

MAURIZIO LAMBARDI*

La crioconservazione per la tutela della biodiversità vegetale

Lettura tenuta il 6 marzo 2008

INTRODUZIONE

Si ritiene che, dall'inizio della domesticazione delle piante e della pratica agricola, l'uomo abbia fatto uso, a fini prevalentemente nutrizionali, di circa 5000 specie; se si considera che le specie vegetali a oggi descritte ammontano, a seconda delle fonti, a 235.000-300.000 (Krishnamurthy, 2003), ne deriva che è inferiore al 2% il totale della biodiversità vegetale "utilizzata". Di queste, soltanto circa 150 specie (comprendenti 250.000 cultivars selezionate o razze locali) sono importanti a livello mondiale per l'alimentazione. Esiste quindi un patrimonio importante di specie vegetali sottoutilizzate o neglette che è sottoposto a preoccupante erosione genetica dovuta a fattori naturali (desertificazione e cambiamenti climatici) o indotti dall'uomo (deforestazione e urbanizzazione). Ma anche le specie domestiche e coltivate non sono immuni dai rischi di erosione genetica: la specializzazione colturale, infatti, comporta l'abbandono di forme selvatiche e ancestrali, di razze e varietà locali prodotte dalla primordiale domesticazione contadina (i *landraces*), di cultivar obsolete.

Una recente stima indica in circa 100.000 (quindi, circa 1/3 della biodiversità vegetale descritta) le specie sottoposte a preoccupante erosione genetica o, addirittura, già a rischio di estinzione (BGCI, 2005), con gravi conseguenze in termini sia di miglioramento genetico tradizionale (per la perdita di importanti caratteri dei quali queste specie sono depositarie), sia di produzione di sostanze naturali utili per la salute o per l'alimentazione. Soltanto nel bacino mediterraneo sono già 34 le specie estinte e circa il 9% quelle considerate mi-

* *Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (IVALSA), Firenze*

nacciate (Chessa, 2004), con punte veramente preoccupanti in Paesi quali la Turchia e la Spagna (22% e 20%, rispettivamente). In Italia, oltre il 5% delle specie vegetali sono considerate sottoposte a erosione genetica.

Per bloccare questa “emorragia” di risorse genetiche, a partire dagli anni '70 si è intrapresa, a livello mondiale, una importante opera di raccolta, caratterizzazione e conservazione in “banche del germoplasma” (conservazione *ex situ*) della biodiversità vegetale, grazie alla quale sono stimate in oltre 6 milioni le “entità vegetali” attualmente mantenute in collezioni (IPGRI, 2004). Di queste, circa il 90% sono conservate in banche del seme, localizzate in varie parti del mondo e gestite da Organizzazioni Internazionali sotto l'egida del CGIAR (Consultive Group In Agricultural Research). È da rilevare, peraltro, che circa 1/4 delle risorse genetiche conservate in questa forma mancano di documentazione affidabile, cosa che determina notevoli problemi nel creare un valido “databank”. Le specie a propagazione vegetativa sono preservate in collezioni clonali; questa forma interessa il 9% delle accessioni attualmente conservate nel mondo.

I metodi biotecnologici, quali la conservazione *in vitro* e, soprattutto, la crioconservazione, sono di recente introduzione (attualmente solo l'1% delle accessioni sono mantenute con questo approccio), ma si pongono già come importanti e innovative forme di preservazione della biodiversità vegetale. Infatti, l'approccio tradizionale alla conservazione *ex situ* basato su banche del seme e collezioni clonali presenta alcune limitazioni e inconvenienti. La conservazione a bassa temperatura (in genere a -20°C) non è perseguibile con specie aventi semi non- o sub-ortodossi, cioè semi che vanno incontro a un rapido deperimento e diminuzione della germinabilità se conservati tal quali e che, d'altro canto, non tollerano una consistente riduzione del contenuto in acqua, necessaria per preservarne la germinabilità durante lo stoccaggio al freddo. Molte specie tropicali, ma anche numerose specie arboree di clima temperato (quali castagno, noce, ippocastano, acero, querce) hanno semi non ortodossi (Pence, 1995), “recalcitranti” alla conservazione. Per quanto concerne poi le collezioni clonali, il mezzo con il quale vengono conservate le specie arboree da frutto e da legno, queste necessitano di vasti appezzamenti di terreno per mantenere un ampio numero di accessioni e hanno elevati costi di gestione per i periodici interventi di potatura, di fertilizzazione e irrigazione, di controllo genetico-sanitario, di rinnovazione degli impianti, spesso sostenuti a prezzo di grandi difficoltà dalle istituzioni pubbliche che ne sono tenutarie. Inoltre, le collezioni clonali sottostanno a rischi di perdite a seguito di eventi climatici eccezionali (quali gelate e inondazioni) o di gravi fitopatie, prime fra tutte le virosi.

Per questo motivo, la crioconservazione (conservazione in azoto liquido) sta oggi attirando l'attenzione di molti gruppi di ricerca in Europa e nel mondo. Alla temperatura dell'azoto in fase liquida (-196°C) le cellule vegetali entrano in uno stato di "quiescenza assoluta", in quanto tutte le reazioni fisiche e biochimiche sono praticamente arrestate; in questa particolare condizione, i tempi di conservazione divengono praticamente illimitati. Peraltro, se le cellule sono portate in questa condizione di ultra-raffreddamento seguendo opportune procedure "preparatorie", la vitalità non ne risulta compromessa e, al ritorno a condizioni standard di coltura, queste possono riassumere la loro piena funzionalità. Tra i principali vantaggi della crioconservazione si ricordano: (i) gli spazi assai contenuti per la conservazione (in un contenitore da 50 litri di azoto liquido si possono stoccare tra i 5000 e i 10000 espianti), (ii) i bassi costi di conservazione (in pratica, solo quelli necessari al mantenimento a livello dell'azoto liquido, una sostanza facilmente reperibile e di costo contenuto), (iii) la possibilità di porre in conservazione un'ampia gamma di organi e tessuti, (iv) il mantenimento del materiale vegetale in assoluta sicurezza genetico-sanitaria e (v) la possibilità di operare una vera conservazione "a lungo termine".

Occorre sottolineare che la conservazione in azoto liquido va considerata un sistema complementare (e non alternativo) alla conservazione con metodi tradizionali. Infatti, è dalla combinazione di approcci diversi di conservazione *in situ* ed *ex situ* che si attua la massima tutela della biodiversità vegetale, riducendo al minimo il rischio di perdite accidentali di germoplasma.

COSA SI PUÒ CONSERVARE IN AZOTO LIQUIDO

Come detto, un importante requisito della tecnologia criogena è quello di permettere la conservazione per tempi illimitati di vari organi e tessuti, prevalentemente provenienti da coltura *in vitro*. A questi si aggiungono semi ed embrioni escissi, polline e, di recente, gemme dormienti, prelevati direttamente da piante in campo.

