



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XXXII.
DISCESE TERMICHE
E TEMPERATURE BASSE E ULTRABASSE
PER LA CREAZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI
DI INTERESSE AGROFORESTALE



Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXVI - 2018



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XXXII.
DISCESE TERMICHE
E TEMPERATURE BASSE E ULTRABASSE
PER LA CREAZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI
DI INTERESSE AGROFORESTALE

Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXVI - 2018

© 2019 Accademia Nazionale Italiana di Entomologia
50125 Firenze - Via Lanciola 12/a

ISBN 978-88-96493-18-2

PRESENTAZIONE

L'utilizzo di metodi di conservazione di organismi vegetali ed animali utilizzando temperature basse e ultrabasse è divenuto una tecnica ampiamente diffusa in tempi recenti per il trattamento di embrioni di insetti, ceppi di acari e nematodi, così come di microorganismi, da destinare al controllo biologico di entomopatogeni. Analogamente, tale metodologia è impiegata in campo vegetale per la conservazione di gemme fiorali, embrioni, e sementi.

Gli interventi che si sono succeduti nella Tavola

Rotonda, organizzata dall'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, dopo aver illustrato alcuni esempi che hanno già trovato positiva applicazione in campo, hanno sottolineato le diverse problematiche relative alla messa a punto delle metodologie più appropriate per la realizzazione della tecnica di crioconservazione.

ROMANO DALLAI

Presidente

Accademia Nazionale Italiana di Entomologia

Pagina bianca

INDICE

Tavola Rotonda su:

DISCESE TERMICHE E TEMPERATURE BASSE E ULTRABASSE PER LA CREAZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI DI INTERESSE AGROFORESTALE

PIO FEDERICO ROVERSI, FRANCESCO PAOLI, SILVIA LANDI – <i>Embriologia e crioconservazione di insetti</i>	Pag. 77
MAURIZIO LAMBARDI – <i>La crioconservazione di specie arboree: dal laboratorio alla criobanca</i>	» 81
SAURO SIMONI, ENRICO DE LILLO – <i>Note su conservazione a basse temperature di ceppi di acari utilizzabili per il controllo biologico</i>	» 89
GIAN PAOLO BARZANTI, VALERIA FRANCARDI – <i>Tecniche per la crioconservazione di microrganismi entomopatogeni</i>	» 95
SILVIA LANDI, GIULIA TORRINI, EUSTACHIO TARASCO – <i>Temperature ultrabasse e protocolli cryo per la costituzione di collezioni viventi di nematodi entomopatogeni</i>	» 99

Pagina bianca

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 23 FEBBRAIO 2018

Tavola Rotonda su:

DISCESE TERMICHE
E TEMPERATURE BASSE E ULTRABASSE
PER LA CREAZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI
DI INTERESSE AGROFORESTALE

Coordinatore:

PIO FEDERICO ROVERSI, Accademico

EMBRIOLOGIA E CRIOCONSERVAZIONE DI INSETTI

PIO FEDERICO ROVERSI^a - FRANCESCO PAOLI^a - SILVIA LANDI^a

^a CREA - Centro di ricerca per la Difesa e la Certificazione, Via Lanciola 12/a, 50125, Firenze, Italia;
e-mail: piofederico.roversi@crea.gov.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

Insect embryology and cryopreservation

Water is the universal solvent of living organisms and in purity it begins to freeze when the temperature drops below 0°C, temperature at which ice begins to be formed in the tissues. In the cryopreservation of arthropod embryos an innovative technique has been proposed which exploits the ability of high concentration cryoprotective substances to pass, during the cooling phase, from the liquid to the solid state, forming a glassy texture and thus preventing the formation of ice crystals.

The investigations on *Drosophila* have highlighted the essentiality of protecting these organisms with adequate concentrations of cryoprotectives and carrying out a process of vitrification and not of freezing.

With specific reference to the Lepidoptera, the first published research occurred only in 2007. Identifying the cryoprotectant with less toxicity and the embryonic stage with greater survival rates in pre-descent thermal treatments allowed the cryopreservation of eggs of a Lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.), and the recovery of a laboratory colony starting from adults developed from eggs stored in an ultra-freezer for 48h at -140°C and subsequently subjected to a thermal rise of 6,000°C / min.

As a part of preliminary studies on the embryonic development of Insects for the development of cryopreservation protocols, a careful study of *Drosophila suzukii* embryogenesis was recently carried out, identifying the easily identifiable morphological markers *in vivo* necessary to identify the process of dorsal closure considered the most suitable for treatments.

The conservation of arthropods at ultra-low temperatures based on cryopreservation by vitrification of embryonic stages will allow the creation of living collections of germplasm of species and genotypes of agricultural, forestry and environmental interest.

KEY WORDS: Insect embryology, cryopreservation, vitrification, long term storage.

L'acqua è il solvente universale degli organismi viventi ed in purezza inizia a congelare quando la temperatura scende al di sotto di 0°C, temperatura in corrispondenza della quale inizia a formarsi ghiaccio nei tessuti, evento che superato un certo livello risulta di norma letale. Quando l'organismo è esposto a basse temperature le molecole d'acqua tendono infatti ad avvicinarsi tra loro disponendosi per formare i cristalli di ghiaccio nei quali vengono incluse le sole molecole d'acqua mentre le altre molecole presenti nei fluidi che circondano i cristalli vengono confinate portando alcune parti ad elevate concentrazioni di soluti che possono così raggiungere livelli tossici per l'organismo. I violenti flussi di acqua determinati da queste irregolari concentrazioni di soluti possono inoltre di per sé divenire causa di danni e rottura delle membrane. La formazione del ghiaccio inizia negli spazi intercellulari dove accrescendosi aumenta la disidratazione delle cellule. Con il congelamento le cellule finiscono inoltre per rimanere schiacciate dai cristalli di ghiaccio. Non bisogna poi dimenticare che i cristalli di ghiaccio presenti in una soluzione possono modificarsi con graduale scomparsa dei cristalli di minori dimensioni e comparsa di cristalli di maggiore dimensioni, fenomeno indicato con il

termine di ricristallizzazione che si accompagna ad ulteriori danni meccanici alle cellule per sfondamento delle membrane. In estrema sintesi il congelamento di organismi viventi può portare a danni fisici e chimici di diverso tipo e ordine di gravità.

In relazione all'utilizzo di temperature ultrabasse, allo stadio attuale sono due le metodiche utilizzate per la conservazione degli embrioni di diverse specie animali, il congelamento e la vitrificazione. Il congelamento, conosciuto da oltre 30 anni, richiede una lenta procedura di raffreddamento ed una costosa strumentazione computerizzata per la riduzione programmata della temperatura. Di recente nella crioconservazione degli embrioni è stata proposta una tecnica innovativa che sfrutta la capacità di sostanze crioprotettive ad alta concentrazione di passare, durante la fase di raffreddamento, dallo stato liquido a quello solido formando una trama vetrosa ed impedendo in tal modo la formazione di cristalli di ghiaccio (FULLER *et al.*, 2004).

Una problematica di particolare rilievo legata al ricorso alle strategie di vitrificazione, con strutturazione delle molecole d'acqua in un solido amorfo, è rappresentata dalla fragilità derivante dalla trasformazione

dell'organismo in tempi brevissimi con velocità di discesa termica dell'ordine di 10.000°C/min in qualcosa di assimilabile in estrema sintesi alla realizzazione di una delicata “scultura vetrosa”, che successivamente nella altrettanto veloce fase di riscaldamento deve essere riportata alla sua funzionalità, evitando che l'instaurarsi di tensioni interne derivanti da differenti gradienti termici dei tessuti causi rotture e conseguente compromissione della vitalità.

