

## Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale

Maurizio Lambardi\* e Anna De Carlo

CNR Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI)

Ricezione: 13 gennaio 2009; Accettazione: 10 febbraio 2009

### Techniques and applications of cryogenics to the conservation and recovery of pathogen-free plant germplasm

**Abstract.** Cryopreservation (cryogenic preservation) refers to the conservation in liquid nitrogen of cells, tissues and organs from *in vitro* culture (shoot tips, embryogenic callus, somatic embryos), as well as from *in vivo* collected material (seeds, embryonic axes and dormant buds). The technique opens important prospects to the safeguard of plant germplasm, allowing the storage of plant material at low cost, for unlimited time and in absolute sanitary and genetic safety, as at the temperature of liquid nitrogen (-196°C) all the biochemical and physical cell processes are completely arrested. For long time, the slow-cooling technique has been the only approach to plant cryopreservation. Here, cell vitrification (i.e., the solidification of liquids in a glassy state which prevents the formation of ice crystals) is achieved by cryodehydration, i.e., slowly cooling (-1°C min<sup>-1</sup>) the explants down to -40°C and then plunging them into liquid nitrogen. In the last 20 years, new techniques have been developed, such as the treatment with vitrification solutions, the droplet-method, the encapsulation-dehydration, the encapsulation-vitrification and the seed dehydration. All these techniques are based on the osmotic or evaporative dehydration of explants which can be afterwards directly immersed in liquid nitrogen, thus producing a marked simplification of cryogenic procedures. The development of such new techniques paved the way to the optimization of effective cryopreservation protocols for numerous horticultural species (vegetables, ornamentals and fruits), mainly by the treatment of shoot tips with PVS2 (a highly concentrated mixture of three cryoprotectants: glycerol, DMSO and ethylene glycol) or by the dehydration in air flow or on silica gel of alginate-encapsulated explants (“synthetic seeds”). Moreover, cryopreservation of dormant buds has also been very successful for the conservation of fruit species reproduced by budding propagation. The procedure is based on winter collection of scions from

which uni-nodal sections are cut, desiccated, slow cooled (-1°C h<sup>-1</sup>) down to -30°C, stored in liquid nitrogen, thawed, re-hydrated and chip budded onto clonal rootstocks. Recently, cryotherapy (i.e., the use of liquid nitrogen to recover pathogen-free plants) showed to be a promising approach to the eradication of viruses, phytoplasma and bacteria from infected material. The technique allows treatment of large numbers of samples and results in a high frequency of pathogen eradication, being of strategic importance to achieve the simultaneous production and long-term storage of pathogen-free plant genetic resources. 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 scientists from 18 European countries. The ultimate profit of the technology is the establishment of cryogenic repositories (“cryobanks”) for the safeguard of plant biodiversity and promising examples are already existing in the world. The organization of a shoot-tip cryobank for the conservation of clonal germplasm is described.

**Key words:** *Ex situ* conservation, Cryobiology, Cryopreservation, Genetic resources, Vitrification.

---

### Introduzione alla crioconservazione

“Erosione genetica”, “perdita di biodiversità”, “specie minacciate o a rischio di estinzione”: fino a non molto tempo fa questa era una terminologia conosciuta ai soli addetti ai lavori, cioè a studiosi, sperimentatori e operatori di istituzioni e organizzazioni pubbliche coinvolte in programmi e iniziative di salvaguardia della biodiversità vegetale e animale. Il fatto che, in breve tempo, siano invece diventati termini di uso comune, proposti all’attenzione del pubblico anche dai mezzi di comunicazione di massa, testimonia la grande preoccupazione con cui si guarda oggi a un fenomeno di proporzioni sempre più grandi e sempre più difficile da fronteggiare. Relativamente al settore vegetale, si stima che siano intorno a 100.000 le specie sottoposte a erosione genetica a vari livelli (<http://www.bgci.org/>), da quelle utilizzate a

---

\* lambardi@ivalsa.cnr.it

fini di alimentazione che, sottoposte ad intenso miglioramento varietale, vedono sempre più ridursi la loro diversità genetica, fino alle specie endemiche a rischio di estinzione per problemi connessi allo sfruttamento agricolo, alla deforestazione, alla desertificazione e al degrado del territorio. In altri termini, circa 1/3 della biodiversità vegetale descritta è sottoposta ad erosione genetica e tale valore è destinato ad aumentare, in misura difficilmente stimabile allo stato attuale in ragione dei cambiamenti climatici che interessano il globo terrestre.

Per bloccare questa “emorragia” di risorse genetiche, a partire dagli anni '70 si è intrapresa a livello mondiale un'importante opera di raccolta, caratterizzazione e conservazione della biodiversità vegetale in “banche del germoplasma” (conservazione *ex situ*), grazie alla quale sono stimate in oltre 6 milioni le “entità vegetali” attualmente mantenute in collezione (<http://www.ipgri.cgiar.org/themes/human/economics.htm>). Inoltre, nel 2004 l'“International Treaty for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture”, promosso dalla FAO, ha sancito l'obiettivo prioritario di conservazione e sfruttamento sostenibile delle risorse genetiche vegetali destinate all'alimentazione e all'agricoltura. Attualmente, le banche del seme sono la forma di conservazione *ex situ* della biodiversità vegetale di gran lunga più diffusa, interessando circa il 90% delle accessioni globalmente preservate (FAO, 1996). Le banche, localizzate in varie parti del mondo, sono gestite da Organizzazioni Internazionali sotto l'egida del CGIAR (*Consultive Group In Agricultural Research*). Nel febbraio 2008 è stata inaugurata nelle Isole Svalbard (Norvegia) la “cripta dei semi” (*The Domesday Vault*), capace di mantenere vitali i semi in conservazione anche in assenza di refrigerazione artificiale, sfruttando le condizioni di freddo naturali della galleria scavata nel permafrost. Nella cripta si conserveranno le repliche di tutti i pool di semi presenti nelle altre banche del mondo, potendo contenere a regime circa 1,5 milioni di accessioni. Per quanto riguarda le specie a propagazione vegetativa, la conservazione si attua con collezioni clonali in campo; questa forma interessa il 9% delle accessioni conservate nel mondo.

In aggiunta a queste forme di conservazione “tradizionale”, tecniche innovative di derivazione biotecnologica, quali la conservazione *in vitro* in crescita rallentata (Lambardi e De Carlo, 2003) e la crioconservazione, stanno uscendo dal contesto dei laboratori sperimentali ed entrando nella pratica operativa. Si stima che, ad oggi, già circa l'1% delle accessioni siano conservate nel mondo con questi approcci innovativi. L'applicazione della criogenia alla conserva-

zione di materiale vegetale (crioconservazione), in particolare, proposta per la prima volta nel 1968 per il mantenimento di colture cellulari, è ormai, a distanza di 40 anni, una realtà anche per la conservazione di organi e tessuti differenziati. Il termine si riferisce allo stoccaggio a temperatura ultra-bassa (in genere  $-196^{\circ}\text{C}$ , la temperatura dell'azoto in fase liquida) di cellule, tessuti ed organi vegetali. A questa temperatura 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 ricorda la possibilità di porre in conservazione un'ampia gamma di organi e tessuti vegetali (apici vegetativi da vitrocoltura, semi ed assi embrionali, embrioni somatici, bulbilli, gemme prelevate in campo, polline), gli spazi assai contenuti per la conservazione (potendosi stoccare in un contenitore di azoto liquido di media grandezza dai 5.000 ai 10.000 espianti), i bassi costi di conservazione (in pratica solo quelli necessari al controllo della criobanca e al mantenimento a livello dell'azoto liquido, una sostanza facilmente reperibile e di costo contenuto), il mantenimento del materiale vegetale in assoluta sicurezza genetico-sanitaria. Inoltre, in azoto liquido si possono conservare linee cellulari e *hairy roots* che producono metaboliti secondari di interesse farmacologico o industriale, colture cellulari embriogeniche e/o geneticamente trasformate (Lambardi *et al.*, 2008). Recentemente, la tecnologia criogena si sta dimostrando anche efficace nell'indurre il risanamento delle piante da virus, fitoplasmi e batteri (crioterapia).

### Cenni di teoria della crioconservazione

In seguito a forte abbassamento termico, le cellule vegetali vanno incontro a danni che ne causano la morte per motivi diversi a seconda della velocità di raffreddamento a cui sottostanno. Quando il raffreddamento è lento e persistente (come, ad esempio, avviene in natura), a partire da alcuni  $^{\circ}\text{C}$  sotto lo zero inizia un graduale processo di formazione di cristalli di ghiaccio extra-cellulari per nucleazione eterogenea (*seeding*), fenomeno favorito dalla presenza di “nucleatori” (*templates*, ad esempio impurità e varie sostanze chimiche, quali i carboidrati) che innescano

la condensazione delle molecole acqua e la loro trasformazione in cristalli. I cristalli di ghiaccio extra-cellulari non sono di per sè particolarmente dannosi, in quanto, se non si accrescono eccessivamente, non hanno la capacità di perforare pareti cellulari integre. D'altra parte, la formazione di cristalli di ghiaccio porta ad una progressiva concentrazione della soluzione extra-cellulare che diventa ipertonica rispetto alla soluzione citoplasmatica della cellula, richiamando quindi molecole d'acqua verso l'esterno per ristabilire equilibrio osmotico. Se protratto, questo fenomeno provoca sia danni colligativi per eccessiva concentrazione dei soluti cellulari che divengono tossici, sia danni fisici alle membrane e raggrinzimento della cellula sottoposta a elevato stress osmotico. Se il raffreddamento è forte e ultra-rapido (come si determina, ad esempio, con l'immersione diretta di espianti in azoto liquido), non c'è il tempo di innescare la formazione di cristalli di ghiaccio extra-cellulari per nucleazione eterogenea; d'altra parte, ad una temperatura intorno a  $-40^{\circ}\text{C}$  inizia la formazione di cristalli di ghiaccio intra-cellulari per nucleazione omogenea: sono cioè le stesse molecole d'acqua capaci di originare un "embrione" di ghiaccio, di misura tale da permetterne l'accrescimento e la trasformazione in cristallo. I cristalli di ghiaccio intra-cellulari indeboliscono l'integrità strutturale, osmotica e colligativa delle cellule, causando rotture e danni meccanici alle membrane cellulari, al nucleo e agli organelli e, in ultima istanza, morte cellulare (Benson, 2008).

In natura, per superare indenni periodi relativamente lunghi di esposizione a temperature anche di vari  $^{\circ}\text{C}$  sotto lo zero, le piante hanno sviluppato meccanismi di acclimatazione al freddo, quali la sintesi di sostanze protettive (di- e oligosaccaridi, polipeptidi, prolina, poliammine, antiossidanti) e cambiamenti nella composizione lipidica delle membrane che limitano lo stress osmotico e ossidativo, stabilizzano le membrane, favoriscono il recupero da danni subletali (Pearce, 2004). Tali meccanismi non hanno però la possibilità di preservare la vitalità di cellule sottoposte ad ultra-raffreddamento rapido, quale quello prodotto da esposizione diretta alla temperatura dell'azoto liquido. Le diverse tecniche criogene oggi disponibili raggiungono questo obiettivo inducendo vitrificazione delle cellule. Il termine "vitrificazione" si riferisce alla solidificazione di un liquido senza cristallizzazione. Questo stato fisico si innesca quando una soluzione acquosa è talmente concentrata o raffreddata così rapidamente da aumentarne la viscosità e impedirne il riarrangiamento molecolare in forma cristallina. Accentuandosi il raffreddamento, la viscosità aumenta al punto tale da fare assumere una consistenza amorfa e

"vetrosa" alla soluzione (Taylor *et al.*, 2004). La vitrificazione dell'acqua nei sistemi biologici avviene quando si concentra sufficientemente la soluzione citoplasmatica, prevenendo così la formazione dei pericolosi cristalli di ghiaccio intra-cellulari. In crioconservazione, la vitrificazione si induce essenzialmente in tre modi:

- per criodisidratazione delle cellule, applicando un raffreddamento lento e controllato degli espianti fino alla temperatura di  $-35 / -40^{\circ}\text{C}$ . Questo innesca il fenomeno sopra descritto di concentrazione della soluzione citoplasmatica per equilibrio osmotico con la soluzione esterna alla cellula che sta progressivamente cristallizzando. Se si applica un opportuno tasso di raffreddamento e non si spinge la disidratazione cellulare oltre il limite di tolleranza della cellula, con la successiva immersione degli espianti in azoto liquido si ha vitrificazione delle cellule che permangono così vitali (tecnica di ultra-raffreddamento a due fasi);
- per osmodisidratazione, quale quella che si induce mediante il trattamento degli espianti con miscele concentrate di crioprotettivi. I crioprotettivi sono sostanze di cui si fa largo uso in crioconservazione per le loro caratteristiche di protezione delle cellule dai danni da ultra-raffreddamento. Tra le sostanze più utilizzate ci sono il glicerolo e il dimetil-solfossido (DMSO), sostanze permeanti la parete e le membrane cellulari; sono crioprotettivi non permeanti, invece, sostanze quali il PEG e il PVP. Grazie alle loro proprietà colligative, abbassano la temperatura di congelamento di una soluzione, ne aumentano la viscosità (riducendone così, ad ogni temperatura, la quantità di cristalli di ghiaccio formati) e proteggono le cellule dai danni da disidratazione, limitando la concentrazione di soluti a livelli tossici e il raggrinzimento cellulare. Glicerolo e DMSO hanno anche azione di scavengers dei radicali liberi che si possono formare a seguito di ultra-raffreddamento rapido. Usati in miscela e in concentrazioni elevate (come nel caso della soluzione PVS2, più avanti descritta), producono un forte effetto disidratante della cellula, sostituendosi all'acqua in essa contenuta, e innalzano la viscosità della soluzione citoplasmatica, creando di fatto i presupposti della vitrificazione cellulare con l'immersione in azoto liquido;
- per disidratazione evaporativa delle cellule, mediante esposizione degli espianti (in genere incapsulati in una matrice di alginato) ad un flusso d'aria sterile o su gel di silice. Anche in questo caso, è fondamentale individuare il giusto tempo di esposizione al trattamento disidratante, al fine

di garantire una buona vitrificazione delle cellule durante l'immersione in azoto liquido.