Le "gemme ascellari e apicali" sono i classici organi riproduttivi della micropiaggazione. Utilizzandoli in crioconservazione, si garantisce il mantenimento della rispondenza genetica alla cultivar di appartenenza e, per tale motivo, sono un eccellente espianto per la conservazione del germoplasma di specie da frutto e da legno (Lambardi e Benelli, 2007). Operando allo stereomicroscopio in cappa sterile, le gemme sono ridotte in dimensione mediante taglio apicale ed eliminazione delle perule più esterne, in modo tale da

favorire la penetrazione delle sostanze crioprotettive. A seconda della specie, l'espianto finale che si ottiene è compreso tra 0.3 e 2 mm (Lambardi e De Carlo, 2003). Nelle latifoglie arboree i migliori risultati si ottengono in genere con gemme di circa 1 mm, mantenendo un maggior numero di perule a protezione del meristema dai rischi di disseccamento durante le operazioni di prelievo e preparazione sotto flusso d'aria sterile. Le gemme possono essere anche incluse in capsule di alginato, producendo "semi sintetici" (Lambardi et al., 2006a), che sono poi crioconservati previo trattamento di disidratazione o con soluzione vitrificante. Le gemme di oltre 90 specie sono state a oggi utilizzate con successo in procedure di crioconservazione mediante vitrificazione e immersione diretta in azoto liquido (Sakai e Engelmann, 2007).

Le "colture di callo embriogenico" sono una importante tecnica di rigenerazione *in vitro* che permette alti tassi di produzione di organi bipolari (gli embrioni somatici), geneticamente identici e pronti a "germinare" con modalità simili a quelle degli embrioni zigotici. Nell'ambito delle specie arboree, sono divenuti una tecnica di propagazione affermata per alcune importanti conifere. Sia porzioni ridotte di callo embriogenico, sia i primordi embrionali (generalmente, previo incapsulamento in alginato) possono essere utilizzati con successo in procedure di crioconservazione, offrendo così una valida alternativa alla conservazione del seme di specie non-ortodosse; inoltre, in azoto liquido si possono conservare importanti linee di callo utilizzate in prove di trasformazione genetica o già transgeniche, mantenendone inalterate le potenzialità di proliferazione e morfogenesi. Oltre 5000 linee embriogeniche di 14 specie di conifere sono in crioconservazione in Canada (Reed, 2001). Al contrario, l'applicazione di questa tecnica alle latifoglie arboree è ancora relativamente limitata, ma i risultati sono comunque molto promettenti (Lambardi et al., 2007a). È ipotizzabile che anche le colture cellulari per la produzione di metaboliti secondari possano essere impiegate in procedure di conservazione in azoto liquido, mantenendone inalterate le capacità biosintetiche, ma al momento non si registrano segnalazioni in letteratura.

Oltre agli espianti provenienti da coltura *in vitro*, anche gemme direttamente prelevate *in vivo*, semi e polline possono diventare prezioso materiale di conservazione in azoto liquido. Le "gemme dormienti" di alcuni fruttiferi (melo e pero) sono, ad esempio, prelevate in inverno da piante in campo, introdotte in azoto liquido e, dopo scongelamento, direttamente innestate su portinnesti. Questa interessante e innovativa procedura è brevemente descritta nel successivo paragrafo. I "semi" sono utilizzati in criogenia per la preservazione di specie a prevalente propagazione gamica, laddove la tradizionale conservazione in banche del seme, a -20°C, non può attuarsi efficacemente.

Richiedono un trattamento disidratante per ridurre il contenuto in acqua (in genere sotto il 20%) prima dell'immersione diretta in azoto liquido. Per le specie dotate di grandi semi, si può ricorrere all'escissione e alla crioconservazione dell'asse embrionale. "Polline": anche i granuli pollinici possono essere crioconservati, previo trattamento con procedure analoghe a quelle impiegate con le altre tipologie di espianto.

RECENTI ACQUISIZIONI E APPLICAZIONI DELLA CRIOCONSERVAZIONE ALLE SPECIE VEGETALI

Sebbene esperienze di crioconservazione di cellule e tessuti vegetali furono intraprese da singoli studiosi già 40 anni fa, è solo di recente che si sono registrate le prime applicazioni pratiche della tecnica alla conservazione di germoplasma di specie erbacee e arboree (Panis e Lambardi, 2006). Agli inizi degli anni '70, infatti, la crioconservazione era una pratica già sufficientemente affermata nel campo della conservazione di cellule e organi animali e umani, ma non si riscontrava un vero interesse a trasporre la tecnica in ambito vegetale. È stata la crescente percezione del rischio di "erosione genetica" che ha stimolato un numero sempre maggiore di studiosi e gruppi di ricerca a esplorare le potenzialità della criogenia per la conservazione della biodiversità vegetale. Ciò ha permesso di sviluppare, soprattutto nell'arco dell'ultimo ventennio, metodi sempre più affidabili di conservazione in azoto liquido e di realizzare i primi esempi di "criobanche vegetali" nel mondo (Engelmann, 2004).

La prima, e per lungo tempo unica, tecnica di crioconservazione impiegata è stata quella basata sul "raffreddamento lento" ("slow cooling"). La tecnica prevede il raffreddamento controllato e graduale ($-0.5/-1^{\circ}\text{C}$ al minuto) degli espianti, immersi in una sostanza crioprotettiva (in genere, glicerolo), da temperatura ambiente fino a -40°C , dopodiché gli espianti sono immersi in azoto liquido. Per questo motivo, la tecnica è definita anche di "congelamento a due fasi" ("two-step freezing"). Durante il lento abbassamento termico, l'acqua presente negli spazi extra-cellulari inizia a congelare per prima, determinando concentrazione della soluzione acquosa residua e tras migrazione per osmosi di molecole d'acqua dall'interno verso l'esterno della cellula, con conseguente aumento della concentrazione della soluzione citoplasmatica ("criodisidratazione"). Questo effetto di "disidratazione controllata" della cellula è alla base della sua sopravvivenza alla temperatura ultra-bassa dell'azoto liquido. Infatti, le molecole d'acqua residue di una qualsiasi soluzione acquosa opportuna-