Da quanto detto deriva che tanto più l'organismo si trova in una fase iniziale della sua ontogenesi e presenta una minore complessità anatomica, tanto minori sono i rischi di danni nel corso dei processi di crioconservazione.

La conservazione e la successiva moltiplicazione di materiale caratterizzato geneticamente, sia di ceppi di batteri e funghi di diversa origine che di insetti, acari e nematodi da impiegare in programmi di controllo biologico richiede, secondo la metodologia tradizionale, un notevole impegno di tempo, di attrezzature e di personale specializzato. Questa fase, inoltre, non sempre assicura il mantenimento di alcune delle proprietà fisio-patologiche dei microrganismi stessi fra cui la patogenicità né, per quanto riguarda insetti, acari e nematodi, può assolutamente garantire il mantenimento delle caratteristiche di partenza. La tecnica della conservazione a basse temperature, basata sul congelamento di organismi viventi a varie temperature e con diverse modalità, potrebbe consentire la realizzazione di “collezioni viventi” in grado di offrire risposte idonee al superamento di vari problemi tecnici, fra cui il mantenimento nel tempo delle caratteristiche genetiche e biologiche del materiale in allevamento e la riduzione degli spazi e dell'impegno umano.

Nello specifico, per quanto attiene agli insetti, la problematica del mantenimento nel tempo delle specie si ripropone con crescente importanza per le entità normalmente mantenute in allevamenti intensivi con finalità economico-produttive, come nel caso del baco da seta (*Bombix mori*), o di impiego in programmi di lotta biologica (predatori e parassitoidi) oppure largamente utilizzate come “esca” per l'isolamento di funghi e nematodi entomopatogeni nonché come “supporto” per lo sviluppo di parassitoidi utili (es. *Nezara viridula*, *Galleria mellonella*). Analogamente, nel caso degli acari fitoseidi, già prodotti a scopo commerciale per la difesa contro alcuni fitofagi, uno dei problemi più importanti da risolvere è la possibilità del loro stoccaggio e la conservazione delle loro caratteristiche predatorie. Quindi, la possibilità offerta dalla crioconservazione di “sospendere” gli allevamenti degli organismi utili e di “riattivarli” al momento del bisogno potrebbe risultare di grande interesse applicativo.

Sebbene la temperatura sia il fattore che più incide sul rallentamento del metabolismo cellulare, limitati sono i dati riguardanti la possibile risposta di organismi

e microrganismi di interesse agro-forestale a condizioni di conservazione mediante stoccaggio a temperatura ultra-bassa (cryopreservation) o in condizioni meno estreme di temperatura comunque tali da determinare condizioni di crescita rallentata (slow growth storage).

Con riferimento agli Insetti molti degli studi sono stati incentrati sui fattori in grado di adeguare la risposta alla basse temperature invernali di insetti di ambienti temperati con particolare riferimento alla preprogrammazione o preconditionamento, che operando con modifiche fisiologiche e biochimiche sulla base di fattori di condizionamento che possono agire sull'organismo o sui progenitori rende possibile la sopravvivenza per brevi o lunghi periodi a basse temperature altrimenti letali. Già nel 1961 SALT aveva rilevato in un Imenottero Braconide, *Bracon cephi* parassitoide di un coleottero dannoso alle graminacee, l'aumento della resistenza alle basse temperature proprio in coincidenza con l'entrata in diapausa. Nel seguito vari ricercatori si sono indirizzati a scandagliare le possibilità di sfruttare diapausa e quiescenza per facilitare lo stoccaggio prevalentemente a breve termine di organismi utili e delle loro vittime da utilizzare in programmi di lotta biologica, in taluni casi incorporando questi accorgimenti in programmi industriali di allevamento massale. Gran parte delle ricerche sono state però indirizzate a verificare le potenzialità di utilizzo di temperature prossime a 0°C, per lo più di poco superiori.

Solo a partire dalla fine degli anni '70 inizi degli anni '80 gli studi hanno iniziato a riguardare la risposta di insetti a temperature ultrabasse e i danni del congelamento, incentrandosi prevalentemente ma non in modo esclusivo sulle possibilità di stoccaggio di embrioni e uova di Ditteri (LEOPOLD e RINEHART, 2010).

Organismo da laboratorio per eccellenza, la *Drosophila* ha permesso di evidenziare la non idoneità dei metodi di crioconservazione basati su protocolli che prevedevano una lenta discesa termica e il successivo stoccaggio in azoto liquido a -196°C, fino a quel momento adottati per altri organismi animali, (MAZUR *et al.*, 1992). È stato infatti solo dopo la scoperta che l'immersione in azoto liquido forniva la necessaria estrema velocità di raffreddamento e l'abbinamento con un successivo quasi altrettanto rapido riscaldamento, che la metodologia per lo stoccaggio a freddo di artropodi e nematodi è divenuta disponibile.

Le indagini sulla *Drosophila* hanno evidenziato l'essenzialità di proteggere questi organismi con adeguate concentrazioni di crioprotettivi e realizzare un processo di vitrificazione e non di congelamento (MAZUR *et al.*, 1992; STEPONKUS e CALDWELL, 1993). In questa fase gli studi sullo stoccaggio a temperature

ultrabasse hanno iniziato a toccare anche insetti entomofagi utili, alcuni tutt'oggi allevati commercialmente come *Aphidoletes aphidimyza* distribuito in programmi di controllo biologico per il controllo di afidi di colture di pregio in serra (MILES e BALE, 1995).

Con specifico riferimento ai Lepidotteri, solo nel 2007 sono stati pubblicati i risultati della prima ricerca che, previa identificazione del crioprotettivo con minore tossicità e dello stadio embrionale con maggiori percentuali di sopravvivenza nei trattamenti pre-discesa termica, ha permesso di crioconservare uova di un Lepidottero, *Galleria mellonella* (L.), e di ricostituire una colonia di laboratorio a partire da adulti sviluppatasi da uova decorionate, trattate con crioprotettivi, stoccate in un ultracongelatore per 48h a -140°C e successivamente sottoposte a risalita termica pari a 6.000°C/min (ROVERSI *et al.*, 2007, COSI *et al.*, 2010).

Più di recente le indagini sono state incentrate su *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), specie aliena recentemente introdotta in Italia, che sta causando ingenti danni alla frutticoltura mediterranea (CALABRIA *et al.*, 2010). Le femmine fecondate depongono le uova all'interno dei frutti mediante ovopositore in via di maturazione e le larve si nutrono della polpa portando al rapido disfacimento dei frutti. Il controllo è reso difficoltoso dall'elevata polifagia, dalla brevità del ciclo biologico e dalla necessità di effettuare i trattamenti in prossimità della raccolta. La lotta biologica con la tecnica del maschio sterile (SIT) è attualmente oggetto di studio e per questo scopo sono state create linee sterili di *D. suzukii* (SCHEDELIG e HANDLER, 2013). In tale contesto la crioconservazione delle uova mediante vitrificazione potrebbe fornire un idoneo ausilio nell'ottimizzazione della produzione massale del dittero. Un elemento critico di tale tecnica è rappresentato dall'individuazione degli stadi di sviluppo da trattare; l'impiego dei crioprotettivi può determinare danni letali sia nei primi stadi di sviluppo con organi non ancora formati che successivamente per difficoltà a penetrare la cuticola (RAJAMOHAN e LEOPOLD, 2007).

