



**CONSERVAZIONE  
*EX SITU DEL*  
**GERMOPLASMA  
*VEGETALE*****

Nel dopoguerra, in seguito alla nascita di organizzazioni mondiali come le Nazioni Unite (1945), iniziò ad essere avvertita l'esigenza di dare agli stati membri una base comune anche riguardo alle tematiche ambientali

1948 – fondazione della:

*International Union for the Protection of Nature (IUPN)*

1956 - il nome della IUPN viene modificato in:

*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)*

1990 – il nome viene ufficialmente contratto in:

*The World Conservation Union (IUCN)*

# *RED DATA BOOK e RED LISTS*

SONO PUBBLICAZIONI REDATTE DALLA IUCN IN CUI  
VENGONO RIPORTATI I TAXA A RISCHIO DI ESTINZIONE E  
IL LORO STATO DI CONSERVAZIONE

# RED DATA BOOK e RED LISTS

SONO PUBBLICAZIONI REDATTE DALLA IUCN IN CUI VENGONO RIPORTATI I TAXA A RISCHIO DI ESTINZIONE E IL LORO STATO DI CONSERVAZIONE

- 1966: primo *Red Data Book*, composto da due volumi dedicati rispettivamente a mammiferi e uccelli

# RED DATA BOOK e RED LISTS

SONO PUBBLICAZIONI REDATTE DALLA IUCN IN CUI VENGONO RIPORTATI I TAXA A RISCHIO DI ESTINZIONE E IL LORO STATO DI CONSERVAZIONE

- 1966: primo *Red Data Book*, composto da due volumi dedicati rispettivamente a mammiferi e uccelli
- 1978: primo *Red Data Book* dedicato alle sole piante

# RED DATA BOOK e RED LISTS

SONO PUBBLICAZIONI REDATTE DALLA IUCN IN CUI VENGONO RIPORTATI I TAXA A RISCHIO DI ESTINZIONE E IL LORO STATO DI CONSERVAZIONE

- 1966: primo *Red Data Book*, composto da due volumi dedicati rispettivamente a mammiferi e uccelli
- 1978: primo *Red Data Book* dedicato alle sole piante
- 1992: primo **Libro Rosso delle Piante d'Italia**

# RED DATA BOOK e RED LISTS

Attualmente i **Red Data Books** e le **Red Data Lists** sono:

- riconosciuti come gli strumenti più efficaci nel monitoraggio dello stato della Biodiversità
- rappresentano un vero caposaldo della nuova Scienza della Biologia della Conservazione

Allo stato attuale si stima che, in tutto il mondo, siano stati pubblicati **circa 400 tra Red Data Books e Red Lists**

# Categorie IUCN di rischio di estinzione (versione 2.3 del 1994)

<p><b>EX</b> Extinct Estinto</p>	<p>Un taxon è EX quando non esistono ragioni per dubitare che l'ultimo individuo sia scomparso</p>
<p><b>EW</b> Extinct in the Wild Estinto in Natura</p>	<p>Un taxon è EW quando sia nota la sua sopravvivenza solo in coltivazione, in cattività o in una o più popolazioni naturalizzate ben al di fuori del suo areale originario.</p>
<p><b>CR</b> Critically endangered Estremamente minacciato</p>	<p>Un taxon è CR quando corre un estremo rischio di estinzione in natura nell'immediato futuro</p>
<p><b>EN</b> Endangered Fortemente minacciato</p>	<p>Un taxon è EN quando non è CR ma corre un elevatissimo rischio di estinzione in natura in un prossimo futuro</p>
<p><b>VU</b> Vulnerable Vulnerabile</p>	<p>Un taxon è VU quando non è CR né EN ma corre un elevato rischio di estinzione in natura in un futuro a medio termine</p>
<p><b>LR</b> Lower risk A minor rischio</p>	<p>Un taxon è LR quando è stato valutato, ma non soddisfa nessuno dei criteri che descrivono le categorie CR, EN, VU. I taxa inclusi nella categoria LR possono essere distinti in tre sottocategorie:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>cd (conservation dependent - dipendenti dalla conservazione):</b> taxa che sono perpetuamente al centro di programmi di conservazione taxon-specifici o habitat-specifici, alla cessazione dei quali il taxon rientrerebbe in una delle categorie di minaccia nel giro di cinque anni.</li> <li>• <b>nt (near threatened - quasi minacciati):</b> taxa che non rientrano in cd ma che sono prossimi a diventare vu.</li> <li>• <b>lc (least concern - a rischio relativo):</b> taxa che non rientrano in cd o nt.</li> </ul>
<p><b>DD</b> Data deficient Dati insufficienti</p>	<p>Un taxon è DD quando non esistono informazioni sufficienti per una valutazione diretta o indiretta del suo rischio di estinzione sulla base della distribuzione e/o dello stato della popolazione.</p>
<p><b>NE</b> Not evaluated Non valutato</p>	<p>Un taxon è NE quando non è stato ancora valutato secondo i criteri.</p>



# EROSIONE GENETICA E RISCHIO DI ESTINZIONE

Si stima che oltre 1/3 DELLA TOTALITÀ DELLE SPECIE VEGETALI sia oggi sottoposta ad EROSIONE GENETICA o, addirittura, da considerarsi già a RISCHIO DI ESTINZIONE



*Orchis tridentata*

L'intera famiglia delle Orchidaceae (non singoli generi o specie) è iscritta nella "Red List" degli organismi a rischio di estinzione

# SALVAGUARDIA DELLA BIODIVERSITÀ VEGETALE

Interventi volti ad ARRESTARE o CONTENERE la PERDITA DI RISORSE GENETICHE dovuta a:

- FATTORI NATURALI (desertificazione e cambiamenti climatici)
- FATTORI ANTROPICI (quali deforestazione, specializzazione colturale, urbanizzazione)



## Viola di Ucria (*Viola ucriana*)

- Endemica della Sicilia
- Reperibile esclusivamente sul Monte Pizzuta, all'interno della Riserva Naturale Orientata Serre della Pizzuta
- L'areale di distribuzione è di soli 0,2 km<sup>2</sup>!

PRESO ATTO DELL'EROSIONE GENETICA O RISCHIO DI ESTINZIONE DI UN CERTO TAXON

```
graph TD; A["PRESO ATTO DELL'EROSIONE GENETICA O RISCHIO DI ESTINZIONE DI UN CERTO TAXON"] --> B["SI PROGRAMMANO LE STRATEGIE DI CONSERVAZIONE PIÙ IDONEE AL CASO"]; B --> C["CONSERVAZIONE IN SITU"]; B --> D["CONSERVAZIONE EX SITU"];
```

SI PROGRAMMANO LE STRATEGIE DI CONSERVAZIONE PIÙ IDONEE AL CASO

CONSERVAZIONE  
*IN SITU*

CONSERVAZIONE  
*EX SITU*

# CONSERVAZIONE *IN SITU* ED *EX SITU*

## CONSERVAZIONE *IN SITU*



Protezione delle specie  
nel loro ambiente  
naturale (ad es. parchi  
naturali)

Parco Naturale dei  
Monti Simbruini



## CONSERVAZIONE *EX SITU*



Protezione del  
germoplama rimosso  
dall'ambiente naturale e  
conservato in collezioni  
(ad es. banche del  
seme)



Collezione di semi

# CONSERVAZIONE *IN SITU* ED *EX SITU*

<b><i>IN SITU</i></b>	<b><i>EX SITU</i></b>
<b>SVANTAGGI</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>•Rischio di <b>malattie</b></li><li>•Esposizione ad <b>agenti atmosferici</b></li><li>•Sono necessari <b>grandi spazi</b> in adeguate <b>aree geografiche</b></li><li>•Alti <b>costi</b> di mantenimento</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•<b>Rimozione</b> dall'ambiente naturale</li><li>•È necessario <b>personale qualificato</b></li><li>•Sono necessari <b>laboratori attrezzati</b></li></ul>
<b>VANTAGGI</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>•<b>Interazione con il proprio ambiente</b> naturale e fisiologico</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•È richiesto <b>poco spazio</b> e può essere attuata in qualsiasi <b>area geografica</b></li><li>•<b>Costi</b> relativamente bassi</li><li>•Ambiente <b>asettico e controllato</b></li></ul>

# CONSERVAZIONE *IN SITU*

## *Abies nebrodensis*



Un felice esempio di conservazione *in situ* è rappresentato in Italia dalla conifera endemico della Sicilia **Abies nebrodensis**, una delle più pregiate essenze arboree italiane

# CONSERVAZIONE *IN SITU*

## *Abies nebrodensis*

- Dopo il 1900 era considerato estinto
- Nel 1957 il ritrovamento in una singola stazione sulle Madonie di una trentina di esemplari diede avvio a specifici programmi di conservazione *in situ*
- Oggi la specie può beneficiare di un costante monitoraggio e di un moderno programma di conservazione (seppure ancora considerata una delle 50 specie vegetali a maggior rischio in tutto il Bacino del Mediterraneo)



# CONSERVAZIONE *EX SITU*

Le strutture più utilizzate per la realizzazione di tali programmi sono:

**ORTI BOTANICI**

**UNIVERSITÀ**

che hanno spazi, risorse e professionalità adeguati all'espletamento di queste funzioni



# CONSERVAZIONE *EX SITU*

Negli **ORTI BOTANICI** e negli **ATENEI** vengono conservate piante vive e/o vengono allestite banche del germoplasma



Orto Botanico di Roma, viale delle palme



Università "Sapienza"

Molti orti botanici sono gestiti dagli atenei

# BANCHE DEL GERMOPLASMA: CONSERVAZIONE *EX SITU*

Cos'è il germoplasma?