### Tecniche di crioconservazione sviluppate per cellule, tessuti e organi vegetali

La prima, e per lungo tempo unica, tecnica utilizzata nella crioconservazione di espianti vegetali è quella basata sul raffreddamento graduale dei campioni fino a  $-35 / -40^{\circ}\text{C}$ , seguito dall'immersione in azoto liquido. Una svolta importante si è però avuta nel 1990 quando due gruppi di ricerca, uno giapponese (Sakai *et al.*, 1990) e uno francese (Fabre e Dereuddre, 1990), dimostrarono, quasi in contemporanea, che era possibile l'immersione diretta degli espianti in azoto liquido (passando cioè da temperatura ambiente a  $-196^{\circ}\text{C}$  nell'arco di pochi secondi), mantenendone la vitalità e la capacità di ricrescita dopo lo scongelamento. Le due tecniche proposte (il trattamento con soluzione vitrificante e l'incapsulazione-disidratazione) differivano sostanzialmente nella metodologia seguita, ma si dimostrarono ben presto entrambe efficaci nel garantire la vitrificazione anche di organi complessi (quali gli apici vegetativi), nel semplificare le procedure di preparazione degli espianti alla conservazione in azoto liquido e nel contenere, per quanto possibile, i costi di implementazione di un crio-laboratorio, pur mantenendo una elevata affidabilità e versatilità dei protocolli.

In seguito sono state sviluppate alcune varianti procedurali alle due tecniche, per cui le procedure di crioconservazione oggi disponibili vengono in genere differenziate proprio in base a come si opera l'ultra-raffreddamento dei campioni: a due fasi (da temperatura ambiente o di  $0^{\circ}\text{C}$  a  $-35 / -40^{\circ}\text{C}$ , poi da questa a  $-196^{\circ}\text{C}$ ) oppure con la diretta immersione in azoto liquido (da temperatura ambiente o di  $0^{\circ}\text{C}$  direttamente a  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Rispetto al raffreddamento controllato, questa "seconda generazione" di tecniche criogeniche è caratterizzata, in genere, da una più articolata preparazione degli espianti, ma anche da costi di applicazione più contenuti, specie in termini di equipaggiamento necessario al laboratorio di crioconservazione.

Le diverse procedure si differenziano per gli espianti a cui vengono prevalentemente applicate (fig. 1), sebbene alcune di esse abbiano una buona versatilità.

#### Ultra-raffreddamento a due fasi (raffreddamento controllato)

La tecnica, di frequente indicata con la terminologia inglese di *slow cooling* o *slow freezing*, si basa sul raffreddamento graduale e controllato dei campioni fino alla temperatura di  $-35^{\circ}\text{C}$  o  $-40^{\circ}\text{C}$ , condotto in



Fig. 1 - Prospetto delle tecniche criogeniche e applicazione alla crioconservazione di cellule, tessuti e organi in ortoflorofruitticoltura.

Fig. 1 - Prospect of cryogenic techniques and application to the cryopreservation of cells, tissues and organs from horticultural species.

genere con una velocità compresa tra  $-0,5^{\circ}\text{C}$  e  $-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (più di frequente  $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), seguito dall'immersione in azoto liquido (Engelmann, 2004). Non è raro, peraltro, imbattersi in protocolli che definiscono come ottimali tassi più bassi di raffreddamento, fino addirittura a  $-0,1^{\circ}\text{C}$  per apici vegetativi di *Mentha* spp. (Uchendu e Reed, 2007). Il raffreddamento graduale dei campioni è in genere applicato facendo ricorso a sofisticati congelatori programmabili, funzionanti in circolazione di azoto liquido controllata da un software che garantisce una elevatissima precisione nel mantenimento del tasso di raffreddamento applicato. In alternativa, le cryovials (crioprovette da 2 ml, il classico contenitore di espianti destinati alla crioconservazione) possono essere inserite in un contenitore apposito (denominato "Mr. Frosty" e commercializzato da Nalgene Inc.), parzialmente riempito con isopropanolo e inserito in un congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'isopropanolo garantisce un raffreddamento controllato che ben si approssima a  $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

La tecnica del raffreddamento controllato fa largo uso del DMSO, sia come pre-trattamento degli espianti, sia come crioprotettivo durante tutta la procedura di raffreddamento e di immersione in azoto liquido. Le concentrazioni di impiego variano tra il 5

e il 15% (Reed e Uchendu, 2008). Altri Autori suggeriscono l'impiego del DMSO in combinazione con altri crioprotettivi, quali glicerolo, saccarosio, PEG, sorbitolo e prolina.

Sebbene in gran parte sostituita dalle procedure che prevedono la diretta immersione degli espianti in azoto liquido, la tecnica di raffreddamento controllato continua ad avere un largo impiego nella crioconservazione di colture cellulari e di callo embriogenico. Facendo ricorso allo *slow cooling*, oltre 1.000 linee di callo di specie di interesse farmacologico sono conservate a -196°C in UK e oltre 5.000 linee embriogeniche di conifere in un'unica criobanca in British Columbia, Canada (Engelmann, 2004). In Francia, si impiega sistematicamente la tecnica del raffreddamento controllato per la crioconservazione di colture embriogeniche di caffè e cacao, utilizzate per produrre materiale di propagazione presso i laboratori della Nestlé Company (Bruno Florin, com. pers.). In Belgio, presso l'Università Cattolica di Leuven, è stata sviluppata una procedura molto efficiente di crioconservazione di colture di callo embriogenico di banana (Panis e Thin, 2001). La procedura prevede la disgregazione di un campione di callo in una soluzione ad elevata concentrazione di saccarosio (180 gr l<sup>-1</sup>), alla quale viene gradualmente aggiunto DMSO fino al raggiungimento di una concentrazione pari a 7,5%. La soluzione finale, contenente cellule embriogeniche in dispersione, è poi ripartita in aliquote all'interno di cryovials che sono quindi sottoposte a raffreddamento graduale in contenitore "Mr. Frosty", posto in congelatore a -80°C. Al raggiungimento della temperatura di -40°C, le cryovials sono immerse in azoto liquido. Dopo scongelamento, la soluzione contenente le cellule è versata in scatole Petri, contenenti carta da filtro su substrato agarizzato. Nell'arco di 3-4 settimane si osserva il recupero dell'attività proliferativa delle cellule che, successivamente, riacquisiscono la piena capacità embriogenica.

#### *Trattamento con soluzione vitrificante di apici vegetativi*

È spesso indicata semplicemente come "tecnica della vitrificazione", sebbene questo possa ingenerare confusione nella terminologia in quanto tutte le procedure criogeniche hanno come finalità ultima la vitrificazione delle cellule. La tecnica si basa sul trattamento degli espianti con una soluzione vitrificante, in genere la soluzione PVS2 (*Plant Vitrification Solution* n°2), proposta per la prima volta da Sakai *et al.* (1990) per la crioconservazione di cellule nucellari dell'arancio 'Navel' (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis*). La soluzione ha una elevata molarità (7,8 M), essendo costituita da 30% di glicerolo, 15% etilenglicole, 15%

DMSO (v/v) in substrato basale di coltura (in genere MS, privo di regolatori di crescita) con 0,4 M di saccarosio. Durante l'ultra-rapido abbassamento termico, la soluzione PVS2 va in super-raffreddamento al di sotto di -100°C e solidifica in forma vetrosa metastabile a circa -115°C. In fase di scongelamento lento, l'analisi al *Differential Scanning Calorimetry* evidenzia devitrificazione esotermica (cristallizzazione) alla temperatura di circa -75°C. La cristallizzazione in fase di scongelamento è facilmente evitata con un rapido innalzamento termico. Sebbene la soluzione PVS2 sia ancora oggi di gran lunga la più impiegata in crioconservazione, nel tempo numerose varianti sono state proposte; di queste, solo la soluzione PVS3 (40% glicerolo e 40% saccarosio su substrato basale di coltura) ha avuto un'apprezzabile diffusione (Sakai *et al.*, 2008).

In quasi 20 anni di sperimentazione, la soluzione PVS2 è stata impiegata nella crioconservazione di apici vegetativi, assi embrionali, callo embriogenico. Peraltro, la tecnica ha trovato la sua massima espressione nella conservazione di apici vegetativi, risultando ad oggi applicata con successo ad oltre 100 specie vegetali (Sakai e Engelmann, 2007).

La procedura standard di crioconservazione di apici vegetativi mediante trattamento con soluzione vitrificante PVS2 prevede i seguenti passaggi (Sakai *et al.*, 2008):

- prelievo di apici vegetativi (*shoot tips*) da gemme ascellari o apicali di germogli proliferanti *in vitro*. Gli apici vegetativi si prelevano operando allo stereomicroscopio sotto aria sterile di una cappa a flusso laminare e sono costituiti da gemme ridotte a circa 1-1,5 mm, lasciando solo i 3-4 primordi fogliari più interni. Numerosi studi hanno evidenziato come il prelievo di apici vegetativi da colture di germogli precedentemente acclimatate al freddo (in genere, a 4-5°C per 2-6 settimane) inneschi meccanismi naturali di resistenza alla crioconservazione (quali la sintesi di prolina, glicinbetaina, carboidrati, glicerolo), sostanze protettive dell'integrità delle membrane e che aumentano il potenziale osmotico cellulare; il pre-trattamento al freddo (*cold hardening*) è particolarmente efficace per favorire la crioconservazione di specie dei climi temperati;
- precoltura degli apici in saccarosio: questa fase ha durata variabile (uno o più giorni) ed è condotta su substrato contenente saccarosio (a concentrazione di 0,1-1 M, più di frequente 0,3 M), in genere alla temperatura di 4°C;
- osmoprotezione: gli apici vegetativi sono trasferiti in cryovials e trattati a 25°C per 20-30 min con

una soluzione composta da glicerolo (2 M) e saccarosio (0,4 M). Questo passaggio incrementa l'osmolarità delle cellule, minimizzando i possibili danni osmotici che possono insorgere con la successiva immersione nella soluzione PVS2;

- trattamento con PVS2: nelle cryovials contenenti gli apici vegetativi, la soluzione osmoprotettiva è sostituita con PVS2. Il tempo di permanenza degli espianti in PVS2 e la temperatura della soluzione sono fattori fondamentali per garantire una adeguata preparazione degli stessi alla vitrificazione durante la fase di raffreddamento ultra-rapido; d'altro canto, occorre evitare l'insorgenza di danni alle cellule a seguito di eccessiva disidratazione, eccessivo stress osmotico e tossicità da concentrazione di soluti nel citoplasma cellulare. Matsumoto *et al.* (1994), ad esempio, hanno evidenziato come un effetto tossico del PVS2 in apici vegetativi di *Wasabia japonica* non crioconservati si determini a partire da 20 min di trattamento a 25°C; al contrario, se il trattamento è effettuato alla temperatura di 0°C, non si osserva alcun effetto indesiderato fino a 60 min di trattamento. A seguito di questa preliminare osservazione, lo studio ha permesso di individuare nel trattamento con PVS2 per 30-60 min a 0°C quello più efficace per indurre elevata tolleranza degli apici vegetativi alla conservazione in azoto liquido. Risultati analoghi sono stati ottenuti con apici vegetativi di pioppo bianco (*Populus alba*) che tollerano trattamenti massimi con PVS2 fino a 40 e 60 min, rispettivamente a 25°C e 0°C (Lambardi, 2002). In generale, i tempi di trattamento con PVS2 che più di frequente si riscontrano come efficaci nei protocolli di crioconservazione sono compresi tra 20 e 90 min (Sakai *et al.*, 2008);
- raffreddamento ultra-rapido a -196°C: dopo aver rimosso il PVS2 del trattamento precedente e averlo sostituito con 0,6 ml di nuova soluzione, le cryovials sono direttamente immerse in azoto liquido. Il tasso di raffreddamento che si ottiene con questa procedura è di circa 300°C min<sup>-1</sup>;
- scongelamento rapido e lavaggio degli espianti: lo scongelamento è in genere effettuato immergendo le cryovials in bagno termostato a 40°C per 50-60 sec (tasso di riscaldamento: circa 250°C min<sup>-1</sup>), dopodiché si rimuove il PVS2 e lo sostituisce con una soluzione di lavaggio costituita da substrato MS contenente 1,2 M di saccarosio. Il trattamento dura 20 min, dopodiché gli espianti sono trasferiti in substrato di ricrescita.

È da rilevare, peraltro, che i protocolli di crioconservazione basati sulla tecnica del trattamento con PVS2 risultano di frequente specie-specifici: in

*Populus* spp., ad esempio, la procedura ottimizzata per il pioppo bianco (*P. alba*), capace di indurre una sopravvivenza del 90% degli apici vegetativi, si è rivelata meno efficiente quando applicata al pioppo grigio (*P. canescens*) e al pioppo nero (*P. nigra*), con sopravvivenze rispettivamente del 54% e 22% (Lambardi, 2002).

La soluzione vitrificante PVS2 ha inoltre trovato impiego in combinazione con altre tecniche di crioconservazione, quali il congelamento in goccia con PVS2 e l'incapsulazione-vitrificazione (fig. 2), più avanti descritte.