LANDI *et al.* (2015) hanno svolto un accurato studio sull'embriogenesi di questo fitofago, individuando i marker morfologici facilmente identificabili in vivo determinandone i tempi di sviluppo. Lo studio è stato effettuato su una popolazione mantenuta in cella climatizzata a 25°C, UR 75%, fotoperiodo 12:12. Le uova vive, trattate con Halocarbon Oil 27 (Sigma) per rendere il corion trasparente, sono state osservate ad intervalli di 30 minuti allo stereo microscopio durante l'intero sviluppo embrionale (WIESCHAUS e NÜSSLEIN-VOLHARD, 1986). I diversi stadi embrionali sono stati fotografati trattando le uova in accordo con il metodo riportato da HAVELKA *et al.* (2007). I dati

acquisiti sono stati comparati con quanto già noto in letteratura su *Drosophila melanogaster* (WEISHAUS e NÜSSLEIN-VOLHRD, 1986; HARTENSTEIN, 1993). Questa metodologia ha permesso di individuare 17 stadi dello sviluppo embrionale. L'embriogenesi di *D. suzukii* si completa in circa 23-25 ore a 25°C. Tali risultati sono in contrasto con quanto riportato da KANZAWA (1939) per il quale lo sviluppo embrionale di *D. suzukii* si completava in sole 13 ore alla medesima temperatura. Viceversa, i tempi di sviluppo registrati sono comparabili con quelli di *D. melanogaster* che completa l'embriogenesi in 21 ore (HARTENSTEIN, 1993). Le fasi di blastula, gastrula, allungamento della banda germinativa, accorciamento della banda germinativa, chiusura dorsale e morfogenesi finale sono raggiunti rispettivamente dopo 4.00, 4.20, 8.30, 11.40, 15.00 e 23.00 ore. I tempi di sviluppo di blastula e di morfogenesi finale sono più lunghi in *D. suzukii* rispetto a *D. melanogaster*: a questi è da imputare la maggior tempistica complessiva di sviluppo embrionale. Inoltre, gli autori hanno evidenziato che il 25.6% delle uova era deposta in stadi di sviluppo avanzati a causa della ritenzione delle uova negli ovidotti.

La fase di chiusura dorsale (stadi 14-15), considerata la più idonea per l'applicazione del protocollo di crioconservazione (STEPONKUS *et al.*, 1990; MAZUR *et al.*, 1992), viene raggiunta a 25°C dopo 14-15 ore dalla deposizione. Dopo tale intervallo di tempo circa il 50% delle uova sono allo stadio 14 e l'altro 50% allo stadio 15.

Nel complesso si ritiene che la conservazione di artropodi a temperature ultrabasse basata sulla crioconservazione mediante vitrificazione di stadi embrionali potrà consentire la realizzazione di collezioni viventi di germoplasma di specie e genotipi di interesse agrario, forestale e ambientale e offrire risposte idonee alle necessità di mantenimento sul medio e lungo periodo delle caratteristiche genetiche delle popolazioni allevate evitando anche fenomeni di deriva genetica, ben noti a tutti quelli che si occupano di mantenere in condizioni di laboratorio organismi utili per programmi di controllo biologico o comunque di interesse per la conservazione di linee in purezza utilizzate in studi di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- CALABRIA G., MÁCA J., BÄCHLI, G., SERRA L., PASCUAL M., 2012 – *First records of the potential pest species Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) in Europe.* - J. Appl. Entomol., 136: 139-147.
- COSI E., ABIDALLA M.T., ROVERSI P.F., 2010 – *The effect of Tween 80 on eggshell permeabilization in Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera, Pyralidae).* - Cryoletters, 31: 291-300.
- FULLER B.J., LANE J., BENSON E.E., 2004 – *Life in the frozen state.* CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 672.

- HARTENSTEIN V., 1993 – *Atlas of Drosophila Development*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Bethesda (MD), <http://www.sdbonline.org/sites/fly/atlas/00atlas.htm>
- HAVELKA J., LANDA V. JR., LANDA V., 2007 – *Embryogenesis of Aphidoletes aphidimyza (Diptera: Cecidomyiidae): morphological markers for stinging of living embryos*. - Eur. J. Entomol., 104: 81-87.
- KANZAWA T., 1939 – *Studies on the fruit flies*. Yamashikenritsu Noji-shikenjo Gyomu-nenpo pp. 49. - Rev. Appl. Entomol., 29: 622 [Abstract].
- LANDI S., GARGANI E., PAOLI F., SIMONI S., ROVERSI P.F., 2015 – *Morphological markers for cryopreservation in the embryonic development of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)*. - Journal of Economic Entomology, 108 (4): 1875-1883.
- LEOPOLD R.A., RINEHART J.P., 2010 – *A template for insect cryopreservation*. In: *Low temperature biology of insects*. Edited by D.L. Delinger and R.E. Lee, Cambridge University Press. pp. 325-341.
- MAZUR P., COLE K.W., HALL J.W., SCHREUDERS P.D., MAHOWALD A.P., 1992 – *Cryobiological Preservation of Drosophila Embryos*. - Science 258: 1932-1935.
- MILES J.E., BALE J.S., 1995 – *Analysis of chilling injury in Aphidoletes aphidimyza*. - Cryobiology, 32: 45-73.
- RAJAMOHAD, A., LEOPOLD R.A., 2007 – *Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: stage selection and avoidance of thermal stress*. - Cryobiology, 54: 44-54.
- ROVERSI P.F., COSI E., IRDANI T., 2008 – *Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae)*. - Cryobiology, 56: 1-7.
- SALT R.W., 1961 – *Principles of insect cold-hardiness*. - Annual Review of Entomology, 6: 55-73.
- SCHETELIG M.F., HANDLER A.M., 2013 – *Germline transformation of spotted wing drosophilid, Drosophila suzukii, with a piggyback transposon vector*. - Genetica, 141: 189-193.
- STEPONKUS P.L., CALDWELL S., 1993 – *An optimized procedure for the cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos*. - Cryoletters, 14: 377-380.
- STEPONKUS P.L., MYERS S.P., LYNCH D.V., GARDNER L., BRONSHTEYN V., LEIBO S.P., RALL W.F., PITT R.E., LIN T.T., MACINTYRE R.J., 1990 – *Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos*. - Nature, 345: 170-172.
- WEISCHAUS E., NÜSSLEIN-VOLHARD C., 1986 – *Looking at embryos*. In *Drosophila a practical approach*. Ed. Roberts DB Oxford University Press, GB, pp. 179-214.

LA CRIOCONSERVAZIONE DI SPECIE ARBOREE: DAL LABORATORIO ALLA CRIOBANCA

MAURIZIO LAMBARDI^a

^aIVALSA, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze). E-mail: lambardi@ivalsa.cnr.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

Cryopreservation of woody species: from the laboratory to the cryobank

Plant cryopreservation has greatly evolved in recent years, being today a safe cost-effective complementary approach to the traditional *ex situ* conservation of plant biodiversity. A milestone in the cryopreservation of woody plant material dates back to 1990, when Akira Sakai and co-workers developed the Plant Vitrification Solution n° 2 (PVS2) which showed to be very effective for the induction of cell vitrification during ultra-rapid freezing in liquid nitrogen. Since then, the number of PVS2-based protocols, mainly developed for the cryopreservation of shoot tips, increased yearly while, at the same time, new and effective encapsulation- and droplet-based methods were proposed. A range of different cryo-techniques is now available for the cryostorage of woody plant germplasm, allowing the safe long-term conservation in liquid nitrogen of different organs and tissues coming from tissue culture or directly collected from plants in the field, such as (i) shoot tips, obtained *in vitro* by axillary or apical buds and used naked or incapsulated in Ca-alginate beads. They are the most used explants with broad-leaf trees, provided that optimized protocols of micropropagation have been achieved; (ii) somatic embryogenic callus, largely used with conifer species for which efficient micropropagation procedures from mature stock plants are rarely available; (iii) seeds and embryonic axes, useful material for the long-term preservation of both seed-propagated, and vegetatively-propagated species, provided that the latter have polyembryonic seeds, like in citrus fruits; (iv) dormant buds, i.e. uni-nodal segments that can be cryopreserved and then, after thawing, used to recover accessions by chip-budding onto rootstocks. Two practical examples of cryobanks for the conservation of polyembryonic seeds from ancient Citrus accessions, and dormant buds from ancient apple cultivars of the Veneto region are described.

