il lungo periodo di permanenza *in vitro*, sono rimasti invariati, così come la morfologia delle piante ambientate e l'analisi molecolare a 20 marcatori SSR. Questi risultati indicano che, nelle condizioni utilizzate per la coltura *in vitro*, in particolare in assenza di citochinina nel substrato di proliferazione, anche in un periodo molto lungo di permanenza *in vitro* non si sono manifestate modificazioni nel materiale vegetale. Ulteriori analisi molecolari più approfondite sono comunque in corso per valutare eventuale insorgenza di variazioni epigenetiche.

Parole chiave: micropropagazione, *Vitis*, SSR.

Ricerca finanziata in parte dal progetto Risorse Genetiche Vegetali (RGV/Trattato FAO) - Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali. Pubblicazione RGV-FAO n. 244

Bibliografia

- BAIRU M.W., AREMU A.O., VAN STADEN J., 2011. *Somaclonal variation in plants: causes and detection methods*. Plant Growth Regul 63:147-173
- BARÁNEK M., KRIZAN B., ONDRUSIKOVA E., PIDRA M., 2010. *DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy*. Plant Cell Tiss Organ Cult 101: 11-22.
- BARÁNEK M., RADDOVÁ J., KRIZAN B., PIDRA M., 2009. *Genetic changes in grapevine genomes after stress induced by in vitro cultivation, thermotherapy and virus infection, as revealed by AFLP*. Genetics and Molecular Biology, 32 (4): 834-839.
- BOWERS J.E., DANGL G.S., VIGNANI R., MEREDITH C.P., 1996: *Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (Vitis vinifera L.)*. Genome 39: 628-633.
- COSTACURTA A., CRESPIAN M., MILANI N., CARRARO R., FLAMINI R., AGGIO L., AJMONE-MARSAN P., CALÒ A., 2003. *Morphological, aromatic and molecular characterization of Muscat vines and their phylogenetic relationships*. Riv. Viticoltura e di Enologia, 2/3 (56): 13-30.
- CRESPIAN M., 2003. *The parentage of Muscat of Hamburg*. Vitis, 42(4): 193-197.
- DELOIRE A., CHARPENTIER M., BERLIOZ G., COLIN A., GIMONNET G., 1995. *Micropropagation of the grapevine: results of 10 years of experiments in the champagne vineyard and results of the first vinifications*. AJEV 46 (4): 571-578.
- GHEORGHE R.N., VISOIU E., POPESCU C.F., PAMFIL D., 2009. *Assessment of genetic stability and fidelity of some micropropagated Vitis vinifera L. "Feteasca neagra" clones by ampelometric and RAPD markers*. Bulletin UASVM Horticulture, 66(1): 51-57.
- GRANT N. J., HAMMATT N., 1999. *Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency*. Tree Physiology 19: 899-903.
- GRENAN S., 1984. *Leaf polymorphism after in vitro culture of Vitis vinifera L.* Vitis 23:159-174.
- GRIBAUDO I., MANNINI F., LISA A., CUOZZO D., 2000. *Phenotypical modifications of micropropagated grapevines*. Acta Hort 530: 231-236.
- HUANG W.J., NING G.G., LIU G.F., BAO M.Z., 2009. *Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of Platanus acerifolia using ISSR markers*. Biologia Plantarum 53 (1): 159-163.
- KAEPLER S. M., KAEPLER H. F., RHEE Y., 2000. *Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants*. Plant Molecular Biology 43: 179-188.
- MIGUEL C., MARUM L., 2011. *An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond*. J. Exp. Bot. 62(11): 3713-3725.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 155: 473-497.
- NAYAK S., KAUR T., MOHANTY S., GHOSH G., CHOUDHURY R., ACHARYA L., SUBUDHI E., 2010. *In vitro and ex vitro evaluation of long-term micropropagated turmeric as analyzed through cytophotometry, phytoconstituents, biochemical and molecular markers*. Plant Growth Regul 64: 91-98.
- OIV, 2009. *Descriptor list for grape varieties and Vitis species (2nd edition)*. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Paris, France.
- PATHAK H., DHAWAN V., 2011. *ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793*. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. DOI 10.1007/s11627-011-9385-0.
- PEROS J.P., TORREGROSA L., BERGER G., 1999. *Variability among Vitis vinifera cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity*. Journal of Experimental Botany, 319 (49): 171-179.
- POPESCU C. F., FALK A., GLIMELIUS K., 2002. *Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines*. Vitis 41 (4):177-182.
- RANI V., RAINA S.N., 2000. *Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal*. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 36: 319-330.
- SCELLENBAUM P., MOHLER V., WENZEL G., WALTER B., 2008. *Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (Vitis vinifera L.)*. BMC Plant Biology 2008, 8:78 doi:10.1186/1471-2229-8-78.
- SMULDERS M. J. M., DE KLERK G. J., 2011. *Epigenetics in plant tissue culture*. Plant Growth Regul 63:137-146.
- THIS P., JUNG A., BOCCACCI P., BORREGO J., BOTTA R., COSTANTINI L., CRESPIAN M., DANGL G.S., EISENHELD C., FERREIRA-MONTEIRO F., GRANDO S., IBANEZ J., LACOMBE T., LAUCOU V., MAGALHAES M., MEREDITH C. P., MILANI N., PETERLUNGER E., REGNER F., ZULINI L., MAUL E., 2004. *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars*. Theor. Appl. Genetics, 109 (7): 1448-1458.

Indagini preliminari sull'impiego delle colture *in vitro* per la salvaguardia di specie vegetali spontanee a rischio di rarefazione nell'Italia Centrale

Maurizio Micheli^{1*}, Silvio Mencaccini², Angela Sabbioni¹, Carla Arcangeli² e Silvia Biondini²

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

² Corpo Forestale dello Stato, Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale, Pieve S. Stefano (AR)

Preliminary investigations on the use of *in vitro* cultures for the safeguard of *Gentiana pneumonanthe* in Central Italy

Abstract. *Gentiana pneumonanthe* L. subsp. *pneumonanthe* is a threatened wild plant in Central Italy (Abruzzo). Preliminary investigations were carried out in order to apply the *in vitro* cultures for the safeguard of plant germplasm. The work has been arranged by three different steps (experiments) respectively concerning: the seed germination in aseptic conditions (*Experiment 1*), the *in vitro* proliferation (*Experiment 2*) and the encapsulation of *in vitro*-derived microcuttings (*Experiment 3*). The results showed that: a preliminary short storage at low temperatures seems to promote the seeds germination (*Experiment 1*); a satisfied proliferation rate (3.1) was recorded when the shoots of *G. pneumonanthe* were cultured on MS enriched by BAP, IBA and GA₃ (*Experiment 2*); the microcuttings encapsulated by calcium alginate maintained a decent value of viability and regrowth (not less than 40%) after 20 days of storage at 4°C.

Key words: Biodiversity, *Gentiana pneumonanthe*, micropropagation, encapsulation, storage.

Introduzione

Il Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale (C.N.B.F.) del Corpo Forestale dello Stato di Pieve S. Stefano (AR) è da tempo impegnato in numerose attività di ricerca e sperimentazione volte alla individuazione di efficaci strumenti per la salvaguardia del germoplasma di specie vegetali spontanee dell'Italia centro-meridionale (ecoregione Mediterraneo centrale). Insieme ai ricercatori del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DSAA) dell'Università di Perugia, nume-

rose sperimentazioni sono state condotte nel settore delle colture *in vitro*, per la tutela di specie vegetali di interesse conservazionistico. Oggetto del presente studio è stata *Gentiana pneumonanthe* L. subsp. *pneumonanthe* (Genziana mettimborsa o *G. palustre*), specie che, pur essendo attribuita alla categoria IUCN LC, risulta a rischio di rarefazione nell'Appennino centrale, dove risente in particolare di processi naturali di interrimento e di pressioni antropiche a carico dell'habitat di elezione (è specie tipica dei molinieti a *Molinia coerulea* (L.) Moench, e può ritrovarsi su torbiere neutre, prati umidi privi di acque superficiali, bordi consolidati di paludi, stagni, sfagnete e marcite). I semi sono stati raccolti in Abruzzo, dove la specie era segnalata sull'Altopiano delle Cinquemiglia (AQ), ma in seguito ritenuta estinta. Recentemente, è stata nuovamente segnalata nelle località di Campo di Rovere e Val d'Arano (Ciaschetti, 2003). Poiché alcune prove preliminari avevano evidenziato la difficoltà dei semenzali ad accrescersi dopo la germinazione, sono state avviate alcune attività sperimentali volte a superare tali problematiche e a verificare la possibilità di impiego di alcune tecniche di coltura *in vitro* per la salvaguardia di questa specie, anche sulla base delle esperienze riportate da altri autori (Lamproye *et al.*, 1987; Pawlowska e Bach, 2003; Rybczynski e Mikula, 2006).

Materiale e metodi

I semi sono stati raccolti nel 2009 dal personale del Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga - Centro Ricerche Floristiche dell'Appennino, nel popolamento in località Campo di Rovere (AQ). Per il campionamento del seme è stato utilizzato un disegno completamente randomizzato, limitando il prelievo al 10% dei frutti presenti nel popolamento, composto da circa 200 individui in frutto.

In fase preliminare sono state effettuate analisi di base, inerenti parametri, quali purezza e peso di 1.000 semi, applicando i protocolli standard usualmente uti-

* maurizio.micheli@unipg.it

lizzati presso il laboratorio del C.N.B.F. di Pieve S. Stefano. È stato effettuato un confronto tra la capacità germinativa di semi non trattati e semi vernalizzati per 60 giorni a 4 °C, evidenziando l'effetto positivo del trattamento al freddo, che ha consentito di conseguire una germinazione quasi ottimale. Sulla scorta di tali informazioni è stata avviata la sperimentazione, allestendo tre prove distinte, volte a studiare, rispettivamente: l'effetto della vernalizzazione sulla germinabilità in condizioni di asepsi (prova 1); l'effetto della componente ormonale del substrato sulla proliferazione degli espianti *vitro*-derivati (prova 2); l'effetto dell'incapsulamento in alginato di calcio sul comportamento delle microtalee *vitro*-derivate (prova 3).

Prova 1: effetto della vernalizzazione sulla germinabilità dei semi di genziana in asepsi

Lotti di 100 semi sono stati opportunamente preparati e sottoposti a vernalizzazione, posizionando i semi in piastre Petri, adagiati su dischi di carta bibula inumidita con acqua. I contenitori, chiusi non ermeticamente, sono stati mantenuti in cella fredda (a circa 4 °C) per 5 differenti periodi di tempo: 0, 15, 30, 45 e 60 giorni. Al termine di ciascun periodo, tutti i semi sono stati sottoposti a trattamento sterilizzante, mediante immersione per 6 ore in una soluzione contenente Plant Preservative Mixture® (PPM) al 2%, addizionato di 3-4 gocce di bagnante (Tween 80®). Si è, quindi, dato seguito all'allestimento delle colture aseptiche su terreno agarizzato, costituito dalla componente nutritiva di MS (Murashige e Skoog, 1962), addizionato di saccarosio (5 g l⁻¹) e agar (7 g l⁻¹). Si è proceduto a differenziare due tipi di terreno, in base all'aggiunta, o meno, di PPM® (0,2%). I semi sono stati posizionati orizzontalmente sul terreno, all'interno di tubi di vetro (1 seme/tubo), contenenti ciascuno 5 ml di substrato. Dopo 30 giorni, sono stati effettuati i rilievi dei parametri scelti per la valutazione finale: emissione della radichetta (%); emissione delle foglie cotiledonari (%); sviluppo di plantule complete (%); osservazioni qualitative.

Prova 2: effetto della componente ormonale del substrato sulla proliferazione degli espianti vitro-derivati

Le plantule ottenute dalla germinazione dei semi vernalizzati per 60 giorni (prova 1) sono state posizionate su due terreni di coltura, caratterizzati dalla medesima componente nutritiva MS, ma differenziati per quella ormonale. Infatti, il substrato denominato MS1 è stato arricchito di 0,5 mg l⁻¹ di 6-benzilaminopurina (BAP) e di 0,05 mg l⁻¹ di acido indolbutirrico (IBA), mentre quello definito MS2 è stato addizionato di 2 mg l⁻¹ di BAP, di 0,1 mg l⁻¹ di IBA e di 1 mg l⁻¹

di acido giberellico (GA₃). Entrambi i terreni sono stati addizionati di saccarosio (30 g l⁻¹) e agar (7 g l⁻¹). Sono stati utilizzati vasi Magenta® (70x70x70 mm) contenenti ciascuno 50 ml di substrato e 5 plantule private della radichetta, allestendo 4 ripetizioni (vasi) per tesi, per un totale di 20+20 espianti. Le colture sono state mantenute in camera di crescita per 30 giorni, per ciascuna delle due subcolture consecutive previste. La valutazione finale è stata fatta rilevando il coefficiente di moltiplicazione ed effettuando osservazioni qualitative.

Prova 3: effetto dell'incapsulamento sul comportamento in vitro delle microtalee

Dal materiale proliferato sono state isolate porzioni uninodali di 3-4 mm di lunghezza (microtalee), private delle foglie, ma dotate di gemme ascellari (fig. 1). Le microtalee sono state suddivise in due lotti (120+120), di cui solo uno destinato ad incapsulamento. Inoltre, per ciascun lotto è stato previsto un periodo di stoccaggio a 4 °C per 0, 10, 20 e 30 giorni, impiegando, per ciascun trattamento 30 microtalee nude o incapsulate. Le microtalee sono state sottoposte al procedimento descritto da Standardi e Micheli (2010), che ha permesso di incapsularle in una matrice di alginato di calcio disciolto in un endosperma artificiale costituito dalla componente nutritiva MS2 (prova 2), ma a metà concentrazione e addizionata di 50 g l⁻¹ di saccarosio. Successivamente allo stoccaggio, sia le microtalee nude che quelle incapsulate sono state seminate in vasi di vetro da 500 ml (10/vaso) contenenti ciascuno 100 ml di un terreno costituito da MS, senza aggiunta di ormoni, addizionato di saccarosio (30 g l⁻¹) e agar (7 g l⁻¹). La semina è stata effettuata cercando sempre di rispettare la polarità delle

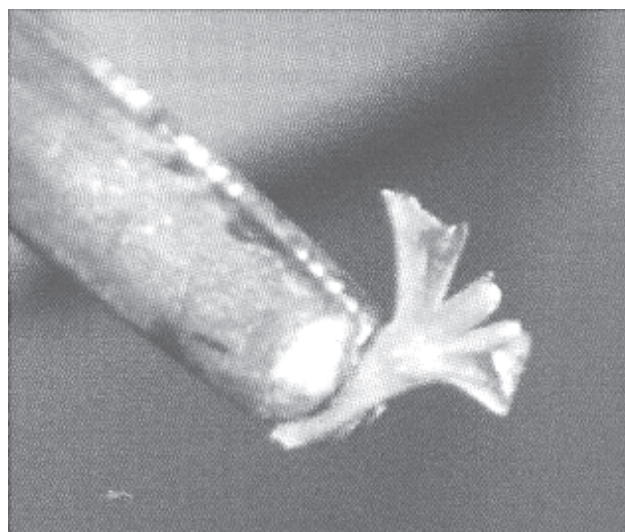


Fig. 1 - Microtalea di *Gentiana pneumonanthe*.
Fig. 1 - Microcutting of *Gentiana pneumonanthe*.

microtalee. Per ciascuna tesi a confronto sono state allestite in asepsi 3 repliche (vasi), mantenute per 30 giorni in camera di crescita. Al termine è stata effettuata la valutazione, analizzando i seguenti parametri: vitalità (microtalee che si presentavano verdi) (%); ripresa (microtalee che mostravano attività vegetativa) (%); conversione (microtalee che evolvevano in plantule) (%).

Tutte le prove

Per tutte le prove, i substrati, tamponati a pH 5,6, ed i contenitori sono stati sterilizzati in autoclave a 115°C per 20 minuti. Le colture sono state sempre posizionate in camera di crescita, condizionata ad una temperatura di 20±2 °C e caratterizzata da un fotoperiodo di 16 ore di luce, di intensità pari a 40 µmol m⁻² s⁻¹. I dati raccolti sono stati sottoposti alle procedure G.L.M. (General Linear Models) del S.A.S. (Statistical Analysis System) e la significatività saggiata mediante il test di Duncan ($\alpha < 0.05$).

Risultati e discussione

Prova 1: effetto della vernalizzazione sulla germinabilità dei semi di genziana in asepsi

L'analisi dei dati raccolti sembra mettere in evidenza un effetto dei diversi periodi di vernalizzazione sulla germinazione, che è risultata mediamente bassa in assenza del trattamento al freddo (35%), che invece, ove previsto, ha consentito di incrementare sensibilmente questo parametro, risultato pari al 70% dopo 30 giorni e 85% dopo 60 giorni di vernalizzazione. Nel corso della prova, l'emissione di foglie cotiledonari è sempre stata rilevata contestualmente allo sviluppo di plantule complete, mentre pochi semi hanno sviluppato solo la radichetta. Per quanto riguarda l'effetto della composizione del substrato, il PPM® sembra avere indotto un significativo decremento della germinazione (pari a -30%) nel caso dei semi non vernalizzati, fino a un valore pari al 5%, evidenziando una possibile sensibilità di questi al biocida. Per periodi di freddo più prolungati (60 giorni), tuttavia, la presenza di PPM® non sembra determinare variazioni significative.