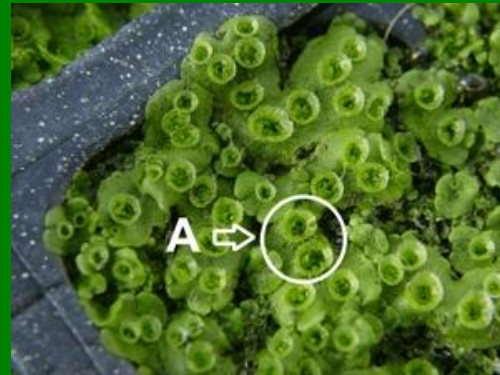
È qualsiasi materiale vegetale (SEMI, ORGANI VEGETATIVI, PROPAGULI, FRAMMENTI DI TESSUTI, CELLULE, SPORE) da cui sia possibile ottenere una PIANTA INTERA



Seme di *Hypericum*



Plantule sul margine  
fogliare di *Kalanchoe*



Tallo di *Marcantia* con  
coppe propagulifere



Sporangio di  
felce

# BANCHE DEL GERMOPLASMA: CONSERVAZIONE *EX SITU*

Cosa sono le banche del germoplasma?

Sono strutture specializzate nella conservazione di semi, di parti di organismi viventi, cellule e spore, idonei a rigenerare un organismo completo



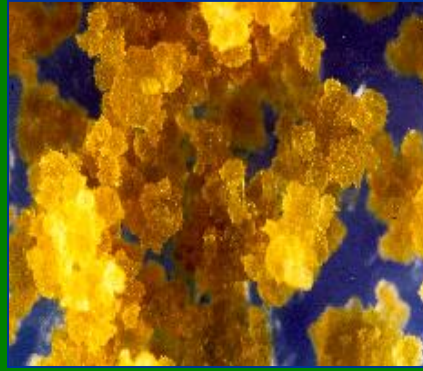
Oltre **6 MILIONI** di specie vegetali sono oggi preservate in banche del germoplasma

# BANCHE DEL GERMOPLASMA: CONSERVAZIONE *EX SITU*

Cosa viene conservato nelle banche del  
germoplasma vegetale?



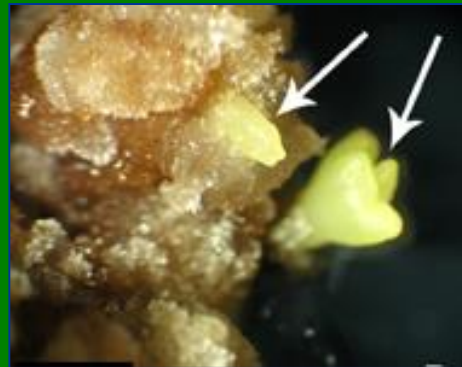
semi



callo



apici caulinari



embrioni



plantule



pollini

Il materiale vegetale conservato nelle banche del germoplasma può essere suddiviso in:

- **COLLEZIONI DI SEMI** (principalmente per le specie a preminente propagazione gamica)
- **COLLEZIONI CLONALI** (principalmente per le specie a propagazione vegetativa)



Banca del seme



Collezione clonale

# BANCHE DEL SEME

Come vengono conservati i semi?



Identificazione  
della specie



Raccolta dei  
semi



Parziale  
disidratazione



Stoccaggio a  
-20°C

## La conservazione del germoplasma nelle BANCHE DEL SEME presenta alcune importanti LIMITAZIONI ed INCONVENIENTI:



Banano  
(genere *Musa*)

La specie da cui è stato ottenuto il banano produceva molti semi

La varietà triploide selezionata per il consumo umano è priva di semi

La varietà triploide è propagata asexualmente mediante polloni (germogli avventizi che si formano alla base del fusto)

La conservazione del germoplasma nelle BANCHE DEL SEME presenta alcune importanti LIMITAZIONI ed INCONVENIENTI:

## MOLTE SPECIE PRESENTANO SEMI NON-ORTODOSSI

SEMI ORTODOSI: che tollerano la deumidificazione (sino a valori di contenuto in acqua del 3-7%), si possono conservare in contenitori ermetici a bassa temperatura (tra 0° C e – 20° C).

NON- O SUB-ORTODOSSI: semi che vanno incontro ad 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 per tempi lunghi



## ***Classificazione dei semi in relazione alla loro conservabilità***

Nel 1973 Roberts mise a punto le 'equazioni di vitalità' che, per ogni combinazione di tenore idrico del seme e di temperatura dell'ambiente di conservazione, prevedevano la durata della vitalità di una partita di semente (Roberts, 1973). L'autore precisò che le formule non potevano essere applicate universalmente. Esse spiegavano, infatti, solo il comportamento di quei semi che, tramite un'essiccazione spinta (fino al 5-10% di umidità) ed una conservazione a temperature basse (inferiori a +5°C), potevano mantenere per lungo tempo la loro vitalità. Tali semi sono stati denominati 'ortodossi' (Roberts, 1973), mentre tutti gli altri sono stati denominati 'recalcitranti'. I semi recalcitranti, molto meno numerosi rispetto all'altro gruppo perdono vitalità, talvolta molto velocemente, quando il contenuto idrico scende al di sotto del 20-40% (in relazione alla specie). Mantenendo il contenuto di umidità idoneo alla sopravvivenza, i semi iniziano più o meno rapidamente a germinare. Ciò rende impossibile la loro conservazione per periodi medio-lunghi (Bonner, 1990). Attualmente, si ritiene che la recalcitranza sia una caratteristica quantitativa piuttosto che qualitativa del seme (del tipo 'tutto o niente'). Infatti, i danni da disidratazione sono il risultato di una o più fasi di stress, che possono essere più o meno evitate con meccanismi di protezione. Sono stato ravvisati quattro gruppi di semi: ortodossi veri, subortodossi, temperato-recalcitranti e tropico-recalcitranti. Recentemente è stato descritto un quinto gruppo detto intermedio (Ellis *et al.*, 1990). Talvolta, si parla semplicemente di semi ortodossi e non ortodossi.

## ***Semi ortodossi veri***

I semi ortodossi veri, una volta essiccati fino al 5-10% di umidità e posti in contenitori ermetici, sopportano basse temperature e conservano a lungo la loro vitalità. Temperature variabili da 0 a -5°C si applicano quando i tempi di conservazione sono inferiori ai 5 anni, mentre, temperature più basse (comprese tra -15 e -18°C) sono preferibili per tempi di conservazione più lunghi. Numerose specie arboree delle aree temperate (generi *Abies*, *Alnus*, *Betula*, *Fraxinus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Platanus*, *Prunus*, *Pseudotsuga*, *Sequoia*, ecc.), hanno semi ortodossi veri. Tra le specie mediterranee si annoverano l'olivo, l'oleandro, la ginestra, ecc.. Nelle zone tropicali, subtropicali e temperato-calde si contano i generi *Acacia* (e molte altre leguminose), *Eucalyptus*, *Casuarina* e *Tectona*. Tra gli alberi con semi ortodossi, *Pinus elliottii* rappresenta il caso di una specie forestale il cui seme è stato mantenuto in buone condizioni per un periodo eccezionalmente lungo. Una partita di seme fornì una facoltà germinativa del 66% dopo 50 anni di permanenza in contenitori ermetici, a +4°C, (Barnett e Vozzo, 1985). Anche i semi delle leguminose, data l'impermeabilità e la durezza dei loro tegumenti, conservano per molti anni la loro vitalità. Ci sono esempi di semi di leguminose che, dopo lunghi periodi di conservazione in erbario, hanno mostrato elevata germinabilità (Willan, 1985): *Leucaena leucocephala* (99 anni), *Cassia bicapsularis* (115 anni), *Albizzia julibrissin* (149 anni) e *Cassia multijuga* (158 anni).