KEY WORDS: dormant buds, embryogenic callus, polyembryonic seeds, shoot tips, vitrification.

INTRODUZIONE

La conservazione della biodiversità delle specie vegetali è oggi una priorità a livello mondiale e comprende azioni che impediscono o riducono fortemente la perdita di risorse genetiche dovuta a fattori naturali (quali la desertificazione e i cambiamenti climatici), oppure indotte dal comportamento umano (deforestazione, specializzazione delle colture, urbanizzazione). Si stima oggi che, delle circa 391.000 specie vegetali conosciute e descritte, oltre il 20% siano da considerare minacciate o già prossime all'estinzione (www.bgci.org/plant-conservation/threats/; RBG KEW, 2016). Le conseguenze di questa perdita di risorse genetiche sono drammatiche se si considera la possibile scomparsa di caratteri unici ed importanti, così come di prodotti naturali utili per la salute e la nutrizione. Allo scopo di contrastare questa erosione di risorse genetiche, a partire dagli anni '70 dello scorso millennio è stato iniziato un importante lavoro, a livello mondiale, di collezione, caratterizzazione e conservazione *ex situ* della biodiversità vegetale in banche del seme e col-

lezioni clonali in campo. Nel 2010 sono state stimate in 7,4 milioni le accessioni tenute in conservazione da organizzazioni internazionali, da istituzioni nazionali e autorità regionali e da compagnie private (FAO, 2010); 90% di queste accessioni (per la metà relative a cereali) sono conservate in circa 1750 banche del seme, sparse nel mondo.

Relativamente alle specie arboree, la conservazione delle risorse genetiche è tradizionalmente effettuata in banche del seme (per le specie prevalentemente riprodotte per via gamica) o in collezioni clonali in campo (per le specie, quali i fruttiferi, largamente propagati per via vegetativa). Sebbene sia innegabile il ruolo fondamentale che svolgono nella conservazione della biodiversità vegetale le banche del seme e le collezioni clonali, questi approcci tradizionali presentano alcune limitazioni e inconvenienti. Lo stoccaggio a bassa temperatura (tipicamente -18°C) di semi parzialmente disidratati non è applicabile con specie a seme non ortodosso o sub-ortodosso, cioè specie con semi che subiscono un rapido deterioramento e diminuzione della germinazione se con-

servati come tali o dopo una sostanziale riduzione del contenuto di acqua, necessaria per preservarne la germinabilità durante la conservazione a lungo termine a basse temperature. Ad esempio, molte specie tropicali, ma anche vari alberi da frutto e da foresta delle zone temperate (quali castagno, noce, ippocastano, acero, quercia e altri) hanno grandi semi non ortodossi, “recalcitranti” alla conservazione a -18°C. Per quanto riguarda le collezioni clonali, la FAO ha stimato che le accessioni in collezioni clonali nel 2010 ammontassero a oltre 700.000, rappresentando così circa il 9% delle risorse genetiche totali conservate nel mondo. Questi arboreti clonali costituiscono un patrimonio straordinario e insostituibile di risorse genetiche, ma richiedono vaste aree e costi elevati di manutenzione per gli interventi periodici di potatura, concimazione, irrigazione e controllo dei patogeni. Ciò rende la loro manutenzione spesso problematica per le istituzioni pubbliche, quando non supportate da adeguati finanziamenti statali o regionali. Inoltre, gli alberi delle collezioni clonali sono costantemente soggetti al rischio di perdite a causa di eventi meteorologici eccezionali (come gelate e inondazioni) o malattie gravi.

Oggi le biotecnologie vegetali offrono importanti opzioni per la raccolta, la caratterizzazione molecolare, l’eliminazione dei patogeni, la propagazione, la documentazione, la conservazione e lo scambio di risorse genetiche vegetali controllate geneticamente e sanitariamente (BENSON, 1999). In questo contesto, l’applicazione delle tecnologie *in vitro* alla conservazione delle risorse genetiche vegetali si è notevolmente evoluta in anni recenti, consentendo lo sviluppo di procedure efficaci di conservazione sia a medio termine delle colture di germogli a temperature al di sopra del congelamento (LAMBARDI e OZUDOGRU, 2013), sia a lungo termine di organi e tessuti provenienti da coltura *in vitro* o direttamente dal campo e stoccati a temperatura criogenica (LAMBARDI e DE CARLO, 2003; PANIS and LAMBARDI, 2006; LAMBARDI e BENELLI, 2007; BENELLI *et al.*, 2013). La crioconservazione applicata alle piante, in particolare, dalla sua introduzione negli anni ’60, è considerata oggi uno straordinario metodo di conservazione a lungo termine del materiale biologico, in totale sicurezza in quanto non induce alterazioni genetiche e preserva il potenziale rigenerativo del materiale mantenuto a temperatura ultra-bassa. L’azoto è il gas criogenico utilizzato in crioconservazione di espianti vegetali, poiché è economico, non è tossico e consente la conservazione di campioni a -196°C (in fase liquida) o a circa -160°C (nella fase vapore) in uno spazio molto limitato. La crioconservazione permette lo stoccaggio del materiale vegetale per un tempo teoricamente illimitato.

TAPPE FONDAMENTALI DELLA CRIOCONSERVAZIONE DI SPECIE ARBOREE

Il primo tentativo di crioconservare materiale vegetale da specie arboree risale al 1960, quando Akira Sakai, un pioniere del settore a cui si devono importanti avanzamenti della tecnica, dimostrò che micro-talee di un anno di pioppo e salice sopravvivevano all’ultra-raffreddamento a -196°C se erano stati esposti a -30°C per 6-24 ore prima dell’immersione in azoto liquido (AL) (SAKAI, 1960). Così come riportato in questo esperimento, la crioconservazione delle piante ha inizialmente seguito la tecnica del “congelamento a due fasi”, in cui si ottiene una disidratazione ottimale delle cellule mediante una prima esposizione del materiale vegetale ad una temperatura prossima ai -40°C (meglio se raggiunta gradualmente con un lento raffreddamento), seguita dalla sua immersione in AL. Questo approccio, sebbene efficace nel prevenire il danno causato dalla formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari, è piuttosto laborioso e oneroso, a causa del costo delle apparecchiature di abbattimento della temperatura a velocità controllata. Per questo motivo, i progressi nella tecnologia hanno successivamente prodotto procedure nuove, semplici ed efficaci, che inducono vitrificazione degli espianti mediante “congelamento a una fase”, cioè con l’immersione diretta in AL (ENGELMANN, 2004; PANIS e LAMBARDI, 2006). Una gamma di metodi criogenici sono oggi disponibili con questo approccio per la conservazione di vari espianti di specie arboree, provenienti da colture *in vitro* (microgemme, callo embriogenico) o direttamente raccolti da alberi in campo (semi, polline, gemme dormienti; Fig. 1).