Prova 2: effetto della componente ormonale del substrato sulla proliferazione degli espianti vitro-derivati

Il terreno più povero di ormoni (MS1) sembra aver indotto una moderata attività proliferativa, facendo riscontrare un coefficiente di moltiplicazione pari a 1,4, significativamente inferiore a quello registrato sul materiale proliferato su MS2 più ricco di fitoregolatori, che ha indotto un tasso di proliferazione pari a 3,1.

Oltre alla buona conformazione dei germogli sviluppati in asepsi, è stata registrata anche una rilevante radicazione pari al 95% su substrato MS1 e 69,3% su MS2, confermando quanto osservato da Pawłowska e Bach (2003), circa la buona attitudine rizogena di questa specie. Ciò ha consentito di ipotizzare di poter impiegare per la fase di ambientamento direttamente il materiale proveniente dalla moltiplicazione. Infine, in presenza di GA₃, è stato inoltre possibile osservare casi di fioritura *in vitro* (fig. 2), confermando quanto riportato da Mišić *et al.* (2001) e da Wang *et al.* (2009) che hanno messo in evidenza, in altre specie, una maggiore frequenza di fioritura *in vitro* a partire da semenzali germinati in asepsi.

Prova 3: effetto dell'incapsulamento sul comportamento in vitro delle microtalee

Le microtalee non incapsulate (nude), seminate subito dopo il prelievo hanno mantenuto una vitalità relativamente bassa (20%), statisticamente simile a quella delle microtalee stoccate per più tempo (30 giorni) (tab. 1). I propaguli nudi mantenuti a 4 °C per periodi intermedi (10 e 20 giorni) hanno, invece, fatto registrare valori significativamente superiori, pari rispettivamente a 43,3 e 50%, anche per quanto riguarda la ripresa. Si può ipotizzare che le microtalee di genziana presentano una bassa vigoria, indotta probabilmente dalle dimensioni ridotte (3-4 mm). Per quanto riguarda i propaguli incapsulati, emerge che la matrice di alginato non sembra averne significativamente condizionato l'attività vegetativa, facendo riscontrare una vitalità e una ripresa comprese tra il 16,6% del materiale seminato dopo 10 giorni di stoccaggio e il 40% di quello mantenuto al freddo per 20 giorni (tab. 1). Inoltre, alcune osservazioni visive consentirebbero di affermare che le microtalee incapsula-



Fig. 2 - Fioritura di germogli *vitro*-derivati.
Fig. 2 - Flowering of *vitro*-derived shoots.

Tab. 1 - Effetto dell'incapsulamento e dello stoccaggio sul comportamento delle microtalee.
 Tab. 1 - Effect of the encapsulation and the storage on the microcutting behaviour.

Tipologia di propaguli	Durata dello stoccaggio a 4°C (gg.)	Vitalità (%)	Ripresa (%)	Conversione (%)
Microtalee Nude	0	20,0 b	20,0 b	6,6 b
	10	43,3 a	43,3 a	6,6 b
	20	50,0 a	50,0 a	26,6 a
	30	30,0 b	30,0 b	26,6 a
Microtalee incapsulate	0	20,0 b	20,0 b	6,6 a
	10	16,6 b	16,6 b	10,0 a
	20	40,0 a	40,0 a	16,6 a
	30	23,3 b	23,3 b	13,3 a

Per ciascun tipo di propagulo i valori di ciascuna colonna seguiti da una lettera diversa sono diversi secondo il test di Duncan ($\alpha < 0,05$).

te, seminate senza stoccaggio, sembrano manifestare una maggiore rapidità di ripresa rispetto a quelle nude. Infine, molto interessante risulta quanto emerge relativamente alla conversione (tab. 1), del tutto spontanea, in quanto le microtalee non erano state preventivamente sottoposte ad alcun trattamento induttivo rizogeno, ma in grado di produrre plantule ben formate e vigorose da destinare direttamente alla fase di ambientamento (fig. 3). Questi dati sembrano parzialmente confermare quelli conseguiti in precedenti esperienze condotte da altri autori (Bach *et al.*, 2004) in merito alla possibilità di incapsulare espianti *vitro*-derivati di questa specie.

Conclusioni

La sperimentazione ha consentito di individuare un efficiente protocollo di germinazione in condizioni di



Fig. 3 - Ambientamento di una plantula ottenuta da una microtalea incapsulata.

Fig. 3 - Acclimatization of a plantlet obtained from an encapsulated microcutting.

asepsi, contribuendo inoltre ad implementare alcune conoscenze sull'effetto del freddo in relazione alla germinabilità della semente. La soddisfacente quantità di materiale ottenuto in asepsi è stata impiegata per individuare un protocollo di micropropagazione, comunque da ottimizzare, se si voglia disporre di un nuovo strumento per la salvaguardia e conservazione di *Gentiana pneumonanthe* L. Infine, si è inteso verificare la possibilità di allestire capsule di alginato di calcio con propaguli unipolari *vitro*-derivati (microtalee), quale strumento di semplificazione per lo stoccaggio e/o la conservazione a basse temperature del germoplasma di questa specie. I preliminari successi conseguiti consentono di ipotizzare l'impiego di questa tecnologia per integrare lo stoccaggio di breve-medio termine con le subcolture di proliferazione o di "crescita rallentata", nonché di poter allestire anche semi sintetici, una volta individuate opportune soluzioni metodologiche atte ad incrementarne la conversione.

Riassunto

Oggetto di studio è stata *Gentiana pneumonanthe* L. subsp. *pneumonanthe*, specie a rischio di "rarefazione" nell'Appennino centrale. Un periodo di stoccaggio a 4 °C per 30 e 60 giorni sembra contribuire positivamente alla germinazione dei semi, conseguita in condizioni di asepsi (prova 1). L'impiego del substrato nutritivo MS, arricchito di BAP, IBA e GA₃, ha fatto registrare un soddisfacente coefficiente di moltiplicazione (3,1) (prova 2). Infine, le microtalee di genziana, incapsulate in alginato, hanno mantenuto inalterata la loro vitalità e ripresa in almeno il 40% dei casi, dopo un periodo di stoccaggio (20 giorni) a basse temperature (prova 3).

Parole chiave: biodiversità, *Gentiana pneumonanthe*, micropropagazione, incapsulamento, stoccaggio.

Bibliografia

- BACH A., PAWLOWSKA B., MALIK M., 2004. *Plantlets from encapsulated meristems of Gentiana pneumonanthe L.* Acta Physiologiae Plantarum, 26(1): 53-57.
- CIASCHETTI G., 2003. *Segnalazioni floristiche italiane.* Informatore Botanico Italiano, 1062 35-1: 101-102
- LAMPROYE A., CREVECOEUR M., KEVERS C., GASPARD TH., 1987. *Multiplication vegetative in vitro de Gentiana lutea et de Gentiana pneumonante.* Ned. Fac. Landbuoww Rijkuniv Gent., 52: 1255-1257.
- MIŠIĆ D., DRAGICEVIĆ I., GRUBIŠIĆ D., CULAFIĆ L., 2001. *In vitro flowering shoot cultures of marsh gentian (Gentiana pneumonanthe L.).* Propagation of Ornamental Plants, 1(1): 54-56.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.* Phisyologia Plantarum, 15: 473-497.
- PAWLOWSKA B., BACH A., 2003. *In vitro propagation of protected species Gentiana pneumonanthe L. for ornamental horticultural use.* Folia Horticulturae 15(1): 113-122.
- RYBCZYŃSKI J.J., MIKULA A., 2006. *Engagement of Biotechnology in the protection of threatened plant species on Poland.* Biodiversity Research and Conservation, 3-4: 361-368.
- STANDARDI A., MICHELI M., 2010. *Biodiversità e propagazione.* Atti della Giornata di Studio "La biodiversità nell'Arboricoltura italiana" (20 aprile 2007, Palermo): 63-66.
- WANG Z.H., WANG S., YE Q.L., 2009. *High frequency early flowering from in vitro seedlings of Dendrobium nobile.* Scientia Horticulturae, 122: 328-331.

Crioconservazione di gemme incapsulate di *Quercus robur* L.: analisi di parametri biochimici correlati allo stress da disidratazione e congelamento

Enrico Gatti, Roberto Stancari e Elisabetta Sgarbi*

Dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti, Università di Modena e Reggio Emilia

Cryopreservation of *Quercus robur* L. encapsulated buds: analysis of biochemical parameters related to dehydration and freezing stress

Abstract. Cryopreservation plays a role of great importance in *ex situ* conservation of plants that produce recalcitrant seeds, like oaks. During the research, a protocol of micropropagation of *Q. robur*, based on the axillary bud proliferation of plantlets obtained by seed, was developed. Furthermore, freezing tests in liquid nitrogen were carried out by applying the encapsulation-vitrification technique. This consists in the inclusion of the buds in alginate beads and in their dehydration using a vitrification solution (PVS2) to protect the explants from lethal injury caused by the direct immersion in liquid nitrogen. In order to monitor possible damages to biological membranes due to the pre-treatments of chilling, dehydration and PVS2-loading, the levels of malondialdehyde, one of the metabolites derived from lipid peroxidation and the electrolyte leakage from the encapsulated buds were evaluated after each step of the protocol. Malondialdehyde values progressively increased after every treatment. Similar results were obtained following the trend of conductivity. Dehydration phase seems to be critical for oak buds. Based on these preliminary results, the study will continue with the aim to reduce cell injury and ensure an optimal recovery of oak explants after cryopreservation.

Key words: oaks, micropropagation, liquid nitrogen, encapsulation-vitrification, cell injury.

Introduzione

Dei grandi querceti mesofili che un tempo dominavano l'intero paesaggio della Pianura Padana rimangono solamente poche isole immerse in un contesto ecologicamente assai diverso, quello di un territorio fra i più antropizzati d'Italia. La riduzione del numero

di individui e delle popolazioni, la frammentazione degli areali e l'introduzione di specie alloctone sono solo alcune fra le cause della perdita di biodiversità che può portare alla progressiva scomparsa di numerosi genotipi. La tutela delle specie e delle risorse genetiche sotto forma di conservazione *ex situ* svolge un ruolo importante per affrontare la perdita di diversità vegetale; a questo riguardo la più alta percentuale delle accessioni è oggi conservata in Banche dei Semi, nelle quali i semi delle specie e delle varietà selezionate vengono prima disidratati e successivamente stoccati a basse temperature (Jaramillo e Baena, 2007). Da alcuni anni, alle tecniche tradizionali di conservazione *ex situ* si affiancano nuove metodiche come la crescita rallentata *in vitro* e la crioconservazione, applicate anche a specie che, come le querce, producono semi recalcitranti, intolleranti la disidratazione e le basse temperature. La crioconservazione consiste nello stoccaggio del materiale biologico a temperature ultra basse (-196 °C, temperatura dell'azoto liquido): il metabolismo e la divisione delle cellule sono bloccate consentendone il mantenimento per tempi indefinitamente lunghi. Per contro questa tecnica, se non correttamente applicata, presenta il rischio della perdita di vitalità del germoplasma conservato; fra i principali danni da congelamento ricordiamo la formazione di cristalli intra- ed extra-cellulari, l'aumento delle concentrazioni dei soluti citoplasmatici, la plasmolisi e i danni osmotici legati all'alterazione della semipermeabilità delle membrane biologiche (Reed, 2008). Per ovviare a questi problemi gli espunti, prima del congelamento, possono essere sottoposti a trattamenti che inducono crioprotezione e disidratazione, con conseguente vitrificazione delle cellule durante l'ultra-raffreddamento in azoto liquido; la vitrificazione consiste in un progressivo aumento della concentrazione dei soluti intracellulari e della conseguente viscosità cellulare. Il citoplasma viene ad assumere uno stato amorfo metastabile, incapace di formare cristalli anche durante un rapido congelamento (Benson, 2008a; Lambardi e De Carlo, 2009). I trattamenti vitrificanti, tuttavia, possono essere essi stessi responsabili della perdita di vitalità degli

* elisabetta.sgarbi@unimore.it

espianti a causa di disidratazione insufficiente o eccessiva, dovuta all'applicazione di protocolli non ottimali o alla tossicità dei composti chimici utilizzati (Benson, 2008b; Sakai *et al.*, 1991).

Nel corso della ricerca sono state allestite prove di crioconservazione in azoto liquido di gemme incapsulate di *Q. robur*, prima mantenute una settimana a 4 °C per favorire la sintesi di sostanze naturali crioprotettive e poi pre-trattate con la soluzione osmoprotettiva LS (Loading Solution) (Sakai e Engelmann, 2007) e con la soluzione PVS2 (*Plant Vitrification Solution* n. 2) (Sakai *et al.*, 1991). Sono stati valutati parametri biochimici correlabili ai possibili danni osmotici e meccanici a carico delle membrane biologiche. Parallelamente è stato messo a punto un protocollo di micropropagazione in grado di garantire il recupero degli espanti dopo lo scongelamento.

Materiali e metodi

Giovani piante di *Q. robur* sono state ottenute da ghiande raccolte durante i mesi di settembre e ottobre 2010, da esemplari selezionati di farnie adulte coltivate in parchi pubblici e viali cittadini di Modena e Reggio Emilia. Dalle piantine, una volta raggiunta l'altezza di 20-25 cm, erano prelevati segmenti nodali di 5-6 mm recanti una gemma ascellare, utilizzati come espanti.

Micropropagazione

Per le prove di micropropagazione gli espanti sono stati lavati, sterilizzati in etanolo per 2 min e in ipoclorito di sodio (2% di Cl attivo) con Tween allo 0,1% per 15 min ed infine risciacquati tre volte in acqua sterile. Le gemme erano poste su substrato di coltura WPM (McCown Woody Plant Medium, Duchefa) con Plant Agar 6 g/l, arricchito con vitamine (Nitsch Vitamin Mixture, Duchefa), saccarosio (20 g/l), acido 1-naftalenacetico (NAA) 0,01 mg/l e due diverse concentrazioni di 6-benziladenina (BA), 0,5 e 1 mg/l, con e senza carbone attivo (CA) alla dose di 2 g/l. Una volta trasferite sul substrato di coltura, 10 espanti per capsula Petri, le gemme erano mantenute in cella climatica a 23±2 °C con fotoperiodo di 16 h.

Criotrattamento

Per le prove di crioconservazione si è fatto riferimento ai protocolli proposti da Sakai e Engelmann (2007) e da Sakai *et al.* (2008). Gli espanti sono stati prima incapsulati (WPM con BA 0,5 mg/l e alginato di Na al 3%, con le capsule successivamente indurite in 100 mM di CaCl per 25 min) ed in seguito mantenuti al buio per una settimana a 4 °C su WPM con BA

0,5 mg/l (pretrattamento di *chilling*). La vitrificazione è stata eseguita sottoponendo gli espanti incapsulati ad un trattamento di osmoprotezione con LS (saccarosio 0,4 M in glicerolo 2M) per 30 min a 25 °C, seguito da immersione in PVS2 (30% (p/v) glicerolo, 15% (p/v) etilenglicole e 15% (p/v) dimetilsulfossido in WPM con saccarosio 4 M) per 60 min a 0-4 °C (Protocollo 1) oppure per 90 min a 25 °C (Protocollo 2). A seguito della vitrificazione in PVS2, le gemme incapsulate erano trasferite in cryovials (contenenti PVS2) e subito congelate in azoto liquido per almeno un'ora; dopo lo scongelamento a 40 °C per 2 min, erano reidratate per immersione in WPM liquido con saccarosio 1,2 M per 25 min a temperatura ambiente.

Test MDA (*malondialdeide*)

La determinazione del contenuto di MDA è stata eseguita in accordo con il metodo proposto da Harding e Benson (1995), 15 ore circa dopo il termine di ciascun trattamento. Gli espanti (20 mg), estratti dalle capsule di alginato, erano immersi in 2 ml di una soluzione 50:50 di acqua distillata e TBA (acido tiobarbiturico allo 0,5% in acido tricloroacetico al 20%) e tenuti a bagnomaria a 100 °C per 25 min; la reazione era bloccata con il trasferimento in ghiaccio per 5 min. I campioni erano centrifugati per 10 min a 1000 x g a temperatura ambiente e il sovrantante utilizzato per la lettura dell'assorbanza a 532 e 600 nm (Spettrofotometro Bekman DU 65). La quantità di MDA era calcolata usando un coefficiente di estinzione di 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

Test MEL (*Meristem Electrolyte Leakage*)

10 espanti incapsulati erano lavati velocemente in 20 ml di acqua distillata per 2 min, immersi in 10 ml di acqua distillata in tubi di vetro e posti in incubazione per 10 min su un agitatore orizzontale a 100 rpm. I valori di conducibilità (espressi in µSiemens), rilevati al termine dell'incubazione con una sonda TETRA-CON 325 collegata a un conduttimetro WTW COND 3110, erano poi divisi per una costante (0,475) al fine di ricavare i valori di conduttanza assoluta del campione, ai quali era sottratto il valore di background dell'acqua misurato all'inizio di ogni prova (Verleyesen *et al.*, 2004).