#### *Tecnica del congelamento in goccia*

Di recente sviluppo, ma con già un buon numero di applicazioni, è la tecnica del congelamento in goccia, proposta inizialmente per la crioconservazione di apici vegetativi di patata (Schäfer-Menuhr *et al.*, 1997). In questa procedura, gli espianti sono immersi in gocce di DMSO (*droplet-freezing*) o PVS2 (*droplet-vitrification*) di 5-10 µl, adagiate a gruppi di 4-5 sopra strisce d'alluminio. Dopo il periodo di trattamento (più breve di quello che si usa con il PVS2 in cryovials), la striscia d'alluminio è inserita in una cryovial pre-raffreddata e questa immersa in azoto liquido. La principale caratteristica della tecnica è quella di permettere velocità di raffreddamento e di scongelamento degli espianti ancora più elevate che nelle altre tecniche, grazie al piccolo quantitativo di crioprotettivo nel quale l'espianto è immerso. La tecnica ha di recente trovato importanti applicazioni alla crioconservazione di apici vegetativi di alcune specie economicamente importanti, quali asparago (Mix-Wagner *et al.*, 2000), aglio (Ellis *et al.*, 2006) e *Musa* spp. (Panis *et al.*, 2005).

#### *Crioconservazione di espianti incapsulati (semi sintetici)*

I semi sintetici (*synthetic seeds* o *artificial seeds*) sono una forma di coltura e conservazione *in vitro* sviluppata originariamente per gli embrioni somatici e poi estesa ad altre tipologie di espianto, quali gemme ascellari, segmenti uni-nodali, embrioni zigotici e bulbilli. La procedura di preparazione di semi sintetici prevede l'immersione degli espianti in una soluzione di alginato di sodio (in genere al 3%) in acqua o substrato nutritivo, addizionato o meno di regolatori di crescita. Operando sotto flusso d'aria sterile, gli espianti vengono poi aspirati con una micropipetta insieme ad una aliquota di soluzione e rilasciati goccia-a-goccia (ogni goccia includente un espianto) in una soluzione complessante, quale cloruro di calcio alla concentrazione di 100 mM, ove permangono per

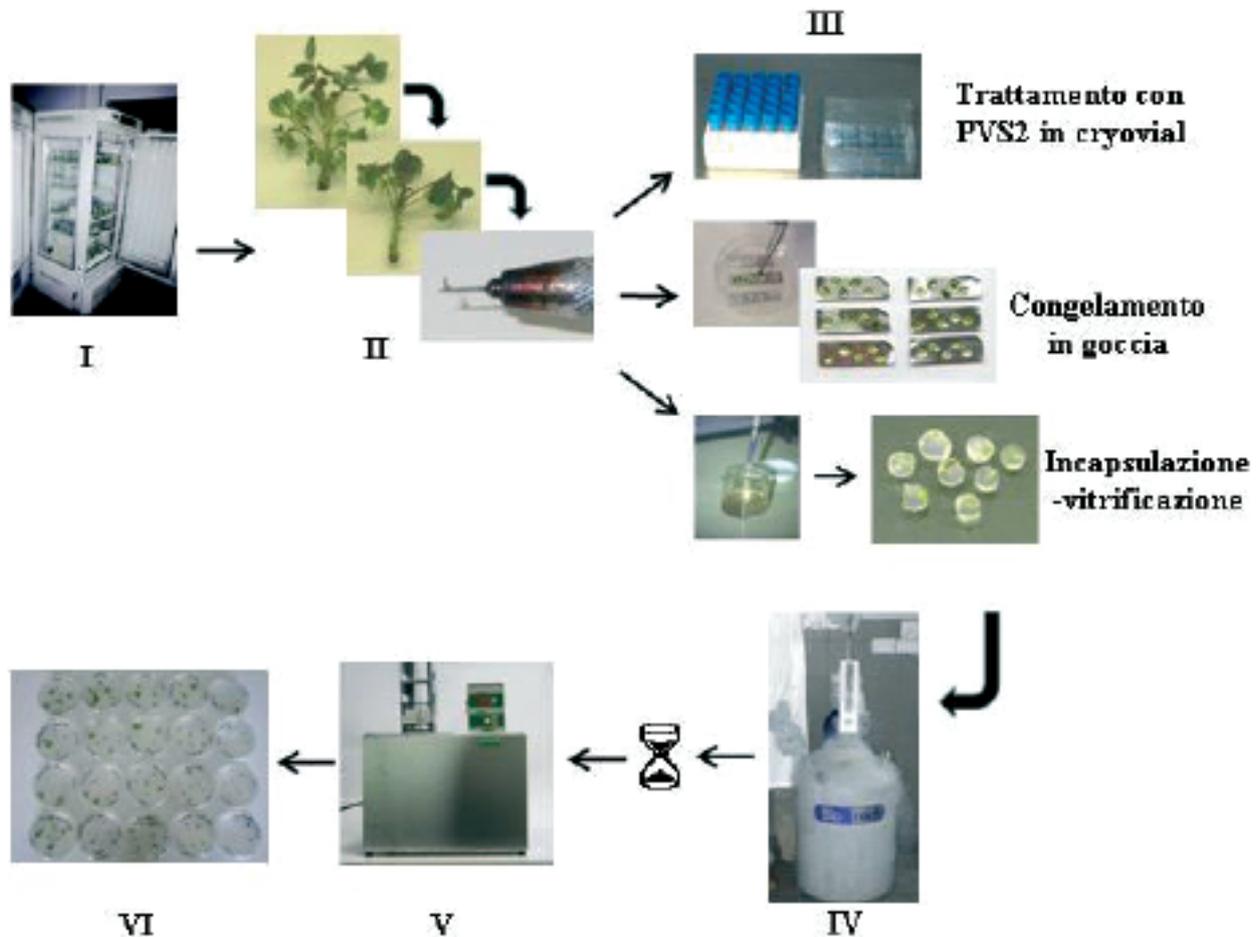


Fig. 2 - Principali fasi delle tecniche basate sull'uso della soluzione vitrificante PVS2. I, acclimatazione a 4°C delle colture di germogli; II, escissione di apici vegetativi a partire da gemme ascellari; III: trattamento degli apici vegetativi con PVS2 (in cryovial, in goccia, inclusi in semi sintetici); IV, immersione diretta in azoto liquido (-196°C); V, scongelamento in bagno termostato a 40°C; VI, ricrescita degli apici vegetativi o "germinazione" dei semi sintetici in substrato agarizzato.

Fig. 2 - Main steps of techniques based on the use of the PVS2 vitrification solution. I, cold-hardening (4°C) of shoot cultures; II, excision of shoot tips from axillary buds; III, treatment of shoot tips with PVS2 (in cryovial, in drop, after encapsulation); IV, direct immersion in liquid nitrogen (-196°C); V, thawing in water bath at 40°C; VI, regrowth of shoot tips or "germination" of synthetic seeds on gelled medium.

20-30 min. Durante questo arco di tempo si determina uno scambio ionico  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  che produce la formazione di capsule sferiche indurite. Queste sono poi sottoposte a lavaggio e i semi sintetici così ottenuti posti a "germinare" (come si definisce lo sviluppo dell'espianto che contengono) o in conservazione su appropriati substrati di coltura. La tecnica dei semi sintetici ha di recente trovato ampia applicazione, ad esempio nel settore delle piante ornamentali (Lambardi *et al.*, 2006b) ove favorisce lo scambio di materiale tra laboratori di vitrocoltura.

Con gli espianati incapsulati in alginato è stata sviluppata una delle tecniche più diffuse di crioconservazione, l'incapsulazione-disidratazione. In questa tecnica, la vitrificazione degli espianati durante raffreddamento ultra-rapido è promossa dal pre-trattamento dei semi sintetici in substrato con alte concentrazioni di

saccarosio e successiva disidratazione in flusso d'aria sterile (quello di una cappa a flusso laminare) o su gel di silice per un tempo appropriato a ridurre sensibilmente il contenuto in acqua, in genere a valori del 20-30%. A fine trattamento disidratante, le capsule sono inserite in criovials 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 vitrocoltura. Una variante prevede il trattamento dei semi sintetici con la soluzione PVS2 (incapsulazione-vitrificazione), combinando così la praticità degli espianati inclusi in semi sintetici con l'efficacia vitrificante del PVS2 (Sakai e Engelmann, 2007).

*Crioconservazione di semi ed assi embrionali*

Lo stoccaggio in camere fredde alla temperatura di  $-18^{\circ}\text{C}$  è l'approccio tradizionale alla conservazione dei semi di una ampia gamma di specie vegetali. Peraltro, molte specie sono caratterizzate da semi "recalcitranti" (non ortodossi) che non tollerano consistenti riduzioni del loro contenuto in acqua e quindi hanno tempi di conservazione molto limitati. Inoltre, molte specie a semi ortodossi tendono nel tempo a perdere potere germinativo quando conservati a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Per tutte queste specie, la conservazione a  $-196^{\circ}\text{C}$  rappresenta una importante opzione per la conservazione del seme a lungo termine.

Prima dell'immersione in azoto liquido, i semi interi devono essere opportunamente ridotti nel loro contenuto in acqua a valori, in genere, inferiori al 20%. Questa operazione viene condotta mediante esposizione dei semi per tempi definiti sotto il flusso d'aria sterile di una cappa a flusso laminare, oppure in contenitori ermeticamente chiusi, contenenti gel di silice o una soluzione acquosa satura di un sale potassico (acetato, idrossido o carbonato di potassio). Dopo il recupero dall'azoto liquido e lo scongelamento in bagno termostato, i semi sono posti a germinare *in vitro* su substrato nutritivo gelificato o, più semplicemente, su ovatta umida.

Quando si opera con semi di grosse dimensioni e/o elevato contenuto in lipidi, può essere conveniente crioconservare il solo asse embrionale, privato cioè dei cotiledoni, permettendone lo stoccaggio nelle cryovials. È quanto, ad esempio, recentemente proposto per la conservazione in azoto liquido di semi di vecchie varietà di arachide (Ozudogru *et al.*, 2009). Ovviamente, questa pratica non si può applicare in presenza di semi che perdono di germinabilità quando privati dei cotiledoni, come ad esempio in pistacchio (Ozden-Tokatli *et al.*, 2007).

È da rilevare che la crioconservazione dei semi si presta anche alla conservazione clonale di specie da frutto caratterizzate dalla contemporanea presenza nel seme dell'embrione zigotico e di embrioni nucellari. È questo il caso del genere *Citrus*, all'interno del quale si annoverano molte specie poliembrioniche. In effetti, è possibile crioconservare con successo il seme intero di varie specie di *Citrus* (Cho *et al.*, 2002b; Pritchard e Nadarajan, 2008), ottenendo in post-crioconservazione lo sviluppo degli embrioni nucellari (Lambardi *et al.*, 2004). La tecnica è attualmente in corso di applicazione per la salvaguardia di una antica collezione Medicea di agrumi (Lambardi *et al.*, 2007).

Per una più esauriente trattazione della crioconservazione di semi ortodossi e non ortodossi si rimanda a

reviews specifiche (Pritchard e Nadarajan, 2008; Walters *et al.*, 2008).

*Crioconservazione di gemme dormienti*

Quella delle "gemme dormienti" è una procedura di crioconservazione molto particolare e innovativa, in quanto non prevede coltura *in vitro*. Sakai (1960) fu il primo a dimostrare la possibilità di crioconservare gemme di *Populus sieboldi* e *Salix koriyanagi*, prelevate durante la stagione invernale e sottoposte a raffreddamento controllato. Molti anni dopo, la tecnica fu ripresa da Forsline e collaboratori (1998) per una importante applicazione nella conservazione di germoplasma di melo. Metodologicamente, la procedura prevede i seguenti passaggi (Towill e Ellis, 2008), illustrati in figura 3:

- le marze sono raccolte a metà inverno e poste in acclimatazione al freddo a  $-5^{\circ}\text{C}$  per 2 mesi;
- dalle marze si ottengono segmenti uni-nodali che sono mantenuti a  $-5^{\circ}\text{C}$  e periodicamente pesati per valutarne la perdita in acqua;
- al raggiungimento di un contenuto in acqua intorno al 30% i segmenti sono sottoposti a raffreddamento graduale, portandoli a temperatura di  $-30^{\circ}\text{C}$  alla velocità di  $-1^{\circ}\text{C h}^{-1}$ ; con alcune specie di *Malus*, i segmenti possono essere sottoposti a raffreddamento graduale senza essere preventivamente sottoposti a disidratazione;
- i segmenti uni-nodali sono quindi immersi in azoto liquido e conservati;
- lo scongelamento si opera in cella frigorifera a  $4^{\circ}\text{C}$  e i segmenti uni-nodali sono posti a reidrattare in torba umida per 2 settimane a  $2^{\circ}\text{C}$ ;
- dai segmenti si prelevano le gemme per la realizzazione di innesti a scaglia (*chip budding*) su portinnesti appositamente preparati.

Presso la criobanca dell'NCGRP/National Center for Genetic Resources Preservation dell'USDA di Fort Collins (Colorado, USA) oltre 2500 accessioni di *Malus* spp. e circa 60 di *Prunus cerasus* sono oggi preservate con questo approccio (David Ellis, com. pers.). In Italia, la tecnica è in sperimentazione per la conservazione di germoplasma di melo autoctono del Veneto, attraverso una collaborazione tra il CNR-IVALSA e il Centro Sperimentale Ortofloricolo "Po di Tramontana", Veneto Agricoltura, di Rosolina (Lambardi *et al.*, 2009).