Metodi basati sull’uso della soluzione PVS2

Agli inizi degli anni ’90, cioè 30 anni dopo il lavoro pionieristico di Sakai con la crioconservazione di pioppo e salice, due procedure diverse venivano proposte quasi contemporaneamente, la “vitrificazione con PVS2” (SAKAI *et al.*, 1990) e l’“incapsulamento-disidratazione” (FABRE e DEREUDDRE, 1990). Entrambe le tecniche hanno immediatamente attirato l’attenzione degli scienziati per la grande semplificazione della procedura di crioconservazione di espianti vegetali, dovuta alla possibilità di indurre vitrificazione cellulare anche con immersione diretta dei campioni in AL. Il termine vitrificazione si riferisce al processo fisico di transizione di una soluzione acquosa in uno stato amorfo e vetroso (non cristallino) durante raffreddamento ultra-rapido. Quando il processo di vitrificazione riguarda il citosol cellulare, la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari è impedito e il tessuto rimane vitale e idoneo alla reintroduzione in condizioni standard di coltura *in vitro*. Il passo principale del metodo proposto da Sakai è il trattamento degli espianti

cosiddetti “semi sintetici o artificiali” (REDENBAUGH, 1993). MURASHIGE (1977) fu il primo a produrre una definizione ufficiale di seme sintetico: “un singolo embrione somatico incapsulato, cioè un prodotto clonale che può essere manipolato e usato come un vero seme per il trasporto, lo stoccaggio e la semina e che evolve in una plantula *in vitro* o *ex vitro*”. L’uso iniziale di singoli embrioni somatici per produrre semi sintetici imitava i semi naturali, dove l’endosperma che circonda l’embrione zigotico viene sostituito dalla capsula di alginato che circonda l’embrione somatico e che può contenere sostanze nutritive addizionate. Più tardi, la tecnologia fu estesa all’incapsulamento di vari propaguli derivati da coltura *in vitro*, come microgemme, segmenti nodali e campioni di callo, che determinarono una nuova definizione di seme sintetico (AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1995): “embrioni somatici, germogli o altri tessuti incapsulati artificialmente che possono essere utilizzati per la semina in condizioni *in vitro* o *ex vitro*” (per una revisione sull’uso di espianti non embrigenici per la produzione di semi sintetici, vedi STANDARDI e MICHELI, 2013). Nel metodo “incapsulamento-disidratazione”, sviluppato da FABRE e DEREUDDRE (1990), i semi sintetici contenenti microgemme sono trattati con un’alta concentrazione di saccarosio, disidratati fino ad un contenuto di umidità del 20-30% (mediante esposizione a flusso d’aria sterile o in gel di silice) e, quindi, immersi in AL all’interno di cryovial. Sebbene la procedura possa essere considerata piuttosto lunga e laboriosa, la presenza di una matrice nutritiva che circonda l’espianto può favorire la sua ricrescita dopo lo scongelamento. La tecnica di “incapsulamento-vitrificazione”, inoltre, combina l’incapsulamento degli espianti con l’esposizione dei semi sintetici ad una soluzione vitrificante. Il metodo è stato applicato con successo a varie specie di frutta (SAKAI ed ENGELMANN, 2007; BENELLI *et al.*, 2013).

La tecnica del congelamento in goccia

In anni recenti, un nuovo approccio di “congelamento a una fase” ha acquisito grande popolarità: si tratta della tecnica di crioconservazione basata sull’inclusione degli espianti “in goccia”. Questa tecnica fu proposta per la prima volta molto prima dei metodi basati sull’uso del PVS2 e sull’incapsulamento, quando KARTHA e COLLEGGHI (1982) riferirono della possibilità di includere meristemi di manioca (*Manihot esculenta*) in piccole gocce di DMSO, preparate su strisce di alluminio. Le strisce erano quindi immerse direttamente in AL che produceva un velocissimo congelamento della goccia e dell’espianto ivi incluso. Dopo un lungo periodo, durante il quale è stato praticamente dimenticato, negli anni 2000 il metodo è stato riconsiderato da vari gruppi nel mondo operanti in crioconservazione e il numero di pubblicazioni basati sul metodo dell’inclusione

in gocce di DMSO o di PVS2 sono andate aumentando ogni anno (GRAPIN *et al.*, 2011). Nella procedura più comune, il metodo si basa sull’inclusione degli espianti in gocce da 5-10 µL di DMSO o PVS2, preparate in gruppi di 4-5 su strisce di fogli di alluminio da 8x30 mm (tali, cioè, da poter essere inserite in cryovial). Dopo questo trattamento (generalmente più breve rispetto alle altre tecniche di vitrificazione), le strisce vengono inserite in cryovial contenenti AL e queste, a loro volta, immerse in AL. Il metodo basato sul congelamento “in goccia” ha ripetutamente dimostrato di essere un sistema molto efficace per indurre la tolleranza degli espianti al congelamento ultra-rapido in AL, presumibilmente perché, rispetto alle altre tecniche di “congelamento a una fase”, consente una più repentina decrescita della temperatura fino a -196°C degli espianti immersi in un quantitativo molto piccolo di crioprotettivo (SAKAI e ENGELMANN, 2007).

Recentemente è stata proposta una tecnica innovativa, basata sull’uso di barrette di alluminio solide, anche queste di dimensioni tali da consentirne l’introduzione in cryovial da 2 ml. Qui gli espianti (microgemme) sono posti in 10 piccoli pozzetti della barretta e quindi incorporati in alginato di calcio. La crioconservazione degli espianti, prima dell’immersione diretta in AL, viene quindi ottenuta posizionando le barrette nel flusso d’aria sterile di una cappa a flusso laminare (“D-cryo-plate”) o mediante immersione in PVS2 (“V-cryo-plate”) per periodi di tempo selezionati sperimentalmente. Per quanto riguarda le specie arboree, le prime applicazioni promettenti sono state recentemente riportate in cachi (MATSUMOTO *et al.*, 2015) e *Prunus* spp. (VUJOVIĆ *et al.*, 2015).

ESPIANTI DA COLTURA *IN VITRO* PER LA CRIOCONSERVAZIONE DI SPECIE ARBOREE

La crioconservazione delle specie arboree si serve largamente di espianti provenienti da colture *in vitro*, vale a dire microgemme ascellari o apicali, prelevate da colture di germogli micropropagati, e porzioni di callo embriogenico.

Microgemme ascellari e apicali

Le microgemme sono di gran lunga gli espianti più usati per la crioconservazione di specie arboree riprodotte clonalmente. Il mantenimento della rispondenza genetica alla pianta madre è assicurato quando si prelevano microgemme apicali o ascellari (Fig. 2, in alto), asportate da colture di germogli micropropagati. In condizioni sterili, la microgemma viene ridotta in dimensione per ottenere il meristema apicale, circondato da alcune foglie primordiali (Fig. 2, in basso). Per quanto riguarda la dimensione finale dell’espianto, varia da un minimo di 0,3 a 2 mm, a seconda della