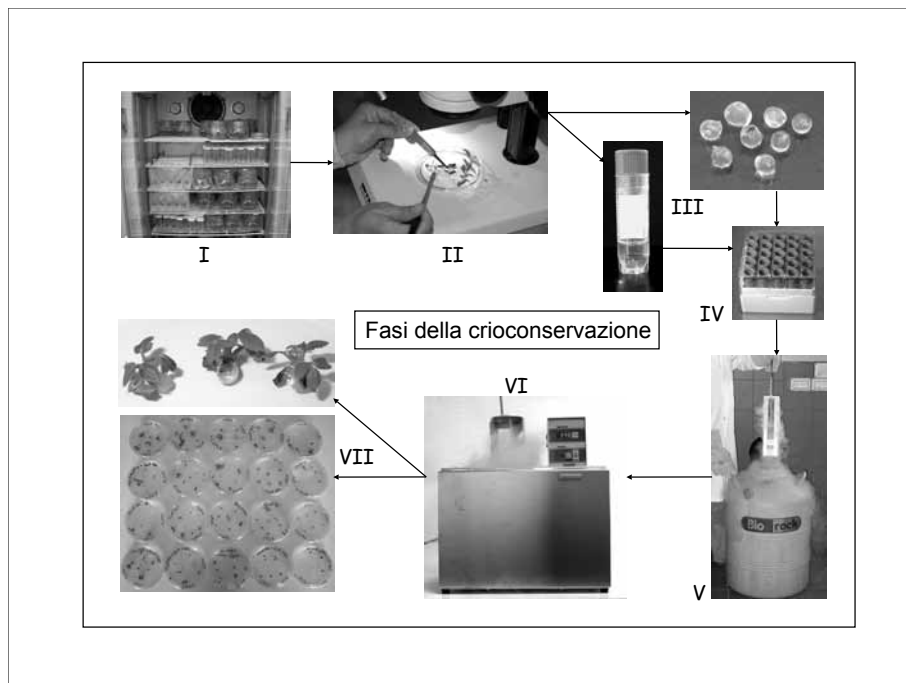


Fig. 1 *Principali fasi di una procedura di crioconservazione di gemme ascellari. I) acclimatazione a 4°C delle colture di germogli dalle quali si effettueranno i prelievi; II) escissione delle gemme allo stereoscopio e sotto cappa sterile; III) trattamento degli espianti con soluzione PVS2 (tecnica “trattamento con soluzione vitrificante”) oppure preparazione di semi sintetici e successiva disidratazione (tecnica “incapsulazione-disidratazione”); IV) le cryovials, contenenti gli espianti “nudi” o incapsulati in alginato, sono assemblate in scatole; V) immersione diretta in azoto liquido; VI) scongelamento in bagno termostato a temperatura di 35-40°C; VII), ricrescita delle gemme (sotto) e “germinazione” dei semi sintetici (sopra)*

mente concentrata non si trasformano più in cristalli di ghiaccio, ma vitrificano. Il termine “vitrificazione” si riferisce al processo fisico di transizione di una soluzione acquosa concentrata ad uno stato amorfo e vetroso (= non cristallino) durante ultra-raffreddamento rapido (Fahy et al., 1984). La vitrificazione è pertanto un fenomeno fisico alternativo alla cristallizzazione delle molecole d’acqua. Cellule sottoposte a ultra-raffreddamento rapido (quale quello che si determinerebbe con l’immersione diretta di espianti in azoto liquido) subiscono danni irreversibili per la formazione di cristalli di ghiaccio extra- e intra-cellulari. I cristalli di ghiaccio intra-cellulari, in particolare, sono molto dannosi perché, ingrandendosi, rompono le membrane cellulari e danneggiano nucleo e organelli. Al contrario, le cellule e gli organi sottoposti a raffreddamento lento vitrificano al momento dell’immersione in azoto

liquido, mantenendosi integri e vitali, pronti a riacquisire il loro pieno metabolismo e ricostruire una coltura di germogli o una linea cellulare quando riportati a temperatura ambiente e reintrodotti in coltura *in vitro*.

La tecnica del “raffreddamento lento” presenta ancora oggi alcune importanti applicazioni pratiche, quale la conservazione di colture embriogeniche di conifere. Richiede però laboratori dotati di “criorefrigeratori”, complesse e costose attrezzature a circolazione di azoto liquido che permettono il graduale avvicinamento degli espianti alla temperatura di -40°C . Questo rende la tecnica non “di massa”, cioè non alla portata dei laboratori medio-piccoli di coltura *in vitro* che volessero approcciare la crioconservazione. Inoltre, quando trasposta alla conservazione di organi complessi (quali le gemme), denota una insufficiente ripetibilità dei risultati in termini di sopravvivenza degli espianti. In tempi relativamente recenti, l’approccio sperimentale alla crioconservazione di specie vegetali ha perciò seguito strade diverse, puntando a contenere, per quanto possibile, i costi di implementazione di un crio-laboratorio, a semplificare le procedure di preparazione degli espianti alla conservazione in azoto liquido e ad elevare l’affidabilità e versatilità dei protocolli. In tal senso, un passaggio fondamentale si è avuto nel 1990 quando due gruppi di ricerca, uno giapponese e uno francese, dimostrarono, quasi in contemporanea, che era possibile l’immersione diretta degli espianti in azoto liquido (passando cioè dalla temperatura ambiente ai -196°C nell’arco di pochi secondi), mantenendone vitalità e capacità di ricrescita dopo scongelamento. Le procedure che svilupparono questi due gruppi sono il “trattamento con soluzione vitrificante” e l’“incapsulazione-disidratazione” (fig. 1). Seppur diverse, garantiscono entrambe ottima vitrificazione degli espianti durante l’ultra-raffreddamento e risultano ancora oggi tra le più utilizzate nei crio-laboratori.

La tecnica del “trattamento con soluzione vitrificante” è basata sul trattamento degli espianti (in genere, gemme ascellari o apicali) con PVS2 (Plant Vitrification Solution n. 2; Sakai et al., 1990), una miscela concentrata di tre crioprotettivi (30% glicerolo, 15% etileneglicole e 15% dimetilsulfossido) in saccarosio 0.4 M, molto efficace nell’indurre protezione e disidratazione delle cellule mediante “osmodisidratazione”. Richiede particolare attenzione nel selezionare, per ogni combinazione specie/espianto, un tempo idoneo di trattamento con PVS2, sufficientemente lungo da garantire protezione al momento dell’immersione in azoto liquido, senza diventare di per sé tossico per le cellule (causa la componente dimetilsulfossido) quando lo si protrae eccessivamente. Dopo il trattamento, crioprovette da 2 cc, contenenti gli espianti ancora immersi in una aliquota di PVS2, sono direttamente immerse in azoto liquido. Una recente e interessante variante è la tecnica del “congelamento

in goccia” (Schäfer-Menuhr et al., 1997). In questa procedura, l’espianto è immerso in una goccia di PVS2 (o di altro crioprotettivo), adagiata sopra una striscia d’alluminio. Dopo il periodo di trattamento a temperatura ambiente, la striscia d’alluminio, portante 4-5 “gocce+espianto”, è inserita in una crioprovetta e questa immersa in azoto liquido.