I valori MDA e MEL sono stati determinati dopo il prelievo delle gemme dalla pianta madre (Controllo), solo per MDA dopo il trattamento di *chilling* (Post *chilling*), dopo la vitrificazione (Post *disid*) e dopo il congelamento (Post *crio*). Solo per MEL sono stati determinati i valori dopo lo scongelamento, senza applicare alcun trattamento crioprotettivo agli espanti (Controllo *crio*).

Analisi statistica

Per tutti gli esperimenti sono state allestite 2-3 prove effettuate in triplicato. Per l'analisi statistica dei dati è stato applicato il test della varianza (ANOVA) ad un fattore per evidenziare differenze significative fra i gruppi confrontati. Per le prove di micropropagazione i confronti tra le medie dei gruppi di trattamento sono stati effettuati applicando il test di Bonferroni.

Risultati e discussione

Per quanto concerne la micropropagazione, i dati riportati in figura 1 mostrano che la concentrazione di BA ottimale per lo sviluppo delle gemme è di 0,5 mg/l, confermando quanto riportato in letteratura riguardo il range ottimale di questa citochinina per la propagazione *in vitro* di *Q. robur* (Gebhardt et al., 1993; Ostrolucká et al., 2007; Puddephat et al., 1997; Vieitez et al., 1985; Zago e Gorian, 1994). Numerosi lavori sperimentali hanno evidenziato che gli espianti di specie ad habitus arboreo producono e rilasciano nel mezzo colturale notevoli quantità di fenoli che si ossidano, provocano l'imbrunimento e inibiscono la crescita degli espianti stessi. Solitamente l'aggiunta al substrato di sostanze antiossidanti (come l'acido ascorbico) o di molecole adsorbenti (come il PVP,

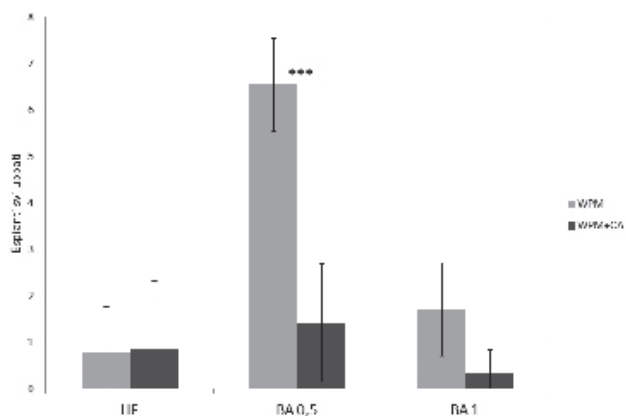


Fig. 1 - Effetto delle differenti condizioni colturali sullo sviluppo di gemme ascellari di quercia. Viene riportato il valore medio riferito a 60 espianti per trattamento (due prove in triplicato, 10 espianti per ogni replicato). HF: substrato WPM senza ormoni; BA 0,5: substrato WPM con NAA 0,01 mg/l e BA 0,5 mg/l; BA 1: substrato WPM con NAA 0,01 mg/l e BA 1 mg/l, WPM+CA: WPM con l'aggiunta di carbone attivo 2g/l. F significativo per $p < 0,001$ (***) ; valori medi dei gruppi confrontati applicando il test di Bonferroni ($P = 0,05$).

Fig. 1 - Effect of different cultural conditions on axillary buds development of oak. The average value referred to 60 explants (two tests in triplicate, 10 explants for each replicate) is reported. HF: WPM medium without hormones; BA 0,5: WPM medium with NAA 0,01 mg/l and BA 0,5 mg/l; BA 1: WPM medium with NAA 0,01 mg/l and BA 1 mg/l, WPM+CA: WPM with the addition of active carbons 2g/l. F significant for $P < 0,001$ (***) ; mean values of groups compared using the Bonferroni test ($P = 0,05$).

PVPP o il carbone attivo) contrasta efficacemente il processo di imbrunimento consentendo un corretto sviluppo degli espianti (Romano e Martins-Loução, 1992; Ostrolucká et al., 2007). Nel nostro sistema sperimentale non si è verificato imbrunimento delle gemme né rilascio di fenoli, solitamente visualizzabili come aloni scuri alla base degli espianti, anche dopo 4-5 settimane di coltura su substrati senza CA. L'aggiunta di CA al substrato di coltura con NAA a 0,01 mg/l e BA a 0,5 mg/l sembra peraltro esercitare un effetto negativo, come dimostra la diminuzione significativa del numero di gemme sviluppate su questo substrato. Poiché le gemme erano prelevate da giovani piante si può ipotizzare che il rilascio di fenoli avvenga solo in minima parte e che l'utilizzo di un substrato appositamente formulato per le piante legnose abbia svolto un ruolo positivo nel prevenire l'imbrunimento. D'altro canto, il CA potrebbe aver diminuito la disponibilità di nutrienti, svolgendo un'eccessiva attività di adsorbimento.

Per quanto concerne i test MDA e MEL, i risultati ottenuti sono mostrati in figura 2 e 3, rispettivamente. Concentrazioni di malondialdeide progressivamente più alte sono state registrate dopo ogni *step* per entrambi i protocolli applicati; un aumento significativo dei valori è stato registrato dopo il trattamento di *chilling* rispetto al controllo e dopo la disidratazione-

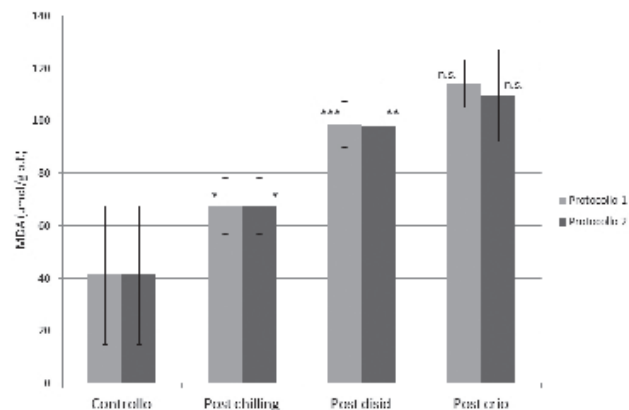


Fig. 2 - Contenuto di MDA nelle gemme dopo il prelievo dalla pianta (controllo) e dopo ciascuno dei trattamenti potenzialmente stressanti effettuati su gemme incapsulate. Protocollo 1: LS per 30 min a 25 °C, PVS2 per 60 min a 0-4 °C; Protocollo 2: LS per 30 min a 25 °C, PVS2 per 90 min a 25 °C. I valori relativi ad ogni trattamento sono stati confrontati con il precedente. F significativo per $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) o non significativo (n.s.) al test ANOVA.

Fig. 2 - MDA content in buds after the excision from the seedling (control) and after every potentially stressing treatment applied on encapsulated buds. Protocollo 1: LS for 30 min at 25 °C, PVS2 for 60 min at 0-4 °C; Protocollo 2: LS for 30 min at 25 °C, PVS2 for 90 min at 25 °C. The values relative to each treatment were compared with the previous. F significant for $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) or non significant (n.s.) at the ANOVA test.

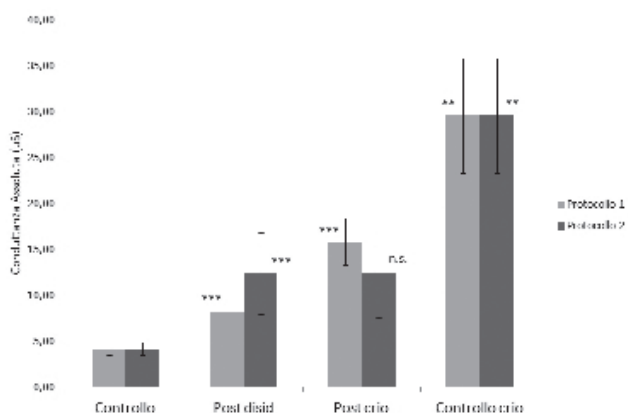


Fig. 3 - Valutazione del MEL test applicato alle gemme dopo il prelievo dalla pianta (controllo) e) e dopo ciascuno dei trattamenti potenzialmente stressanti effettuati su gemme incapsulate. Protocollo 1: LS per 30 min a 25 °C, PVS2 per 60 min a 0-4 °C; Protocollo 2: LS per 30 min a 25 °C, PVS2 per 90 min a 25 °C. I valori relativi ad ogni trattamento sono stati confrontati con il precedente. F significativo per $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) o non significativo (n.s.) al test ANOVA.

Fig. 3 - Evaluation of the MEL test applied to buds after the excision from the seedling (control) and after every potentially stressing treatment applied on encapsulated buds. Protocollo 1: LS for 30 min at 25 °C, PVS2 for 60 min at 0-4 °C; Protocollo 2: LS for 30 min at 25 °C, PVS2 for 90 min at 25 °C. The values relative to each treatment were compared with the previous. F significant for $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) and $p < 0,001$ (***) or non significant (n.s.) at the ANOVA test.

vitrificazione. Non sono emerse differenze tra i due protocolli, mentre è da sottolineare l'ampia variabilità interna ai campioni del controllo. Questi risultati mostrano chiaramente come i trattamenti effettuati per la preparazione delle gemme al congelamento in azoto siano stressanti, con un presumibile avvio di reazioni di perossidazione lipidica a carico delle membrane biologiche difficilmente controllabili. I livelli rilevati nelle gemme di quercia espiantate (controllo) sono comunque più bassi di quelli osservati in gemme di azalea poste in analoghe condizioni (Verleysen *et al.*, 2004). Per quanto riguarda il MEL test sono stati osservati valori differenti di conduttanza assoluta relativamente ai due protocolli di disidratazione (fig. 3). Per il protocollo 1 sono stati rilevati aumenti significativi dopo ogni *step*. L'applicazione del protocollo 2 sembra indurre un aumento significativo della conduttanza durante la disidratazione ma poi i valori rimangono simili anche dopo il criotattamento. La disidratazione-vitrificazione condotta a 25 °C per 90 min è evidentemente critica per le gemme e forse esercita un'eccessiva disidratazione dei campioni. Tuttavia se si confrontano i due protocolli non emergono significative differenze tra i valori di conduttanza registrati dopo la disidratazione e dopo il criotattamento (dati non mostrati). E' in ogni caso possibile attribuire un ruolo protettivo dei trattamenti

di preparazione degli espianti, poiché i valori maggiori di conduttanza si sono registrati in gemme immerse in azoto liquido senza alcun pre-trattamento.

Come già sottolineato da Verleysen *et al.* (2004), il test MEL sembra essere più sensibile del test MDA e dunque più utile per monitorare velocemente l'esito di ciascuno *step* dell'articolato protocollo di preparazione degli espianti al trattamento di crioconservazione; inoltre si rivela di grande utilità nel caso di espianti a lenta ricrescita dopo il congelamento, per i quali occorre aspettare molte settimane prima di poter valutarne la vitalità.

Conclusioni

Pur configurandosi come la fase preliminare di un progetto più ampio volto alla crioconservazione di farnia e di altre specie del genere *Quercus*, la presente ricerca ha raggiunto due risultati importanti: adattare i protocolli di micropropagazione presenti in letteratura alle esigenze di genotipi locali di farnia e fornire una valutazione sugli *step* critici del protocollo di crioconservazione. Nel corso della presente ricerca è emerso che molte variabili possono incidere sull'esito dei complessi protocolli applicati e che alcuni passaggi della sperimentazione sono ancora poco efficienti per la conservazione in azoto liquido di espianti di farnia. Particolare attenzione dovrà essere rivolta a testare differenti tecniche di disidratazione degli espianti prima del congelamento e alla fase finale di recupero degli espianti stessi, comparando diverse condizioni culturali.

Ringraziamenti

Si ringraziano il Sig. Giancarlo Urso del C.I.G.S. (Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti) dell'Ateneo di Modena e Reggio Emilia per il prezioso aiuto nell'allestimento del Laboratorio di Criogenia e la Dott. Eleonora Santoro per la collaborazione fornita nelle prove di crioconservazione.

Riassunto

La crioconservazione svolge un ruolo di grande importanza nella conservazione *ex situ* di piante che, come le querce, producono semi recalcitranti. Nel corso della ricerca è stato messo a punto un protocollo di micropropagazione da gemme di *Q. robur* e sono state effettuate prove di crioconservazione utilizzando la tecnica dell'incapsulazione-vitrificazione. L'aumento dei livelli di metaboliti derivanti dalla perossidazione lipidica e degli elettroliti rilasciati a

seguito di un'alterata permeabilità delle membrane, sono stati correlati allo stress indotto dai trattamenti di *chilling*, disidratazione e vitrificazione e dal congelamento in azoto liquido di espianti incapsulati in alginato.

Parole chiave: azoto liquido; danno cellulare; incapsulazione-vitrificazione; micropropagazione; querce.

Ricerca condotta nell'ambito del Progetto CrioBanca del Germoplasma UNIMORE, finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Reggio Emilia "Pietro Manodori".

Bibliografia

- BENSON E.E., 2008a. *Cryopreservation theory*. In: Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Springer (New York): 15-30.
- BENSON E.E., 2008b. *Cryopreservation of Phytodiversity: A critical appraisal of theory & practice*. Critical Reviews in Plant Sciences 27 (3): 141-219.
- GEBHARDT K., FRÜHWACHT-WILMS U., WEISGERBER, 1993. *Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes*. Ann. Sci. For. 50, suppl 1: 323-329.
- HARDING K., BENSON E.E., 1995. *Biochemical and molecular methods for assessing damage, recovery and stability in cryopreserved plant germoplasm*. In: Genetic Preservation of Plant Cells *in vitro*. Springer (Berlin): 113-167.
- JARAMILLO S., BAENA M., 2007. *Ex situ conservation of plant genetic resources: training module*. Bioersivity Int.: 42-51.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., 2009. *Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale*. Italus Hortus 16: 79-98.
- OSTROLUCKÁ M.G., GAJDOŠOVÁ A., LIBIAKOVÁ G., 2007. *Protocol for micropropagation of Quercus spp.* In: Protocol for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Springer (Dordrecht), pp. 85-91.
- PUDDEPHAT I.J., ALDERSON P.G., WRIGHT N.A., 1996. *Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of Quercus robur L. in vitro*. J. Exp. Bot., 48: 951-962.
- REED B.M., 2008. *Cryopreservation. Practical consideration*. In: Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer (New York), pp. 3-11.
- ROMANO A., MARTINS-LOUÇÃO M.A., 1992. *Micropropagation of mature cork-oak (Quercus suber L.): establishment problems*. Scientia gerundensis 18: 17-27.
- SAKAI A., ENGELMANN F., 2007. *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review*. Cryoletters 28(3): 151-172.
- SAKAI A., HIRAI D., NIINO T., 2008. *Development of PVS-Based vitrification and Encapsulation-vitrification protocols*. In: Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer (New York), pp. 33-51.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1991. *Survival by vitrification of nucellar cell of navel orange (Citrus sinensis var. brasiliensis Tanaka) cooled to -196°C*. Plant Physiol. 9: 30-33.
- VERLEYSEN H., SAMYN G., VAN BOCKSTAELE E., DEBERGH P., 2004. *Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 77: 11-21.
- VIEITEZ A.M., SAN-JOSE M.C., VIEITEZ E., 1985. *In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature Quercus robur, L. J. Hortic. Sci. Biotech.* 60: 99-106.
- ZAGO L., GORIAN F., 1994. *Propagazione vegetative in vitro di semenzali di Quercus robur L.* Monti e Boschi 5: 31-35.

Micropropagazione di specie aromatiche dell'Isola d'Elba

Laura Pistelli^{1*}, Cecilia Noccioli², Roberta Celata¹, Francesca D'Angiolillo¹ e Luisa Pistelli²

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

² Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Pisa

Micropropagation of endemic species of Elba island

Abstract. Elba island belongs to the archipelago Toscano, the largest marine Park in Europe, influenced by the Mediterranean climate. Its vegetation is characterised by several aromatic species used as traditional food and cosmetics, in phytotherapy and aromatherapy. The plants are usually collected in wild field, inducing a impoverishment of the natural habitat. The aim of this study is to utilize micropropagation technique, commonly used for massive production of plants, for the conservation of the germoplasm of selected species typical of these islands: *Calamintha nepeta* L., *Crithmum maritimum* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Myrtus communis* L., *Nepeta cataria* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Satureja hortensis* L. The main type of explants used have been either microcutting (vegetative apical portions), in some case axillary buds, or internodes. After sterilization, the explants were placed on suitable culture media for growth. Sterilization percentage and multiplication rate were measured, indicating that some wild plants were difficult to sterilize, but others were well *in vitro* propagated. The detection of head-space components produced from the *in vitro* plantlets looks similar to that known in wild type plants. Micropropagation of these aromatic plants will play a role for protection of ecosystem but also an additional use, as "babyplants", a token gift for tourist customers.

Key words: *in vitro* cultures, volatile organic compounds, sterilization percentage, plantlet multiplication rate, "babyplants".