*Scongellamento, ricrescita e rispondenza genetica del materiale proveniente da crioconservazione*

Lo scongelamento degli espianti o dei semi sintetici deve essere molto veloce, al fine di evitare nucleazione delle molecole d'acqua e formazione di cristalli

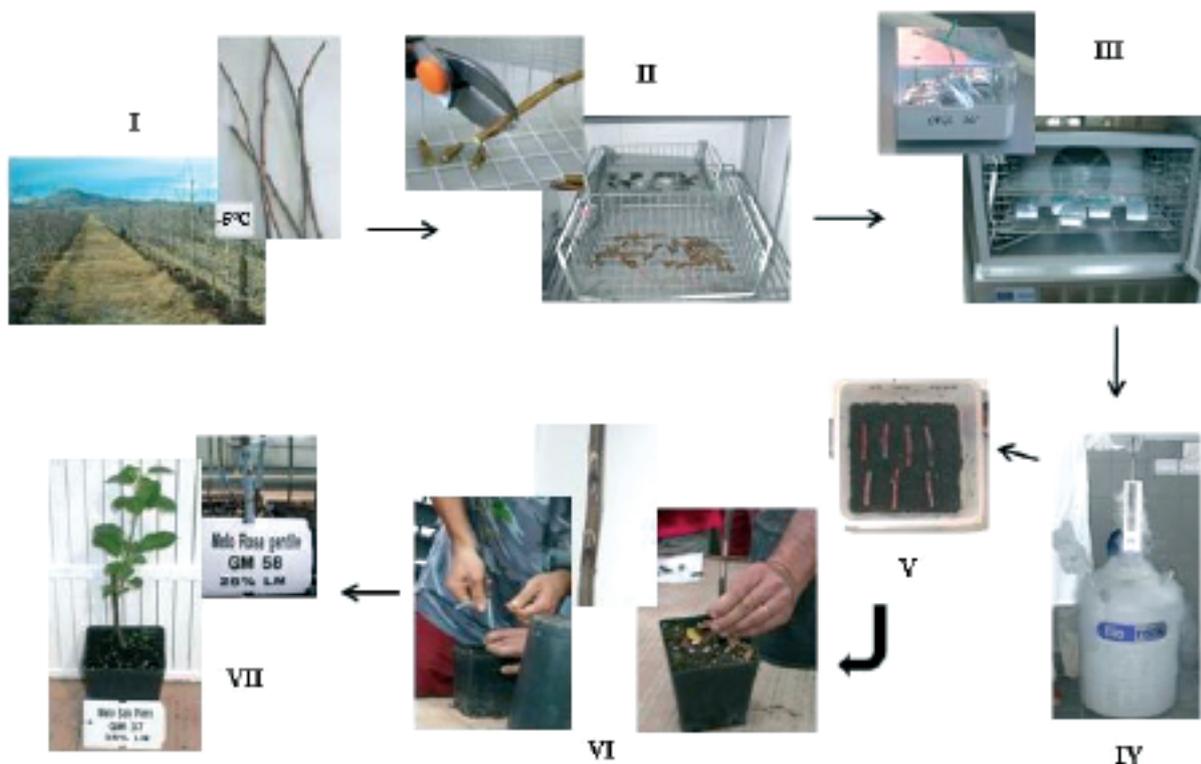


Fig. 3 - Esempio di procedura di crioconservazione di gemme dormienti, applicata al CNR-IVALSA per germoplasma di melo del Veneto. I, raccolta invernale delle marze e conservazione a  $-5^{\circ}\text{C}$  per 8 settimane; II, preparazione dei segmenti uni-nodali, conservazione a  $-5^{\circ}\text{C}$  e disidratazione fino ad un contenuto d'acqua del 26% (6-8 settimane); III, raffreddamento controllato dei segmenti fino a  $-30^{\circ}\text{C}$  ( $1^{\circ}\text{C h}^{-1}$ ); IV, immersione dei segmenti uni-nodali in azoto liquido; V, scongelamento e reidratazione in torba umida a  $2^{\circ}\text{C}$  per 2 settimane; VI, innesto a scaglia (*chip budding*) su portinnesti di *Malus floribunda*, cv Radian; VII, attecchimento dell'innesto dopo 1-2 settimane e sviluppo del germoglio dopo 6 settimane.

Fig. 3 - Example of a procedure of dormant bud cryopreservation, applied at the CNR-IVALSA on apple germplasm of Veneto. I, winter collection and storage at  $-5^{\circ}\text{C}$  (8 weeks) of scions; II, preparation of uni-nodal segments, storage at  $-5^{\circ}\text{C}$  and desiccation up to a moisture content of 26% (6-8 weeks); III, slow cooling of uni-nodal segments up to  $-30^{\circ}\text{C}$  ( $1^{\circ}\text{C h}^{-1}$ ); IV, immersion of uni-nodal segments in liquid nitrogen; V, thawing and rehydration in damp peat at  $2^{\circ}\text{C}$  for 2 weeks; VI, chip budding onto *Malus floribunda* rootstocks, cv Radian; VII, graft healing in 1-2 weeks and shoot development after 6 weeks.

di ghiaccio extra- ed intra-cellulari per un fenomeno detto di “ricristallizzazione migratoria”: 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 cryovials, contenenti gli espianti o i semi sintetici, dall’azoto liquido ad un bagno termostato a  $40^{\circ}\text{C}$ . In questo modo, in meno di un minuto si ha il passaggio degli espianti da  $-196^{\circ}\text{C}$  a  $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ .

Il substrato di coltura sul quale vengono trasferiti gli apici vegetativi, tal quali o incapsulati in alginato, svolge l’importante funzione di stimolare l’uscita da una sorta di “dormienza” indotta dalla permanenza a  $-196^{\circ}\text{C}$ , limitare la formazione di tessuto indifferenziato (callo), favorire lo sviluppo degli apici vegetativi (o la “germinazione” dei semi sintetici) e la “riparazione” di micro-danni che possono essere insorti in zone del meristema. Talvolta, il trasferimento degli espianti su substrato standard di coltura è sufficiente per garantirne lo sviluppo. In altri casi, occorre agire

sulla composizione del substrato stesso. In pioppo bianco, ad esempio, la comparazione di vari substrati, diversi per la componente ormonale, ha evidenziato che la fase di ricrescita degli apici vegetativi è favorita da un substrato basale contenente benziladenina (BA) a  $1,5\ \mu\text{M}$  e acido gibberellico ( $\text{GA}_3$ ) a  $0,3\ \mu\text{M}$  (Lambardi *et al.*, 2000). Lo sviluppo di apici incapsulati risulta talvolta favorito dall’inclusione di carbone attivato, avente la funzione di assorbire i composti fenolici prodotti dalle cellule morte (Paulet *et al.*, 1993); in altri casi occorre estrarre gli apici dalle capsule per favorirne lo sviluppo.

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, in 20 anni di esperienze di crioconservazione di specie vegetali, hanno valutato gli aspetti di stabilità a livello fenotipico, citologico, biochimico e molecolare del materiale sottoposto a conservazione in azoto liquido,

non producendo evidenze di alterazioni stabili importanti (Harding, 2004). Anche le poche segnalazioni prodotte di alterazioni genetiche non sembrano tali da destare eccessiva preoccupazione nell'uso della criogenia. Ad esempio, un'analisi molecolare RAPDs è stata condotta su piante di crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) provenienti da crioconservazione di apici vegetativi, mediante le tecniche di trattamento con soluzione vitrificante e incapsulazione-disidratazione. Lo studio ha impiegato 8 primers, producendo 103 bande di lunghezza compresa tra 200 e 2.000 bp, evidenziando solo in un caso su 46 (proveniente da incapsulazione-vitrificazione) una banda diversa per uno specifico primer (Martin e González-Benito, 2005).

Occorre sottolineare, peraltro, che la crioconservazione di apici vegetativi 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 destinate alla crioconservazione devono essere correttamente monitorate in termini di sicurezza genetico-sanitaria prima del prelievo degli espianti; allo stesso modo, attenzione si deve porre in post-crioconservazione, evitando procedure di ricrescita e proliferazione a rischio di variabilità somaclonale. Ad esempio, indagini morfologico-molecolari condotte su colture di germogli di radicchio rosso (*Cichorium intybus*) durante 10 cicli di proliferazione, intervallati da procedure di conservazione in azoto liquido mediante trattamento con PVS2, hanno dimostrato il mantenimento della rispondenza morfologica e genetica (mediante marcatori RAPDs) sia durante la micropropagazione, sia nel materiale proveniente da crioconservazione (De Carlo *et al.*, 2007).

### **Applicazione della crioconservazione all'ortofloro-frutticoltura**

#### *Specie orticole*

La crioconservazione è stata applicata con successo a varie specie orticole, quali aglio, asparago, *Brassica* spp., patata, canna da zucchero, radicchio. Le tecniche applicate ed il tipo di espianto crioconservato variano in base alla specie, per quanto il trattamento con soluzione vitrificante di apici vegetativi risulti il più utilizzato. Di seguito, si riportano informazioni su quattro orticole di elevato interesse economico.

*Patata* (*Solanum tuberosum*). La metodologia del congelamento in goccia, descritta da Schäfer-Menuhr *et al.* (1997), prevede l'utilizzo di apici vegetativi di circa 2-3 mm di lunghezza, prelevati da gemme apicali, che sono trattati con DMSO (10%) per 1-3 h a temperatura ambiente. Gli apici sono quindi immersi in gocce di DMSO su striscia di alluminio; ogni striscia è quindi inserita in cryovial e questa direttamente immersa in azoto liquido. Per lo scongelamento, le strisce di alluminio sono poste in substrato liquido MS a temperatura ambiente; successivamente gli apici vegetativi scongelati vengono posti in gocce di agarosio all'1%, lasciate solidificare per 30-60 min. Viene quindi aggiunto il substrato di ricrescita e gli espianti sono mantenuti a 22°C e fotoperiodo di 16 h. La tecnica garantisce l'80% di sopravvivenza degli apici vegetativi e una ricrescita media del 40%. La tecnica del congelamento in goccia è stata applicata con successo anche in combinazione con la soluzione vitrificante (Halmagyi *et al.*, 2005). A differenza della precedente metodologia, gli apici vegetativi (di 3-4 mm, escissi da gemme apicali) vengono pre-trattati con substrato MS liquido, contenente 0,5 M di saccarosio, per 24 h a 24°C. Gli apici sono quindi trattati con PVS2 in gocce su strisce di alluminio, con un tempo di incubazione di 10-15 min. Dopo immersione diretta delle cryovials e conservazione in azoto liquido, lo scongelamento è operato su substrato liquido MS a temperatura ambiente. Questa metodologia garantisce percentuali di ricrescita intorno al 50%. Anche la tecnica del trattamento con soluzione vitrificante è stata applicata con ottimi risultati alla crioconservazione di patata, ottenendo con oltre 55 genotipi una ricrescita di almeno il 40% degli apici vegetativi in post-conservazione (Golmirazaie e Panta, 2000). La patata rappresenta una delle specie più importanti tra quelle crioconservate su larga scala. Attualmente, criobanche di patata sono presso (i) il Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) di Gatersleben, Germania, ove sono conservate a -196°C più di 1.000 accessioni di patata utilizzando la tecnica del congelamento in gocce di DMSO (Keller, 2007), (ii) l'Institute for Crop and Grassland Science in Braunschweig, Germania (oltre 500 antiche cultivar; Mix-Wagner *et al.*, 2003) e (iii) l'International Potato Center di Lima, Perù (oltre 200 accessioni; Golmirazaie e Panta, 2000).

*Aglio* (*Allium sativum*). Numerosi lavori dimostrano la possibilità di crioconservare varie tipologie di espianti di aglio, quali le infiorescenze immature, le gemme fiorali, i bulbilli o i bulbi singoli provenienti da coltura *in vitro*. Per l'aglio, particolarmente efficiente si è rivelata la tecnica del congelamento in

gocce di PVS2 di apici vegetativi, escissi da bulbilli di aglio (Ellis *et al.*, 2006). In tale procedura, gli apici vegetativi, previa sterilizzazione, sono pre-trattati a 5°C per 48 h e successivamente incubati per 15-30 min in PVS2 a 0°C. Gli espianti sono quindi inseriti in gocce di PVS2 su strisce di alluminio e queste immerse direttamente in azoto liquido, all'interno di cryovials. Gli espianti vengono scongelati immergendo le strisce di alluminio in soluzione MS liquida contenente 1,2 M di saccarosio per 20 minuti a 25°C. La tecnica del congelamento in gocce di PVS2 è stata di recente applicata anche ad infiorescenze immature di numerose accessioni di aglio (Kim *et al.*, 2007). L'impiego di questo tipo di espianto risulta molto interessante in quanto da ogni singola infiorescenza immatura è possibile ottenere, tramite coltura *in vitro*, più di 20 microbulbilli che sono in genere virus-essenti o comunque denotano un tasso virale estremamente basso. Questo studio ha investigato la crioconservazione di infiorescenze immature o bulbilli di oltre 250 accessioni di 5 specie di *Allium*, compreso *Allium sativum*, presenti nelle due più importanti collezioni della Corea. Attualmente, 221 di queste accessioni sono conservate in criobanca presso il National Institute of Crop Science di Mokpo, Corea del Sud. Anche la tecnica del trattamento con soluzione vitrificante si è dimostrata efficace nel permettere la crioconservazione di apici vegetativi (Ellis *et al.*, 2006). In questo lavoro, alcune accessioni hanno risposto meglio all'impiego della soluzione vitrificante PVS2, altre al PVS3. Presso l'IPK di Gatersleben, Germania, sono attualmente in crioconservazione 22 accessioni di aglio da colture micropropagate virus-essenti (Keller, 2007).