La tecnica di “incapsulazione-disidratazione” (Fabre e Dereuddre, 1990) è basata sulla conservazione di “semi sintetici”: gli espianti (gemme ascellari, embrioni somatici o porzioni di callo embrionico) sono inizialmente immersi in una soluzione di alginato di sodio; la soluzione è quindi fatta gocciolare (ogni goccia contenente un espianto) in un’altra di cloruro di calcio che, per scambio cationico, determina la formazione di capsule sferiche solide. Nella procedura di crioconservazione, i semi sintetici così ottenuti sono sottoposti a disidratazione in flusso d’aria sterile (quello di una cappa a flusso laminare) o in gel di silice per un tempo appropriato a ridurne sensibilmente il contenuto in acqua. A fine trattamento disidratante, le capsule sono inserite in crioprovette e queste immerse direttamente in azoto liquido. È una tecnica che comporta alcuni vantaggi, quali la facilità di manipolazione e trattamento dei semi sintetici, nonché la possibilità di includere regolatori di crescita nella capsula che possono favorirne la “germinazione” dopo scongelamento e reintroduzione in vitrocultura. Una variante proposta da Sakai (2000) prevede il trattamento dei semi sintetici con la soluzione PVS2 (“incapsulazione-vitrificazione”), combinando così la praticità degli espianti inclusi in semi sintetici con l’efficacia vitrificante del PVS2. Anche la crioconservazione dei semi “natural” o dei loro assi embrionali escissi si basa su una preventiva disidratazione degli espianti, in genere in flusso d’aria, per portare il loro contenuto in acqua a valori inferiori al 20%. Semi e assi embrionali, posti all’interno di crioprovette, possono quindi essere direttamente immersi in azoto liquido.

I protocolli di crioconservazione comprendono altri passaggi precedenti il trattamento vitrificante principale, quali l’acclimatazione al freddo (4°C) delle colture di germogli o delle linee cellulari e i trattamenti con saccarosio e/o crioprotettivi, aventi tutti una funzione di preparazione degli espianti allo shock termico che subiranno con l’immersione diretta in azoto liquido. Successivamente alla conservazione in azoto liquido, lo scongelamento degli espianti deve essere molto veloce, al fine di evitare, durante la devitrificazione, la trasformazione delle molecole d’acqua in cristalli di ghiaccio extra- e intra-cellulari per un fenomeno detto di “ricristallizzazione migratoria”: infatti, se il rialzo termico avviene lentamente, le prime molecole d’acqua che si formano funzionano da nuclei di condensazione, richiamando altre molecole d’acqua

ed evolvendo in grossi cristalli di ghiaccio. Uno scongelamento sufficientemente rapido si ottiene trasferendo le crioprovette, contenenti gli espianti o i semi sintetici, dall'azoto liquido a un bagno termostato a 40°C. In questo modo, in circa un minuto si ha il passaggio degli espianti da -196°C a una temperatura superiore a 0°C. La reintroduzione in coltura *in vitro*, infine, deve avvenire su substrati colturali che favoriscano un pronto "risveglio" degli espianti. In genere, con gemme ascellari (o con i semi sintetici che le contengono) si fa ricorso a concentrazioni elevate di citochinine, mentre per il recupero di linee embriogeniche possono essere necessarie combinazioni di citochinine e auxine. La germinazione di semi o assi embrionali non richiede il ricorso a regolatori di crescita.

Quella delle "gemme dormienti" è una procedura di crioconservazione molto particolare e innovativa, in quanto non prevede coltura *in vitro*. È idonea alla conservazione del germoplasma di specie da frutto che possono essere innestate a gemma (Towill e Ellis, 2008). La tecnica inizia con il prelievo di marze da piante in campo durante la stagione invernale, quando le gemme hanno già accumulato un consistente numero di ore in freddo. Dalle marze sono ottenuti segmenti uni-nodali che vengono mantenuti a -5°C in ambiente ventilato, fino a quando il loro contenuto in acqua non si riduce a valori pari o inferiori al 30%. I segmenti vengono poi raffreddati lentamente fino a -30°C e immersi in azoto liquido. Dopo scongelamento e reidratazione dei segmenti, le gemme vengono escisse e utilizzate per l'innesto a gemma su portinnesti appositamente preparati. Sebbene di recente sviluppo, la tecnica ha già trovato pratica applicazione presso l'NCGRP/National Center for Genetic Resources Preservation dell'USDA di Fort Collins (Colorado, USA), dove oltre 2500 accessioni di *Malus* spp. e circa 60 di *Prunus cerasus* sono oggi preservate con questo approccio (Ellis, com. pers.).

La "crioterapia" è una promettente applicazione della criogenia al risanamento da virosi e fitoplasmi. Con l'immersione in azoto liquido, infatti, avviene una naturale "selezione" delle cellule del meristema che sopravvivono all'ultra-raffreddamento: quelle più apicali (duomo meristematico) sono caratterizzate da una soluzione citoplasmatica più concentrata e, pertanto, risultano più propense alla vitrificazione. Al contrario, man mano che ci si allontana dall'apice meristematico, le cellule sono più "ricche" in acqua e subiscono più facilmente la formazione di cristalli di ghiaccio intra-cellulari. Dal momento che, nelle piante virosate, le cellule della parte più apicale dei meristemi (in genere, quelle localizzate nei primi 0.2 mm) sono virus-esenti, sviluppando un protocollo che ottimizzi questo "effetto selezione" delle cellule che sopravvivono a -196°C, è possibile recuperare dall'azoto liquido espianti

