



Consiglio Nazionale delle Ricerche



IVALSA - CNR - IVALSA	
Tit: VI.6.2	CI: MOBILITA' E F:
N. 0004042	27/10/2008

Al Consiglio Nazionale delle Ricerche
DIREZIONE GENERALE
Paesi Industrializzati - Organismi Internazionali
P.le Aldo Moro, 7
00185 Roma

Oggetto: Programma mobilità di breve durata (Short-term Mobility - anno 2008) - Categoria B (studiosi stranieri). **Proponente:** Prof. Ario Ceccotti, Direttore IVALSA **Fruitore:** Dr.ssa Adela Eugenia Halmagyi

Relazione scientifica: Sviluppo di una tecnica innovativa di crioconservazione (droplet-freezing system) da applicare su specie ornamentali (*Rosa* spp. e *Photinia fraserii*)

Attività di ricerca svolta dal visitatore straniero presso l'IVALSA

L'attività di ricerca svolta presso il nostro istituto dalla dr.ssa Halmagyi ha avuto come obiettivo l'applicazione della procedura criogena droplet-freezing system per la conservazione a lungo termine di specie ornamentali, quali rosa (cv 'S. Antonio di Padova') e *Photinia fraserii*, in modo da preservarne la biodiversità per usi futuri. La cv 'S. Antonio di Padova' è una rosa scomparsa negli anni '60 e recentemente riscoperta dalla 'Associazione vivaisti di Saonara'(PD). Le due specie, su cui è già stato messo a punto un protocollo per la coltura *in vitro*, sono state selezionate e controllate sia sotto l'aspetto genetico che sanitario. Il sistema droplet-freezing prevede il posizionamento dei singoli espianti in una goccia di soluzione vitrificante posta su piccole strisce di foglio di alluminio e l'immersione rapida in azoto liquido. Il vantaggio applicativo del droplet-freezing system è la possibilità di raggiungere un elevato grado di congelamento dovuto alle piccole quantità di crioprotettivo in cui sono posti gli espianti.

Prima dell'arrivo della dr.ssa Halmagyi, piante coltivate *in vitro* di *Photinia fraserii*, specie ornamentale arbustiva, e di rosa sono state mantenute a 4°C con luminosità ridotta per almeno 2

CNR IVALSA
ISTITUTO PER LA VALORIZZAZIONE
DEL LEGNO E DELLE SPECIE ARBOREE
www.ivalsa.cnr.it
P.IVA 02118311006
C.F. 80054330586

Firenze
Via Madonna del Piano 10
50019 Sesto Fiorentino
T +39 055 52251
F +39 055 5225507

Trento
Via Biasi 75
38010 S. Michele all'Adige
T +39 0461 660111
F +39 0461 650045

Grosseto
Via Aurelia 49
58022 Follonica
T +39 056 652356
F +39 056 652356

settimane (hardening). Durante il soggiorno della nostra ospite sono stati con Lei concordati i diversi parametri utili alla messa a punto di un protocollo per il droplet-freezing system applicabile alle due specie oggetto di studio.

Materiale vegetale

Piante stock coltivate *in vitro* e mantenute a 4° C, sono state utilizzate per il prelievo di apici gemmari (3-4 mm) con l'ausilio di uno stereomicroscopio ed in condizioni di sterilità. I germogli di rosa cv 'S. Antonio di Padova' erano mantenuti in substrato M&S (Murashige e Skoog; 1962) addizionato con 0,5 mg/l di BA, 30 g/l di saccarosio, 8 g/l di agar, mentre quelli di *Photinia* in un substrato QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) con 1 mg/l di BA e le stesse concentrazioni di saccarosio e agar.

Crioconservazione

Gli espianti ottenuti sono stati incubati in capsule Petri (Ø 5cm) su un filtro sterile bagnato con 2 ml di substrato liquido addizionato con 0,5 e 0,75 M di saccarosio (sterilizzato a freddo) per 24 h e mantenuti in cella climatica a 23°C. Dopo questo trattamento di precoltura, gli apici gemmari sono stati disidratati collocandoli in gocce (4µl) di soluzione vitrificante PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) poste su strisce di alluminio sterili (0,5 x 1,5 cm). Il tempo di contatto tra la soluzione vitrificante e gli apici gemmari di rosa è stato di 20 e 30 min, mentre per gli apici di *Photinia*, sono stati saggiati tre differenti tempi di contatto con PVS2, 10, 20 e 30 min. Dopo il trattamento con la soluzione vitrificante PVS2, i fogli di alluminio sono stati introdotti in cryovials (2 ml) riempite con azoto liquido e queste immediatamente immerse nel contenitore da 40 l di azoto liquido, per la conservazione. I campioni sono rimasti in azoto liquido per 24 h.

Gli espianti crioconservati sono stati scongelati rapidamente, immergendo e scuotendo leggermente le strisce di alluminio in substrato M&S liquido a temperatura ambiente. Gli apici scongelati sono stati trasferiti su un substrato di crescita, simile a quello delle colture stock e mantenuti in cella di crescita a 23°C con bassa illuminazione (5 µmol⁻²s⁻¹ di intensità luminosa).

Gli apici gemmari crioconservati saranno monitorati ogni 7 giorni e dopo 3 settimane sarà testata la percentuale di sopravvivenza e successivamente la percentuale di ricrescita. Considerati i tempi necessari per lo sviluppo dei germogli, questa ultima parte del programma di ricerca sarà proseguita

dall'IVALSA, dopo il ritorno della dr.ssa Halmagyi in Romania, rimanendo costantemente in contatto con Lei per ulteriori informazioni e elaborazione dei risultati ottenuti.

Il Proponente
Prof. Ario Ceccotti
(Direttore IVALSA)



Ario Ceccotti

Sesto Fiorentino, 24 ottobre 2008