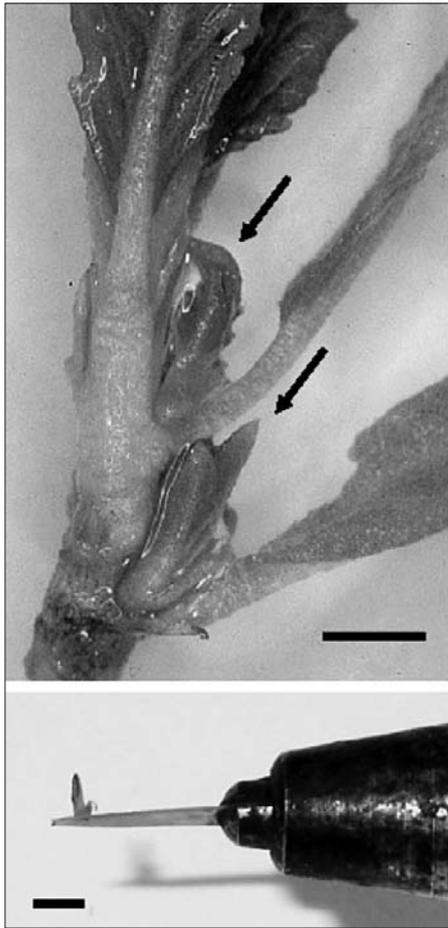


Fig. 2 – *Sopra*: microgemme ascellari sviluppate *in vitro* (freccie) e usate nella crioconservazione di pioppo bianco (*Populus alba*). *Sotto*: un espianto ottenuto da microgemma ascellare, pronto per l'applicazione di trattamenti preparatori alla diretta immersione in AL (da LAMBARDI *et al.*, 2000). Barre, 1 mm.

specie (LAMBARDI e DE CARLO, 2003). La quantità di foglie primordiali mantenute attorno al meristema centrale (da 2 a 4 coppie, in media) influisce sulla sopravvivenza delle microgemme in post-crioconservazione, in quanto riduce il rischio di dessiccazione del meristema durante l'escissione e lo protegge da danni durante la manipolazione dell'espianto. D'altra parte, la presenza di troppe foglie può interferire sulla penetrazione dei crioprotettivi nella parte interna della microgemma; per questo motivo viene generalmente applicato un taglio trasversale nella parte apicale della microgemma. I principali vantaggi dell'utilizzo di microgemme da coltura *in vitro* per la crioconservazione di specie arboree sono:

- possono essere utilizzate nude o incapsulate in alginato di Ca in un'ampia gamma di metodi di crioconservazione (“vitrificazione basata su PVS2”, “incapsulamento-disidratazione”, “incapsulamento-vitrificazione”, “congelamento in goccia”);
- molte decine di espianti possono essere ottenuti da un singolo vaso di germogli in micropropagazione;
- migliaia di microgemme possono essere criocon-

servate anche in un contenitore di AL di medie dimensioni (100 litri o meno);

- possono essere utilizzate anche per il recupero di piante esenti da organismi patogeni mediante crio-terapia (WANG *et al.*, 2009).

Tra le problematiche che determinano, si ricordano:

- le tecniche criogeniche basate sull'impiego di microgemme sono scarsamente efficienti in specie caratterizzate da bassi tassi di proliferazione in micropropagazione (ad esempio, castagno, noce, quercia, olivo);
- i tassi di ricrescita post-crioconservazione sono spesso dipendenti dalla cultivar;
- il recupero *in vitro* di una linea di coltura di germogli in proliferazione da microgemme crioconservate può richiedere diverse subcolture e, quindi, un tempo piuttosto lungo;
- il passaggio “dal campo-all'AL-al campo” delle accessioni in collezione richiede molto tempo poiché sono necessari due cicli di micropropagazione, vale a dire prima e dopo la crioconservazione; per questo motivo, nelle specie frutticole che possono essere riprodotte mediante innesto a gemma, l'uso in crioconservazione di gemme dormienti, raccolte direttamente dalle piante in campo, è generalmente preferito (vedi più avanti).

Qualunque sia la tecnica utilizzata, la sopravvivenza delle microgemme in post-crioconservazione può essere fortemente influenzata dalla durata dei trattamenti che inducono la vitrificazione, ovvero il tempo di permanenza in PVS2 (o altra miscela crioprotettiva) o il livello di disidratazione delle microgemme incapsulate. In effetti, la durata di questi trattamenti dovrebbe essere abbastanza lunga da consentire la vitrificazione cellulare durante il congelamento ultra-rapido in AL, senza produrre effetti tossici (con protocolli basati su PVS2) o plasmolisi cellulare (con protocolli basati sulla disidratazione). Inoltre, sebbene i trattamenti sopra descritti svolgano un ruolo fondamentale nell'indurre la vitrificazione cellulare, ulteriori passaggi che li precedono possono contribuire a ottimizzare la tecnica di conservazione, come (i) l'acclimatazione delle colture di germogli a basse temperature (generalmente 4-5°C per le specie arboree di clima temperato) per alcune settimane, (ii) l'acclimatazione delle microgemme (dopo l'escissione) a 4°C per un periodo che va da 24 a 96 ore, (iii) il pre-trattamento delle stesse con una miscela di crioprotettori composta da 2 M glicerolo e 0,4 M saccarosio (MATSUMOTO *et al.*, 1994) per 20-30 minuti (LAMBARDI e DE CARLO, 2003).

Crioconservazione di callo embriogenico

Nella coltura *in vitro*, il callo embriogenico (nelle conifere indicato come “masse embriogeniche somatiche”) è composto da cellule de-differenziate in grado di evolvere in embrioni somatici quando coltivate in

condizioni di coltura e substrato contenente uno specifico regolatore di crescita (in genere il 2,4-D). L'embriogenesi somatica è un sistema di rigenerazione *in vitro* di importanza strategica per l'applicazione ai programmi di trasformazione genetica o come metodo di propagazione altamente efficiente, ad esempio in pini (MONTALBÀ *et al.*, 2016) e in altre specie di conifere (KLYMASZEWSKA *et al.*, 2016). Tuttavia, la subcoltura periodica del callo embriogenico aumenta il rischio di contaminazione e riduce nel tempo il suo potenziale di produrre embrioni somatici. Inoltre, l'induzione *in vitro* di cellule embriogeniche richiede molto lavoro ed è particolarmente difficile quando si lavora con specie per le quali sono disponibili espianti adatti solo durante un periodo limitato dell'anno, come nelle conifere dove vengono prodotte le prime cellule embriogeniche da poche cellule del sospensore di embrioni zigotici, escissi e introdotti *in vitro* in uno specifico e stretto periodo di immaturità (LAMBARDI, 2000; KLYMASZEWSKA *et al.*, 2016). In base al tipo di callo embriogenico, le tecniche di crioconservazione applicate sono sia il "congelamento a due fasi" (con abbassamento termico in genere di $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), largamente utilizzato con callo embriogenico di conifere, sia il "congelamento a una fase", preferito con le latifoglie. La crioconservazione del callo embriogenico è stata di recente ampiamente descritta da OZUDOGRU e LAMBARDI (2016).

ORGANI DIRETTAMENTE RACCOLTI IN CAMPO:
DUE ESEMPI DI CRIOBANCA DI SPECIE ARBOREE

Oltre agli espianti provenienti da vitrocultura, anche taluni organi (semi, assi embrionali, gemme dormienti) e tessuti (polline), prelevati direttamente da piante in campo, possono essere efficacemente impiegati per la crioconservazione di specie arboree. Di seguito si riportano due esempi di criobanche costituite presso il CNR-IVALSA di Firenze per la conservazione di antico germoplasma di agrumi e melo.