*Asparago* (*Asparagus officinalis*). La crioconservazione dell'asparago ha già prodotto risultati molto promettenti, anche se la tecnica non ha ancora trovato applicazione alla conservazione del germoplasma su vasta scala. Già agli inizi degli anni '90 fu proposta una semplice procedura per la conservazione in azoto liquido di segmenti uni-nodali da vitrocultura (Uragami *et al.*, 1990). La procedura prevede il pre-trattamento degli espianti su substrato MS addizionato di 0,7 M di saccarosio per 2 giorni e la successiva disidratazione su gel di silice fino ad un contenuto in acqua inferiore al 20%, dopodiché gli espianti sono immersi direttamente in azoto liquido. Successivamente, è stata proposta la tecnica dell'ultra-raffreddamento a due fasi per la conservazione di meristemi di asparago (Suzuki *et al.*, 1998): i meristemi, mantenuti su substrato MS addizionato di 0,4 M di glucosio per 2 giorni a 26°C, sono trattati con soluzio-

ne crioprotettiva (0,2 M di sorbitolo e 8% di DMSO in MS liquido) per 2 h a temperatura ambiente, sottoposti a raffreddamento controllato (0,5°C min<sup>-1</sup>) fino alla temperatura di -40°C e successivamente immersi in azoto liquido. La percentuale di ricrescita è superiore al 70%. Elevate percentuali di recupero (oltre il 90%) sono state ottenute applicando la tecnica del congelamento in goccia in DMSO ad apici vegetativi di 8 cultivar di asparago (Mix-Wagner *et al.*, 2000). Questo studio ha anche evidenziato la possibilità di recuperare materiale virus-essente mediante crioterapia.

*Radicchio* (*Cichorium intybus*). La crioconservazione di apici vegetativi di radicchio è stata ottenuta mediante le tecniche dell'ultra-raffreddamento a due fasi (Demeulemeester *et al.*, 1992), l'incapsulazione-disidratazione (Vandenbusshe *et al.*, 2002) e il trattamento con soluzione vitrificante (Lambardi *et al.*, 2006a). Quest'ultima tecnica, in particolare, è stata sviluppata per la conservazione di linee selezionate di varie tipologie di radicchio rosso, mantenute in coltura *in vitro* presso il Centro Sperimentale Ortofloricolo "Po di Tramontana", Veneto Agricoltura, di Rosolina. Gli espianti (apici vegetativi di 1-2 mm di lunghezza), prelevati da germogli in proliferazione, sono pre-trattati a 4°C per 2 giorni su substrato privo di ormoni, incubati per 30 min con soluzione crioprotettiva (2 M glicerolo e 0,4 M saccarosio in MS liquido) a 25°C all'interno di cryovials, trattati con PVS2 per 60 min a 0°C e, quindi, immersi direttamente in azoto liquido. Lo scongelamento è effettuato in bagno termostato a 40°C e la ricrescita in substrato MS addizionato di 0,5 µM di BA. La procedura si è dimostrata assai efficace, con una sopravvivenza massima dell'80% nel caso della tipologia 'Rosso di Chioggia'. Dopo 3 mesi di ricrescita, i germogli sono stati radicati *in vitro*, acclimatati *in vivo* e trasferiti in campo, dimostrando una assoluta rispondenza morfologica e molecolare alla linea di origine (De Carlo *et al.*, 2007).

#### *Specie ornamentali*

Efficienti procedure di crioconservazione sono state sviluppate per un'ampia gamma di specie ornamentali da fiore reciso e da giardino, talora comparando tecniche diverse. Per la crioconservazione di apici vegetativi di *Chrysanthemum morifolium*, ad esempio, Halmagyi *et al.* (2004) hanno sviluppato e confrontato procedure di ultra-raffreddamento a due fasi, incapsulazione-disidratazione e congelamento in gocce di PVS2, evidenziando una più elevata sopravvivenza in post-crioconservazione (60%) con quest'ultima tecnica.

Nei protocolli di varie specie ornamentali, il pre-trattamento al freddo delle colture di germogli e degli

espianti da questi prelevati si è spesso dimostrato una fase importante nell'indurre una più elevata tolleranza alla conservazione in azoto liquido. Esempi di questo tipo sono (i) i segmenti nodali di *Chrysanthemum*, mantenuti a 10°C e 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di intensità luminosa per 3 settimane (Martin e González-Benito, 2005), (ii) le colture di germogli di *Photinia fraseri*, acclimatate a 4°C in oscurità per 2-3 settimane (Ozden-Tokatli *et al.*, 2008), e (iii) le colture di callo embriogenico di *Aesculus hippocastanum*, acclimatate a 4°C per 5 giorni in oscurità (Lambardi *et al.*, 2005).

Il tempo di trattamento in soluzione PVS2, così come l'esposizione di semi sintetici a procedure di disidratazione, rappresentano i passaggi chiave per indurre vitrificazione degli espianti durante raffreddamento ultra-rapido in azoto liquido. L'analisi dei vari protocolli disponibili in letteratura per specie ornamentali evidenzia una ampia variabilità dei tempi di trattamento con PVS2 ritenuti ottimali, da un minimo di 5 min con la tecnica del congelamento in goccia per apici vegetativi di *Chrysanthemum grandiflora* (Halmagyi *et al.*, 2004) fino a 3 h nell'incapsulazione-vitrificazione di apici vegetativi di *Dianthus caryophyllus* (Halmagyi e Deliu, 2007). Operando con la tecnica di incapsulazione-disidratazione, Lynch *et al.* (1996) riportano che 2 h di esposizione di semi sintetici di *Rosa multiflora* al gel di silice sono sufficienti per indurre 25% di "germinazione" in post-crioconservazione; i semi sintetici di *Photinia fraserii* richiedono invece 8 h di disidratazione in flusso d'aria sterile per acquisire tolleranza al raffreddamento ultra-rapido in azoto liquido (Ozden-Tokatli *et al.*, 2008).

La presenza di cultivar chimeriche è un aspetto del quale tenere conto nella crioconservazione di specie ornamentali. Lo sviluppo di germogli avventizi dal meristema sottoposto a crioconservazione può determinare la perdita della variante chimerica nella pianta che da questo si svilupperà. In un interessante studio condotto con una cultivar chimerica di *Chrysanthemum* ('Apricot Marble') è stato evidenziato che il 70% delle piante ottenute da crioconservazione di apici vegetativi, mediante tecnica del raffreddamento controllato, presentava una evidente alterazione della colorazione rosa. Al contrario, le piante provenienti da apici vegetativi solo pre-trattati con DMSO non presentavano alcuna anomalia morfologica, a dimostrazione che la perdita del carattere chimerico era da attribuire al processo di ultra-raffreddamento a due fasi o al successivo recupero dall'azoto liquido (Fukai *et al.*, 1994). La formazione di germogli avventizi da apici vegetativi crioconservati è stata riportata anche in *Chrysanthemum morifolium* (Halmagyi *et al.*, 2004).

È inoltre da segnalare che le cellule che compongono l'apice vegetativo possono talvolta mostrare una diversa tolleranza alla conservazione a -196°C, con conseguente ricrescita che interessa parti diverse del meristema. Osservazioni morfologiche di apici vegetativi di *Chrysanthemum grandiflora*, provenienti da crioconservazione, hanno evidenziato che la ricrescita cellulare interessa principalmente le cellule dei primordi fogliari e solo raramente quelle del domo meristemato (Fukai e Oe, 1990). All'opposto, Halmagyi e Pinker (2006) hanno evidenziato che le cellule compatte del meristema di rosa, caratterizzate da pochi vacuoli di ridotta dimensione e basso contenuto in acqua, esibivano elevata tolleranza al raffreddamento ultra-rapido in azoto liquido; al contrario, le cellule più distanti dal domo meristemato, con larghi vacuoli e maggior contenuto in acqua, non sopravvivevano. La diversa attitudine delle cellule dell'apice vegetativo a tollerare la conservazione in azoto liquido può avere importanti ripercussioni in termini di risanamento da patogeni mediante crioterapia (vedi più avanti).

#### *Specie da frutto*

Le principali specie da frutto per le quali sono state ad oggi sviluppate efficienti procedure di crioconservazione sono riportate in tabella 1.

In assoluto, la tecnica del trattamento con soluzione vitrificante (in genere PVS2) di apici vegetativi è quella che ha trovato il più largo impiego, determinando percentuali di sopravvivenza e ricrescita sempre superiori al 50%. Oltre agli apici vegetativi, la tecnica è stata applicata con successo anche nella crioconservazione di colture di callo embriogenico di olivo (Lambardi *et al.*, 2002) e assi embrionali di *Citrus madurensis* (Cho *et al.*, 2002a) e *Citrus sinensis* (Santos e Stushnoff, 2003). Anche operando con le specie da frutto si evidenzia l'importanza di individuare il giusto tempo di trattamento degli espianti alla soluzione PVS2 prima dell'immersione diretta in azoto liquido: le segnalazioni vanno da un minimo di 20 min nel trattamento a 25°C di apici vegetativi di kaki (Matsumoto *et al.*, 2001), fino a 2 h in ciliegio (Niino *et al.*, 1997). La maggior parte dei protocolli comprende, inoltre, uno o più pre-trattamenti preparatori al passaggio in PVS2, quali: (i) l'acclimatazione a 4-5°C delle colture di germogli prima dell'espianto degli apici vegetativi, in genere protratta per 3-5 settimane, (ii) l'acclimatazione a 4°C anche degli apici vegetativi escissi (24 h), di frequente associata alla coltura in substrato contenente elevata concentrazione di saccarosio (0,3-0,7 M), (iii) l'osmoprotezione con crioprotettivi, in genere 20-30 min in una soluzione 2 M di glicerolo e 0,4 M di saccarosio.

Tab. 1 - Tecniche ed espianti utilizzati nella crioconservazione delle principali specie da frutto. La ricrescita si riferisce alla percentuale finale di piante sviluppate rispetto agli espianti posti in conservazione in azoto liquido.

Tab. 1 - Techniques and explants used for the cryopreservation of important fruit species. "Ricrescita" (regrowth) refers to the final percentage of plants developed from the explants initially stored in liquid nitrogen.

Specie	Espianto	Trattamento	Ricrescita (%)	Bibliografia
Raffreddamento controllato				
<i>Malus</i> spp.	AV	0,2°C min <sup>-1</sup>	92	Zhao <i>et al.</i> , 1999
<i>Vitis vinifera</i>	AV	0,2°C min <sup>-1</sup>	40	Zhao <i>et al.</i> , 2001
Trattamento con PVS2				
<i>Amygdalus communis</i>	AV	120 min, 0°C	100	Al-Ababneh <i>et al.</i> , 2003
<i>Castanea sativa</i>	AV	120 min, 0°C	54	Vidal <i>et al.</i> , 2005
<i>Diospyros kaki</i>	AV	20 min, 25°C	89	Matsumoto <i>et al.</i> , 2001
<i>Malus</i> spp.	AV	80 min, 25°C (PVS3)	88	Wu <i>et al.</i> , 2001
<i>Malus domestica</i>	AV	80 min, 25°C	80	Niino <i>et al.</i> , 1992
<i>Musa</i> spp.	AV	30 min, 0°C	85	Panis <i>et al.</i> , 2007
<i>Olea europaea</i>	CE	90 min, 0°C	38	Lambardi <i>et al.</i> , 2002
<i>Olea europaea</i>	AV	90 min, 0°C	27	Lynch <i>et al.</i> , 2007
<i>Prunus</i> spp.	AV	120 min, 25°C	80	Niino <i>et al.</i> , 1997
<i>Prunus domestica</i>	AV	90 min, 0°C	57	De Carlo <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrus</i> spp.	AV	90 min, 25°C	72	Niino <i>et al.</i> , 1992
<i>Vitis</i> spp.	AV	80 min, 0°C	85	Matsumoto e Sakai, 2003
Incapsulazione-disidratazione/vitrificazione				
<i>Actinidia</i> spp.	AV	GS, 4 h	85	Bachiri <i>et al.</i> , 2001
<i>Citrus</i> spp.	ES	FL, 5 h	100	Gonzalez-Arno <i>et al.</i> , 2003
<i>Citrus aurantium</i>	AV	SG, 2 h	83	Al-Ababneh <i>et al.</i> , 2002
<i>Citrus madurensis</i>	AE	SG, 3 h	65	Cho <i>et al.</i> , 2002a
<i>Malus</i> spp.	AV	FL, 4 h	91	Zhao <i>et al.</i> , 1999
<i>Malus domestica</i>	AV	FL, 6 h	88	Paul <i>et al.</i> , 2000
<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i>	AV	PVS2, 3 h	100	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Prunus dulcis</i>	AV	GS, 9 h	62	Shatnawi <i>et al.</i> , 1999
<i>Pyrus syriaca</i>	AV	FL, 5 h	40	Tahtamouni e Shibli, 1999
<i>Vitis</i> spp.	AV	FL, 7 h	60	Wang <i>et al.</i> , 2000
<i>Vitis vinifera</i>	AV	GS, 2 h	40	Zhao <i>et al.</i> , 2001
Disidratazione di semi e assi embrionali				
<i>Castanea sativa</i>	AE, ES	FL, 2 h	100	Corredoira <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus</i> spp.	SI	FL, 10-22 h	93	Lambardi <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus aurantifolia</i>	SI, AE	FL, 2 h	92	Cho <i>et al.</i> , 2002b
<i>Citrus sinensis</i>	AE	SG, 2 h	100	Santos e Stushnoff, 2003
<i>Pistacia</i> spp.	SI	SG, 8 h	90	Ozden-Tokatli <i>et al.</i> , 2007
Disidratazione gemme dormienti				
<i>Diospyros kaki</i>	GD	PVS2, 20 min, 25°C	89	Matsumoto <i>et al.</i> , 2001
<i>Malus</i> spp.	GD	1°C h <sup>-1</sup> fino a -30°C	76	Forsline <i>et al.</i> , 1998
<i>Malus</i> spp.	GD	1°C h <sup>-1</sup> fino a -30°C	70	Höfer <i>et al.</i> , 2006
<i>Malus domestica</i>	GD	1°C min <sup>-1</sup> fino a -40°C	83	Wu <i>et al.</i> , 2001

**Espianti:** AV, apici vegetativi; GD, gemme dormienti; SI, semi interi; AE, assi embrionali; CE, callo embriogenico; ES, embrioni somatici. **Trattamenti:** GS, disidratazione su gel di silice; FL, disidratazione sotto flusso d'aria sterile.