Introduzione

L'isola d'Elba (Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano) ospita una flora tipica della macchia mediterranea caratterizzata da numerose piante spontanee aromatiche che contengono metaboliti secondari, tra

cui gli oli essenziali, utilizzati sia a scopo alimentare e cosmetico, sia in aromaterapia, che in fitoterapia (Rinaldi, 2001). Si rende quindi necessario tutelare il territorio dall'impovertimento delle specie aromatiche, salvaguardando il germoplasma, adottando nuove tecniche colturali per una produzione agricola sostenibile, anche diffondendo la coltura controllata artificiale (micropropagazione) per nuove applicazioni anche non tradizionali. La micropropagazione si presenta come una valida alternativa alle normali tecniche di coltivazione, per i numerosi vantaggi che presenta (Lucchesini e Mensuali-Sodi, 2010).

L'obiettivo di questa ricerca, inserita nel progetto IT-FR Marittimo "PYRGI Strategia d'impresa in settori di nicchia per l'economia agroindustriale del mediterraneo", è quindi la produzione *in vitro* di piante aromatiche dell'arcipelago, da destinare a diversi usi, per potenziare l'imprenditoria locale. Tra le numerose piante aromatiche dell'arcipelago (Rinaldi, 2001) sono state quindi selezionate e raccolte: nepetella o mentuccia comune (*Calamintha nepeta* L.), finocchio marino (*Crithmum maritimum* L.), lavanda selvatica (*Lavandula angustifolia* Miller), mirto (*Myrtus communis* L.), erba dei gatti (*Nepeta cataria* L.), rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), santoreggia domestica (*Satureja hortensis* L.). Gli espianti sono stati opportunamente sterilizzati e messi a moltiplicare su selezionati mezzi di coltura e i germogli ottenuti sono stati analizzati tramite tecnica SPME (Solid Phase Micro Extraction) per valutare la produzione di sostanze aromatiche *in vitro*.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

Calamintha nepeta L., *Crithmum maritimum* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Myrtus communis* L., *Nepeta cataria* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Satureja hortensis* L. sono state raccolte nell'isola d'Elba e mantenute in vaso per acclimatazione. I semi di alcune specie impiegate sono stati gentilmente forniti dalla ditta SAIS, Cesena Italia.

* lpistelli@biologia.unipi.it

Micropropagazione

Diversi tipi di espianti (germogli apicali, basali, internodi, e semi) sono stati sterilizzati secondo le metodiche riportate in tabella 1. La propagazione è avvenuta impiegando i mezzi di coltura riportati nella tabella 1. Le piantine sono state mantenute alla temperatura di 22 ± 1 °C con irradianza di $80 \mu\text{M s}^{-1} \text{m}^{-2}$ radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) ad un fotoperiodo di 16 ore di luce/8 ore di buio. Gli espianti sono stati trasferiti regolarmente su nuovo mezzo di coltura in contenitori Magenta ogni 4 settimane.

Analisi della componente volatile

Gas cromatografia: strumento HP 5890 Series II Plus; colonne capillari HP-Wax e HP-5MS (30m x 0,25mm; film rivestimento 0,25 μm); temperatura iniettore e detector: 250 °C; temperatura del forno: da 60 °C (10 min) a 220 °C a 5 °C/min; gas di trasporto: N_2 (2 ml/min); detector FID; split: ratio 1:30; vol. iniezione: 0,5 μl . L'identificazione dei componenti è stata effettuata su entrambe le colonne, confrontando i tempi di ritenzione dei singoli componenti con quelli di campioni puri autentici e dei loro indici di ritenzione relativi alla serie di *n*-alcani.

Gas cromatografia-massa: strumento HP 5890 Series II Plus, colonna capillare HP-5MS (30m x 0,25mm; film rivestimento 0,25 μm); detector di massa HP 5972; temperatura iniettore e detector: 220 °C e 280 °C rispettivamente; temperatura del forno da 60 °C (10 min) 20 °C/min; gas di trasporto: He (0,6 ml/min); sorgente: 70eV. L'identificazione dei componenti è avvenuta mediante analisi computerizzata degli spettri di massa, dei tempi di ritenzione ed indici di ritenzione, confrontati con i dati presenti sia nella libreria elaborata dal nostro gruppo di ricerca attraverso campioni di riferimento e olii essenziali noti, sia nelle librerie di spettri di massa NBS-75 e Wiley, sia con dati presenti in letteratura (Adams, 1995; Connolly and Hill, 1991; Swigar e Silverstein, 1981).

Analisi SPME: l'analisi SPME (*Solid Phase Micro Extraction*) è stata condotta con un dispositivo munito di fibra in polidimetilsilossano (SUPELCO, PDMS, 100 μm) per campionare (15 min) la frazione volatile formata sopra un campione di materiale vegetale fresco chiuso ermeticamente in una beuta e lasciato equilibrare per 30 min. Alla fine del tempo di campionamento, la frazione adsorbita è stata sottoposta ad analisi GC e GC-MS.

Tab. 1 - Micropropagazione semplice di specie aromatiche dell'isola d'Elba. Protocolli efficaci di sterilizzazione, vitalità degli espianti post-sterilizzazione *in vitro* (dopo 2 settimane), mezzo di coltura e tasso di moltiplicazione a fine ciclo di subcultura (4 settimane).

Tab. 1 - Simple micropropagation of aromatic species of Elba island. Suitable protocols of sterilization and viability of *in vitro* explants (after 2 weeks of sterilization) Proliferation media and multiplication rate (number of shoots per explants per subculture cycle, 4 weeks).

Specie vegetale	Tipo di espianto	Sterilizzazione	Vitalità	Mezzo	Tasso di moltiplicazione
<i>Calamintha nepeta</i> L.	internodi	Steril A	50.00%	Medium A	4
<i>Crithmum maritimum</i> L.	Porzioni basali	Steril D	100	Medium A	3
<i>Crithmum maritimum</i> L.	Porzioni basali	Steril D	100	Medium D	9
<i>Lavandula angustifolia</i> L.	internodi	Steril B	80.00%	Medium B	3
<i>Myrtus communis</i> L.	Porzioni apicali	Steril B	100.00%	Medium A	3
<i>Myrtus communis</i> L.	internodi	Steril B	100.00%	Medium A	2
<i>Nepeta cataria</i> L.	semi	Steril D	50.00%	Medium A	6
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	internodi	Steril E	100	Medium C	1
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Porzioni apicali	Steril E	80	Medium C	1
<i>Salvia officinalis</i> L.	semi	Steril D	20	Medium A	2
<i>Satureja hortensis</i> L.	Porzioni apicali	Steril E	80.00%	Medium A	1
<i>Satureja hortensis</i> L.	semi	Steril D	70	Medium A	1

Mezzi di sterilizzazione

- Steril A: Tween 20 0.05% 20 min, NaOCl 50% 10 min, acqua sterile 5 min ad ogni fase
- Steril B: Tween 20 0.05% 20 min, EtOH al 70%, 1 min, ACE commerciale 50% 10 min, acqua sterile 5 min ad ogni fase
- Steril D: ACE commerciale 20% 10 min, Plant preservative mixture (PPM) 2%, MgSO_4 50 mg/L, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 50 mg/L, MgCl_2 50 mg/L 18 h 24 °C, acqua sterile 5 min ad ogni fase
- Steril E: saccarosio 20 g/L, ACE commerciale 0,01%, 15 giorni al buio; Tween-20 0.05% 20 min, EtOH 70%, 1 min, ACE commerciale 50% 10 min, acqua sterile 5 min ad ogni fase

Substrati di crescita

- Medium MS0: mezzo Murashige e Skoog (1962) vitamine MS, saccarosio 3%, agar 0,8%, PPM 0,05%, pH 5.5.
- Medium A: MS0 + BA 0,5 g/L
- Medium B: MS0 + BA 0,5 g/L + NAA 0,46 g/L
- Medium C: MS0 + BA 0,5 g/L + IAA 0,017 g/L
- Mezzo D: MS, saccarosio 20%, + BA 0,5 g/L + IAA 0,017 g/L + NH_4NO_3 1 g/L + KNO_3 1,5 g/L +

Risultati e discussione

Micropropagazione delle specie aromatiche

Le specie aromatiche selezionate per questo lavoro sono state prelevate in diverse zone dell'isola d'Elba e allevate in vaso prima del loro utilizzo. In tabella 1 sono elencati i diversi espianti utilizzati ed i relativi mezzi di sterilizzazione che hanno fornito i migliori risultati di vitalità. Gli espianti di *C. maritimum* e di *M. communis* sono risultati i più facilmente sterilizzabili, raggiungendo la totalità di espianti non inquinati e vitali, come noto in letteratura (Grigoriadou e Maloupa 2008; Ruffoni e Mascarello 2009).

Una buona percentuale di successo è stata rilevata anche per *R. officinalis* (metodo E, 80-100%), per internodi di *L. angustifolia* (metodo B, 80%) e per porzioni apicali di *S. hortensis* (metodo E, 80%). Il metodo E, che prevedeva una forzatura degli espianti mediante un pretrattamento con saccarosio per 15 giorni, ha confermato la sua validità già nota per altre specie della macchia mediterranea (Ruffoni e Mascarello, 2009). I semi sono stati impiegati per *S. officinalis*, *N. cataria* e *S. hortensis*, poichè gli espianti raccolti dalle piante spontanee non hanno dato risultati sperati. I semi di *N. cataria* e *S. hortensis* hanno mostrato una media germinabilità, risultata scarsa per quelli di *S. officinalis*, che però non sono stati pretrattati con fitoregolatori.

Gli espianti vitali sono stati propagati scegliendo semplici substrati di crescita ed il tasso di moltiplica-

zione dei germogli è stato valutato alla fine del ciclo di subcultura (tab. 1). I due tipi di espianti di *C. maritimum* hanno prodotto il numero più elevato di germogli, utilizzando un mezzo addizionato di citochinine (medium A) e auxine (medium D) (Grigoriadou e Maloupa 2008). Il *M. communis* ha proliferato discretamente pur con un substrato più semplice (medium A) di quelli noti in letteratura (Ruffoni e Mascarello 2009). Il medium A ha fornito discreti risultati anche per la proliferazione di *L. angustifolia* e di *S. officinalis*. e con i germogli provenienti da semi *N. cataria*, impiegando ridotte concentrazioni di fitoregolatori rispetto a quelle note per il genere *Nepeta* (Nestorović et al. 2010). *R. officinalis* ha proliferato molto poco pur adottando un mezzo arricchito, confermando quanto già noto (Misra e Chaturvedi 1984). Infine la moltiplicazione di *S. hortensis* è stata ottenuta sia da semi che da giovani germogli, confermando quanto noto in *S. obovata*, che le porzioni di piante mature sono poco adatte alla propagazione (Arrebola 1997).

Analisi dei composti volatili delle piantine coltivate in vitro

I principali composti identificati negli spazi di testa delle specie analizzate sono riportati nella tabella 2. Le frazioni volatili delle specie in esame sono caratterizzate prevalentemente da composti monoterpenici, soprattutto alifatici. Nel caso di *C. maritimum*, *L. angustifolia*, *M. communis*, *R. officinalis*, *S. officinalis* e *S. hortensis* le piantine moltiplicate *in vitro*

Tab. 2 - Costituenti principali identificati nello spazio di testa delle specie esaminate.
Tab. 2 - Main constituents identified in head space of examined species.

Composto	KI	Cal	Cri	Lav	Myr	Nep	Ros	Sal	Sat
α -pinene	940				65,0		24,7	14,6	
Camphene	955						12,2		
sabinene	978		14,5						
β -pinene	981	42,4						17,0	
mircene	993						12,0		
<i>p</i> -cimene	1028								15,6
limonene	1032	15,0							
1,8-cineolo	1036			11,9					
γ -terpinene	1062		31,6						29,0
α -thujone	1109							20,5	
metiltimolo	1235		20,3		7,2				
cariofillene	1418			19,3	6,8	47,6			20,0
aromadendrene	1445					6,6			
<i>cis</i> -muurolo-3,5-diene	1448	13,9							
germacrene D	1481			8,5					
β -selinene	1485					8,4			

Cal: *Calamintha nepeta*; Cri: *Crihnum maritimum*; Lav: *Lavandula angustifolia*; Myr: *Myrtus communis*; Nep: *Nepeta cataria*; Ros: *Rosmarinus officinalis*; Sal: *Salvia officinalis*; Sat: *Satureja hortensis*.

possedevano una composizione corrispondente a quella degli spazi di testa o degli oli essenziali ottenuti da piante autoctone coltivate in vaso o cresciute spontaneamente (Özcan *et al.* 2006; Flamini *et al.* 2004; Zawirska-Wojtasiak e Wasowicz 2009; Longaray Delamare *et al.* 2007; Sefidkon *et al.* 2006). Lo spazio di testa di *N. cataria* ha mostrato la presenza di una considerevole frazione sesquiterpenica qualitativamente differente da quella riportata in letteratura (Gilania *et al.* 2009). Solo nel caso di *C. nepeta* i costituenti identificati nello spazio di testa si sono rivelati diversi da quelli noti in letteratura, che riportavano il piperitone ossido come composto principale (25,4%) (De Pooter *et al.* 1986).

Conclusioni

I risultati raccolti indicano che il protocollo di sterilizzazione è risultato legato alla specie vegetale ed al tipo di espianto utilizzato. Le piante prescelte mostrano un tasso di moltiplicazione variabile ma sufficiente per un impiego di questa tecnica nel settore vivaistico delle piante officinali e per mantenere il germoplasma. Nelle analisi dello spazio di testa le piantine moltiplicate *in vitro* hanno mostrato, nella maggior parte dei casi, una composizione quali-quantitativa analoga a quella conosciuta di piante autoctone coltivate in vaso o cresciute spontaneamente.

Riassunto

L'obiettivo di questo lavoro è di sfruttare le caratteristiche della micropropagazione per propagare, conservare il germoplasma e produrre "babyplants" di alcune specie aromatiche presenti nell' Isola d'Elba, territorio del Parco Nazionale dell' Arcipelago Toscano: *Calamintha nepeta* L., *Crithmum maritimum* L., *Lavandula angustifolia* L., *Myrtus communis* L., *Nepeta cataria* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Satureja hortensis* L. I risultati ottenuti impiegando diversi espianti e semplici mezzi di coltura dimostrano la capacità delle piantine selezionate di generare una discreta quantità di nuovi germogli in grado di produrre composti volatili tipici. Questa tecnica risulta quindi promettente per dare nuovo impulso allo sviluppo imprenditoriale dell'arcipelago.

Parole chiave: Colture *in vitro*, componenti volatili, percentuale sterilità, tasso moltiplicazione, "babyplants".

Bibliografia

- ADAMS R.P., 1995. *Identification of essential oil components by gas chromatography-mass spectroscopy*. Allured (Carol Stream, Illinois).
- ARREBOLA M.L., SOCORRO O., BARCELÓ-MUÑOZ A., SIMÓN-PÉREZ E., PLIEGO-ALFARO F., 1997. *Micropropagation of Satureja obovata* Lag.. HortScience, 32 (7): 1278-1280.
- CONNOLLY J.D., HILL R.A., 1991. *Dictionary of terpenoids*. Chapman & Hall (London).
- DE POOTER H.L., DE BUYCK L.F., SCHAMP N.M., 1986. *The volatiles of Calamintha nepeta subsp. glandulosa*. Phytochemistry, 25 (3): 691-694.
- FLAMINI G., CIONI P.L., MORELLI I., MACCIONI S., BALDINI R., 2004. *Phytochemical typologies in some populations of Myrtus communis L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy)*. Food Chemistry, 85: 599-604.
- GILANIA A.H., SHAHA A.J., ZUBAIRA A., KHALIDA S., KIANIA J., AHMED A., RASHEED M., AHMADE V.U., 2009. *Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of Nepeta cataria L.* Journal of Ethnopharmacology, 121: 405-411.
- GRIGORIADOU K., MALOUPA E., 2008. *Micropropagation and salt tolerance of in vitro grown Crithmum maritimum L.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94: 209-217.
- LONGARAY DELAMARE A.P., MOSCHEN-PISTORELLO I.T., ARTICO L., ATTI-SERAFINI L., ECHEVERRIGARAY S., 2007. *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil*. Food Chemistry, 100: 603-608.
- LUCCHESINI M., MENSUALI-SODI A., 2010. *Plant Tissue Culture. An Opportunity for the Production of Nutraceuticals*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 698: 185-202
- MISRA P., CHATURVEDI H.C., 1984. *Micropropagation of Rosmarinus officinalis L.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 3 (2): 163-168.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497.
- NESTOROV J., MISIĆ D., SILER B., SOKOVIĆ M., GLAMOČLIJA J., CIRIĆ A., MAKSIMOVIĆ V., GRUBIŠIĆ D., 2010. *Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic Nepeta species and the evaluation of their antimicrobial activity*. Fitoterapia, 81 (6): 621-626.
- ÖZCAN M.M., PEDRO L.G., A. FIGUEIREDO C., BARROSO J.G., 2006. *Constituents of the essential oil of sea fennel (Crithmum maritimum L.) growing wild in Turkey*. Journal of Medicinal Food, 9 (1): 128-130.
- RINALDI G., marzo 2000. *Flora dell' Arcipelago Toscano*, Edizioni Archipelagos, Portoferraio (Livorno).
- RUFFONI B., MASCARELLO C., 2009. *Tecniche per la propagazione in vitro degli arbusti mediterranei*. Flortecnica, 6: 51-52.
- SEFIDKON F., ABBASI K., G.B., KHANIKI, 2006. *Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of Satureja hortensis*. Food Chem. 99: 19-23.
- SWIGAR A.A., SILVERSTEIN R.M., 1981. *Monoterpenes*. Aldrich Chem. Comp., (Milwaukee).
- ZAWIRSKA-WOJTASIAK R. AND WASOWICZ E., 2009. *GC analysis of rosemary aroma isolated traditionally by distillation and by SPME*. Journal of Essential Oil Research, 21: 8-15.