## ***Semi subortodossi***

I semi subortodossi, conservati nelle stesse condizioni utilizzate per gli ortodossi veri, mantengono la loro vitalità per periodi più brevi. Si tratta di semi grossi con un alto contenuto di lipidi (es. *Juglans* spp. e *Caryca* spp.) o di semi piccoli con tegumenti sottili, come nel caso dei generi *Populus* e *Salix*. Molti semi, considerati fino a poco tempo fa recalcitranti, grazie alla messa a punto di idonee tecniche di conservazione, possono essere ora collocati nella categoria dei subortodossi (Hong & Ellis, 1995). Tra questi si citano i semi di limone (Mumford & Grout, 1979), di mandioca (Ellis *et al.*, 1981) e di faggio (Suszka, 1974). Nel caso del faggio, il vasto areale di distribuzione, la fruttificazione episodica e, nelle ultime decadi, tendenzialmente meno frequente e abbondante, l'importanza economica e la necessità di assicurare una fornitura regolare di sementi per gli ambienti forestali, spiegano il fiorire di ricerche finalizzate al prolungamento della conservabilità del seme, già di per sé non facile. Fino agli anni '60 non si conoscevano tecniche efficaci per conservare la qualità delle faggioline

per più di una stagione. Venivano, quindi, seminate subito dopo la raccolta o stratificate all'aperto in attesa della semina primaverile, tecnica questa tuttora impiegata. Suszka nel 1974 e Bonnet-Masimbert e Muller nel 1975 divulgarono una strategia per la corretta preparazione dei semi. Essa si basa sull'essiccazione frazionata a temperature relativamente basse: il seme è sottoposto a corrente d'aria a +20°C fino a ridurre il contenuto di umidità al 12%; successivamente, la semente viene sottoposta, alternativamente, a ventilazione e riposo finché il livello idrico non scende ulteriormente fino all'8%. In tal modo i semi possono essere conservati per almeno 5 anni a -5°C. Un presupposto fondamentale per la buona conservazione dei semi subortodossi è l'elevata qualità dei semi al momento della raccolta. L'operatore è favorito dal fatto che le annate in cui questa condizione si verifica, coincidono, spesso, con quelle in cui la fruttificazione è abbondante. In molti casi, quando la qualità iniziale della semente non è idonea rispetto agli standard della specie considerata, se ne sconsiglia la conservazione (Piotto, 1992). Infatti, la germinazione massima varia da specie a specie: è generalmente elevata nel genere *Pinus* e piuttosto ridotta per i generi *Cupressus* e *Juniperus*.

### ***Semi temperato-recalcitranti***

I semi delle specie presenti negli areali a clima temperato che non tollerano l'essiccazione (come ad esempio *Quercus* spp.) sono detti temperato-recalcitranti. In realtà, grazie a tecniche messe a punto di recente (Suszka & Tylkowski, 1980; Suszka *et al.*, 2000), le ghiande di diverse specie di querce possono essere conservate per alcuni anni (3-5) a temperature prossime a 0°C. Tuttavia, queste tecniche, anche se fossero applicabili a tutti i semi recalcitranti, non sarebbero sufficienti a supportare i programmi di conservazione *ex situ* delle risorse genetiche. Altre specie caratteristiche degli ambienti temperati con semi recalcitranti sono i castagni (*Castanea* spp.), gli ippocastani (*Aesculus* spp.), il nespolo giapponese (*Eriobotrya japonica*) e l'acero argenteo (*Acer saccharinum*).

### ***Semi tropico-recalcitranti***

La vitalità dei semi tropico-recalcitranti, caratteristici di numerose specie presenti in ambienti tropicali o subtropicali, mal sopportano le basse temperature e la disidratazione. Il contenuto idrico non deve mai scendere al di sotto del 20-40% e la temperatura non deve abbassarsi sotto i +10/+15°C. In queste condizioni i semi sopravvivono ma germinano rapidamente. I semi di molte *Dipterocarpaceae* dal legname pregiato (varie specie di *Shorea*, *Parashorea*, *Hopea*, *Dipterocarpus*, ecc.), di diverse specie tropicali e subtropicali del genere *Araucaria* (*A. angustifolia*, *A. columnaris*, *A. hunsteini*) e di specie da frutta di importanza economica come il mango (*Mangifera indica*), il litchi (*Litchi chinensis*), il rambutan (*Nephelium lappaceum*) e l'avocado (*Persea americana*), appartengono a questo gruppo.

### ***Semi intermedi***

I semi intermedi sopportano livelli relativamente bassi di umidità (circa 10%) ma, una volta essiccati sono danneggiati dalle basse temperature. I semi del caffè, della papaia e della palma d'olio appartengono a questa categoria.

Molte specie tropicali, ma anche numerose specie da frutto e forestali di clima temperato (quali CASTAGNO, NOCE, IPPOCASTANO, ACERO, QUERCIA) hanno semi non-ortodossi



*Castanea sativa*



*Juglans nigra*



*Quercus suber*

A petri dish containing several pieces of plant tissue cultures, likely germling explants, growing on a dark agar medium. The cultures are light green and white, with some showing root-like structures. The text is overlaid on the image.

**TECNICHE IN  
VITRO PER LA  
CONSERVAZIONE  
DEL  
GERMOPLASMA**

# MICROPROPAGAZIONE



Germoglio

*Citochinine*



G.multiplo

- Separazione dei germogli
- Radicazione



Pianta

Messa a dimora



Plantula

# PROPAGAZIONE DA CALLO

## 1 callogenesei

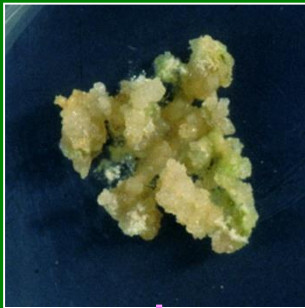




# PROPAGAZIONE DA CALLO

## 2 rigenerazione

Callo



Caulogenesi (*Citochinine*)



Germogli

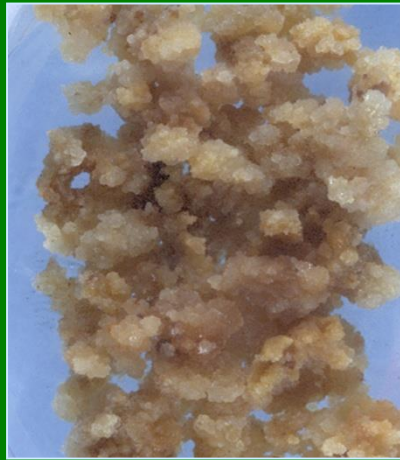
Rizogenesi  
(*Auxine*)

Plantula



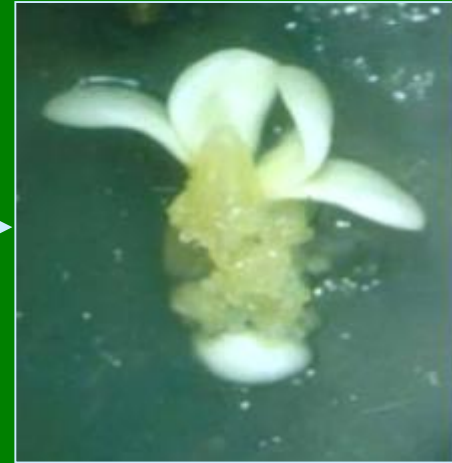
La plantula rigenerata può essere messa a dimora se il sistema vascolare delle radici è connesso con quello del germoglio

# EMBRIOGENESI SOMATICA



Callo

embriogenesi



Embione somatico

Sviluppo  
dell'embrione



Pianta

Sviluppo  
della plantula



Plantula



**CRIOCONSERVAZIONE**

# TECNICA DELLA CRIOCONSERVAZIONE

Consiste nello STOCCAGGIO DI GERMOPLASMA A TEMPERATURA ULTRA-BASSA ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), propria dell'azoto in fase liquida