Anche le tecniche che si servono di semi sintetici (incapsulazione-disidratazione e, più occasionalmente, incapsulazione-vitrificazione) sono state di frequente usate con apici vegetativi di specie da frutto. È da notare che queste procedure comportano ricrescite

molto elevate in post-crioconservazione, fino al 100% in *Citrus* spp. (Gonzalez-Arno *et al.*, 2003) e in *Poncirus trifoliata* x *C. sinensis* (Wang *et al.*, 2002).

Nelle specie da frutto, la tecnica dell'ultra-raffreddamento a due fasi è stata più sporadicamente appli-

cata, prevalentemente per la crioconservazione di gemme dormienti di melo (Forsline *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2001; Höfer *et al.*, 2006).

### Risanamento da virosi mediante crioterapia di apici vegetativi

La crioterapia di specie vegetali rappresenta una recente e promettente applicazione della criobiologia e si riferisce all'impiego della conservazione in azoto liquido per ottenere colture di germogli risanate, a partire da materiale affetto da virus, fitoplasmi o batteri. Poco più di 10 anni fa, Brison e collaboratori (1997) furono i primi a dimostrare la possibilità di ottenere materiale risanato dal PPV (*Plum Pox Virus*) di un portinnesto interspecifico di *Prunus*, semplicemente recuperando apici vegetativi in coltura dopo un ciclo di trattamento con soluzione vitrificante e crioconservazione. Dopo un lungo periodo di "incubazione", la tecnica fu riproposta per il risanamento della vite da GVA (*grapevine virus A*), mediante crioconservazione di apici vegetativi incapsulati (Wang *et al.*, 2003), e della banana (*Musa spp.*) da CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) e BSV (*Banana Streak Virus*), due pericolose virosi che determinano consistenti riduzioni nella produzione, rendono problematico il miglioramento varietale e impediscono la disseminazione di germoplasma (Helliot *et al.*, 2002). Questi Autori, perfezionando un protocollo di crioconservazione di apici vegetativi mediante trattamento con soluzione vitrificante a partire da materiale infetto di 'Williams' (una cultivar di banana da dessert), ottennero il 30% e 90% di plantule risanate da CMV e BSV, rispettivamente.

Ma un fondamentale passo avanti nello sviluppo e nella comprensione del meccanismo di azione della crioterapia si deve all'importante lavoro svolto in anni recenti da Qiaochun Wang e collaboratori nel risanamento della patata e patata dolce da virus e fitoplasmi (Wang *et al.*, 2009). Nella patata, è stato possibile ottenere eradicazione di PLRV (*Potato Leaf Roll Virus*) e PVY (*Potato Virus Y*) mediante 3 diverse procedure criogeniche (incapsulazione-disidratazione, incapsulazione-vitrificazione e congelamento in gocce di PVS2), ottenendo oltre l'80% e il 90% di piante risanate, rispettivamente da PLRV e PVY. Nella patata dolce (*Ipomoea batatas*), la crioterapia è stata applicata con successo per eradicare due pericolose virosi (SPCSV, *Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus*, e SPFMV, *Sweet Potato Feathery Mottle Virus*), anche in co-infezione, e un fitoplasma (SPLL, *Sweet Potato Little Leaf Phytoplasma*), ottenendo sempre almeno l'85% di ricrescita di apici vegetativi in post-crioconservazione e il 100% di piante risanate.

La crioterapia di apici vegetativi può anche servire al risanamento da batteriosi: è quanto è stato dimostrato con il risanamento di varie specie di *Citrus* (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. grandis*, *C. limon*) dall'HLB (*Huanglongbing bacterium*), un batterio Gram-negativo, localizzato nel floema, diffuso in oltre 40 Paesi dell'Asia, Africa e America e responsabile di una grave patologia, l'"inverdimento" degli agrumi (Ding *et al.*, 2008).

È da rilevare che, in questi lavori, la crioterapia di apici vegetativi si è rivelata superiore in efficacia al classico approccio di risanamento mediante coltura di meristema oppure termoterapia/coltura di apice vegetativo.

Per comprendere come la crioterapia agisca nell'eradicazione di patogeni occorre ricordare che i virus sono distribuiti non uniformemente nelle cellule dei tessuti e, in genere, non riescono ad infettare le cellule in intensa attività mitotica del vero meristema, cioè la parte più apicale (circa, 0,25 mm in lunghezza) di un apice vegetativo, comprendente il domo meristemático e la prima coppia di primordi fogliari. Dal canto loro, fitoplasmi e parassiti batterici obbligati si localizzano unicamente nei tessuti conduttori. Di conseguenza, nelle piante infette, il domo meristemático è generalmente costituito da cellule in larga parte o totalmente esenti da questi patogeni. All'aumentare della distanza dal domo meristemático, aumenta in proporzione diretta il rischio di incontrare cellule infette. Nel risanamento tradizionale da virosi e altri patogeni, la coltura di veri meristemi dà spesso risultati molto limitati in termini di rigenerazione. Per questo motivo, si opera con la coltura di apice vegetativo (di circa 1 mm), dopo aver sottoposto la pianta madre o la coltura di germogli a un ciclo di termoterapia che, producendo un considerevole rallentamento della replicazione virale, determina un aumento dell'area virus-esente dell'apice. D'altra parte, rispetto alle cellule sottostanti, le cellule del domo meristemático sono caratterizzate da più ridotte dimensioni, vacuoli piccoli, un elevato rapporto volumetrico nucleo-citoplasma e, in generale, una maggiore concentrazione citoplasmatica (fig. 4). Per questo motivo, con la crioconservazione di apici vegetativi è possibile indurre una sorta di selezione delle cellule che sopravvivono, essendo quelle del domo meristemático le più "naturalmente" predisposte ad andare incontro a vitrificazione e, quindi, a sopravvivere alla temperatura di -196°C. Peraltro, se il virus infetta anche parte delle cellule del meristema (del domo o dei primordi fogliari), le probabilità di ottenere plantule risanate con la crioterapia diminuisce consistentemente. L'efficacia della tecnica criogena nel risanare piante

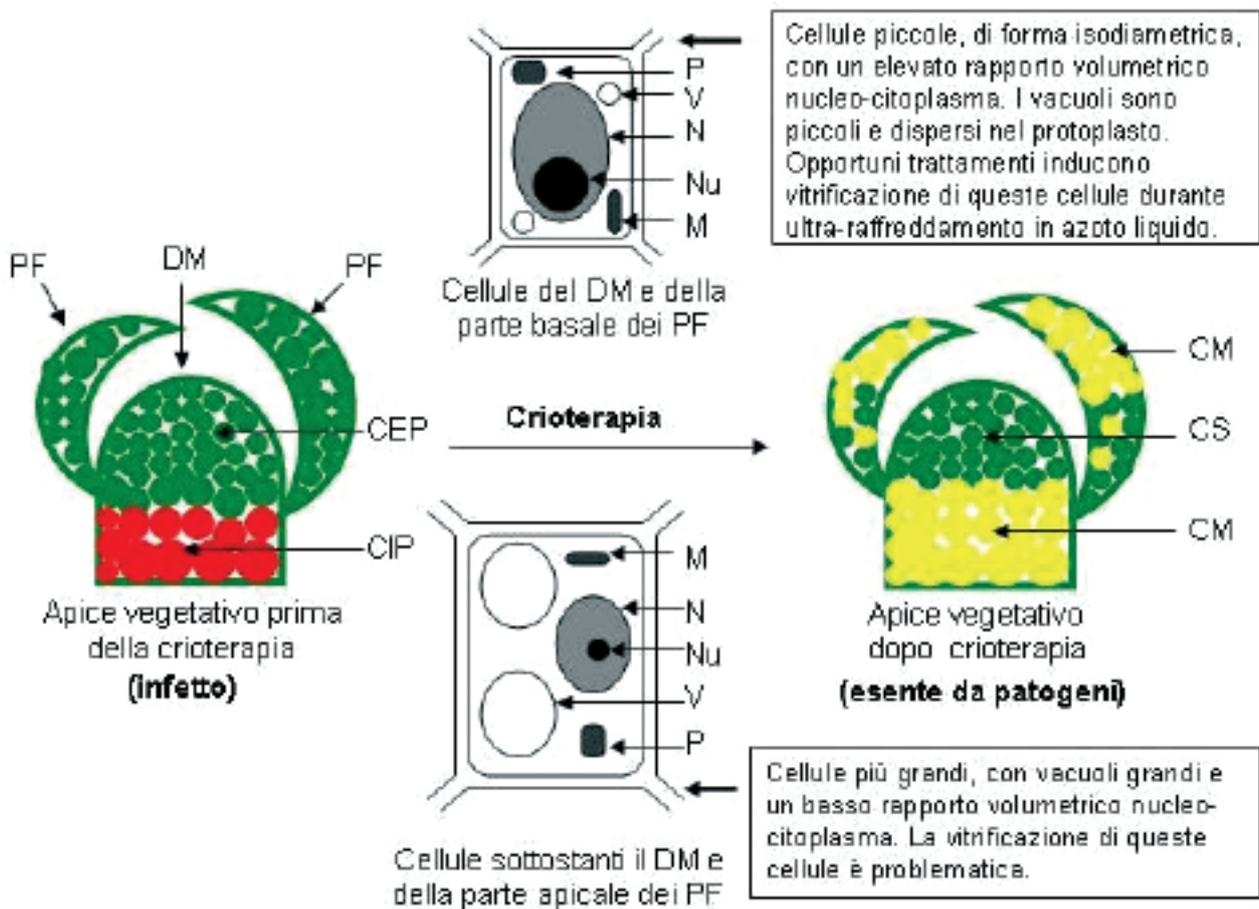


Fig. 4 - Eliminazione di cellule infette da patogeni (virus, fitoplasmi, batteri) in apici vegetativi mediante crioterapia. Le cellule più differenziate e infette muoiono, mentre le più giovani cellule del domo meristemato, aventi un più elevato rapporto volumetrico tra nucleo e citoplasma, sono esenti da patogeni e sopravvivono alla crioconservazione. Così, il domo meristemato che sopravvive rigenera un germoglio risanato. DM, domo meristemato; CEP, cellule esenti da patogeni; CIP, cellule infette da patogeni; CM, cellule morte; CS, cellule sopravvissute; PF, primo paio di primordi fogliari; M, mitocondri; N, nucleo; Nu, nucleolo; P, proplastidi; V, vacuoli (per gentile concessione di Q.C. Wang and J.P.T. Valkonen).

Fig. 4 - Elimination of infected cells (virus, phytoplasma, bacteria) by cryotherapy of shoot tips. The more differentiated, infected cells die, whereas the youngest pathogen-free cells of the meristematic dome, having a large nucleocytoplasmic volume ratio, survive to cryopreservation. Thus, surviving meristematic dome regenerates a new, pathogen-free shoot. DM, meristematic dome; CEP, pathogen-free cells; CIP, pathogen-infected cells; CM, killed cells; CS, surviving cells; PF, first pair of leaf primordia; M, mitochondria; N, nucleus; Nu, nucleolus; P, proplastids; V, vacuoles (courtesy of Q.C. Wang and J.P.T. Valkonen).

da patogeni dipende, pertanto, dalle caratteristiche di infezione che si determinano in ogni combinazione specie-patogeno.

Per una più esauriente trattazione della tecnica crioterapica si rimanda ad una recente *review* di Wang *et al.* (2009).

### Organizzazione di una criobanca vegetale

Così come avviene nei centri tradizionali di conservazione *ex situ* del germoplasma (banche del seme, collezioni clonali), la criobanca vegetale deve essere in grado non solo di conservare un ampio pool di accessioni in sicurezza genetico-sanitaria, ma anche di rendere disponibile, a chi ne fa richiesta, materiale di

propagazione in tempi relativamente brevi. Per tale motivo, l'organizzazione di una criobanca cambia a seconda del tipo di materiale che viene sottoposto a conservazione in azoto liquido.