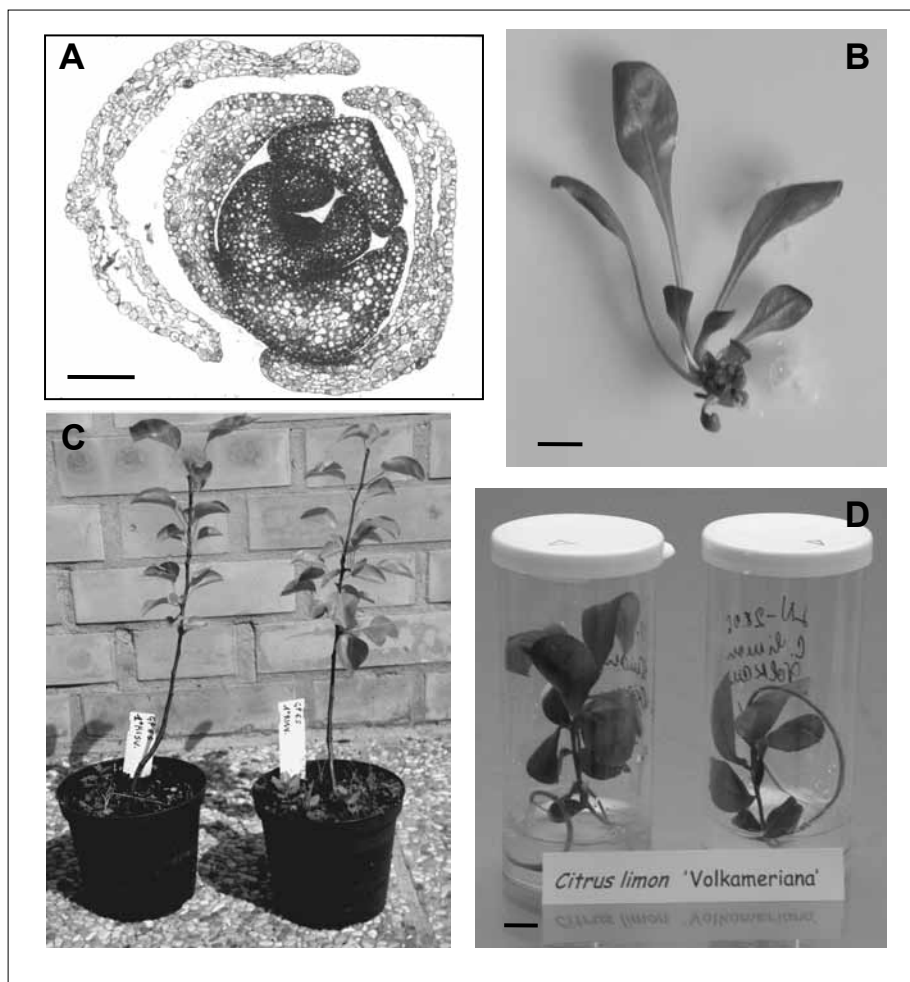


Fig. 2 *Recupero di espianti da crioconservazione. A)* la sezione trasversale di una gemma di pioppo proveniente da conservazione in azoto liquido evidenzia la perfetta integrità dell'apice meristemático. Si notano alcune rotture solo nei tessuti delle perule, peraltro ininfluenti ai fini del corretto sviluppo della gemma nel post-conservazione (barra, 0.1 mm); *B)* un germoglio di radicchio rosso (tipologia "Chioggia"), sviluppato da una gemma sottoposta a crioconservazione mediante "trattamento con soluzione vitrificante" (barra, 1 mm); *C)* piante di pero di varietà autoctone del Veneto, ricostituite dopo crioconservazione di gemme ascellari; *D)* semenzali di *Citrus limon* 'Volkameriana' (= *Citrus volkameriana*), originati da embrioni nucellari sviluppati da semi disidratati e crioconservati (barra, 1 cm)

che produrranno piante "virus-free". La procedura è già stata sperimentata con successo su numerose combinazioni specie/patogeno (quali, susino/PPV, vite/

GVA, banana/BSV, numerosi virus della patata; Wang e Valkonen, 2007), risultando molto efficace e di più semplice applicazione che la tradizionale pratica della termoterapia e coltura di meristema. Inoltre garantirebbe la conservazione a lungo termine di germoplasma sicuramente esente da virus.

ESEMPI DI PROCEDURE DI CRIOCONSERVAZIONE SVILUPPATE PRESSO IL CNR-IVALSA DI FIRENZE

Presso il CNR-IVALSA/Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree di Sesto Fiorentino (Firenze) è operante il “Laboratorio di Biotecnologie per la Conservazione *in vitro* e la Crioconservazione” nel quale si studiano tecniche innovative di conservazione del germoplasma vegetale, quali la conservazione in crescita rallentata (a 4°C) e la crioconservazione. Nell’arco di un decennio sono state sperimentate varie tecniche di crioconservazione di gemme, semi naturali e sintetici, assi embrionali e linee embriogeniche, con risultati in alcuni casi di elevato interesse scientifico e applicativo.

La procedura di crioconservazione sviluppata per gemme ascellari di pioppo bianco (*Populus alba*), ad esempio, si basa sul trattamento con soluzione PVS2 e immersione diretta degli espianti in azoto liquido. Garantisce una sopravvivenza degli espianti superiore al 90% che, in ragione di oltre il 60%, sono poi in grado di proseguire nello sviluppo e originare piante acclimatate (Lambardi et al., 2000). Lo stesso protocollo si è poi rivelato efficace anche con altre specie di pioppo (Lambardi, 2002) o, recentemente, con cloni selezionati da piante monumentali di pioppo bianco (Benelli et al., 2008). Indagini isto-anatomiche, condotte su gemme provenienti da conservazione in azoto liquido, hanno dimostrato l’ottima protezione delle cellule meristematiche indotta dal trattamento con soluzione vitrificante PVS2 (fig. 2A). Relativamente alle specie da frutto, risultati molto promettenti sono stati ottenuti anche con la crioconservazione di gemme di susino domestico (De Carlo et al., 2000) e kaki (Benelli et al., 2004). Più problematica, invece, si è rivelata l’applicazione della tecnica a germoplasma di olivo per il quale, di recente, pur pervenendo a una sopravvivenza del 25% di gemme della cv Frantoio sottoposte a crioconservazione, si è confermata la difficoltà a indurre la successiva ricrescita degli espianti (Lynch et al., 2007).

Gemme ascellari provenienti da coltura *in vitro* sono state utilizzate anche per la salvaguardia di germoplasma del Veneto, attraverso una collaborazione pluriennale con Veneto Agricoltura. Efficienti protocolli di crioconservazione sono stati sviluppati per linee selezionate di radicchio rosso (Lambardi et al.,

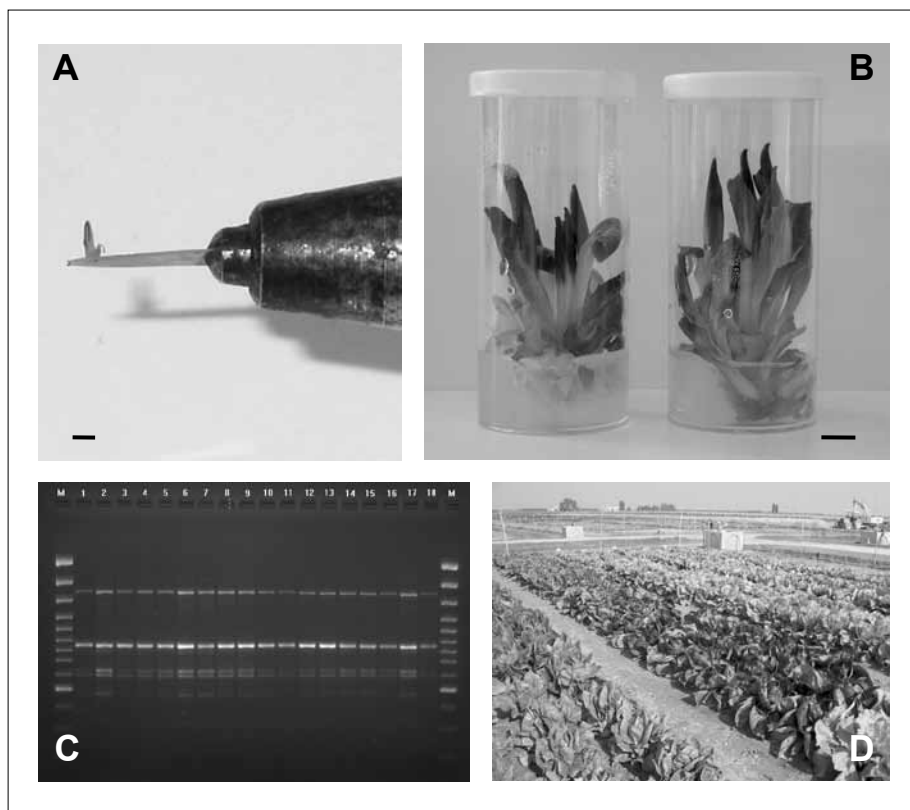


Fig. 3 Crioconservazione di radicchio rosso. A) una gemma proveniente da coltura in vitro e pronta per essere utilizzata in una procedura di crioconservazione (barra, 1 mm); B) sviluppo di germogli da gemme crioconservate (barra, 1 cm); C) analisi molecolare condotta con RAPDs, che evidenzia la rispondenza genetica tra la coltura di germogli utilizzata per i prelievi di gemme (profili 1-7) e i germogli ottenuti dopo conservazione in azoto liquido (profili 8-18); D) prove in campo di valutazione morfologica di piante provenienti da crioconservazione