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

Luciano Concezzi^{1*}, Ferdinando Desantis¹, Mauro Gramaccia¹, Maurizio Micheli², Tiziano Gardi², Lorenzo Raggi³, Celeste Brigida³, Emidio Albertini³ e Mario Falcinelli³

¹ 3APTA - 3A Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria, Pantalla di Todi, Perugia

² Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

³ Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

Effects of slow growth conservation and genetic stability control of local apple germplasm collected in the *In Vitro* Germplasm Bank of the Umbria Region

Abstract. Slow growth storage is a widely adopted strategy to increase the time spanning between subsequent subcultures, arising both economic and safety advantages (reducing contamination risk or mutation onset). This procedure was tested on a large part of the accessions of the fruit tree species collected in the *in vitro* Bank of Umbria Region. This paper reports the results of the evaluation trials set up in order to test the effectiveness of the slow growth storage protocol adopted for one of the accessions taken into account. On the same material a molecular analysis was done in order to highlight presence/absence of genetic mutations occurred between thesis and control.

Key words: AFLP markers, genetic correspondence, *in vitro* conservation, protocol validation.

Introduzione

Presso la Banca del germoplasma *in vitro*, allestita dalla 3A Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria (3APTA) con la collaborazione del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DSAA) della Facoltà di Agraria di Perugia e collocata presso le medesime strutture della 3APTA, sono collezionati oltre 40 genotipi di 7 diverse specie. Il materiale trasferito in coltura *in vitro*, dopo alcuni cicli proliferativi utili ad ottenerne uno stock adeguato, è avviato alla conservazione alle basse temperatu-

re (4 °C) secondo uno specifico protocollo messo a punto in precedenza (Concezzi *et al.*, 2011). La conservazione a basse temperature è una tecnica ormai affidabile che permette di stoccare gli espianti micro-propagati a temperature comprese fra lo 0 ed i 10 °C e per periodi di tempo che possono andare da pochi mesi fino a diversi anni (Lambardi *et al.*, 2002). In particolare, per il melo alcuni autori riportano periodi di conservazione fino a 28 mesi in condizioni simili a quelle discusse nel presente contributo (Wilkins *et al.*, 1988). Nel caso di studio qui presentato, il cui obiettivo era quello di sottoporre a verifica il protocollo adottato escludendo la possibilità che il periodo di conservazione alle basse temperature potesse indurre anomalie nel comportamento proliferativo degli espianti, il periodo di conservazione a 4°C varia da un minimo di 12 mesi fino a 50 mesi consecutivi. Al termine della prova è stato poi effettuato anche un saggio di analisi genetica per verificare la stabilità del germoplasma tra le tesi esposte alle basse temperature e quella sempre proliferata in cella climatica.

Materiali e metodi

Verifica del protocollo di frigoconservazione

Oggetto di studio è stata la varietà locale "Mela Rossa di S.Venanzo". Sono state messe a confronto tre tesi corrispondenti a tre diversi periodi di conservazione a 4 °C e un campione usato come controllo, mantenuto sempre in camera di crescita (23 °C). Le tre tesi erano così caratterizzate: Tesi A e B, permanenza continuata a 4 °C rispettivamente per 50 e 27 mesi; Tesi C, permanenza a 4 °C di 12 mesi ripetuti per tre volte consecutive. Il campione usato come controllo era stato mantenuto sempre in camera di crescita eseguendo periodicamente (ogni 30 giorni circa) subcolture di moltiplicazione degli espianti, oltre a rinnovare il terreno di coltura.

* lconcezzi@parco3a.org

La prova di confronto tra le tesi da frigo ed il controllo è stata impostata secondo la metodologia di seguito riportata: 1) preparazione di microtalee uninodali (lunghezza tra 5 e 10 mm) prelevate dalle porzioni centrali degli espianti; 2) 5 repliche corrispondenti a 5 vasi Magenta GA7 contenenti ciascuno 5 microtalee. È stato utilizzato un terreno costituito dalla componente inorganica QL (Quoirin e Lepoivre, 1977) e addizionato di biotina e riboflavina (0,1mg/l), acido nicotinico, acido p.aminobenzoico e tiamina (1 mg/l), acido folico (0,01 mg/l), Ca-pantotenato (0,5 mg/l), BAP e GA₃ (0,5 mg/l), IBA (0,1 mg/l), adenina solfato (1 mg/l), saccarosio (30 g/l), agar (8 g/l); il valore di pH era 5,5. I rilievi (fig. 1) sono stati eseguiti su 5 subcolture consecutive al termine di un periodo di 40gg di allevamento in cella climatica. I dati raccolti (e dei quali si da conto nei risultati) sono relativi a parametri quantitativi (numero e lunghezza dei germogli) e qualitativi (presenza di callo, germogli non sviluppati e germogli vitrescenti).

Verifica della stabilità genetica

In una seconda fase le tre tesi, insieme con il controllo, sono state sottoposte ad un saggio di analisi molecolare per verificarne la stabilità genetica ed escludere la possibilità che durante il periodo di tempo trascorso *in vitro* fossero comparse mutazioni. Il parametro discriminante tra le tesi ed il controllo era il numero di subcolture (conteggiate dal momento del trasferimento *in vitro* al momento in cui sono state eseguite le analisi), così ripartito: Tesi A, 7 subcolture; Tesi B, 13; Tesi C, 11; Controllo, 43 subcolture. Le analisi, sono state eseguite dal Dipartimento di Biologia Applicata della Facoltà di Agraria di Perugia, utilizzando marcatori di tipo AFLP. Circa 350 ng di DNA genomico totale sono stati sottoposti a reazione di restrizione e ligazione (RL) a 37 °C per 4

ore utilizzando: 5 Unità dell'enzima *Eco*-RI, 5 Unità dell'enzima *Mse*-I, 1X *Restriction-Ligation buffer*, 50 pmol di adattatore *Mse*-I, 50 pmol di adattatore *Eco*-RI, 10 mMol ATP, 1 Unità dell'enzima T4 Ligasi. La complessità del DNA genomico è stata ridotta amplificando solo 1/100 della reazione di restrizione-ligazione nella fase di pre-amplificazione utilizzando *primer* addizionati di una base selettiva ciascuno (A per l'*Eco*-RI e C per l'*Mse*-I), in un volume totale di 50 ml. Alla reazione di pre-amplificazione è seguita l'amplificazione selettiva utilizzando *primer* contenenti 3 basi selettive. Uno dei due primer (in questo caso il primer *Eco*-RI) era marcato con 6-Fam, una molecola fluorescente rilevabile al sequenziatore.

In totale ciascun DNA è stato analizzato con 2 combinazioni di *primer* *Eco*+ACA/*Mse*+CAC, *Eco*+ACC/*Mse*+CAC. La corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione e la visualizzazione dei relativi ampliconi, è stata effettuata utilizzando un analizzatore genetico a 16 capillari ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems). I profili elettroforetici dei prodotti di amplificazione sono stati analizzati per presenza (1) e assenza (0) di ogni singolo amplicone con il software GeneMapper.

Risultati e discussione

Verifica del protocollo di frigoconservazione

I dati rilevati sono stati analizzati mediante test *t-student* con significatività del 99% (p<0,01). Le differenze registrate nei valori di tutti i parametri quantitativi presi in considerazione non sono risultate statisticamente significative. Nelle figure 2 e 3 si riporta l'andamento dei valori registrati per il numero dei germogli e la loro lunghezza. Nel primo caso si osserva una sostanziale omogeneità dei valori tra le tesi ed il controllo, anche nel passaggio tra la prima e le restanti subcolture, dove il valore medio complessivo passa da circa 2,3 a 1,4. Riguardo alla lunghezza dei

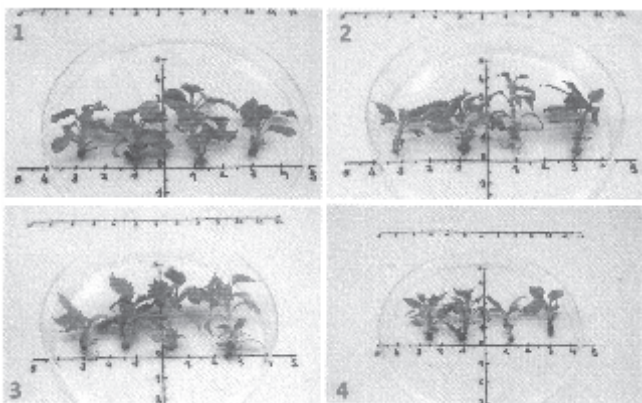


Fig. 1 - Rilievo dei parametri quantitativi: 1) Tesi A, 2) Tesi B, 3) Tesi C, 4) Controllo.

Fig. 1 - Quantitative parameters detection: 1) Thesis A, 2) Th. B, 3) Th. C, 4) Control.

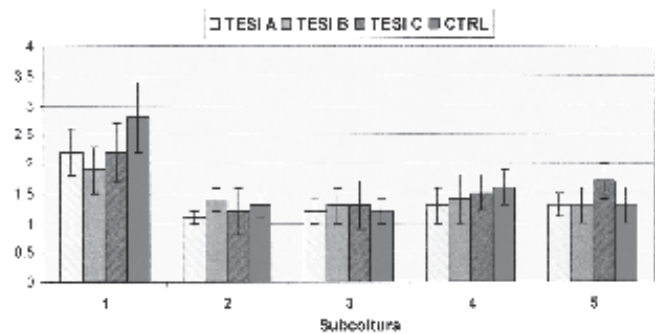


Fig. 2 - Valore medio del numero di germogli misurato al termine di ciascuna subcoltura (media di 5 repliche).

Fig. 2 - Average values of number shoot at the end of each subculture (average of 5 repetition).

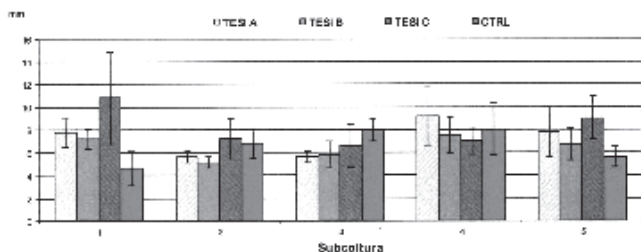


Fig 3 - Valore medio della lunghezza dei germogli misurato al termine di ciascuna subcultura (media di 5 repliche).

Fig. 3 - Average values of shoot lenght at the end of each subculture (average of 5 repetition).

germogli l'andamento è più disomogeneo e privo di tendenze evidenti: la tesi C (permanenza delle colture a 4 °C per 12 mesi ripetuti per tre volte consecutive) in genere ha mostrato valori maggiori delle altre tesi e del controllo, in quasi tutte le subcolture. Nella tabella 1 si riportano i valori percentuali medi dei tre parametri qualitativi esaminati: in questo caso le tre tesi mostrano generalmente valori di presenza di callo quasi doppi rispetto al controllo, mentre si può affer-

mare che il livello qualitativo degli espianti è decisamente buono dati i valori pressoché nulli sia di germogli vitrescenti che di quelli non sviluppati.

Verifica della stabilità genetica

L'analisi preliminare, condotta con 2 combinazioni di primer, dopo corsa elettroforetica su sequenziatore capillare e scoring con il software Gene Mapper (fig. 4), ha fornito un totale di 136 ampliconi tutti monomorfici (posseduti da tutti i campioni analizzati).

Conclusioni

La prova qui descritta ha permesso di confermare, almeno per la varietà oggetto di studio, la validità del protocollo di frigoconservazione alle basse temperature: non sono state evidenziate alterazioni nel comportamento durante la fase di proliferazione delle tre tesi conservate a 4°C rispetto a quella di controllo, mantenuta sempre in cella climatica (23°C). Le differenze

Tab. 1 - Valori medi percentuali dei parametri qualitativi.

Tab. 1 - Percent average values of qualitatives parameters.

Subcultura	Presenza di callo				Germogli non sviluppati				Germogli vitrescenti			
	Tesi A	Tesi B	Tesi C	Controllo	Tesi A	Tesi B	Tesi C	Controllo	Tesi A	Tesi B	Tesi C	Controllo
1	4	0	12	0	0	0	0	4	0	0	4,7	0
2	70	52	64	40	0	0	0	0	0	0	0	0
3	84	52	88	36	0	0	0	0	0	0	0	0
4	48	44	44	28	0	0	0	0	0	2,9	0	0
5	4	12	16	12	0	0	0	0	0	0	0	0

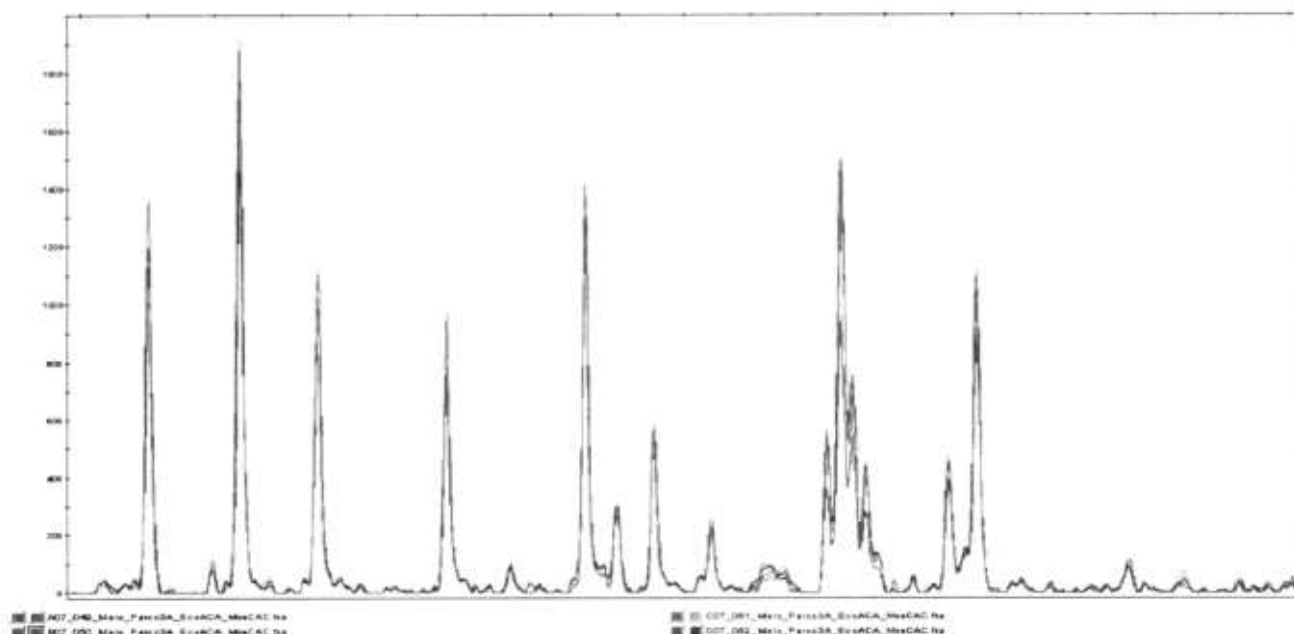


Fig. 4 - Esempio di profilo elettroforetico AFLP. Tesi e controllo sono rappresentati da colori diversi. La sovrapposizione dei picchi evidenzia l'assenza di polimorfismi tra i campioni analizzati.

Fig. 4 - AFLP profile example. Different colours represent different thesis and control. The peak overlapping highlight polymorphisms absence among analyzed samples.

riscontrate non sono significative ed in genere gli espianti di tutte le tesi mostrano una attitudine alla proliferazione analoga (e in alcuni casi anche migliore) a quella del controllo. Relativamente al saggio di stabilità genetica, sebbene i dati mostrino una omogeneità tra tutte le tesi, al fine di poter dare una risposta chiara e decisiva si ritiene opportuno ripetere l'analisi aumentando il numero di combinazioni di primer ed includendo il DNA genomico della pianta madre.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano per la preziosa collaborazione la Dr.ssa Giulia Gervasi, la Dr.ssa Scilla Valecchi, il Dr. Marco Caffarelli, la Dr.ssa Francesca Moretti e la Dr.ssa Livia Polegri.

Riassunto

La conservazione alle basse temperature è una strategia comunemente adottata per aumentare il tempo tra una subcoltura e la successiva, con evidenti vantaggi sia economici che di sicurezza (rischio contaminazioni, insorgenza mutazioni). Anche presso la

Banca *in vitro* della Regione Umbria questo procedimento è stato testato su buona parte delle accessioni di specie arboree da frutto in collezione. In questo contributo si riportano i risultati delle prove di valutazione della validità del protocollo di frigoconservazione relative ad una delle accessioni. Sempre sullo stesso materiale è stato poi eseguito un saggio molecolare per evidenziare la presenza/assenza di disomogeneità genetiche tra le tesi ed il controllo.