La criobanca di apici vegetativi è attualmente la forma di conservazione più diffusa per il germoplasma di specie a propagazione vegetativa (quali, ad esempio, le specie da frutto), ma è anche quella che richiede l'organizzazione più complessa, essendo lo stoccaggio degli apici vegetativi in azoto liquido inserito tra due cicli di micropropagazione. La figura 5 illustra le diverse fasi che caratterizzano un centro di conservazione *in vitro* e crioconservazione di apici vegetativi:

- si inizia con la costituzione di una coltura di ger-

mogli *in vitro*, a partire da espianti prelevati da una pianta madre dell'accessione che si deve introdurre in conservazione. Nel caso di specie da frutto e ornamentali, particolare attenzione deve essere posta nel controllo genetico-sanitario della pianta madre dalla quale si effettua il prelievo, in quanto un errore in questa fase potrebbe avere ripercussioni gravissime, ad esempio con la diffusione in post-conservazione di pericolose patologie. Questa fase ha una durata variabile in termini di tempo, da poche settimane a vari mesi, a seconda del potenziale di proliferazione del materiale posto in coltura;

- la coltura di germogli viene utilizzata per il prelievo di apici vegetativi che saranno introdotti in crioconservazione. Gli apici, tal quali o incapsulati

in alginato (semi sintetici), sono sottoposti agli opportuni trattamenti crioprotettivi e quindi introdotti in crioconservazione all'interno di cryovials. Per ogni specie, la tecnica di crioconservazione da applicare è selezionata dalla letteratura esistente; altrimenti, la fase di conservazione è preceduta dallo sviluppo di un idoneo protocollo che deve garantire una sopravvivenza e ricrescita degli apici in post-conservazione superiore al 50%. La percentuale stimata di sopravvivenza degli espianti è un fattore condizionante la quantità di apici vegetativi da porre in conservazione. È stata anche proposta una formula, basata sulla distribuzione binomiale, per la determinazione del numero di propaguli da porre in crioconservazione, in funzione del numero di prove di controllo effettuate, della rela-

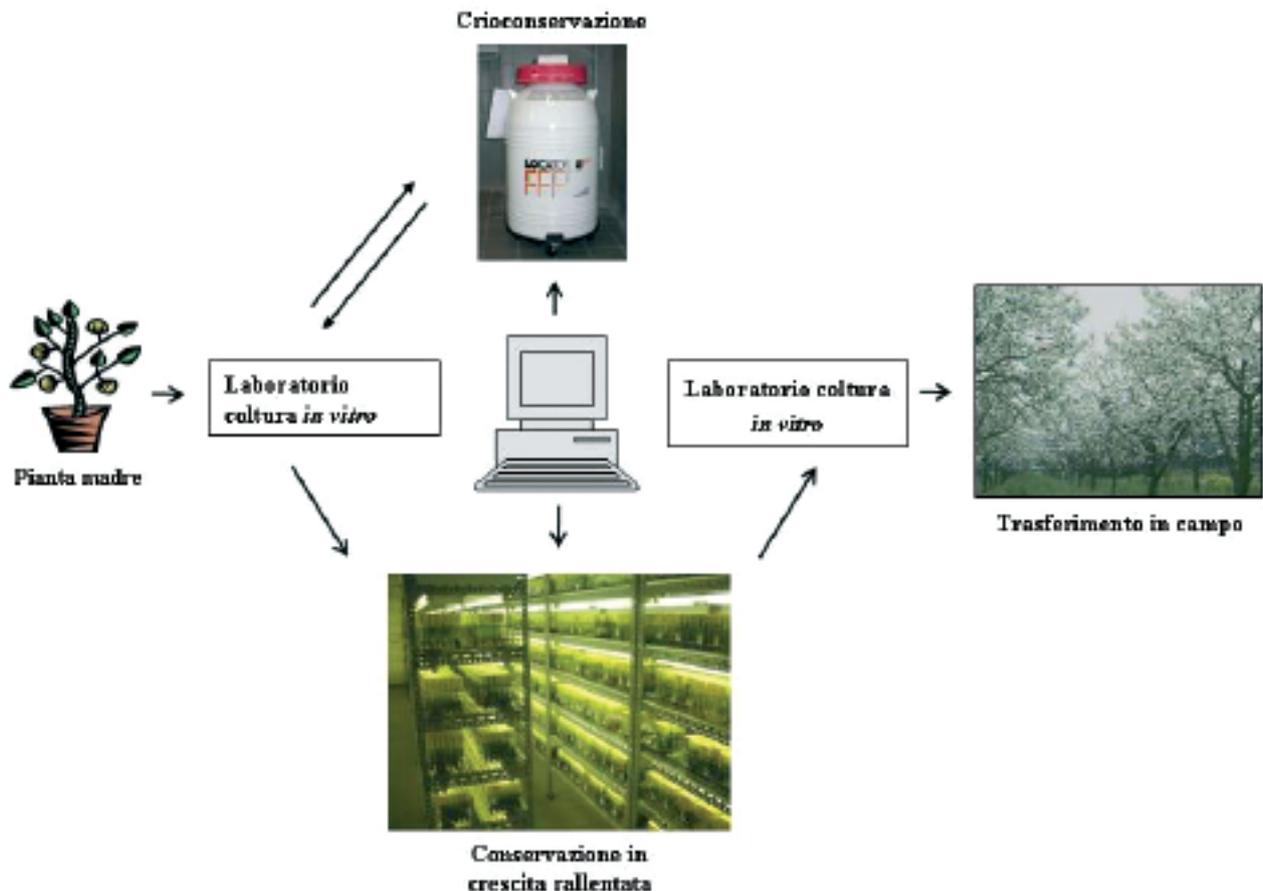


Fig. 5 - Organizzazione di una criobanca di apici vegetativi per la conservazione di germoplasma clonale. Per ogni accessione, nel laboratorio di cultura *in vitro* si avvia una coltura di germogli, a partire da espianti prelevati da una pianta madre di sicura rispondenza genetico-sanitaria. Mentre un congruo campione di apici vegetativi viene introdotto in crioconservazione, la coltura viene trasferita in conservazione in crescita rallentata. Per la ricostituzione dell'accessione in campo si utilizzano germogli mantenuti in crescita rallentata, completandone il ciclo di micropropagazione con la radicazione e l'acclimatazione *in vivo*. In caso di necessità, la coltura può essere in qualsiasi momento ricostituita a partire da apici vegetativi in crioconservazione. Tutto il processo di conservazione è informatizzato.

Fig. 5 - Organization of a shoot-tip cryobank for the conservation of clonal germplasm. For each accession, a shoot culture is established in the tissue culture laboratory by collecting explants from a pathogen-free and genetically-controlled stock plant. While a sample of shoot tips is introduced in cryopreservation, the shoot culture is transferred in slow growth storage. For the re-establishment in field of the accession, shoots from slow growth storage are used to complete the micropropagation cycle with the rooting and *in vivo* acclimation phases. When necessary, the shoot culture can be re-established from cryopreserved shoot tips. All the conservation process is computerized.

tiva sopravvivenza ottenuta e della probabilità di ottenere almeno un espianto in ricrescita in post-conservazione (Engelmann, 2004);

- un campione sufficientemente ampio della coltura di germogli è mantenuto in conservazione *in vitro* in crescita rallentata, in genere indotta nelle specie temperate con la conservazione a 4°C, in totale oscurità o in condizioni di luce attenuata e fotoperiodo breve (Lambardi e De Carlo, 2003). La coltura viene subcoltivata ogni 6-12 mesi (a seconda della specie) e, quando si rende necessario il rinnovo (per invecchiamento della coltura, per insorgenza di patologie o per contaminazione), viene ricostituita a partire da apici vegetativi mantenuti in crioconservazione; il recupero degli apici vegetativi dall'azoto liquido e la ricostituzione della coltura di germogli richiede tempi medio-lunghi (da 4 a 8 mesi), a seconda della specie;
- il recupero *in vivo* di un accessione può avvenire in tempi relativamente brevi (8-12 settimane) a partire dal materiale mantenuto in conservazione a 4°C, mediante il ritorno in condizioni standard di coltura, radicazione e acclimatazione *in vivo* delle plantule;
- tutta la procedura di conservazione è informatizzata: sia le cryovials che i contenitori in crescita rallentata sono dotati di etichette con codici a barre che riportano, su un programma appositamente sviluppato, un numero congruo di informazioni. Per ogni cryovial contenente gli apici vegetativi è infatti possibile, in ogni momento, risalire alla data di entrata in crioconservazione, alla coltura stock in crescita rallentata di provenienza, alle subcolture da questa ricevute al momento del prelievo, al nome degli addetti che hanno operato le subcolture o applicato la procedura di crioconservazione, alla pianta madre dalla quale si è originata la coltura di germogli.

Un esempio di centro di conservazione di questo tipo è quello del Laboratory of Tropical Crop Improvement della Università Cattolica di Leuven (Belgio) che ospita, sotto gli auspici della FAO, l' "INIBAP Transit Centre" (ITC), la più grande collezione *in vitro* al mondo di germoplasma di banana. Cuore di tale collezione è la criobanca (Panis *et al.*, 2007), uno tra i più importanti esempi al mondo di conservazione in azoto liquido di germoplasma vegetale. Presso il centro di Leuven sono attualmente in conservazione in crescita rallentata (a 15°C, trattandosi di specie tropicale) circa 1.200 accessioni di *Musa*, 540 delle quali sono state già replicate in crioconservazione. Obiettivo finale è quello di avere ogni accessione in entrambe le forme di conservazione.

La fase di mantenimento delle colture in crescita rallentata può ritenersi opzionale. Le accessioni possono, infatti, essere recuperate direttamente dall'azoto liquido, reintrodotte in micropropagazione e successivamente trasferite *in vivo*. Ovviamente, una scelta di questo tipo riduce notevolmente i costi di gestione di un centro di conservazione; d'altra parte, allunga considerevolmente i tempi di recupero in campo di una accessione e diminuisce i margini di sicurezza della conservazione.

Così come per gli apici vegetativi, altre forme di crioconservazione non possono prescindere dal passaggio dalla coltura *in vitro*: è questo il caso della conservazione di colture cellulari, di colture di callo embriogenico, di embrioni somatici e di assi embrionali escissi. Anche i semi provenienti da crioconservazione sono in genere germinati *in vitro*, su carta da filtro umida o su substrato agarizzato (Walters *et al.*, 2008; Pritchard e Nadarajan, 2008). Diversamente, la crioconservazione di gemme dormienti non necessita del supporto di un laboratorio di coltura *in vitro*, in questo risultando una forma di conservazione che richiede i più bassi investimenti in termini di strumentazione tecnica.

## Conclusioni

La crioconservazione di specie vegetali ha compiuto nell'ultimo ventennio un progresso scientifico decisivo che ne fa oggi uno strumento di straordinaria potenzialità per fronteggiare il preoccupante fenomeno dell'erosione genetica. Sono già numerose le specie orticole, ornamentali e da frutto per le quali è disponibile una procedura criogenica semplificata, ripetibile e affidabile in termini di conservazione a lungo termine del germoplasma, in assoluta garanzia del mantenimento della rispondenza genetica e molecolare. Inoltre, le varie tecniche disponibili hanno allargato la gamma di organi e tessuti che possono essere preservati in azoto liquido, includendo le colture di cellule e di calli embriogenici, svincolate così dalla necessità del mantenimento in continua proliferazione.

L'interesse che suscita questa tecnologia a livello Europeo è testimoniato dall'Azione COST 871 "CryoPlanet, Cryopreservation of crop species in Europe" ([www.biw.kuleuven.be/dtp/tro/cost871/Home.htm](http://www.biw.kuleuven.be/dtp/tro/cost871/Home.htm)) che, sotto l'egida dell'European Science Foundation, ha avuto avvio nel settembre 2006 e si concluderà nel 2010. L'Azione è stata sottoscritta da 18 Paesi dell'UE (Belgio, Bulgaria, Repubblica Ceca, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Italia, Olanda, Polonia, Portogallo, Romania, Serbia,

Slovacchia, Spagna, Svizzera, UK) e si propone di approfondire le conoscenze su aspetti di base ed applicativi della criobiologia.

È importante, comunque, sottolineare che le tecniche di crioconservazione non hanno l'obiettivo di sostituirsi alle tecniche tradizionali di mantenimento *in situ* ed *ex situ* del germoplasma vegetale; piuttosto, devono considerarsi come un loro importante complemento, tale da allargare la variabilità filogenetica conservabile e, al tempo stesso, fornire una reale garanzia contro l'accidentale perdita di preziosa biodiversità. A tutela di quelle risorse genetiche che sono strumento indispensabile per promuovere lo sviluppo sostenibile delle produzioni agricole.

### Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'Ente Cassa di Risparmio di Firenze per il contributo concesso al CNR-IVALSA per la realizzazione del progetto "Tecnologie innovative per la tutela della biodiversità vegetale mediante crioconservazione e realizzazione di una criobanca del germoplasma di *Citrus* della Villa Medicea di Castello in Firenze".

Un sincero ringraziamento va anche a Veneto Agricoltura e, in particolare, ai Dr. i Alberto Previati e Michele Giannini per la preziosa collaborazione e il supporto finanziario nella conduzione di uno studio pluriennale sulla crioconservazione di germoplasma selezionato e autoctono del Veneto.

### Riassunto

Il termine crioconservazione (conservazione criogenica) si riferisce allo stoccaggio di cellule, tessuti ed organi vegetali alla temperatura ultra-bassa dell'azoto in fase liquida (-196°C). A questa temperatura tutte le reazioni fisiche e biochimiche sono praticamente arrestate, ma le cellule si mantengono vitali e il loro tempo di conservazione diviene praticamente illimitato. Alla tradizionale procedura basata sul raffreddamento controllato, si aggiungono oggi tecniche innovative di vitrificazione ed immersione diretta degli espianti in azoto liquido. Nell'ultimo ventennio, efficienti procedure di crioconservazione sono state sviluppate per numerose specie orticole, ornamentali e da frutto. Una recente applicazione della criogenia, la crioterapia, apre importanti prospettive al risanamento delle piante da virus, fitoplasmi e batteri.