2006b; fig. 2B) e antiche cultivar di melo e pero (Schiavon et al., 2003; fig. 2C), in coltura presso il Laboratorio di Micropropagazione del Centro Sperimentale Ortofricolo “Po di Tramontana” di Rosolina (RO). Le gemme di radicchio rosso (fig. 3A), in particolare, si sono rivelate un materiale molto idoneo alla conservazione in azoto liquido mediante la tecnica di “trattamento con soluzione vitrificante”. La procedura ottimizzata produce elevate percentuali di sopravvivenza e pronta ricostituzione delle linee dopo il recupero da azoto liquido (fig. 3B).

Semi e assi embrionali sono stati impiegati per la crioconservazione di germoplasma di *Pistacia* spp. (Ozden-Tokatli et al., 2007) e *Arachis hypogaea*

(Ozudogru et al., 2009), attraverso una collaborazione con il Gebze Institute of Technology di Kocaeli, Turchia. La tecnica impiegata è quella della disidratazione di semi (o di assi embrionali escissi) e immersione diretta in azoto liquido. Da alcuni anni, inoltre, si sta sviluppando questa stessa metodologia con semi di agrumi (fig. 2D). La conservazione di germoplasma di *Citrus* si può avvalere, infatti, del seme, in quanto la maggior parte delle specie è poliembrionica, con prevalente germinazione dei soli embrioni nucellari (identici al genotipo materno) a discapito dell'embrione zigotico. Nonostante questa importante peculiarità, la semplice conservazione a -20°C del seme di agrumi non è praticabile per le sue caratteristiche di "recalcitranza" alla disidratazione e allo stoccaggio (seme non ortodosso). Lo studio, pertanto, ha lo scopo di fornire un importante strumento di salvaguardia della ampia biodiversità del genere *Citrus*. I risultati già conseguiti (Lambardi et al., 2004; Lambardi et al., 2007b) sono alla base di un progetto di duplicazione in azoto liquido di una antica collezione Medicea di agrumi (vedi paragrafo "La crioconservazione e le criobanche vegetali nel mondo").

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti anche con la crioconservazione di colture di callo embriogenico. Linee a elevata potenzialità embriogenica di olivo (*Olea europaea*, cv. Canino) e ippocastano (*Aesculus hippocastanum*) sono state crioconservate con la tecnica di "trattamento con soluzione PVS2" e immersione diretta in azoto liquido di porzioni di callo embriogenico (Lambardi et al., 2002, 2005). Cellule di callo embriogenico di frassino ossifillo (*Fraxinus angustifolia*), invece, sono state prima incluse in capsule di alginato, sottoposte a trattamento con PVS2 e crioconservate (Tonon et al., 2001). Entrambe le tecniche si sono dimostrate efficaci e hanno consentito la ricostituzione delle linee embriogeniche dopo scongelamento, mantenendone inalterate le potenzialità proliferative ed embriogeniche.

STABILITÀ GENETICA DEL MATERIALE DA CRIOCONSERVAZIONE

Le principali peculiarità della crioconservazione (assenza di subcolture e totale arresto del metabolismo cellulare) ne fanno una tecnica sicura in termini di stabilità genetica del materiale conservato. Prova di ciò sono gli oltre 140 lavori sperimentali che, negli ultimi 25 anni di esperienze di crioconservazione di specie vegetali, hanno valutato gli aspetti di stabilità a livello fenotipico, citologico, biochimico e biomolecolare del materiale sottoposto a conservazione in azoto liquido, non producendo mai evidenze di alterazioni stabili importanti (Harding, 2004). Negli studi condotti presso il CNR-IVALSA,

grande attenzione è posta nell'accertare la stabilità genetica delle colture provenienti da crioconservazione. Ad esempio, le indagini morfologico-molecolari condotte sulle linee di radicchio rosso hanno sempre dimostrato il mantenimento della rispondenza genetica (fig. 3C) e morfologica (fig. 3D) del materiale proveniente da crioconservazione (De Carlo et al., 2007).

Occorre sottolineare, peraltro, che la crioconservazione di gemme ascellari è inserita all'interno di due cicli di micropropagazione, il primo di preparazione del materiale alla crioconservazione, il secondo finalizzato a sviluppare una coltura di germogli dagli espianti recuperati dall'azoto liquido. In tal senso, risulta importante agire con la massima cautela in entrambe queste fasi: le colture di germogli devono essere correttamente monitorate in termini di sicurezza genetico-sanitaria prima del prelievo degli espianti; allo stesso modo, attenzione deve essere posta nel post-crioconservazione, evitando procedure di coltura e rigenerazione a rischio di variabilità somaclonale nelle fasi di ricrescita e proliferazione degli espianti.

LA CRIOCONSERVAZIONE E LE CRIOBANCHE VEGETALI NEL MONDO

L'Unione Europea crede molto nelle potenzialità della crioconservazione per la salvaguardia della biodiversità vegetale. Ne è testimonianza l'Azione COST 871 "CryoPlanet, Cryopreservation of Crop Species in Europe" che, sotto l'egida dell'European Science Foundation, ha avuto avvio nel settembre 2006 e si concluderà nel 2010 (<http://www.biw.kuleuven.be/dtp/tro/cost871/Home.htm>). L'Azione è stata sottoscritta da 18 Paesi dell'UE (Belgio, Bulgaria, Repubblica Ceca, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Inghilterra, Italia, Lussemburgo, Olanda, Polonia, Portogallo, Romania, Serbia, Slovacchia, Spagna) e ha già visto l'organizzazione di alcuni importanti Meeting, uno dei quali a Firenze, presso l'Area di Ricerca CNR (10-12 maggio 2007), con Atti pubblicati su un numero speciale (n. 4, 2007) della rivista internazionale «Advances in Horticultural Science».

Per quanto l'applicazione della tecnologia criogena alla tutela della biodiversità vegetale sia relativamente recente, già esistono nel mondo esempi molto rappresentativi di criobanche del germoplasma. Tra le più importanti si ricordano:

- il già citato NCGRP/National Center for Genetic Resources Preservation dell'USDA di Fort Collins (Colorado, USA) ove germoplasma di melo e ciliegio è crioconservato con la tecnica delle "gemme dormienti";
- il National Clonal Germplasm Repository (NCGR) di Corvallis (USA)

ove, con la medesima tecnica, sono crioconservate oltre 100 accessioni di pero;

- il Centro per la crioconservazione del germoplasma di banana (oltre 500 accessioni) dell'INIBAP Transit Centre-Bioversity International, presso la Katholic University di Leuven (Belgio);
- la criobanca del Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research di Gatersleben (Germania) ove si conservano più di 1000 accessioni di patata, oltre a germoplasma di *Allium* e *Mentha*;
- l'AFOCEL (Association Forêt Cellulose), in Francia, che crioconserva germoplasma di eucalitto (gemme dormienti);
- il "National Institute of Agrobiological Resources" in Giappone (oltre 400 accessioni di gelso);
- le oltre 5000 linee embriogeniche di importanti conifere, mantenute in crioconservazione in Canada, sotto l'egida del British Columbia Ministry of Forests.