La criobanca di semi poliembrionici di Citrus

La crioconservazione di semi interi o embrioni escissi è un'altra importante strategia per la salvaguardia del germoplasma di specie arboree a propagazione gamica, specialmente se provenienti da specie con semi sub-ortodossi o non ortodossi che non possono essere conservati a temperatura di -18°C . Inoltre, il seme può rappresentare un importante strumento anche per la conservazione del germoplasma pregiato di specie propagate vegetativamente aventi semi poliembrionici, cioè semi contenenti embrioni nucellari che accompagnano l'embrione zigotico e rappresentano una fedele riproduzione genetica della pianta madre. Un esempio di questo tipo di conservazione è dato da

uno studio, realizzato presso il CNR-IVALSA di Firenze, dove è stata sviluppata una procedura criogenica per consentire la duplicazione di un'antica collezione di agrumi, situata nel giardino botanico della "Villa Medicea" di Castello, nella periferia di Firenze. La collezione fu iniziata da Cosimo I de' Medici nel XVI secolo e comprende oltre 600 accessioni, alcune delle quali uniche. È stato sviluppato un protocollo efficiente di disidratazione dei semi (fino ad un contenuto di umidità prossimo al 20%) e immersione diretta in AL, ottenendo sempre più del 75% di germinabilità in post-crioconservazione (LAMBARDI *et al.*, 2007). Poiché la maggior parte delle accessioni di agrumi della collezione sono polembribrioniche, da ogni seme proveniente da crioconservazione sono poi state prodotte piantine multiple di tipo nucellare. Quindi, questo seme è un ottimo materiale per la crioconservazione clonale, a condizione che gli embrioni nucellari abbiano la predominanza nello sviluppo, rispetto all'embrione zigotico. Il protocollo per la crioconservazione dei semi di agrumi polembribrionici è stato descritto da DE CARLO *et al.* (2011).

È anche da segnalare che le specie arboree hanno spesso cotiledoni di grandi dimensioni che rendono le dimensioni del seme non idonee all'uso in crioconservazione, come nel caso di castagno, noce, quercia, diverse specie tropicali. In questo caso, è stata riportata la possibilità di conservare in AL assi embrionali privati dei cotiledoni, dopo l'applicazione di un appropriato protocollo di disidratazione. Esempi sono disponibili in letteratura per *Quercus faginea* (GONZALEZ-BENITO e PEREZ-RUIZ, 1992) e *Castanea sativa* (CORREDOIRA *et al.*, 2004).

La criobanca di gemme dormienti

Questa tecnica fu sviluppata per germoplasma di melo alla fine degli anni '90 da alcuni ricercatori del Centro di Risorse Genetiche dello United States Department of Agriculture (USDA-ARS) di Geneve, USA (FORSLINE *et al.*, 1998). La procedura ha il grande vantaggio di non richiedere alcun passaggio delle accessioni in vitrocultura, in quanto si serve di micromarze (portanti una gemma) che vengono disidratate e direttamente conservate in AL, e di permettere consistenti risparmi di tempo e manodopera per la conservazione e il recupero del germoplasma in post-crioconservazione (LAMBARDI *et al.*, 2011). Per il recupero delle accessioni, dopo scongelamento le micromarze vengono impiegate per innesti a gemma su portinnesti appositamente predisposti.

Successivamente alla raccolta delle marze e al loro successivo stoccaggio per circa due mesi a -5°C , la procedura perfezionata presso il CNR-IVALSA prevede i seguenti passaggi: (i) la parte centrale di ogni marza viene impiegata per preparare micromarze (segmenti uni-nodali) di circa 35 mm, con una gemma centrale;

(ii) le micromarze vengono stratificate in cella a -5°C, ove subiscono una lenta e graduale riduzione del contenuto di umidità; (iii) dopo un periodo variabile tra i 15 e i 40 giorni, al raggiungimento di un contenuto in umidità compreso tra il 20% e il 30%, le micromarze vengono avvolte in gruppi di 5 in fogli di alluminio, a loro volta avvolti in pellicola trasparente, e questi inseriti in scatole da crioconservazione; (iv) le scatole, contenenti un massimo di 35 micromarze, subiscono un raffreddamento graduale di -1°C ogni ora, fino al raggiungimento di -30°C, temperatura alla quale permangono per ulteriori 24 ore; (v) le scatole vengono immerse e stoccate in AL; (vi) in post-crioconservazione, le scatole sono riscaldate a 4°C per 24 ore, dopodiché le micromarze, liberate dagli involucri, sono stratificate in torba umida e mantenute 2 settimane a 2°C; durante questo periodo, le micromarze sottostanno ad una graduale reidratazione; (vii) dalle micromarze si prelevano gli scudetti, utilizzati per innesti a ‘chip-budding’ o ‘T-budding’ su portinnesti appositamente preparati. Questa procedura, quando ottimizzata, garantisce la sopravvivenza all’AL sia delle cellule cambiali dello scudetto (che permettono la saldatura col cambio del portinnesto), sia delle cellule meristematiche della gemma. Le esperienze condotte per oltre un quinquennio dal CNR-IVALSA, in collaborazione con Veneto Agricoltura, con antiche varietà di melo del Veneto hanno dimostrato che la procedura si può efficacemente adattare a materiale raccolto a fine gennaio in climi assai più miti rispetto a quello continentale statunitense. Le percentuali di recupero del germoplasma di melo del Veneto dopo innesto con gemme da crioconservazione è sempre stato in un range compreso tra il 40% e il 100%. Inoltre, è in corso una prova presso il Centro Attività Vivaistiche di Tebano (Faenza) che ha già evidenziato come la tecnica, con opportuni adattamenti, possa applicarsi persino a piante di melo in contenitore costantemente mantenute in screen-house (CONTALDO *et al.*, 2018).

CONCLUSIONI

Grazie al lavoro condotto da diversi gruppi di ricerca nel mondo e ad una specifica azione COST dell’UE (n° 871, “CryoPlanet”, si veda GRAPIN *et al.*, 2011), negli ultimi 25 anni la crioconservazione delle piante si è concretamente trasferita dal laboratorio di ricerca all’applicazione pratica per la conservazione delle risorse genetiche minacciate. Le specie arboree a prevalente propagazione vegetativa, in particolare, hanno ottenuto grandi benefici dallo sfruttamento di questa tecnologia come approccio complementare alla conservazione *ex situ* in collezioni clonali, grazie alla possibilità di ridurre spazi e costi necessari alla manutenzione delle piante in campo. Vari metodi sono stati

sviluppati e applicati alla conservazione in AL di molteplici tessuti e organi vegetali, provenienti sia dalla diretta raccolta in campo, sia da coltura *in vitro* di germogli e callo embriogenico. La ricerca deve continuare a muoversi nella direzione di semplificare e rendere sempre più affidabili e riproducibili i protocolli di coltura *in vitro* e le tecniche di crioconservazione.

RINGRAZIAMENTO

L’Autore ringrazia per il contributo al CNR-IVALSA ricevuto nell’ambito del “Trattato internazionale sulle risorse fitogenetiche per l’alimentazione e l’agricoltura - RGV-FAO”, programma triennale 2017-2019.

BIBLIOGRAFIA

- AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., SMITH M.A.L., 1995 – *Glossary*. In: Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Aitken-Christie J., Kozai T. & Smith M.A.L. Eds, Kluwer, Dordrecht, pp. ix-xii.
- BENELLI C., DE CARLO A., ENGELMANN F., 2013 – *Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis* - Biotechnol Adv., 31: 175-185.
- BENSON E.E., 1999 – *Cryopreservation*. In: Plant Conservation Biotechnology, Benson E.E. Ed, Taylor & Francis, London, pp. 83-95.
- CONTALDO C., TURA E., PANCALDI M., BURRONI F., BENELLI C., DE CARLO A., LAMBARDI M., 2018 – *Nuove tecnologie per la conservazione delle specie da frutto certificate* - Frutticoltura, 10: 8-15.
- 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: 33-42.
- DE CARLO A., LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2011 – *Cryogenic technologies for the long-term storage of Citrus germplasm*. In: Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Yeung E. & Thorpe T.A. Eds, Methods in Molecular Biology, vol. 710, Springer, pp. 185-200.
- ENGELMANN F., 2004 – *Plant cryopreservation: progress and prospects* - In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 40: 427-433.
- FABRE J., DEREUDDRE J., 1990 – *Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips* - CryoLetters, 11: 413-126.
- FAO, 2010 – *The Second Report on the state of the world’s plant genetic resources for food and agriculture*. In: <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/i1500e00.htm>.
- 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. Hort. Sci., 123: 365-370.
- GONZALEZ-BENITO M.E., PEREZ-RUIZ C., 1992 – *Cryopreservation of Quercus faginea embryonic axes* - Cryobiology, 29: 685-690.
- GRAPIN A., KELLER E.R.J., LYNCH P.T., PANIS B., REVILLA BAHILLO A., ENGELMANN F., 2011 – *Cryopreservation of crop species in Europe* - COST Action 871-Proceeding of the final meeting. Angers, France, February 8-11, pp. 233. Available: www.cost.eu/module/download/53639