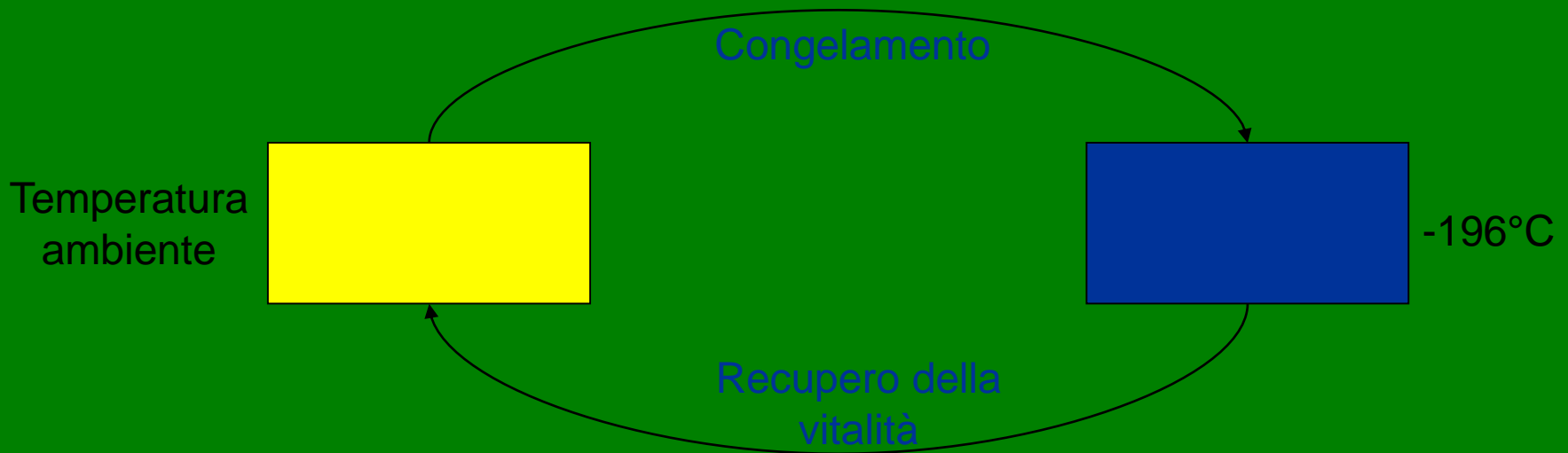


# VANTAGGI DELLA CRIOCONSERVAZIONE

1. **SPAZI RELATIVAMENTE CONTENUTI** per la conservazione (in un contenitore da 35 litri di azoto liquido si possono stoccare oltre 6.000 espianti),
2. **BASSI COSTI DI CONSERVAZIONE** (in pratica, solo quelli necessari al mantenimento del livello di azoto liquido, sostanza facilmente reperibile e di costo contenuto)
3. possibilità di porre in conservazione un **AMPIO RANGE DI ORGANI E TESSUTI** provenienti da coltura *in vitro*, (Lambardi e De Carlo, 2003),
4. il mantenimento del materiale vegetale in assoluta **SICUREZZA GENETICO-SANITARIA**
5. possibilità di operare una **CONSERVAZIONE A TEMPO ILLIMITATO**

Alla temperatura di  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , le cellule vegetali entrano in uno stato di “QUIESCENZA ASSOLUTA”, in quanto tutte le TRASFORMAZIONI FISICHE e REAZIONI BIOCHIMICHE sono praticamente arrestate

Se le cellule sono portate nella condizione di ultra-raffreddamento seguendo opportune “PROCEDURE PREPARATORIE”, la VITALITÀ non ne risulta compromessa e, al ritorno a condizioni standard di coltura, possono riassumere la loro piena funzionalità



# PRINCIPI DELLA CRIOCONSERVAZIONE:

## Disidratazione

Se il materiale vegetale fosse posto direttamente in azoto liquido subirebbe **DANNI IRREVERSIBILI** per la **FORMAZIONE DI CRISTALLI DI GHIACCIO INTRA- ED EXTRA-CELLULARI** che romperebbero le membrane, il nucleo e tutti gli altri organelli

Per questo è necessario che il materiale vegetale sia **DISIDRATATO** fino ad un livello in cui **LE MOLECOLE D'ACQUA RESIDUE NON SIANO PIÙ IN GRADO DI GENERARE CRISTALLI DI GHIACCIO** e la soluzione citoplasmatica vada incontro a **VITRIFICAZIONE**

# PRINCIPI DELLA CRIOCONSERVAZIONE:

## Vitrificazione

Il termine “**VITRIFICAZIONE**” si riferisce al processo fisico di TRANSIZIONE DI UNA SOLUZIONE ACQUOSA AD UNO STATO AMORFO (= non cristallino) durante ultra-raffreddamento

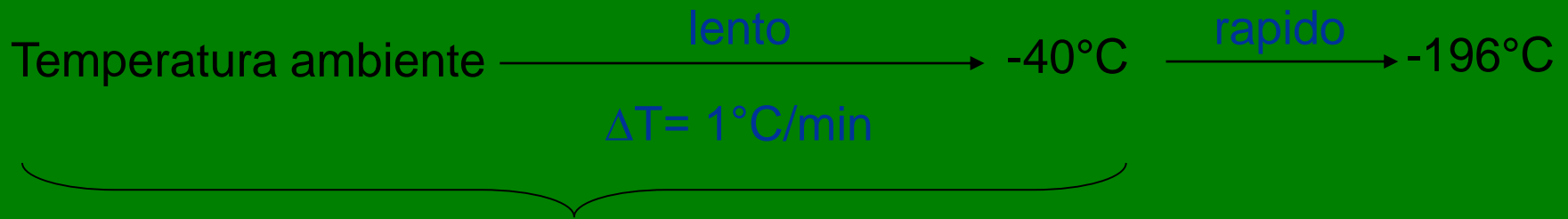
La vitrificazione del citoplasma cellulare PREVIENE LA FORMAZIONE DI CRISTALLI DI GHIACCIO INTRA-CELLULARI

Gli espianti sottoposti a vitrificazione si mantengono **INTEGRI E VITALI ALLA TEMPERATURA DELL'AZOTO LIQUIDO** e sono in grado di ricostituire una coltura di gemogli o una linea cellulare quando reintrodotti in coltura *in vitro*



# TECNICA CLASSICA:

## Slow cooling (raffreddamento controllato)



In sostanza crioprotettiva (ad es. glicerolo, DMSO, etilenglicole, abbassano la temperatura di congelamento di una soluzione. Glicerolo e DMSO hanno anche funzione di “scavenger” dei radicali liberi che si possono formare durante l’ultra-raffreddamento)

L’acqua presente negli spazi extra-cellulari inizia a congelare per prima, determinando una concentrazione della soluzione 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”).

# TECNICA CLASSICA:

## Slow cooling (raffreddamento controllato)

La tecnica presenta alcuni inconvenienti:

- necessità di servirsi di **ATTREZZATURE PARTICOLARI** (i criorefrigeratori a decremento termico controllato)
- **SCARSA RIPETIBILITÀ** dei risultati quando impiegata per la conservazione di **ORGANI COMPLESSI** (quali le gemme)



criorefrigeratore a decremento termico controllato

# TECNICHE MODERNE:

## Trattamento con soluzione vitrificante

Questa tecnica si è rivelata una tra le più efficaci.

Consiste nel trattare il materiale vegetale con una miscela, molto efficace nel proteggere e promuovere la disidratazione, formata da 3 crioprotettivi:

1. Glicerolo
2. DMSO
3. Glicol etilenico

L'unico problema è rappresentato dal fatto che OGNI SPECIE ED OGNI TIPO DI ESPIANTO RICHIEDONO DIVERSI TEMPI DI TRATTAMENTO

Il tempo deve essere SUFFICIENTEMENTE LUNGO per garantire la protezione ma NON ECCESSIVAMENTE LUNGO per evitare l'intossicazione degli espianti

# TECNICHE MODERNE: Incapsulazione-disidratazione

Queste tecniche si avvalgono della TECNOLOGIA DEI SEMI SINTETICI



# TECNICHE MODERNE: Incapsulazione-disidratazione

Queste tecniche si avvalgono della **TECNOLOGIA DEI SEMI SINTETICI**

Immersione degli espianti in alginato di sodio

Si fa gocciolare l'alginato in una soluzione di cloruro di calcio (ogni goccia contiene un espianto)

Le gocce solidificano (scambio cationico) e si formano capsule sferiche solide (semi sintetici)

Disidratazione in flusso di aria secca sterile

Immersione in azoto liquido

Scongelamento e reintroduzione in coltura



# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA DI ALCUNE ORCHIDEE SPONTANEE PER LA REINTRODUZIONE ALL'INTERNO DEL PARCO NATURALE REGIONALE DEI MONTI SIMBRUINI

*<sup>1</sup>Dip. Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza"*

*<sup>2</sup>Parco Naturale Regionale dei Monti Simbruini*



Università degli Studi di  
Roma “Sapienza”



Parco Naturale Regionale dei  
Monti Simbruini



Progetto di realizzazione di interventi di salvaguardia degli habitat di importanza comunitaria, consistente nella reintroduzione di specie di orchidee autoctone all'interno del S.I.C. IT6030040 Monte Autore e Monti Simbruini Centrali a tutela dell'habitat 6210 – “Formazioni erbose secche seminaturali e facies coperte da cespugli su substrato calcareo (*Festuco-Brometalia*)”.