Nel nostro Paese mancano al momento esempi di criobanche già operanti. Peraltro, è attualmente in corso presso il CNR-IVALSA un programma biennale per la realizzazione di una criobanca di germoplasma di *Citrus* spp., con finanziamento dell'Ente Cassa di Risparmio di Firenze e la collaborazione della Soprintendenza Speciale per il Patrimonio Storico, Artistico ed Etnoantropologico e per il Polo Museale della città di Firenze. Lo studio ha come obiettivo la duplicazione in azoto liquido dell'antica collezione di agrumi della Villa Medicea di Castello, iniziata nel XVI secolo da Cosimo I de' Medici e comprendente oltre 500 accessioni, alcune delle quali presenti in uno o pochi esemplari, spesso non rintracciabili altrove. La criobanca avrà lo scopo di salvaguardare questo prezioso germoplasma dai "rischi del tempo" e costituirebbe il primo esempio in Italia di applicazione della crioconservazione alla tutela della biodiversità vegetale.

CONCLUSIONI

Sono a tutti noti gli importanti progressi prodotti dalle biotecnologie nei settori della caratterizzazione e della propagazione del germoplasma vegetale, grazie a tecniche sempre più raffinate e affidabili di biologia molecolare e di coltura *in vitro*. Al contrario, meno conosciute sono le prospettive che apre la crioconservazione nella tutela della biodiversità vegetale, anche perché la criogenia è solo di recente applicazione a questo settore. Le potenzialità sono comunque notevoli, grazie anche ai progressi compiuti nello sviluppo

di procedure semplici e affidabili: basti pensare che in un contenitore medio di azoto liquido (50 litri) si può replicare una collezione clonale di 2-3 ha, a costi assai contenuti e in assoluta sicurezza genetico-sanitaria. Nel mondo, già si annoverano importanti esempi di centri di conservazione in azoto liquido di germoplasma vegetale. È logico attendersi, in un futuro non lontano, l'inclusione a pieno titolo delle criobanche tra i sistemi più affidabili di conservazione *ex situ*, al pari di banche del seme e collezioni clonali. In tal senso, è da accogliere favorevolmente il crescente interesse riservato, anche nel nostro Paese, a questa tecnologia.

RINGRAZIAMENTI

Un sincero ringraziamento al Prof. Ario Ceccotti, Direttore del CNR-IVALSA, e ai principali collaboratori dell'Autore nell'attività di ricerca e sviluppo della crioconservazione, Dr.sse Carla Benelli e Anna De Carlo. Un doveroso ringraziamento va anche all'Ente Cassa di Risparmio di Firenze, per il finanziamento al progetto "CRIOGERM", e al Prof. Franco Scaramuzzi, Presidente dell'Accademia dei Georgofili, per aver promosso la presentazione di questa lettura nel prestigioso contesto dell'Accademia.

RIASSUNTO

La crioconservazione apre importanti prospettive alla tutela del germoplasma vegetale, in quanto permette la conservazione in azoto liquido di organi e tessuti provenienti da coltura *in vitro* (gemme ascellari e apicali, calli embriogenici ed embrioni somatici), gemme dormienti, semi interi e assi embrionali; la tecnica ha bassi costi e permette la conservazione per tempi illimitati e in assoluta sicurezza genetico-sanitaria. Alla temperatura di -196°C, infatti, tutte le reazioni fisiche e biochimiche della cellula sono praticamente arrestate. Le tecniche di recente sviluppo ("trattamento con soluzione vitrificante", "incapsulazione-disidratazione", "incapsulazione-vitrificazione", "congelamento in goccia") hanno tutte il vantaggio di permettere la diretta immersione degli espianti in azoto liquido, con grande semplificazione delle procedure. Con questo approccio, efficienti protocolli di crioconservazione sono stati sviluppati per numerose specie vegetali, operando principalmente mediante trattamento di gemme ascellari e apicali con soluzione vitrificante PVS2 o con la disidratazione di espianti incapsulati in alginato ("semi sintetici"). Presso il CNR-IVALSA di Firenze è operante un gruppo di lavoro che ha in questi anni sviluppato e ottimizzato procedure di crioconservazione per gemme ascellari, semi e linee embriogeniche di varie specie arboree (quali pioppo, susino, olivo, melo, pero, kaki, pistacchio, ippocastano, frassino) e specie orticole (radicchio rosso). Mentre l'UE mostra attenzione e interesse a questo settore della ricerca, per il quale ha avviato nel 2006 l'Azione COST 871 (CryoPlanet, Cryopreservation of Crop Species in Europe) alla quale

partecipano 17 Paesi europei, già esistono nel mondo importanti esempi di criobanche vegetali. In Italia è attualmente in corso un progetto per la realizzazione di una criobanca che raccoglierà le accessioni di una antica collezione Medicea di agrumi.

ABSTRACT

Cryopreservation opens important prospects to the safeguard of plant germplasm, allowing the conservation in liquid nitrogen of organs and tissues from *in vitro* culture (shoot tips, embryogenic callus and somatic embryos), dormant buds, entire seeds and embryonic axes. Plant material can be stored in liquid nitrogen at low cost, for unlimited time and in absolute sanitary and genetic safety, as at the temperature of -196°C all the biochemical and physical cell processes are completely arrested. Newly developed techniques ("treatment with vitrification solution", "encapsulation-dehydration", "encapsulation-vitrification", "droplet-freezing") have all the advantage of allowing the direct immersion of explants in liquid nitrogen, thus producing a marked simplification of procedures. This way, effective cryopreservation protocols have been developed for plant species, mainly by the treatment of shoot tips with the PVS2 solution or by the dehydration of alginate-encapsulated explants ("synthetic seeds"). In recent years, a working group of the CNR-IVALSA of Florence has developed and optimized procedures for the cryopreservation of shoot tips, seeds and embryogenic lines from various woody species (such as poplar, plum, olive, apple, pear, persimmon, pistachio, horsechestnut, ash), as well as horticultural crops (red chicory). While the EU shows great attention and interest to this research area, promoting the onset in 2006 of the COST Action 871 (CryoPlanet, Cryopreservation of Crop Species in Europe) which gathers 17 European countries, promising examples of "cryogenic repositories" for plant species are already existing in the world. In Italy, a project is running, aimed to the establishment of a cryobank which will preserve the accessions from an ancient Medicean collection of citrus.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BENELLI C., GIORDANI E., PEDUTO F., BELLINI E. (2004): *Crioconservazione di Diospyros kaki L.*, Atti VII Giornate Scientifiche SOI, Napoli, pp. 391-393.
- BENELLI C., CAPUANA C., DE CARLO A., TSVETKOV I. (2008): *Application of cryopreservation to the long-term storage of poplar and aspen (Populus spp.) germplasm*, «MTT Agrifood Research Finland», 153, pp. 46-47.
- BGCI (2005): in <http://www.bgci.org/>
- CHESSA I. (2004): *Risorse genetiche delle piante della macchia mediterranea*, «Italus Hortus», 11, pp. 20-24.
- 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*, «CryoLetters», 21, pp. 215-222.
- DE CARLO A., PREVIATI A., BENELLI C., DA RE F., GIANNINI M., LAMBARDI M. (2007): *Molecular validation of a micropropagation-cryopreservation procedure for red chicory (Ci-*