Parole chiave: conservazione *in vitro*, marcatori AFLP, similarità genetica, valutazione protocolli.

Bibliografia

- CONCEZZI L., DESANTIS F., GRAMACCIA M., PALADIN C., 2011. *Le attività di conservazione di varietà locali di fruttiferi presso la banca del germoplasma in vitro della Regione Umbria*. Acta Italus Hortus 1:70-73.
- LAMBARDI M., BENELLI C., DE CARLO A., 2002. *Tecnologie per la conservazione in vitro di specie arboree*. Italus Hortus, 9(3) p. 58-60.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P., 1977. *Improved media for in vitro culture of Prunus sp.* Acta Hort., 78: 437-442.
- WILKINS C.P., NEWBURY H.J., DODDS J.H., 1988. *Tissue culture conservation of fruit trees*. Plant Gen. Res. Newsletter 73/74:9-20.

Propagazione *in vitro* di una specie endemica siciliana: *Cistus crispus*

Marcello Airò* e Antonio Giovino

CRA-SFM Unità di ricerca per il recupero e la valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria (PA)

In vitro propagation of an endemic sicilian species: *Cistus crispus*

Abstract. *Cistus crispus* is an endemic species exclusive of the province of Messina and recorded, with the *status* of “Threatened” (T), in the Libro Rosso delle Piante d’Italia. The aim of this study was to increase knowledge on the propagation for protection of the species. Apical and nodal microcuttings, *in situ* collected, have been sterilized for *in vitro* introduction. The aseptic explants, were used as preliminary explants to establish *in vitro* culture. To determinate the optimal medium for shoot multiplication, microcuttings were cultured on gelled Murashige and Skoog (MS) medium enriched with increasing concentrations (0; 0.3 ; 0.6 and 1.2 mg L⁻¹) of three different cytokinins (BA, KIN, 2-iP) separately, in a factorial experiment. The highest multiplication rate (5.5 shoots/explants/month) was achieved with KIN 0.6 mg L⁻¹. The microshoots were also tested to determinate the optimum conditions for *in vitro* rooting on the same substrate MS (macro and micro-nutrients), with different concentrations (0; 0.5 ; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) of two auxins (IAA and IBA). The best performance of rooted plants were scored on 1.0 mg L⁻¹ IAA, the rooting rate was approximately 4 roots/plant in almost 3 weeks. The plants acclimated *ex vitro* in 20 days and provided a higher percentage than 80%.

Key words: micropropagation, growth regulator, acclimatization, reinforcing.

Introduzione

Il cisto a foglie crespe è un piccolo arbusto, simile a *C. albidus*, presenta foglie ovali leggermente vischiose con forte odore aromatico, alto circa 50 cm, che in maggio si ricopre di numerosi fiori rosso-viola-cei (Pignatti, 1982) (fig. 1).

Cistus crispus, è una specie molto rara; non cresce in nessun regione d’Italia eccetto che in Sicilia dove

la si può trovare esclusivamente in alcune zone della provincia di Messina e in poche località nell’area dello Stretto (Bartolo *et al.*, 1994). È specie mediterranea, tipica della fascia collinare, dove la vegetazione è costituita da piccoli arbusti sempreverdi (macchia bassa e gariga). L’ambiente in cui cresce spontanea è sottoposto a forte pressione antropica, dovuta a pascolo, ma soprattutto al periodico verificarsi di incendi. Ciononostante, il cisto a foglie crespe trae un beneficio dal passaggio del fuoco in quanto è da considerarsi pianta “pirofita”: i suoi semi, infatti, hanno la capacità di rimanere attivi a lungo nel terreno e germinano scarificati naturalmente a causa delle elevate temperature.

Per la sua limitatissima distribuzione sul territorio nazionale il suddetto cisto è stato inserito nella “Libro Rosso delle Piante d’Italia” (Conti *et al.*, 1992), lista redatta in funzione della rarità delle specie e del loro pericolo di estinzione, con lo status di “Minacciata” (M), proprio di quelle entità le cui popolazioni hanno subito una forte riduzione per eccesso di sfruttamento, distruzione estensiva degli habitat o per altre alterazioni ambientali. Questa specie, seppur adattata a fenomeni come gli incendi, non è in grado di sopravvivere all’inquinamento del suolo, nonché all’antropizzazione dovuta in larga parte all’e-



Fig. 1 - *Cistus crispus* in fioritura.
Fig. 1 - *Cistus crispus* flowering.

* marcello.airò@entecra.it

spansione edilizia. La possibilità di coltivare e mantenere *in vitro* il *C. crispus*, prescindendo dalla disponibilità di materiale *in situ*, fornisce importanti conferme sulle potenzialità della tecnica della micropropagazione, già largamente impiegata per la propagazione di specie a rischio, utilizzate in programmi di conservazione e ripopolamento di areali ove la presenza delle stesse va via via riducendosi drasticamente.

Materiali e metodi

Per l'introduzione *in vitro* di questa specie è stato scelto, come più opportuno tipo di espianto, la micro talea nodale ed apicale (Gatti *et al.*, 2004). Gli espianti sono stati sterilizzati secondo il protocollo che prevedeva un lavaggio in acqua e detergente, un passaggio di 30 sec in etanolo 70%, una sterilizzazione in ipoclorito al 1,2% di cloro attivo per 20 minuti e tre risciacqui in acqua distillata sterile, sotto cappa a flusso laminare orizzontale. Le micro talee sono state successivamente poste in scatole Petri, contenenti un substrato nutritivo agarizzato, contenente i sali e le vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962), al fine di valutare le percentuali di sterilità e di vitalità. Una volta ottenuta una linea clonale, si è proceduto alla propagazione degli espianti per alcuni cicli sullo stesso substrato MS, addizionato con 30 g l⁻¹ di saccarosio, 0,5 mg l⁻¹ di BA e 8 g l⁻¹ di agar, in modo da ottenere la massima efficienza proliferativa del materiale da utilizzare nelle successive prove sperimentali di moltiplicazione e radicazione *in vitro* della specie oggetto di studio. Applicando uno schema fattoriale, sono state messe a confronto concentrazioni crescenti (0; 0,3; 0,6; 1,2 mg l⁻¹) di tre differenti fitoregolatori di crescita BA, KIN e 2-iP per stimolare lo sviluppo di gemme ascellari e indurre il maggior tasso di moltiplicazione. È stato adottato uno schema sperimentale a blocco randomizzato con tre ripetizioni per ciascun trattamento con 20 germogli per blocco per un totale di 60 espianti per trattamento. I dati sono stati statisticamente analizzati con ANOVA e la separazione delle medie è stata effettuata mediante il test delle Minime Differenze Significative (MDS) di Fisher ($P \leq 0,05$) (Petersen, 1985). I rilievi biometrici, effettuati dopo 4 settimane, hanno riguardato il numero di gemme ascellari sviluppate dai singoli espianti nonché il numero di radici per pianta. Allo stesso modo, utilizzando un substrato come descritto in precedenza ed in assenza di citochinine, si è proceduto al saggio di concentrazioni crescenti (0; 0,5; 1 e 2 mg l⁻¹) di ormoni di crescita auxinici IBA e IAA.

Tutte le prove di micropropagazione sono state effettuate in camera di crescita a 23±1 °C con un foto-

periodo di 16 ore di luce per giorno ad una intensità luminosa di 30 mmol m⁻² s⁻¹. Le piante radicate sono state trasferite dopo circa 4 settimane in bancali di ambientamento con sistema di irrigazione mist, per favorire l'acclimatamento delle stesse e la conseguente emissione di nuovi germogli ascellari, nonché radici avventizie.

Risultati e discussione

Il protocollo di sterilizzazione applicato ha consentito di ottenere una percentuale di espianti privi di contaminazioni superiori al 70% con una pari percentuale relativa alla vitalità degli stessi. La difficoltà di ottenere percentuali maggiori di sterilità degli espianti primari è stata dovuta al materiale di partenza essendo stato reperito *in situ* da pochi esemplari. Il cisto a foglie crespe, ha manifestato nel complesso una buona reattività alla coltura *in vitro*, gli apici posti nel substrato di coltura MS arricchito di BA 0,5 mg l⁻¹ hanno prodotto in circa 5 settimane nuovi germogli ascellari che con 2 cicli di subcolture, di 3 settimane ciascuno, hanno dato origine ad una coltura stabile ed in attiva proliferazione. I germogli così prodotti hanno permesso di ottenere un numero di microtalee sufficienti per espletare i successivi esperimenti con l'obiettivo di ottimizzare i mezzi di coltura per la proliferazione e la successiva radicazione *in vitro*.

Nella prova di moltiplicazione, le plantule, allevate sui substrati arricchiti con le tre differenti citochinine, hanno espresso la migliore attitudine proliferativa sul mezzo di coltura contenente KIN alla concentrazione di 0,6 mg l⁻¹, fornendo circa 5,5 germogli dopo 4 settimane in coltura (fig. 2). Ad una più bassa concentrazione dello stesso ormone, i valori rilevati, hanno mostrato un trend negativo, così come in presenza delle altre citochinine (BA e 2-iP) utilizzate in prova.

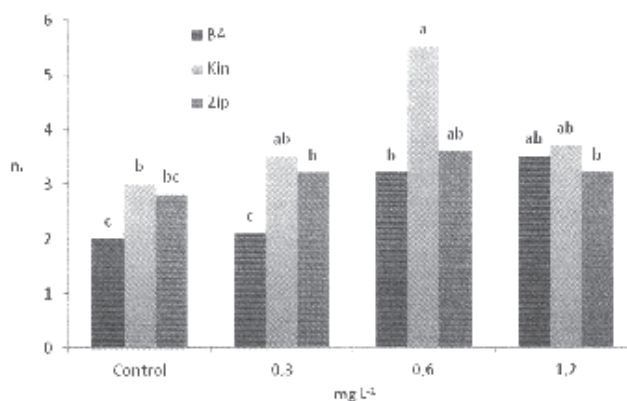


Fig. 2 - Effetto del trattamento con differenti citochinine sul tasso di moltiplicazione *in vitro* di *C. crispus*

Fig. 2 - Effect of different combination of cytokinins on *in vitro* proliferation rate of *C. crispus*.

Nell'esperimento di radicazione, la presenza di primordi radicali sulle microtalee di *C. crispus*, è stata evidente dopo poco più di una settimana. Su substrato di coltura, in presenza di IAA alla concentrazione di $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, le microtalee di cisto hanno emesso circa 4 radici filiformi e ben connesse al sistema vascolare delle stesse (figg. 3 e 4). Concentrazioni superiori, così come il testimone non trattato, hanno fatto rilevare valori staticamente significativi inferiori. In presenza di IBA le microtalee, al contrario, hanno mostrato una minore attitudine alla radicazione. Le plantule radicate e messe in bancale di ambientamento, hanno evidenziato la maggiore percentuale di attecchimento (83%) proprio in corrispondenza del trattamento con

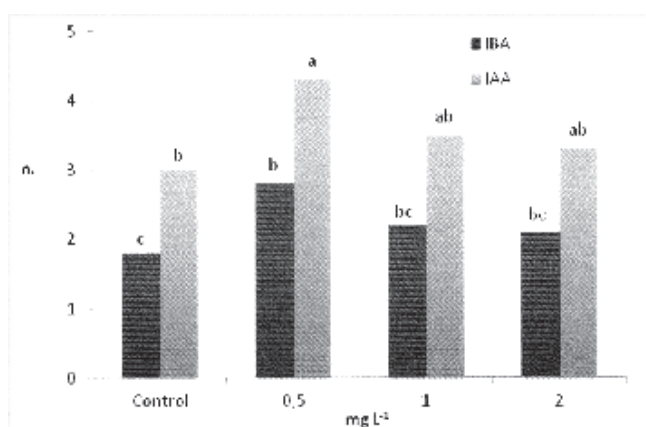


Fig. 3 - Effetto del trattamento con IBA e IAA sul numero di radici emesse *in vitro* di *C. crispus*.

Fig. 3 - Effect of different concentrations of IBA and IAA on of *C. crispus* rooting.



Fig. 4 - *Cistus crispus* su substrato di radicazione.

Fig. 4 - *Cistus crispus* on rooting medium.

IAA $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, adattandosi alle condizioni *ex vitro* dopo circa una 20 giorni e mostrando caratteristiche fenotipiche uguali alle piante madri da cui erano state prelevate.

Le plantule trattate con IBA, mostravano radici morfologicamente più ingrossate che tendevano a spezzarsi una volta introdotte nei contenitori Giffy®, utilizzati per l'ambientamento, compromettendo l'attecchimento delle stesse.

Conclusioni

La presente ricerca ha consentito di mettere a punto un efficiente e riproducibile protocollo di micropropagazione di *C. crispus*, sia nella fase di proliferazione che in quella di radicazione non è stata osservata produzione di callo, pertanto, dal momento che il protocollo proposto si basa sull'induzione di gemme ascellari, dovrebbe essere garantita la stabilità genetica del materiale di propagazione. La tecnica della propagazione *in vitro*, risulta una metodica di grande interesse ampiamente utilizzata in programmi di conservazione e ripopolamento (*reinforcing*) delle specie a rischio.

Ringraziamenti

L'autore intende ringraziare, per l'attiva collaborazione durante lo svolgimento dell'intera prova, i Sigg.ri Gaetano Giardina e Giuseppe Farruggia, dell'Unità di Ricerca del CRA-SFM.

Riassunto

Cistus crispus è una specie endemica esclusiva della provincia di Messina ed inserito nella Lista Rossa della flora italiana a rischio, con lo status di "Minacciata" (M). Il presente studio nasce dall'esigenza di incrementare gli strumenti di propagazione e salvaguardia della suddetta specie. Talee apicali e nodali prelevate *in situ*, sono state sterilizzate per l'introduzione *in vitro*. Una volta allestita la coltura asettica, si è proceduto al saggio delle più opportune concentrazioni di ormoni esogeni, citochinini ed auxinici. Per la prova di moltiplicazione gli espianti sono stati allevati su substrato agarizzato di Murashige e Skoog (MS, 1962) in presenza di differenti ormoni di crescita (BA, Kin, 2iP) a concentrazioni crescenti (0; 0,3; 0,6 e $1,2 \text{ mg l}^{-1}$). Le piante ottenute, sono state successivamente allevate su substrato MS in presenza o meno di diverse concentrazioni (0; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ mg l}^{-1}$) di auxine, IAA ed IBA, separatamente.

Le plantule hanno moltiplicato bene su substrato

arricchito di Kin alla concentrazione di $0,6 \text{ mg l}^{-1}$, fornendo circa 5,5 germogli dopo 4 settimane. Le piante radicate su IAA alla concentrazione di $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ hanno emesso circa 4 radici/pianta in poco più di 3 settimane, con percentuali di attecchimento *ex vitro* superiori all'80%.

Parole chiave: micropropagazione, fitoregolatori di crescita, acclimatamento, ripopolamento.

Bibliografia

- AA.VV., 1954. Enciclopedia Agraria REDA
MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
PETERSEN R.G., 1985. *Design and analysis of experiments*. Marcell Dekker, New York.
PIGNATTI, 1982. *Flora D'Italia*. EDAGRICOLE, Bologna.
CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992. *Libro Rosso delle Piante d'Italia*. WWF Italia, Roma.

Crioconservazione di cultivar di melo mediante *droplet vitrification*

Emiliano Condello¹, Andrea Frattarelli¹, Bart Panis² e Emilia Caboni^{1*}

¹ CRA - FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

² K.U. Leuven - Laboratory of Tropical Crop Improvement, Leuven (Belgio)

Cryopreservation of apple cultivars by *droplet vitrification*

Abstract. *In vitro* axillary buds of 2 apple cultivars, Pinova and Jonagold, were successfully cryopreserved by droplet vitrification. The effect of the length of the PVS2 treatment on the recovery after cryopreservation was evaluated. *In vitro* axillary buds of the cv Pinova were subjected to PVS2 for 15, 30, 45, 60, 80 or 100 min, while Jonagold buds were treated with PVS2 for 15, 30, 45 or 60 minutes. The highest shoot recovery was obtained, in both cultivars, applying a 60 min PVS2 treatment.

Key words: axillary buds, *Malus domestica*, PVS2, regrowth.

Introduzione

Il CRA-Centro di ricerca per la Frutticoltura di Roma (CRA-FRU) è la sede della collezione nazionale *in vivo* di germoplasma frutticolo con circa 8000 accessioni (www.fru.entecra.it/rgv/inventario_nazionale). La crioconservazione rappresenta uno dei metodi complementari all'approccio di conservazione *ex situ*, *in field* e, rispetto a quest'ultima, presenta molteplici vantaggi tra cui i minori costi di mantenimento del materiale e la riduzione dei rischi legati ad avverse condizioni climatiche (Engelman, 2000; Panis e Lambardi 2005).