Ottenimento di  
plantule *in vitro*



reintroduzione in specifiche  
aree del parco (restauro  
ambientale)

# ORCHIDACEAE

**30.000 specie e 800 generi**



# ORCHIDACEAE

**30000 specie e 800 generi**

**È la più grande famiglia vegetale**  
(dopo la famiglia delle *Asteracee*)

# ORCHIDACEAE

30000 specie e 800 generi

**È la più grande famiglia vegetale**  
(dopo la famiglia delle *Asteracee*)

**L'intera famiglia (non singoli generi o specie) è iscritta nella "Red List" degli organismi a rischio di estinzione**

# ORCHIDACEAE: CONSERVAZIONE

*In situ*



Conservazione negli habitat naturali

# ORCHIDACEAE: CONSERVAZIONE

***In situ***

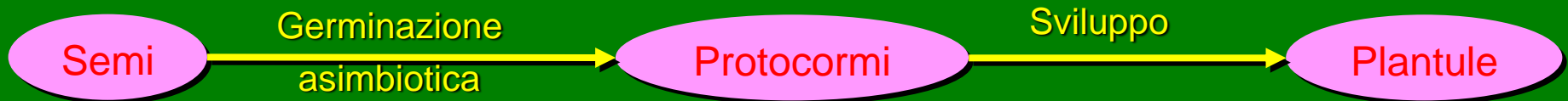
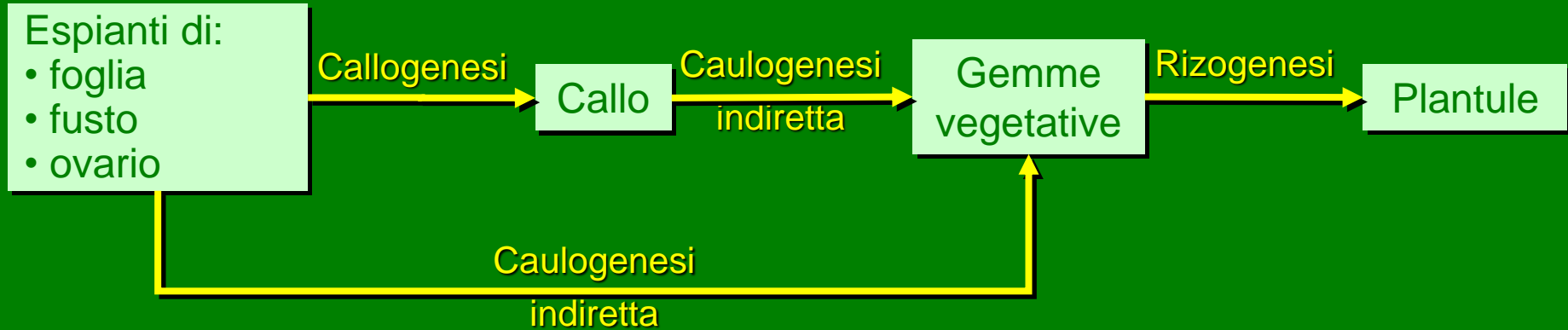
Conservazione negli habitat naturali

***Ex situ***

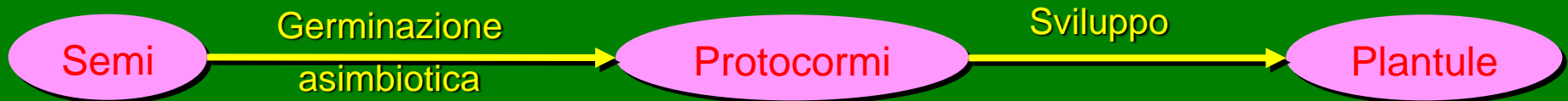
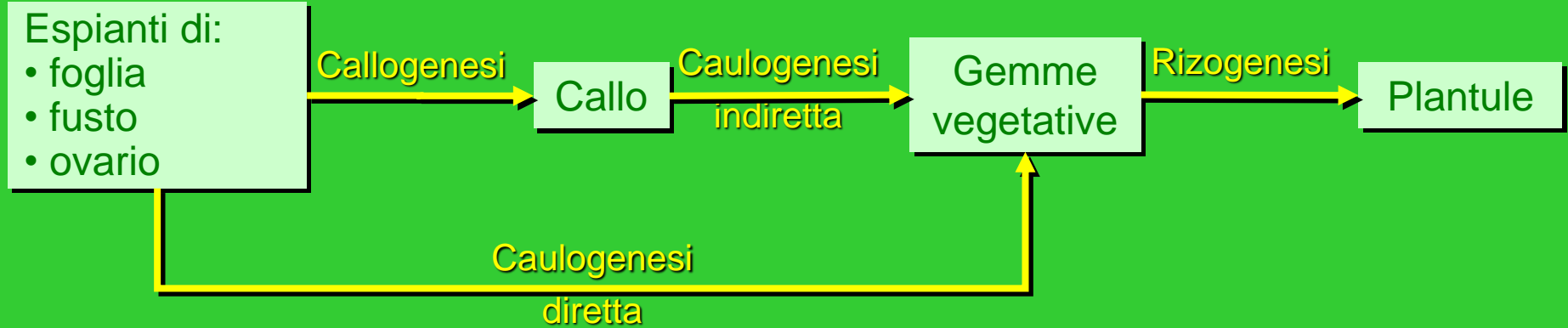
## **Banche del Germoplasma**

- semi vitali disidratati,
- semi ed embrioni crioconservati,
- colture *in vitro* di cellule indifferenziate,
- piante ottenute *in vitro* da seme o per micropropagazione,

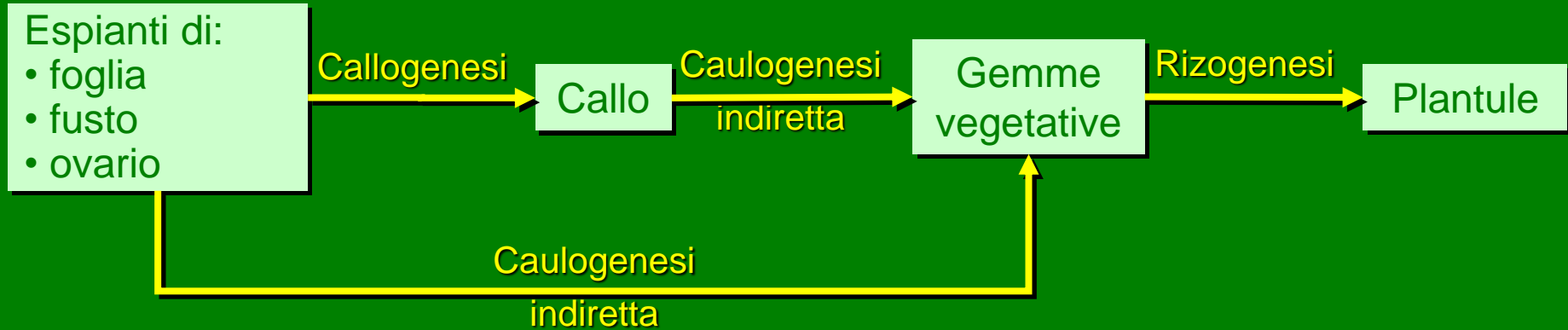
# STRATEGIE



# STRATEGIE



# STRATEGIE



# SPECIE DI INTERESSE



***Orchis tridentata.***





# SPECIE DI INTERESSE

*Orchis mascula*



# SPECIE DI INTERESSE

*Orchis provincialis*



# SPECIE DI INTERESSE



*Gymnadenia conopsea*



# RACCOLTA

- Nei mesi di Aprile e Maggio le piante fiorite sono state identificate

# RACCOLTA

- Nei mesi di Aprile e Maggio le piante fiorite sono state identificate
- Sono stati prelevati organi da impiegare per l'induzione di callogenesi e caulogenesi