**Parole chiave:** conservazione *ex situ*, criobiologia, crioconservazione, risorse genetiche, vitrificazione.

### Bibliografia

- AL-ABABNEH S.S., KARAM N.S., SHIBLI R.A., 2002. *Cryopreservation of sour orange (Citrus aurantium L.) shoot tips*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 38: 602-607.
- AL-ABABNEH S.S., SHIBLI R.A., KARAM N.S., SHAT NAWI M.A. 2003. *Cryopreservation of bitter almond (Amygdalus communis L.) shoot tips by encapsulation-dehydration and vitrification*. Adv. Hortic. Sci. 17: 15-20.
- BACHIRI Y., SONG G.Q., PLESSIS P., SHOAR-GHAFFARI A., REKAB T., MORISSET C., 2001. *Routine cryopreservation of kiwifruit (Actinidia spp.) germplasm by encapsulation-dehydration: importance of plant growth regulators*. CryoLetters 22: 61-74.
- BENSON E.E., 2008. *Cryopreservation theory*. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, pp. 15-32.
- BRISON M., DE BOUCAUD M.T., PIERRONNET A., DOSBA F., 1997. *Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Prunus roostock experimentally infected with Plum Pox Potyvirus*. Plant Sci. 123: 189-196.
- CHO E.G., HOR Y.L., KIM H., RAO V.R., ENGELMANN F., 2002a. *Cryopreservation of Citrus madurensis embryonic axes by encapsulation-dehydration*. CryoLetters 23: 325-332.
- CHO E.G., NOOR N.M., KIM H., RAO V.R., ENGELMANN F., 2002b. *Cryopreservation of Citrus aurantifolia seeds and embryonic axes using a desiccation protocol*. CryoLetters 23: 309-316.
- CORREDOIRA E., SAN-JOSÉ M.C., BALLESTER A., VIEITEZ A.M., 2004. *Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of european chestnut*. CryoLetters 25: 33-34.
- 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: 215-222.
- DE CARLO A., PREVIAI A., BENELLI C., DA RE F., GIANNINI M., LAMBARDI M., 2007. *Molecular validation of a micropropagation-cryopreservation procedure for red chicory (Cichorium intybus L.) selected lines*. Atti "Fundamental aspects of cryopreservation/cryoprotection and genetic stability". COST Action 871, Oviedo (Spagna), 12-14 Aprile 2007, pp. 56-57.
- DEMEULEMEESTER M.A.C., PANIS B.J., DE PROFT M.P., 1992. *Cryopreservation of in vitro shoot tips of chicory (Cichorium intybus L.)*. CryoLetters 13: 165-174.
- DING F., JIN S.X., HONG N., ZHONG Y., CAO Q., YI G.J., WANG G.P., 2008. *Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating Candidatus Liberobacter asiaticus, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips*. Plant Cell Rep. 27: 241-250.
- ELLIS D., SKOGERBOE D., HELLIER B., VOLK G., 2006. *Implementation of garlic cryopreservation techniques in the National Plant Germplasm System*. CryoLetters 27: 99-106.
- ENGELMANN F., 2004. *Plant cryopreservation: progress and prospects*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 40: 427-433.
- FABRE J., DEREUDDRE J., 1990. *Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips*. CryoLetters 11: 413-426.
- FAO, 1996. *The State of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. FAO, Rome, Italy.
- FORSLINE P.L., TOWILL L.E., WADDELL J.W., STUSHNOFF C., LAMBOY W.F., MCFERSON J.R., 1998. *Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 123: 365-370.
- FUKAI S., OE M., 1990. *Morphological observations of chrysanthemum shoot tips cultured after cryopreservation and freezing*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59: 383-387.
- FUKAI S., TOGASHI M., GOI M., 1994. *Cryopreservation of in vitro-grown Dianthus by encapsulation-dehydration*. Tech.

- Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. 46: 101-107.
- GOLMIRAZAIE A.M., PANTA A., 2000. *Advances in potato cryopreservation at CIP*. In: F. Engelmann, H. Tanaka (eds.) Cryopreservation of tropical germplasm. Current research progress and application. IPGRI, Roma, pp. 250-254.
- GONZÁLEZ-ARNAO M.T., JUÁREZ J., ORTEGA C., NAVARRO L., DURAN-VILA N., 2003. *Cryopreservation of ovules and somatic embryos of Citrus using the encapsulation-dehydration technique*. CryoLetters 24: 85-94.
- HALMAGYI A., FISCHER-KLÜVER G., MIX-WAGNER G., SCHUMACHER H.M., 2004. *Cryopreservation of Chrysanthemum morifolium (Dendranthema grandiflora Ramat.) using different approaches*. Plant Cell Rep. 22: 371-375.
- HALMAGYI A., DELIU C., COSTE A., 2005. *Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method*. CryoLetters 25: 313-322.
- HALMAGYI A., PINKER I., 2006. *Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 84: 145-153.
- HALMAGYI A., DELIU C., 2007. *Cryopreservation of carnation (Dianthus caryophyllus L.) shoot tips by encapsulation-vitrification*. Scientia Hort. 113: 300-306.
- HARDING K., 2004. *Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review*. CryoLetters 25: 3-22.
- HELLIOT B., PANIS B., POU MAY 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.
- HÖFER M., BILAVCIK A., J. ZAMEČNIK B., 2006. *Preliminary results of the cryopreservation of Malus germplasm from the fruit gene bank collection at the Institute of Fruit Breeding, Dresden*. Cryobiol. 53: 421.
- KELLER E.R.J., 2007. *Cryopreservation for maintenance of plant germplasm in Germany*. Adv. Hort. Sci. 21: 228-231.
- KIM H.H., LEE J.K., HWANG H.S., ENGELMANN F., 2007. *Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique*. CryoLetters 28: 471-482.
- LAMBARDI M., 2002. *Cryopreservation of Germplasm of Populus (Poplar) Species*. In: L. Towill (ed) Cryopreservation of Plant Germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 50. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 269-286.
- LAMBARDI M., LYNCH P.T., BENELLI C., MEHRA A., SIDDIKA A., 2002. *Towards the cryopreservation of olive germplasm*. Adv. Hort. Sci. 16: 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 e 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: 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: 185-192.
- LAMBARDI M., BENELLI C., DE CARLO A., PREVIATI A., DA RE F., GIANNINI M., 2006a. *Biotechnologies for the preservation of selected red chicory (Cichorium intybus L.) lines*. Acta Hort. 725: 311-318.
- LAMBARDI M., BENELLI C., OZUDOGRU A.E., OZDEN-TOKATLI Y., 2006b. *Synthetic seed technology in ornamental plants*. In: J.A. Teixeira da Silva (ed) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues, vol. II. Global Science Books, UK, pp. 347-354.
- LAMBARDI M., FABBRI A., CACCAVALE A., 2000. *Cryopreservation of white poplar (Populus alba L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips*. Plant Cell Rep. 19: 213-218.
- LAMBARDI M., HALMAGYI A., BENELLI C., DE CARLO A., VETTORI C., 2007. *Seed cryopreservation for conservation of ancient Citrus germplasm*. Adv. Hort. Sci. 21: 198-202.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU A.E., BENELLI C., 2008. *Cryopreservation of embryogenic callus*. In: B. Reed (ed) Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, pp. 177-210.
- LAMBARDI M., BENELLI C., DE CARLO A., PREVIATI A., 2009. *Advances in the Cryopreservation of Fruit Plant Germplasm at the CNR-IVALSA Institute of Florence*. Acta Hort. (Atti "First Int. Symp. on Biotechnology of Fruit Species". Dresda, 1-5 settembre 2008). In stampa.
- LYNCH P., HARRIS W.C., CHARTIER-HOLLIS J. M., 1996. *The cryopreservation of shoot tips of Rosa multiflora*. Plant Growth Regul. 20: 43-45.
- LYNCH T., SIDDIKA A., MEHRA A., BENELLI C., LAMBARDI M., 2007. *The challenge of successful cryopreservation of olive (Olea europaea L.) shoot tip*. Adv. Hort. Sci. 21: 211-214.
- MARTIN C., GONZÁLEZ-BENITO M.E., 2005. *Survival and genetic stability of Dendranthema grandiflora Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration*. Cryobiol. 51: 281-289.
- 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.
- MATSUMOTO T., MOCHIDA K., ITAMURA H., SAKAI A., 2001. *Cryopreservation of persimmon (Diospyros kaki Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips*. Plant Cell Rep. 20: 398-402.
- MATSUMOTO T., SAKAI A., 2003. *Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (Vitis) by a two-step vitrification protocol*. Euphytica 131: 299-304.
- MIX-WAGNER G., CONNER A.J., CROSS R.J., 2000. *Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the 'droplet' method*. N.Z.J. Crop. Hort. Sci. 28: 283-287.
- MIX-WAGNER G., SCHUMACHER H.M., CROSS R.J., 2003. *Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen*. CryoLetters 24: 33-41.
- NIINO T., SAKAI A., YAKUWA H., NOJIRI K., 1992. *Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28: 261-266.
- NIINO T., TASHIRO K., SUZUKU M., OHUCHI S., MAGOSHI J., AKIHAMA T., 1997. *Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification*. Sci. Hort. 70: 155-163.
- OZDEN-TOKATLI Y., OZUDOGRU E.A., GUMUSEL F., LAMBARDI M., 2007. *Cryopreservation of Pistacia spp. seeds by dehydration and one-step freezing*. CryoLetters 28: 83-94.
- OZDEN-TOKATLI Y., DE CARLO A., GUMUSEL F., PIGNATTELLI S., LAMBARDI M., 2008. *Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants*. Prop. Orn. Plants 8: 17-22.
- OZUDOGRU E.A., OZDEN-TOKATLI Y., GUMUSEL F., BENELLI C., LAMBARDI M., 2009. *Development of a cryopreservation procedure for peanut (Arachis hypogaea) embryonic axes and its application to local Turkish germplasm*. Adv. Hort. Sci. 23 (1): 41-48.
- PANIS B., THINH N.T., 2001. *Cryopreservation of Musa germplasm. INIBAP Technical Guideline 5*. In: J.V. Escalant e S. Sharrock (eds) International Network for the Improvement of Banana and Plantain. IPGRI, Montpellier, pp. 1-45.
- 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., VAN DEN HOUWE I., PIETTE B., SWENNEN R., 2007. *Cryopreservation of the Banana Germplasm Collection at the International Transit Centre-Biodiversity International*. Adv.

- Hort. Sci. 21: 235-238.
- 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.
- PAULET F., ENGELMANN F., GLASZMANN J.C., 1993. *Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (Saccharum sp.) using encapsulation/dehydration or encapsulation-vitrification*. Plant Cell Rep. 12: 525-529.
- PEARCE R.S., 2004. *Adaptation of higher plants to freezing*. In: B. Fuller, N. Lane e E.E. Benson (eds) Life in the Frozen State. CRC Press, Boca Raton, pp. 171-204.
- PRITCHARD H.W., NADARAJAN J., 2008. *Cryopreservation of orthodox (desiccation tollerant) seeds*. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, Springer, pp. 485-501.
- REED B.M., UCHENDU E., 2008. *Controlled rate cooling*. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, pp. 77-92.
- SAKAI A., 1960. *Survival of the twigs of woody plants at -196°C*. Nature 185: 392-394.
- SAKAI A., KOBAYASH 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., ENGELMANN F., 2007. *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review*. CryoLetters 28: 151-172.
- SAKAI A., HIRAI D., NIINO T., 2008. *Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols*. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, pp. 33-58.
- SANTOS R.I., STUSHNOFF C., 2003. *Desiccation and freezing tolerance of embryonic axes from Citrus sinensis [L.] Osb. pretreated with sucrose*. CryoLetters 24: 281-292.
- SCHÄFER-MENUHR A., SCHUMACHER H.M., MIX-WAGNER G., 1997. *Cryopreservation of potato cultivars - design of a method for routine application in genebanks*. Acta Hort. 447: 477-482.
- SHATNAWI M.A., ENGELMANN F., FRATTARELLI A., DAMIANO C., 1999. *Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of almond (Prunus dulcis Mill.)*. CryoLetters 20: 13-20.
- SUZUKI T., KANEKO M., HARADA T., YAKUWA T., 1998. *Enhanced formation of roots and subsequent promotion of growth of shoots on cryopreserved nodal segments of Asparagus officinalis L.* Cryobiol. 36: 194-205.
- TAHTAMOUNI R.W., SHIBLI R.A., 1999. *Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (Pyrus syriaca)*. Adv. Hort. Sci. 13: 156-160.
- TAYLOR M.J., SONG Y.C., BROCKBANK K.G.M., 2004. *Vitrification in tissue preservation: new developments*. In: B. Fuller, N. Lane e E.E. Benson (eds) Life in the Frozen State. CRC Press, Boca Raton, pp. 603-642.
- TOWILL L.E., ELLIS D.D., 2008. *Cryopreservation of dormant buds*. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, pp. 421-442.
- UCHENDU E., REED B.M., 2007. *A comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of mint (Mentha spp.)*. Plant Physiol. 87: 201-205.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M., 1990. *Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of Asparagus officinalis L. grown in vitro*. Plant Cell Rep. 9: 328-331.
- VANDENBUSSCHE B., DEMEULEMEESTER M., DE PROFT M., 2002. *Cryopreservation of Cichorium intybus L. var foliosum (Chicory)*. In: L.E. Towill e Y.P.S. Bajaj (eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 50. Cryopreservation of Plant Germplasm 2. Springer, Berlin, pp. 78-95.
- VIDAL N., SÁNCHEZ C., JORQUERA L., BALLESTER A., VIEITEZ A.M., 2005. *Cryopreservation of chestnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 41: 63-68.
- WALTERS C., WESLEY-SMITH J., CRANE J., HILL L.A., CHMIELARZ P., PAMMENTER N.W., BERJAK P., 2008. *Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds*. In: B.M. Reed (ed) Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer, New York, pp. 465-484.
- WANG Q.C., TANNE E., ARAV A., GAFNY R., 2000. *Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 63: 41-46.
- WANG Q.C., BATUMAN O., LI P., BAR-JOSEPH M., GAFNY R., 2002. *Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck.] by encapsulation-dehydration*. Plant Cell Rep. 20: 901-906.
- WANG Q.C., MUNIR M., LI P., GAFNY R., SELA I., TANNE E., 2003. *Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of Vitis vinifera L.* Plant Sci. 165: 321-327.
- WANG Q.C., PANIS B., ENGELMANN F., LAMBARDI M., VALKONENE 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.: 1-13.
- WU Y.J., ZHAO Y., ENGELMANN F., ZHOU M., ZANG D., CHEN S., 2001. *Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips*. CryoLetters 22: 375-380.
- ZHAO Y., WU Y., ENGELMANN F., ZHOU M., ZHANG D., CHEN S., 1999. *Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration*. CryoLetters 20: 103-108.
- ZHAO Y., WU Y., ENGELMANN F., ZHOU M., 2001. *Cryopreservation of axillary buds of grape (Vitis vinifera) in vitro plantlets*. CryoLetters 22: 321-328.