Differenti tecniche di crioconservazione sono state sviluppate nel corso degli anni e tra queste la più recente è la tecnica della "droplet vitrification", che si basa sulla conservazione in azoto liquido di espianti inclusi in singole gocce di una soluzione vitrificante (PVS2). Al fine di valutare l'applicabilità del metodo *droplet vitrification* su cultivar di melo (*Malus domestica*, Bork), sono state utilizzate gemme ascellari da germogli cresciuti *in vitro* delle cv Pinova e Jonagold ed è stato valutato l'effetto della durata dell'esposi-

zione alla soluzione vitrificante PVS2 sulla ricrescita degli espianti dopo il trattamento in azoto liquido.

Materiali e metodi

Germogli di melo (*Malus domestica*, Borkh), cv Pinova e Jonagold, sono stati cresciuti *in vitro* su un terreno MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionato con benziladenina (BA, 1,35 μM) e acido 3-indolbutirrico (IBA, 0,25 μM) (Caboni *et al.*, 2000). Le colture sono state mantenute a 25 ± 1 °C con un fotoperiodo di 16 ore e un'intensità luminosa di $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Come espianti per la crioconservazione sono stati utilizzati segmenti nodali (SN) consistenti nella gemma ascellare e nella porzione (in media 0,2-0,4 cm) di stelo corrispondente (fig. 1). In accordo con Panis *et al.* (2005), i SN sono stati inizialmente trattati con una *loading solution* per 20 minuti, per preparare gli espianti al successivo stress osmotico, e disidratati con la soluzione vitrificante (PVS2, 30% glicerolo, 15% etilenglicole, 15% DMSO) a diversi tempi di esposizione (cv Pinova: 15, 30, 45, 60, 80 o 100 minuti a 0 °C; cv Jonagold: 15, 30, 45 o 60 minuti a 0 °C). In seguito, i SN sono stati trasferiti singolarmente in gocce di PVS2 posizionate su una striscia di un

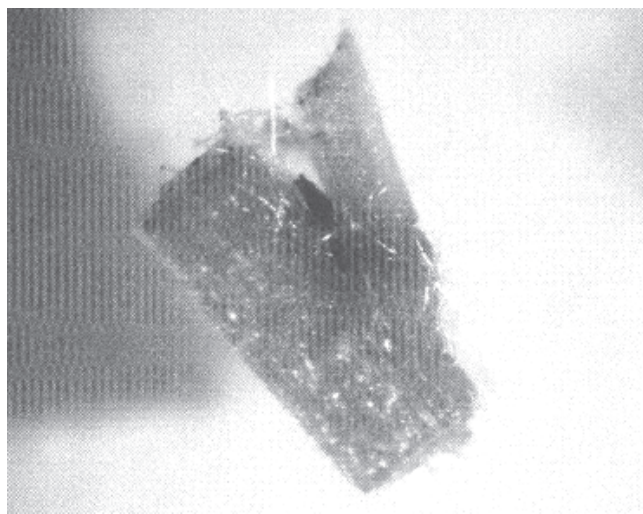


Fig. 1 - Cv Pinova. Preparazione degli espianti per la crioconservazione: SN con gemma ascellare.

Fig. 1 - Cv Pinova. Preparation of the explant for cryopreservation: SN with axillary bud.

* emilia.caboni@entecra.it

foglio di alluminio e immersi in azoto liquido. Dopo 30 minuti gli espianti sono stati trasferiti in una *recovery solution* (RS) consistente nel terreno di crescita standard liquido privo di fitoregolatori contenente 1,2 M di saccarosio, mantenuti a temperatura ambiente per 15 minuti e, successivamente, trasferiti su un terreno 0,3 M saccarosio. Gli espianti sono stati mantenuti al buio per una settimana, poi trasferiti su un terreno di moltiplicazione e mantenute alle condizioni standard di coltura. I controlli sono stati trattati direttamente con la RS e trasferiti nel terreno standard per la ricrescita.

La ricrescita è stata valutata dopo 8 settimane dal trattamento in azoto liquido. Le gemme che hanno ripreso il normale sviluppo (produzione di nuove foglie e/o espansione dei piccoli germogli) sono state considerate in ricrescita.

I risultati derivano dalla media di 10 espianti per tre repliche per ogni trattamento. Per i trattamenti è stato utilizzato un disegno sperimentale randomizzato. Sui dati è stato calcolato l'errore standard.

Risultati e discussione

Quattro settimane dopo la crioconservazione si possono osservare tre reazioni differenti da parte dei SN: gemme completamente o parzialmente necrotiche; formazione di callo; formazione del germoglio da parte della gemma (fig. 2).

Il trattamento con PVS2 riduce il contenuto d'acqua nei tessuti e previene la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari, responsabili del danneggiamento delle cellule durante la fase di congelamento. Dalla valutazione della ricrescita effettuata dopo 8

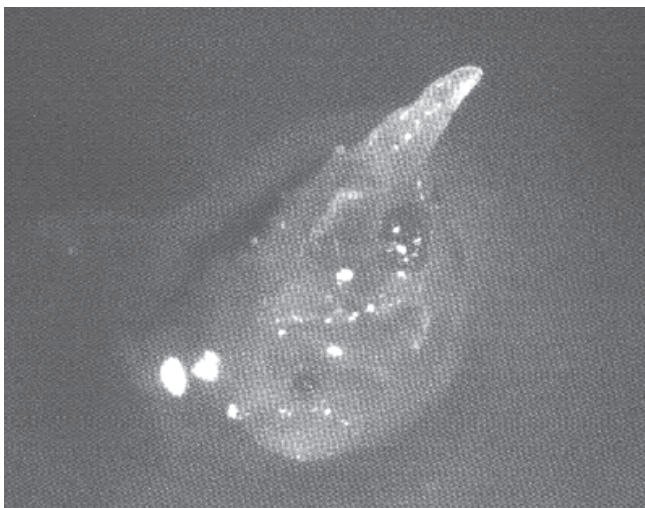


Fig. 2 - Cv Pinova. Ricrescita del germoglio 4 settimane dopo la crioconservazione.

Fig. 2 - Cv Pinova. Regenerating axillary bud 4 weeks after cryopreservation.

settimane risulta evidente che la durata del trattamento con la PVS2 non ha influenzato la ricrescita dei controlli, mentre nei SN crioconservati la percentuale di ricrescita è stata condizionata dalla durata di immersione nella PVS2. Infatti, per la cv Pinova la ricrescita aumentava con l'incremento del tempo di esposizione da 15 min (3,3%) a 60 min (46,7%), per poi rimanere costante fino a 100 min (43,3%) di trattamento (fig. 3). La cv Jonagold ha mostrato una risposta simile, con un incremento della ricrescita da 30 min (6,7%) a 60 min (40,0%) (fig. 4).

Riassunto

Gemme ascellari di due cultivar di melo (Pinova e Jonagold) sono state crioconservate mediante la tecnica della *droplet vitrification*. I singoli espianti sono stati immersi in una goccia di soluzione vitrificante (PVS2) posizionata su un foglietto di alluminio e immersi in azoto liquido. È stato determinato il tempo

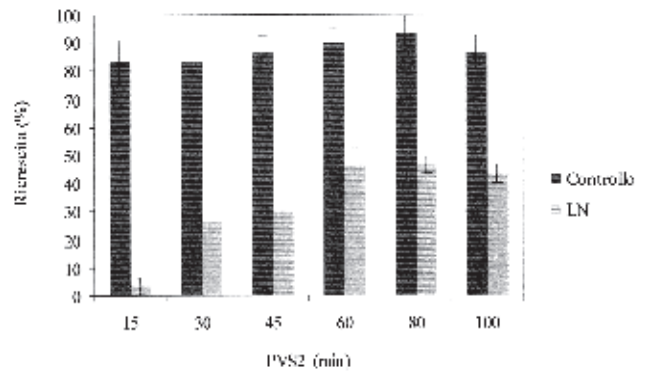


Fig. 3 - Cv Pinova. Effetto della durata del trattamento con PVS2 sulla ricrescita di SN crioconservati (LN) o senza trattamento in azoto liquido (Controllo).

Fig. 3 - Cv Pinova. Effect of length (min) of the PVS2 treatment on regrowth (%) of SN after cryopreservation (LN) and without immersion in LN (Control).

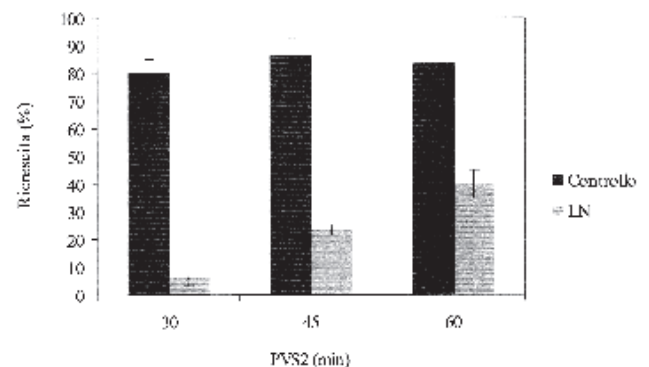


Fig. 4 - Cv Jonagold. Effetto della durata del trattamento con PVS2 sulla ricrescita di SN crioconservati (LN) o senza trattamento in azoto liquido (Controllo).

Fig. 4 - Cv Jonagold. Effect of length (min) of the PVS2 treatment on regrowth (%) of SN after cryopreservation (LN) and without immersion in LN (Control).

di esposizione alla PVS2 più idoneo per le cultivar. Il tasso di ricrescita più elevato in entrambe le cultivar è stato ottenuto trattando gli espianti con PVS2 per almeno 60 min.

Parole chiave: *Malus domestica*, gemme ascellari, PVS2, ricrescita.

Bibliografia

- CABONI E., LAURI P., D'ANGELI S., 2000. In vitro *plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture*. Plant Cell Rep. 19: 8755-760.
- ENGELMANN F., 2000. *Importance of Crop for Conservation of Plant Genetic Resources*. In: Engelmann F, Takagi H, Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application, IPGRI (Rome): 8-20.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- PANIS B., PIETTE B., SWENNEN R., 2005. *Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae*. Plant Sci. 168: 45-55.
- PANIS B., LAMBARDI M., 2005. *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)*. In: "The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources". International Workshop Turin, March 5-7, pp 43-54.

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 espianți sono stati immersi in azoto liquido per 30 min e il resto direttamente trasferiti alla fase di ricrescita (controllo). Gli espianți 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 espianți 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 espianți (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 espianți 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 espianți 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 espianți sul terreno di ricrescita è stato messo in evidenza che il contenuto in clorofille era minore negli espianți 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 espianți provenienti dall'immersione in azoto liquido rispetto al controllo. Anche il contenuto di fenoli totali è risultato maggiore negli espianți crioconservati rispetto al controllo in ambedue i tipi di espianito. 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 pyraeaster, 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., NORMAH 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.

La micropropagazione per la valorizzazione della biodiversità dei fruttiferi

Carmine Damiano

CRA - FRU, Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Sono passati molti decenni da quando nel 1838 Schleiden avanzò l'ipotesi della totipotenzialità delle cellule, cioè della loro capacità di ricostituire, con le informazioni genetiche possedute, l'organismo dal quale esse sono state espianate. Tuttavia, solo nel 1902 Haberland tentò di allestire *in vitro* una coltura di tessuti vegetali. Da questo tentativo sono trascorsi più di cento anni, durante i quali alcune ricerche fondamentali in fisiologia, differenziamento, biochimica hanno fornito le conoscenze per intraprendere, fra le altre, l'attività della micropropagazione così come oggi la conosciamo. A tal riguardo, va precisato che questa è solo una parte della grande famiglia di attività correlate alla coltura *in vitro* dei vegetali ed essa serve a moltiplicare clonalmente *in vitro*, cioè senza variarne l'assetto genetico, individui selezionati per caratteristiche fenotipiche. Una volta accettata questa definizione-obiettivo, si deducono alcune specifiche finalità quali la moltiplicazione di materiali altamente eterozigoti o di difficile propagazione vegetativa, infertili, bisognosi di moltiplicazione rapida in gran numero di esemplari e di protezione dall'erosione, a costo di produzione vantaggioso. Sebbene, in senso stretto, non siano considerate tecniche moltiplicative, tuttavia, per la loro connessione con la micropropagazione, assumono grande rilevanza la conservazione *in vitro* e la crioconservazione. Entrambi i metodi possono essere adottati per la creazione di banche di risorse genetiche, la loro implementazione, tuttavia, è ancora da verificare; esse possono essere immediatamente utilizzate come servizio ancillare ai laboratori di produzione commerciale o, in scala ridotta, per la conservazio-

ne di biodiversità frutticola a rischio di estinzione. L'attività vivaistica frutticola italiana ed europea ha adottato la micropropagazione, affiancandola alla propagazione tradizionale, fin dal 1978. Oggi, milioni di piante vengono prodotte in qualificati laboratori sparsi sul territorio, appartenenti a numerose specie fruttifere mediterranee. Nel 2004 è stato avviato un progetto di Ricerca e Sperimentazione per incrementare la frutticoltura meridionale dall'acronimo Fru.Med; fra le attività era prevista quella del Sottoprogetto Pro.Vi. Sud, che sta per Propagazione e Vivaismo nel Sud. Durante la durata del progetto, cui hanno partecipato il Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma, l'Unità di Ricerca per la Frutticoltura di Caserta, il Centro di Ricerca per l'agrumicoltura e le colture mediterranee di Acireale, l'Unità di Ricerca per la floricoltura di Sanremo e Palermo, il Dipartimento di Coltivazione Arboree di Catania, il Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma, il Dipartimento di Coltivazioni Arboree della Toscana, COVIP di Bari, CRS Basile Caramia di Bari e l'Istituto di Economia Agraria di Perugia, si sono messe a punto diverse fasi della micropropagazione di numerosi gruppi di specie fruttifere (circa 36 "varietà locali" fra pesco, susino, ciliegio, noce, nocciolo, fragolina, albicocco, melo, pero, melograno, kaki, azzeruolo, sorbo, nespolo del Giappone) che, per quanto a conoscenza dei ricercatori, sono abbastanza rare, neglette o sottoutilizzate e/o iscritte nei registri regionali della biodiversità. Tutte le specie del Progetto sono conservate con tecniche di crescita rallentata, mentre alcune sono sperimentate per la crioconservazione.

Conservazione *in vitro* in crescita rallentata di specie ornamentali

Carla Benelli¹, Aylin Ozudogru¹, Giuliano Dradi², Romano Roncasaglia² e Maurizio Lambardi¹

¹ CNR IVALSAs, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Sesto Fiorentino (FI)

² Vivai Piante Battistini Società Agricola s.s., Martorano di Cesena (FC)

La coltura *in vitro* offre l'opportunità di propagare, preservare e garantire un più sicuro scambio di materiale vegetale ed evitare che le piante siano esposte a danni causati da condizioni atmosferiche avverse. Numerose specie ornamentali, frutticole e forestali sono attualmente propagate e mantenute *in vitro* a sostegno di progetti specifici di conservazione *ex situ* del germoplasma vegetale. La conservazione *in vitro* può essere attuata mantenendo le colture in condizioni che prevedono tassi di crescita minima, in genere riducendo la temperatura di coltura, utilizzando ritardanti di crescita o mediante l'aggiunta nel substrato di sostanze osmoticamente attive, come sorbitolo, mannitolo o saccarosio. Attraverso questa metodologia le piante possono essere conservate per diversi mesi (talora, anche per un anno o più) ed essere prontamente riportate in normali condizioni di coltura nell'ambito di una produzione opportunamente programmata. Questo risulta particolarmente utile nei laboratori commerciali di micropropagazione che, influenzati dai flussi di mercato, possono, in tal modo, ridurre i costi di manodopera legati alle subcolture necessarie per il mantenimento delle diverse specie. Tuttavia, è necessario che per ogni specie siano opportunamente valutati fattori come la composizione del substrato di coltura, la temperatura di conservazione, la presenza/assenza di luce, con l'obiettivo di massimizzare l'efficienza di conservazione. Il CNR-IVALSAs,

nell'ambito del progetto 'VITROFLOR', finanziato dal MiPAF, sta conducendo prove sperimentali in condizioni di crescita rallentata su alcune specie ornamentali di rilevante importanza economica (*Anthurium andreanum*, *Ranunculus asiaticus* e *Carex oshimensis*), al fine di valutare gli effetti sulla qualità dei germogli in conservazione di due diverse temperature (6° e 10° C), in condizioni luce e oscurità, di due concentrazioni di saccarosio (30 e 60 gr/l) nel mezzo di coltura e di tre tipi di contenitore (vaso in vetro, vaso in plastica biodegradabile e Microbox®). I risultati del primo anno mostrano che è possibile protrarre la conservazione *in vitro* fino ad 8 mesi in anthurium e 9 mesi in ranuncolo; i germogli in conservazione, pur evidenziando sintomi evidenti di ossidazione del substrato (anthurium) o eziolamento (ranuncolo), hanno mostrato ottima capacità di ricrescita dopo 4 e 6 mesi di conservazione. La conservazione dell'anthurium è stata possibile solo alla temperatura di 10°C, mentre il ranuncolo si è adattato bene ad entrambe le temperature, ottenendo beneficio dal mantenimento in substrato MS addizionato di 60 g/l di saccarosio. E' in fase di valutazione l'effetto di diverse temperature di conservazione (4° e 10°C, buio) in *Carex*, mentre in anthurium è in atto un confronto tra differenti contenitori di coltura per massimizzare il periodo di conservazione a 10°C in condizioni di luce e oscurità.