# RACCOLTA

- Nei mesi di Aprile e Maggio le piante fiorite sono state identificate
- Sono stati prelevati organi da impiegare per l'induzione di callogenesi e caulogenesi
- Circa 200 individui per ogni specie sono stati contrassegnati

# RACCOLTA

- Nei mesi di Aprile e Maggio le piante fiorite sono state identificate
- Sono stati prelevati organi da impigrire per l'induzione di callogenesi e caulogenesi
- Circa 200 individui per ogni specie sono stati contrassegnati
- Nei mesi di Giugno e Luglio, sono stati raccolti gli ovari maturi

# CALLOGENESI E CAULOGENESI

MEZZO	A	B	C	D	E	F
TERRENO	MS	MS	MS	B5	ORC+	ORC-
BAP (mg/l)	1	-	-	-	-	-
NAA (mg/l)	-	0.5	-	-	-	-
TDZ (mg/l)	-	1	1.2	-	-	-
2,4-D (mg/l)	-	-	-	1	-	-
KIN	-	-	-	0.5	0.5	0.5
Saccarosio (g/l)	20	20	20	20	20	20
Agar (g/l)	8	8	8	8	8	8
CA (g/l)	1	1	1	1	1	1
pH	5.8	5.8	5.8	6.5	6.5	6.5

MEZZO	G	H	I	L
TERRENO	MS	B5	ORC+	ORC-
saccarosio (g/l)	20	20	20	20
AGAR (g/l)	8	8	8	8
CA (g/l)	1	1	-	-
pH	5.8	5.8	6.5	6.5

**MS** = Murashige & Skoog  
includente vitamine;

**B5** = B5 Gamborg  
includente vitamine;

**ORC+** = Orchimax  
includente vitamine,  
carbone attivo e tampone  
MES;

**ORC-** = Orchimax  
includente vitamine e  
tampone MES;

**BAP** = 6-  
benzilamminopurina;

**NAA** = acido 1-  
naftalenacetico;

**TDZ** = tidiazuron;

**2,4-D** = acido 2,4-  
diclorofenossiacetico;

**KIN** = chinetina;

**CA** = carbone attivo.



# CALLOGENESI E CAULOGENESI



Espianti caulinari



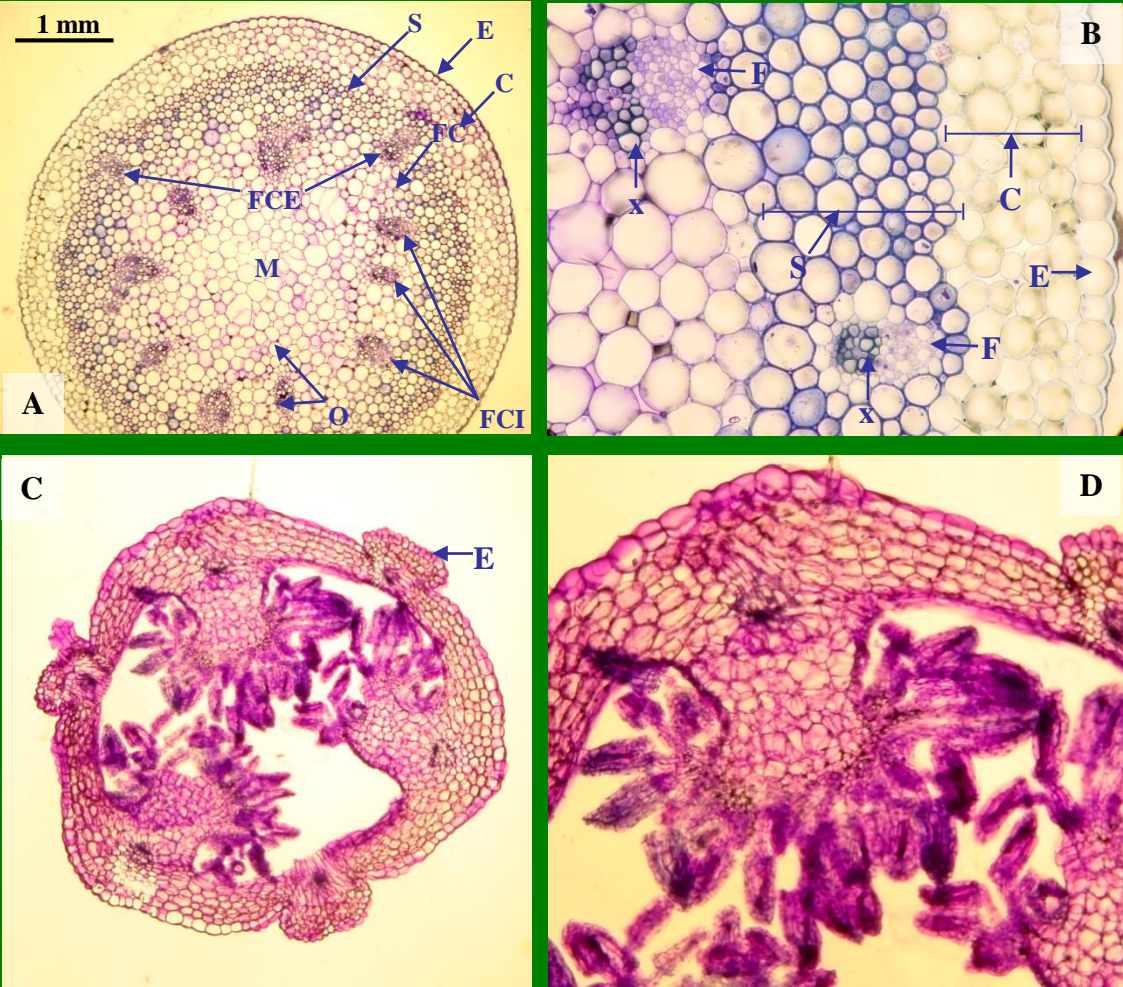
Espianti fogliari



Espianti di ovario

I numerosi tentativi falliti hanno dimostrato callogenesi che le specie studiate sono **RECALCITRANTI ALLA CALLOGENESI E ALLA CAULOGENESI AVVENTIZIA**

Le analisi istologiche hanno rivelato che sono scarsi i tessuti competenti per il dedifferenziamento e per l'organogenesi avventizia. Nel fusto, il parenchima corticale è praticamente assente, infatti la corteccia è costituita quasi esclusivamente da tessuto collenchimatico. Il parenchima midollare è circondato da una fascia di sclerenchima che forma una barriera fisica tra questo e la zona corticale. Inoltre, tra le cellule costituenti il midollo sono presenti grandi spazi intercellulari che rendono tale tessuto simile ad un parenchima aerifero che, per l'alto grado di specializzazione, notoriamente non è predisposto al dedifferenziamento.

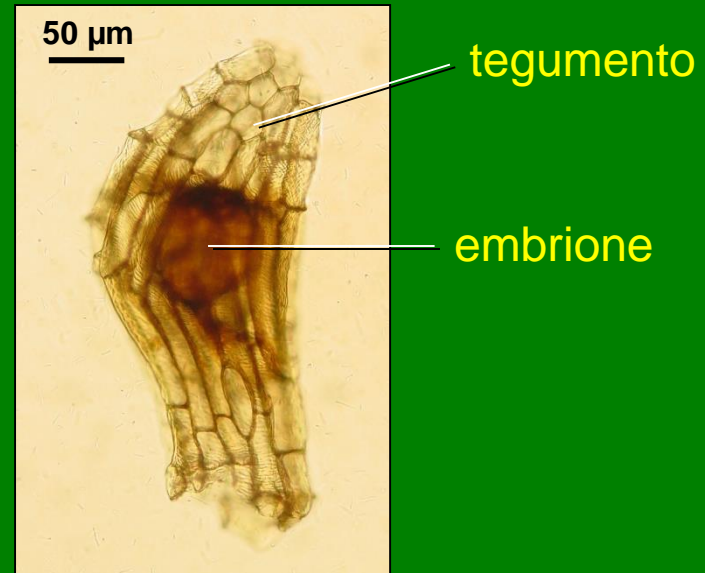


Sezioni istologiche di fusto (A e B) ed ovario (C e D) di *Gymnadenia conopsea*. C: cortex; E:epidermide; FCI: fasci conduttori interni; FCE: fasci conduttori esterni;M: midollo; O: ovuli; S:sclerenchima; X:xilema; F: floema