- chorium intybus L.) selected lines, COST Action 871, Oviedo (Spain), 12-14 aprile, pag. 56-57.
- ENGELMANN F. (2004): *Plant cryopreservation: progress and prospects*, *In vitro Cell. & Dev. Biol.-Plant*, 40, pp. 427-433.
- FABRE J., DEREUDDRE J. (1990): *Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips*, *CryoLetters*, 11, pp. 413-126.
- FAHY G.M., MACFARLANE D.R., ANGELL C.A., MERYMAN H.T. (1984): *Vitrification as an approach to cryopreservation*, *Cryobiology*, 21, pp. 407-426.
- HARDING K. (2004): *Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review*, *CryoLetters*, 25, pp. 3-22.
- IPGRI (2004): in <http://www.ipgri.cgiar.org/themes/human/economics.htm>
- KRISHNAMURTHY K.V. (2003): *Textbook of Biodiversity*, Science Publ. Inc., Enfield, pp. 20-38.
- LAMBARDI M. (2002): *Cryopreservation of germplasm of poplar (Populus species)*, in L.E. Towill (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 50 Cryopreservation of Plant Germplasm II*, Springer, Berlin Heidelberg, pp. 269-286.
- LAMBARDI M., FABBRI A., CACCAVALE A. (2000): *Cryopreservation of white poplar (Populus alba L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips*, *Plant Cell Reports*, 19, pp. 213-218.
- LAMBARDI M., LYNCH P.T., BENELLI C., MEHRA A., SIDDIKA A. (2002): *Towards the cryopreservation of olive germplasm*, *Adv. Hort. Sci.*, 16, pp. 165-174.
- LAMBARDI M., DE CARLO A. (2003): *Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees*, in S.M. Jain and K. Ishii (eds), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, pp. 815-840.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., BIRICOLTI S., PUGLIA A.M., LOMBARDO G., SIRAGUSA M., DE PASQUALE F. (2004): *Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/ cryopreservation of Citrus intact seeds*, *CryoLetters*, 25, pp. 81-90.
- LAMBARDI M., DE CARLO A., CAPUANA M. (2005): *Cryopreservation of embryogenic callus of Aesculus hippocastanum L. by vitrification/one-step freezing*, *CryoLetters*, 26, pp. 185-192.
- LAMBARDI M., BENELLI C., OZUDOGRU A.E., OZDEN-TOKATLI Y. (2006a): *Synthetic seed technology in ornamental plants*, in J.A. Teixeira da Silva (ed), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, II, Global Science Books, UK, pp. 347-354.
- LAMBARDI M., BENELLI C., DE CARLO A., PREVIATI A., DA RE F., GIANNINI M. (2006b): *Biotechnologies for the preservation of selected red chicory (Cichorium intybus L.) lines*, *Acta Horticulturæ*, 725, pp. 311-318.
- LAMBARDI M., BENELLI C. (2007): *La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree*, *Frutticoltura*, 6, pp. 34-39.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU A.E., BENELLI C. (2007a): *Cryopreservation of embryogenic callus*, in Reed B. (ed), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, Berlin, pp. 177-210.
- LAMBARDI M., HALMAGYI A., BENELLI C., DE CARLO A., VETTORI C. (2007b): *Seed cryopreservation for conservation of ancient Citrus germplasm*, *Adv. Hort. Sci.*, 21, pp. 198-202.
- LYNCH P.T., SIDDIKA A., MEHRA A., FABBRI A., BENELLI C., LAMBARDI M. (2007): *The challenge of successful cryopreservation of olive (Olea europaea L.) shoot tips*, *Adv. Hort. Sci.*, 21, pp. 211-214.

- OZDEN-TOKATLI Y., OZUDOGRU E.A., GUMUSEL F., LAMBARDI M. (2007): *Cryopreservation of Pistacia spp. seeds by dehydration and one-step freezing*, «CryoLetters», 28, pp. 83-94.
- OZUDOGRU E.A., OZDEN-TOKATLI Y., GUMUSEL F., BENELLI C., LAMBARDI M. (2009): *Development of a cryopreservation procedure for peanut (Arachis hypogaea L.) embryonic axes and its application to local Turkish germplasm*, «Adv. Hort. Sci.», 23, in stampa.
- PANIS B., LAMBARDI M. (2006): *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)*, in J. Ruane and A. Sonnino (eds), *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*, FAO, Rome, pp. 61-78.
- PENCE V.C. (1995): *Cryopreservation of recalcitrant seeds*, in Y.P.S. Bajaj (ed), *Cryopreservation of Plant Germplasm I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, xxxii, Springer, Berlin Heidelberg, pp. 29-50.
- REED B.M. (2001): *Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants*, «CryoLetters», 22, pp. 97-104.
- SAKAI A. (2000): *Development of cryopreservation techniques*, in F. Engelmann and H. Takagi (eds), *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*, IPGRI, Rome, pp. 1-7.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I. (1990): *Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification*, «Plant Cell Reports», 9, pp. 30-33.
- SAKAI A., ENGELMANN F. (2007): *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review*, «CryoLetters», 28, pp. 151-172.
- SCHÄFER-MENHUR A., SCHUMACHER H.M., MIX-WAGNER G. (1997): *Cryopreservation of potato cultivars - design of a method for routine application in genebanks*, «Acta Horticulturae», 447, pp. 477-482.
- SCHIAVON L., PREVIATI A., DA RE F., LAMBARDI M., BENELLI C. (2003): *Recupero, salvaguardia e conservazione di germoplasma frutticolo autoctono del Veneto*, «L'Informatore Agrario», 16, pp. 53-55.
- TONON G., LAMBARDI M., DE CARLO A., ROSSI C. (2001): *Crioconservazione di linee embriogeniche di Fraxinus angustifolia Whal*, Atti del "VI Convegno Nazionale Biodiversità", Valenzano, pp. 619-625.
- TOWILL L.E., ELLIS D.D. (2008): *Cryopreservation of dormant buds*, in B. Reed (ed), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, Berlin, pp. 421-442.
- WANG Q., VALKONEN J.P.T. (2007): *Elimination of viruses and phytoplasma by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips: analysis of all cases*, «Adv. Hort. Sci.», 21, pp. 265-269.