Ricerca finanziata dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali. Progetto 11076/7643/09 "Innovazione delle tecniche *in vitro* per il miglioramento quali-quantitativo del materiale di propagazione di piante ornamentali" (VITROFLOR).

Conservation of swiss endemic orchids

Elena Rios Thalmann, Erich Stutz e Rafael Schneider

IUNR, ZHAW Zurich University of Applied Sciences, Waedenswil (Svizzera)

Orchid is one of the most popular plants worldwide. The family of Orchidaceae is very common and morphologically diverse. In Switzerland more than 70 species of Orchids have been registered. The Genera *Dactylorhiza*, *Orchis*, *Ophrys*, *Spirantes* and *Serapias* are the most interesting ones due to being in the Swiss national list of endangered species. In contrast to the tropical orchids, Swiss orchids have amongst others the following characteristics: they are usually terrestrial and not epiphytic, they develop special structures (tubers) to hibernate and the morphology of their seeds is different. The seed morphology is indeed an important characteristic for the success of sterilization in *in vitro* cultures. Different substances for sterilisation, i.e. Hydrogen peroxide, Sodium hypochlorite, Calcium hypochlorite, Steriplant, have been used. Hydrogen peroxide (3%, 3 minutes) has been often described as the most efficient method. However, with this method the seeds are completely bleached and do not germinate. The best result has been obtained with a concentrated solution (almost 2.5%) of Sodium hypochlorite. When using Sodium hypochlorite, the time of exposition is not the important criterion, but it is the change in colour of the seeds which

has to be observed. They turn from dark brown to light brown or beige. There are colour scales to determine the right colour but a lot of experience is needed to work with them. For micropropagation, standard media like MS, Malgrem, Kew, P668 and P597 have delivered good results for different species. The plant material or orchid capsules can be used when the capsule is still green (green pod) or when it is mature. The best results have been obtained with mature capsules, however, the sterilisation process is more difficult. Acclimatisation and planting on soil is the most difficult step in *in vitro* propagation. Different trials showed that terrestrial species grow better on soil when they are cultivated in a medium containing mycorrhiza fungi. In spite of the success in micropropagation of Swiss endemic orchids, governmental and environmental institutions are mainly focused on their *in-situ* conservation. The maintenance of the natural habitat of this species, the natural dissemination of the plants and the creation of new habitats also in urban regions (green roofs) are some of the strategies to follow. Many people, institutions and industries are interested in greening their roofs and giving orchids more place.

Conservazione *in vitro* del castagno (*Castanea sativa* Mill.) tramite crescita rallentata

Maurizio Capuana¹ e Sara Di Lonardo²

¹ IGV-CNR, Istituto di Genetica Vegetale, Sesto Fiorentino (FI)

² IBIMET-CNR, Istituto di Biometeorologia, Firenze

Castanea sativa Mill. è una delle specie arboree che possono essere coltivate *in vitro*, seppure con qualche difficoltà. Come è noto, questa tecnica di coltura costituisce anche uno strumento di conservazione del gemoplasma, in affiancamento alla tradizionale conservazione *in situ* (l'importanza della conservazione *ex situ* è stata riconosciuta internazionalmente in anni recenti nella Global Strategy for Plant Conservation). Il mantenimento a lungo termine di collezioni in coltura *in vitro* richiede però un notevole impegno di manodopera e, in generale, costi elevati; ecco allora che la crescita rallentata (*slow growth*) rappresenta un utile strumento per la conservazione a medio/lungo termine di materiale vegetale in spazi limitati ed a costi ridotti.

Del castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) esiste un ampio patrimonio genetico che va salvaguarda-

to. In questo lavoro, utilizzando la cv Montemarano, è stata verificata la possibilità di effettuare la conservazione *in vitro* a medio termine, testando temperature di incubazione diverse, nonché l'effetto della presenza o assenza di luce e l'influenza dell'aggiunta di fitoregolatori al mezzo di coltura.

E' risultato essenzialmente che alla temperatura di 8°C ed a luminosità ridotta, è possibile conservare il materiale in coltura per lunghi periodi. Dopo 36 mesi, quasi il 90% dei germogli coltivati in mezzo WPM contenente 0.1 mg/l di benziladenina è risultato vitale ed ha ripreso un'attiva crescita in seguito a trasferimento nel nuovo substrato nutritivo ed incubazione a 23 °C con maggiore intensità luminosa. La temperatura di 4°C è invece apparsa meno idonea per un periodo di conservazione superiore ai 12 mesi.

Utilizzo della micropropagazione per il recupero e la propagazione di ecotipi locali di carciofo (*Cynara scolymus* L.) interessanti dal punto di vista agronomico qualitativo e nutrizionale

Roberto Cappelletti, Luca Vita e Bruno Mezzetti

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche

Nell'ambito di un progetto promosso dalla Regione Marche (L/R 37/99) con lo scopo di rilanciare l'orticoltura nella Regione attraverso la valorizzazione delle biodiversità autoctone, è stato condotto un lavoro di ricerca utilizzando la tecnica di propagazione *in vitro* al fine di caratterizzare, selezionare e propagare linee di carciofo interessanti sia sotto il profilo agronomico sia qualitativo e nutrizionale. A seguito di ripetuti sopralluoghi e colloqui con gli agricoltori è stato prelevato, in aziende diverse ma accomunate dalle stesse condizioni pedoclimatiche e stesse tecniche colturali adottate, il materiale appartenente all'ecotipo locale di interesse, "Carciofo di Montelupone" e trasferito in laboratorio così da iniziare le prove per le rispettive fasi della tecnica *in vitro*. Parallelamente sono state raccolte informazioni e dati per una caratterizzazione morfologica e fenologica dell'ecotipo.

La fase di sterilizzazione è stata condotta sottoponendo il materiale vegetale a trattamenti con ipoclorito di sodio come agente sterilizzante per differenti tempi di azione registrando come variabile, una volta prelevato l'espianto (apice meristemico) e posizionato in tubi contenenti substrato MS0 utilizzando lo stereomicroscopio, la percentuale di espianti vivi, inquinati e morti così da poter scegliere la combinazione in grado di assicurare il miglior risultato in termini di percentuale di espianti sani e vitali. La successiva prova di proliferazione è stata effettuata allevando il materiale sterilizzato in differenti substrati contenenti diverse concentrazioni di BA (benziladenina),

IBA (acido indol-butirrico) e TDZ (tidiazuron) con l'obiettivo di ottenere indicazioni utili sul miglior substrato da utilizzare per ottenere un tasso di proliferazione adeguato ed uno sviluppo vegetativo equilibrato. Il materiale vegetale ritenuto idoneo è stato avviato ad una prova di radicazione utilizzando un controllo MS0 ed un substrato MS addizionato con IBA ed infine, le plantule provviste di radici, sono state ambientate in vasetti di torba addizionata con rhizolite e mantenute in condizioni di elevata UR. I risultati hanno permesso di ottenere una buona azione del trattamento sterilizzante e successivamente tassi di proliferazione accettabili mentre, quelli relativi alle fasi successive, hanno confermato le difficoltà di questa specie a radicare *in vitro* e, di conseguenza, sopravvivere *in vivo* (Morone Fortunato *et al.*, 2004) ed evidenziano la necessità di effettuare ulteriori prove per migliorare le rese di materiale di qualità ambientato.

A supporto della tecnica di micropropagazione per la conservazione e valorizzazione del materiale autoctono di carciofo sono state eseguite analisi qualitative e nutrizionali che hanno messo in luce caratteristiche interessanti in termini di solidi solubili, acidità titolabile, contenuto in polifenoli e capacità antiossidante dell'ecotipo propagato *in vitro*, e di altri ecotipi di carciofo identificati nel territorio regionale. Questi risultati confermano l'interesse della coltura *in vitro* per il recupero e la propagazione di linee locali di carciofo garantendo elevati standard qualitativi e nutrizionali del prodotto.

Tipicamedioadriatico - selezione e propagazione di varietà locali per lo sviluppo della filiera di produzione ortofrutticola di qualità nel medio-adriatico

Bruno Mezzetti¹, Stefano Vita², Luca Vita² e Roberto Cappelletti¹

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche

² Laboratorio di Micropropagazione, Azienda Agricola Vita Stefano, Montegiorgio (Fermo)

Il progetto per la valorizzazione di germoplasma ortofrutticolo dell'area Medio-Adriatica, finanziato dal programma MIPAF - OIGA D.M. 18829/2009 - 05/08/2009, ha come obiettivo l'organizzazione di una filiera di produzione locale di frutta, di specie e varietà individuate fra ecotipi locali e nuovi genotipi frutto di incroci e selezioni effettuate dal D3A-UNIVPM. Le specie arboree in valutazione e propagazione sono melo, susino e visciola mentre per i piccoli frutti: fragola, lampone, mirtillo e mora.

A questo scopo sono iniziate delle sperimentazioni atte a testare vari protocolli di micropropagazione reperiti in letteratura scientifica per i genotipi di interesse così da individuare i periodi migliori per il prelievo del materiale vegetale, i trattamenti di sterilizzazione e i substrati più idonei per le rispettive fasi della tecnica di propagazione. Sperimentazioni finalizzate alla messa a punto di protocolli di micropropagazione sono stati avviati per il seguente materiale vegetale:

- Melo: ecotipi locali Gelata e Mela rosa marchigiana e selezioni (sterilizzazioni iniziate testando soluzioni di NaCl (2%, 5%, per diversi tempi di azione 5', 10', 15', 20')
- Susino: selezioni da incroci delle varietà comuncino-giapponesi con *P. brigantia*, NaCl (2%, 5%, per diversi tempi di azione 5', 10', 15', 20')
- Visciola: valutazione diverse linee locali di visciola propagate anche per innesto su portinne-

sto (Ma x Ma1460) propagati mediante metodi tradizionali e micropropagazione (individuando protocolli idonei di sterilizzazione e moltiplicazione), con lo scopo ultimo di evitare onerose pratiche di asportazione polloni.

- Fragola: selezioni prodotte dal dipartimento (D3A- UNIVPM) già disponibili *in vitro*, attualmente in proliferazione (MS0, (controllo) e MS + BA 0,25; 0,5; 1; mg/l + IBA 0,1 mg/l), sterilizzazioni in NaCl (2%, 5%, per diversi tempi di azione 5', 10', 15', 20') di *Fragaria virginiana glauca* (FVG) e ambientamento di *Fragaria chiloensis* (clone grande e piccolo) per futuri incroci.
- Lampone: le varietà Ruby, Rossana e Polka, già disponibili *in vitro* sono state avviate a prove di proliferazione in differenti substrati (MS0 (controllo) e MS + BA 0,25; 0,5; 1; + IBA 0,1 mg/l). Varietà quali: JoanIrene, Tulameen e Himbotop verranno prelevate e avviate prove di sterilizzazione.
- Mora: la varietà Cheyenne, già *in vitro*, sarà proliferata (MS0 (controllo) e MS + BA 0,25; 0,5; 1 mg/l) e ambientata.
- Mirtillo: prove di sterilizzazione con NaCl (2%, 5%, per diversi tempi di azione 5', 10', 15', 20') di materiale vegetale stoccato in frigo (varietà: Duke, Bluecrop, Coville, Blueready) prelevato in diverse epoche.

Il pero (*Pyrus communis* L.) in Puglia: conservazione e valorizzazione della biodiversità

Girolamo Russo e Carmela Pacucci

Dipartimento di Scienze Agro-ambientali e Territoriali, Università di Bari

L'Italia è il paese europeo più ricco di biodiversità per la straordinaria conformazione geomorfologica, per la diversità climatica e per le molteplici tipologie ambientali che vanno dagli habitat semi-desertici del Sud a quelli alpini del Nord. Si tratta di una biodiversità storica, legata quindi alla modificazione dei paesaggi e alla cultura di ogni regione. Tuttavia gran parte di questa diversità ecologica oggi è in grave pericolo di estinzione, proprio a seguito delle profonde trasformazioni che interessano il nostro territorio.

Anche il pero è a rischio di impoverimento varietale. Infatti le statistiche ufficiali agli inizi degli anni Novanta del '900 elencavano circa 30 varietà, ma sul mercato oggi ne troviamo al massimo sei, che costituiscono circa l'80% di tutta la produzione. Il mondo della ricerca guarda con attenzione particolare alla conservazione e valorizzazione delle "vecchie varietà" anche al fine del loro riutilizzo nell'agricoltura sostenibile e nelle biotecnologie. Occorre, inoltre, dare un riconoscimento al ruolo sociale delle agricolture storiche che conservano le varietà locali: così i consumatori stessi hanno maggiore possibilità di scelta e di recupero dei sapori perduti.

La graduale sostituzione delle varietà tradizionali ha investito, com'era ovvio, la Puglia "piana", ossia gran parte della superficie agricola della regione, quella che ha conosciuto i modelli dell'agricoltura

industriale. Solo marginalmente il fenomeno ha interessato le altre zone, tra le quali il Gargano, la Murgia interna (barese, brindisina e tarantina) e in parte il Salento. Questi luoghi rappresentano oggi i serbatoi della diversità frutticola tradizionale della Puglia. Più che mai marginale, il Gargano si rivela, pertanto, un punto di osservazione importante per la conoscenza di varietà "antiche" di pero.

Lavori recenti hanno permesso il censimento sul territorio salentino di una notevole quantità di accessioni tradizionali legate storicamente a questa terra. Nel Barese e nel Foggiano il patrimonio varietale presente è costituito soprattutto da pere estive, dove, almeno fino al 1960, secondo una preziosa monografia di Sansavini (2007), si producevano 170 mila quintali di pere (il 76% della produzione regionale) di cui il 98 % era costituito da varietà locali: tra queste si citano le Perelle di Maggio (Puredd), il Pero Marchese, il Mezzorotolo, il Muzzaduro, l'Ustinella, il Rignanese e, soprattutto, la Pera d'Ischitella.

Obiettivo della presente ricerca è dare un contributo conoscitivo-divulgativo della presenza in territorio pugliese delle molteplici varietà antiche di pero ancora presenti e descrivere le nuove tecniche di conservazione per salvaguardare anche le tradizioni contadine dei territori alla luce delle nuove strategie di valorizzazione sostenibile della biodiversità.

Approcci di crioconservazione di *Pyrus communis* mediante il metodo della *droplet vitrification*

Emiliano Condello¹, Andrea Frattarelli¹, Dario Berrettoni¹, Rosario Muleo² e Emilia Caboni¹

¹ CRA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

² Dipartimento di Produzioni Vegetali, Università della Tuscia

Il CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma (CRA-FRU) è la sede della collezione nazionale *in vivo* di germoplasma frutticolo con circa 8000 accessioni. La crioconservazione rappresenta uno dei metodi complementari all'approccio di conservazione *ex situ* (in campo) e presenta alcuni vantaggi, tra cui i minori costi di mantenimento e la riduzione dei rischi legati a condizioni climatiche avverse.

Germogli di pero (*Pyrus communis* L), cultivar Angelica e portinnesto Farold 40, sono stati moltiplicati *in vitro* su un terreno LP (Quoirin et al., 1977) modificato e in presenza di 1,78 μ M BA e 0,25 μ M IBA (Caboni et al., 1999). Per la cultivar Angelica, al fine di ottimizzare il protocollo di micropropagazione, sono stati anche preliminarmente applicati trattamenti con rutina, floroglucinolo e naringenina, sia in fase di moltiplicazione che di radicazione.

In accordo con il protocollo della *droplet vitrification* proposto da Panis et al. (2005) in banana, gli espianti (gemme ascellari) sono stati inizialmente disidratati per 20 minuti in una *loading solution*, costituita da terreno liquido con glicerolo (2 M) e saccarosio

(0,4 M), e successivamente trattati, con tempi di esposizione crescenti, con soluzione vitrificante PVS2, contenente glicerolo, etilenglicole e DMSO. Gli espianti sono stati, quindi, trasferiti singolarmente in gocce di PVS2 posizionate su una striscia di alluminio e questa immersa in azoto liquido. Dopo 30 minuti gli espianti sono stati trasferiti in una *recovery solution*, contenente saccarosio (1,2 M), a temperatura ambiente per 15 minuti, e, successivamente, trasferiti sul terreno di coltura standard. I controlli sono stati trasferiti direttamente nella *recovery solution*. Quattro settimane dopo il trattamento in azoto liquido sono stati osservati espianti completamente o parzialmente necrotici, con formazione di callo o con sviluppo del germoglio. La percentuale di ricrescita è stata condizionata dalla durata di esposizione alla soluzione PVS2. Ad oggi la sopravvivenza degli espianti (in media 10%) è stata ottenuta in Farold 40 applicando la soluzione vetrificante per 60'. E' in corso l'applicazione di pre-trattamenti degli espianti con fitoregolatori per migliorare la ricrescita dopo la conservazione in azoto liquido.