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

I semi delle orchidee sono piccolissimi e quasi privi di nutrienti



# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

## Germinazione in natura:

- opportune condizioni chimico-fisiche
- relazione simbiotica con fungo

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

## Germinazione in natura:

- opportune condizioni chimico-fisiche
- relazione simbiotica con fungo

## Germinazione asimbiotica (*in vitro*):

- assenza microrganismi nel mezzo
- condizioni fisiche (temperatura e fotoperiodo)
- condizioni chimiche (pH, nutrienti, vitamine e regolatori di crescita)

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

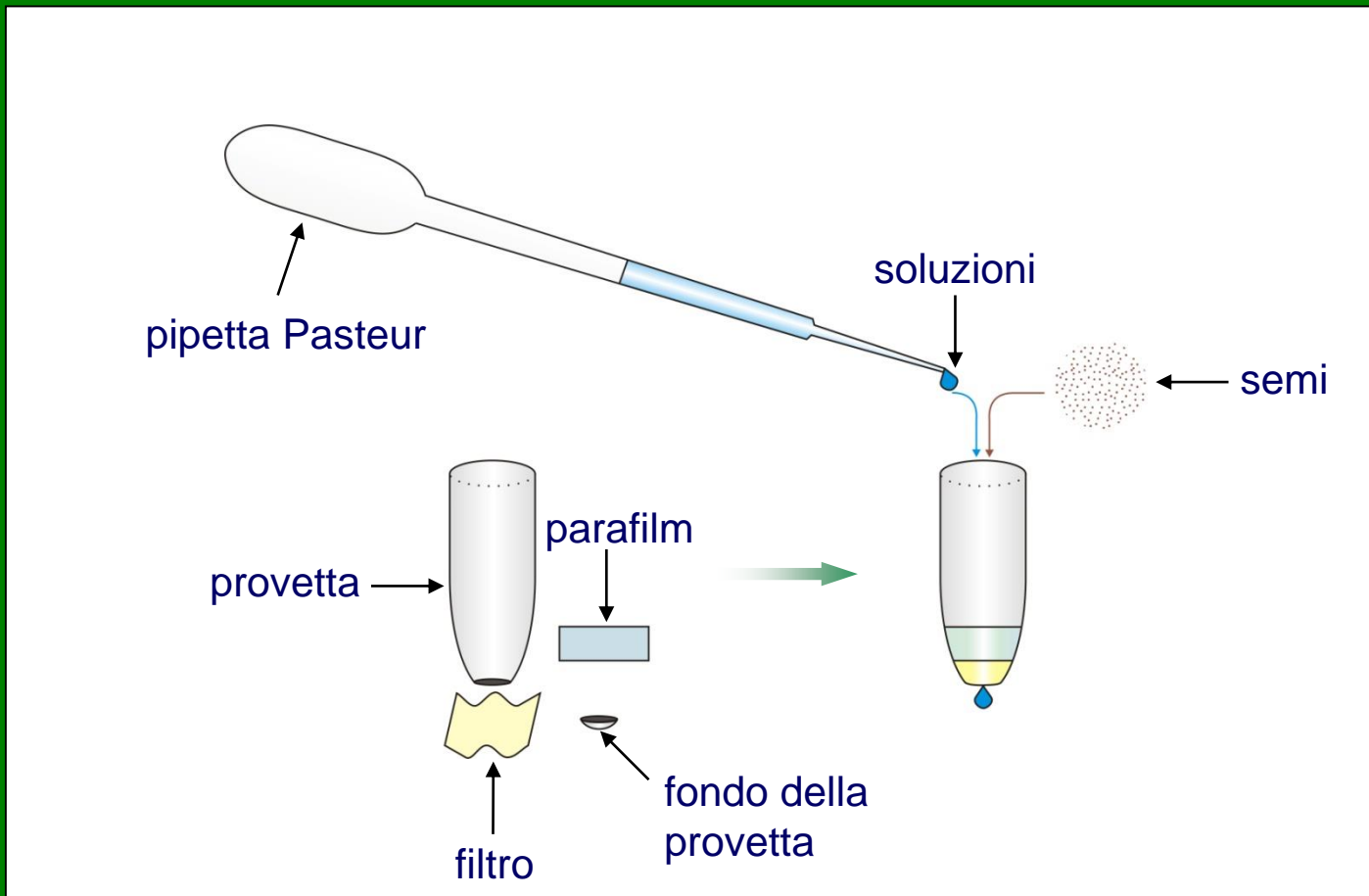
## Separazione dei semi e vernalizzazione

Prima dell'inoculo nei mezzi per la germinazione i semi sono stati:

- separati dagli ovari mediante setaccio;
- stoccati alla temperatura di 4°C all'oscurità per almeno due mesi (vernalizzazione).

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

## Sterilizzazione ed eliminazione delle sostanze idrofobiche dalla superficie del tegumento





# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

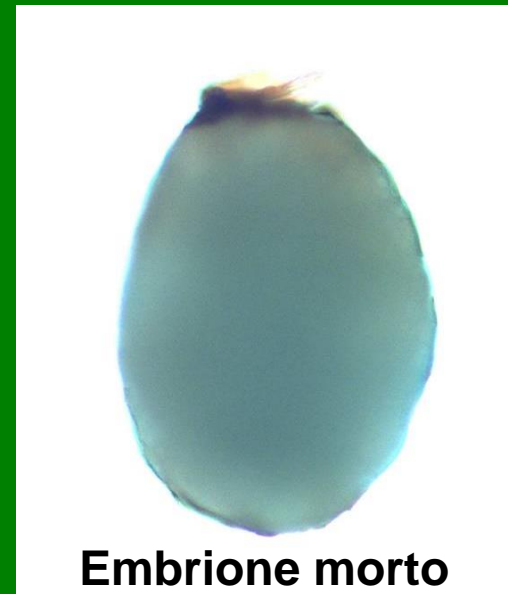
**Sterilizzazione ed eliminazione delle sostanze idrofobiche dalla superficie del tegumento**

<b>TRATTAMENTI PRE-INOCULO</b>		
<b>COMPOSTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE</b>	<b>TEMPO</b>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>2%</b>	<b>5'</b>
<b>NaClO</b> <b>Tween 20</b>	<b>1%</b> <b>1 goccia / 100 ml</b>	<b>15'</b>
<b>H<sub>2</sub>O sterile</b>		<b>10'</b>

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

## Vitalità prima e dopo la sterilizzazione

Test con cloruro di trifeniltetrazolio



Van Waes, J. M. and Deberg, P. C. (1986) - Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 66: 435-442.

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

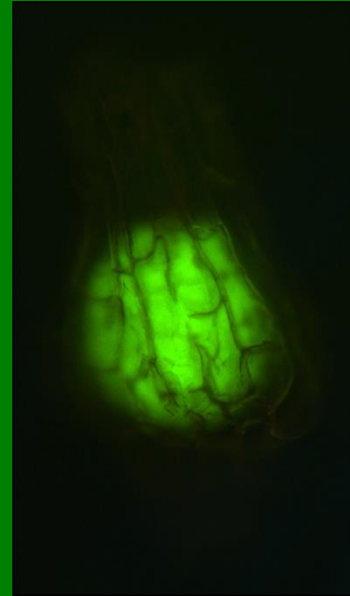
## Vitalità prima e dopo la sterilizzazione

### Test con fluoresceina diacetato

Seme con  
embrione vivo  
osservato in  
campo chiaro



Seme con  
embrione vivo  
osservato  
sotto luce blu



Rasmussen H.N. (1995) - Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. *Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain.*

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

## Vitalità prima e dopo la sterilizzazione

Con entrambi i test di vitalità non è stata osservata una significativa diminuzione nella percentuale dei semi vitali a seguito dei trattamenti pre-inoculo

# GERMINAZIONE ASIMBIOTICA

## Mezzi colturali

### MEZZO LIEVITO:

75 mg/l (Ca)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
75 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
75 mg/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0.5 g estratti di lievito  
20 g/l saccarosio  
6 g/l Agar  
0.5 g/l carbone attivo  
pH 5.8

### MEZZO COCCO:

75 mg/l (Ca)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
75 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
75 mg/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
10 ml/l latte cocco  
20 g/l saccarosio  
6 g/l Agar  
0.5 g/l carbone attivo  
pH 5.8

### MEZZO OMAX HF+CA:

Omax comprendente CA 14 g/l  
6 g/l Agar  
pH 5.8

### MEZZO OMAX HF:

Omax 14 g/l  
6 g/l Agar  
pH 5.8

### MEZZO OMAX BA+CA:

Omax comprendente CA 14 g/l  
BA 2 mg/l  
6 g/l Agar  
pH 5.8

### MEZZO MS:

Sali MS (½) +  
vitamine  
BA 2 mg/l  
20 g/l saccarosio  
6 g/l Agar  
0.5 g/l carbone attivo  
pH 5.8

### MEZZO MS:

Sali MS (½) +  
vitamine  
BA 2 mg/l  
20 g/l saccarosio  
6 g/l Agar  
0.5 g/l carbone attivo  
pH 5.8

### MEZZO OMAX BA:

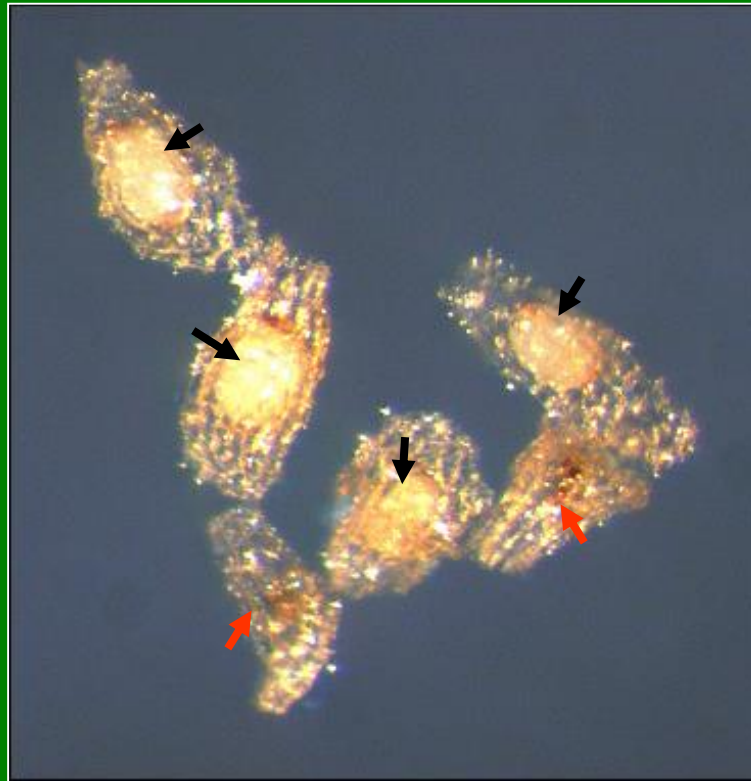
Omax 14 g/l  
BA 2 mg/l  
6 g/l Agar  
pH 5.8

Migliore per la germinazione

Migliore per lo sviluppo del protocormo

# INOCULO DEI SEMI

Giorno zero



**Frecce nere: semi con embrione vivo**

**Frecce rosse: semi con embrione morto**

# RIGONFIAMENTO DELL'EMBRIONE E ROTTURA DEL TEGUMENTO

Giorno 20-30



# EMBRIONE PRIVO DI TEGUMENTO

2°-3° mese





# COMPARSA DELLE PRIME RIZINE SUL PROTOCORMO

3°-4° mese



# FORMAZIONE DELL'APICE CAULINARE

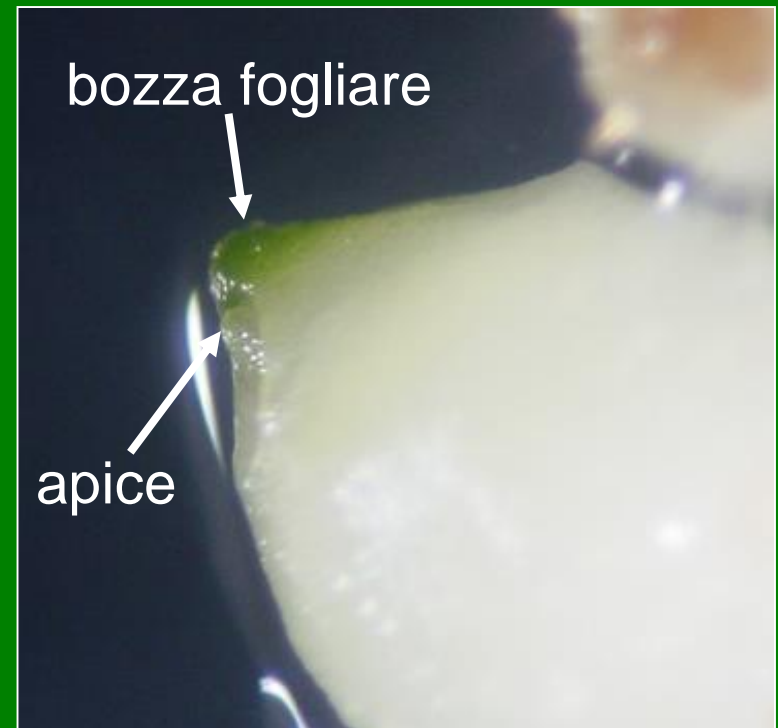
4°-5° mese



# FORMAZIONE DELLA PRIMA

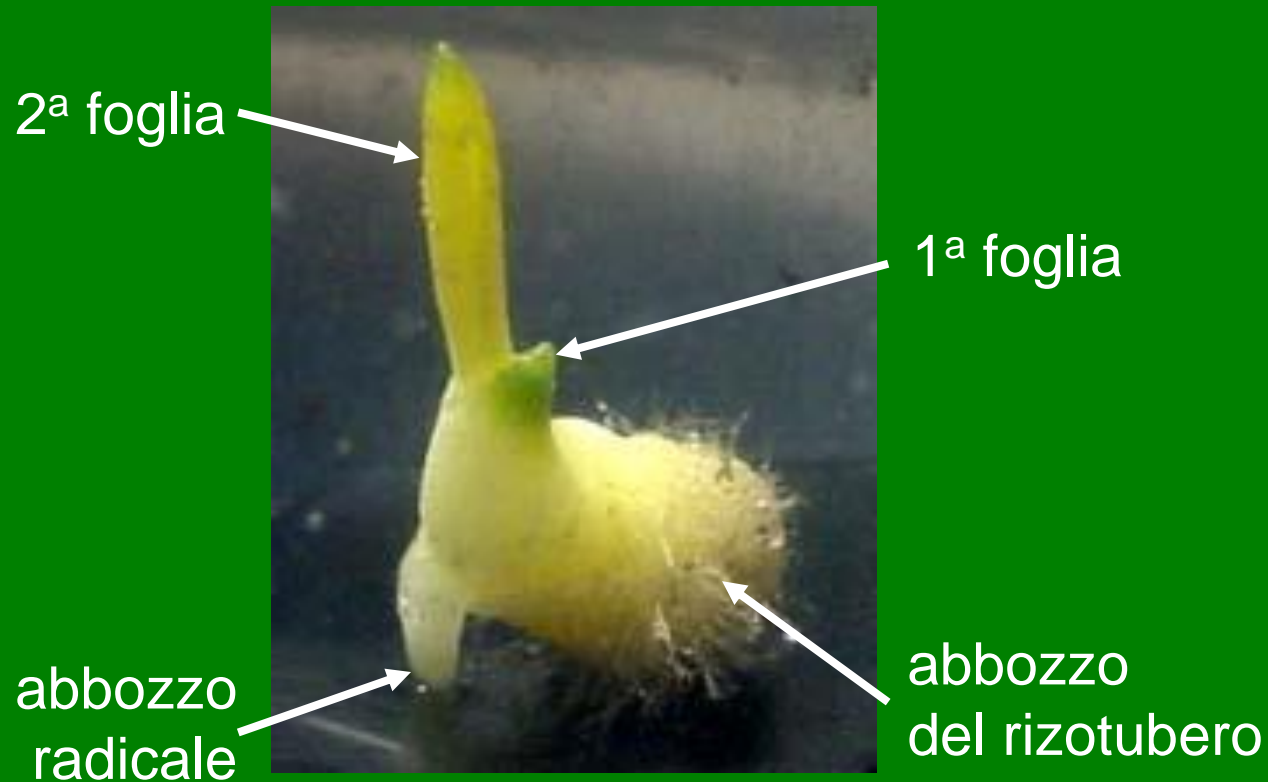
## BOZZA FOGLIARE

5°-6° mese



# FORMAZIONE DELL'APICE RADICALE

5°-6° mese



# PROSPETTIVE

1. OTTENIMENTO DI NUMEROSE PLANTULE
2. MICORRIZZAZIONE
3. ACCLIMATAZIONE
4. REINTRODUZIONE