- KARTHA K.K., LEUNG N.L., MROGINSKI L.A., 1982 - *In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (Manihot esculenta Crantz)* - Z. Pflanzenphysiol., 107: 133-140.
- KIM H.H., LEE Y.G., SHIN D.J., KO H.C., GWAG J.G., CHO E.G., ENGELMANN F., 2009 - *Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures*. - CryoLetters, 30: 320-334.
- KLIMASZEWSKA K., HARGREAVES C., LELU-WALTER M.A., TRONTIN J., 2016 - *Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000*. In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, Germanà M.A. & Lambardi M. Eds., Humana Press-Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London, pp. 131-166.
- 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., DE CARLO A., 2003 - *Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees*. In: *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Jain S.M. & Ishii K. Eds., Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, pp. 815-840.
- LAMBARDI M., BENELLI C., 2007 - *La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree* - Frutticoltura, 6: 34-39.
- 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., DE CARLO A., 2009 - *Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale*. - Italus Hortus, 16(1): 79-98.
- LAMBARDI M., BENELLI C., DE CARLO A., OZUDOGRU E.A., PREVIATI A., ELLIS D., 2011 - *Cryopreservation of ancient apple cultivars of Veneto: a comparison between PVS2-vitrification and dormant bud techniques*. - Acta Hort., 908: 191-198.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2013 - *Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature* - Acta Hort., 988: 29-42.
- 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., YAMAMOTO S., FUKUI K., RAFIQUE T., ENGELMANN F., NIINO T., 2015 - *Cryopreservation of persimmon shoot tips from dormant buds using the D cryo-plate technique*. - Horticulture Journal, 84: 106-110.
- MONTALBÁN I.A., GARCÍA-MENDIGUREN O., MONCALEÁN P., 2016 - *Somatic embryogenesis in Pinus spp.* In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, Germanà M.A. & Lambardi M. Eds., Humana Press-Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London, pp. 405-416.
- MURASHIGE T., 1977 - *Plant cell and organ cultures as horticultural practices*. - Acta Hort., 78: 17-30.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. - Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- OZUDOGRU E.A., LAMBARDI M., 2016 - *Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants*. In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, Germanà M.A. & Lambardi M. Eds., Humana Press-Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London, pp. 537-550.
- PANIS B., LAMBARDI M., 2006 - *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)*. In: *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*, Ruane J. & Sonnino A. Eds., FAO, Rome, pp. 61-78.
- RBG Kew, 2016 - *State of the world's plants* - Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 82.
- REDENBAUGH K., 1993 - *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. - Boca Raton, CRC Press, pp. 481.
- SAKAI A., 1960 - *Survival of the twigs of woody plants at -196 °C* - Nature, 185: 393-394.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1990 - *Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification*. - Plant Cell Rep., 9: 30-33.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1991 - *Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis var. brasiliensis) cooled to -196 °C*. - J. Plant Physiol., 137: 463-470.
- SAKAI A., ENGELMANN F., 2007 - *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review*. - CryoLetters, 28: 151-72.
- SAKAI A., HIRAI D., NIINO T., 2008 - *Development of PVS2-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols*. In: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Reed B. Ed., Springer, Berlin, pp. 33-58.
- STANDARDI A., MICHELI M., 2013 - *Encapsulation on vitro-derived explants: an innovative tool for nurseries*. In: *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*, Lambardi M., Ozudogru E.A. & Jain S.M. Eds., Humana, Springer, New York, pp. 397-418.
- VUJOVIC T., CHATELET P., RUZIC D., ENGELMANN F., 2015 - *Cryopreservation of Prunus spp. using aluminium cryo-plates*. - Sci. Hortic., 195: 173-182.
- WANG Q.C., PANIS B., ENGELMANN F., LAMBARDI M., VALKONEN J.P.T., 2009 - *Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation*. - Ann. Appl. Biol., 154: 351-363.

NOTE SU CONSERVAZIONE A BASSE TEMPERATURE DI CEPPI DI ACARI UTILIZZABILI PER IL CONTROLLO BIOLOGICO

SAURO SIMONI^a - ENRICO DE LILLO^b

^a (CREA-DC) – Centro di ricerca per la Difesa e la Certificazione, Via Lanciola 12/a, 50125, Firenze, Italia; e-mail: sauro.simoni@crea.gov.it

^b Università degli Studi di Bari Aldo Moro – Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.). Via G. Amendola, 165/a, 70126, Bari, Italia; e-mail: enrico.delillo@uniba.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

Notes on the cold storage of Acari applied as Biological Control Agents

Large debating was about the categorization of insects and mites as regard their responses to cold temperature. The chance to store species or particular strains of insects or mites, as parasitoids or predators, for long time is aimed to guarantee the availability of efficient natural enemies in order to face recrudescing pests or even new ones (alien species or species extending their geographical distribution).

The exposure to cold temperature in outdoor environment as well as in artificial cold storage conditions may reshape behavior and performances of the involved arthropods. Predatory mites of the family Phytoseiidae are important and largely commercialized natural enemies applied against phytophagous pests like mites and small insects. To determine their efficiency in different uses and storage, the low temperature as stressor must be: considered in the pattern of definitions to be evaluated together with the other biological and behavioral traits; quantified to which extent cold susceptibility may affect the biocontrol efficacy.

KEY WORDS: low temperature, IPM, biological control, cold tolerance, phytoseiids.

INTRODUZIONE

L’introduzione, il potenziamento ed il continuo utilizzo di nemici naturali nel controllo biologico (Biological Control Agents: BCA) degli organismi nocivi riscuotono sempre più attenzione perché sono in grado di elevare la resilienza di un agroecosistema vessato da avversità, biotiche e abiotiche, e sottoposto a pressioni di carattere fitosanitario, fornendo così un indiscutibile vantaggio dal punto di vista economico, della salute umana e dell’impatto ambientale (SIMONI, 2015).

La produzione massale degli organismi antagonisti degli acari e insetti fitofagi è, in qualche modo forzatamente, arbitraria in termini di numero di individui prodotti per intervallo di tempo. La consistenza della produzione può dipendere da esigenze contingenti e impreviste (es.: densità elevate di un determinato fitofago, particolari andamenti climatici). Il mantenimento nel lungo periodo di determinati BCA è fondamentale per soddisfare un’esigenza di aumentare la popolazione di un allevamento specifico, all’occorrenza necessario, che fornisca una congrua disponibilità del BCA necessario.

Oltre alle esigenze strumentali del processo industriale necessarie nel breve periodo con tutte le logistiche e

i requisiti associati per tale produzione (materiali di produzione e confezionamento, specie antagonista prodotta, ingredienti per la dieta artificiale, continua manutenzione di impianti e attrezzature, distribuzione del materiale con modalità spesso dispendiose), si impone l’esigenza di mantenere attive nel medio-lungo termine linee di allevamento senza decremento delle caratteristiche qualitative del BCA con particolare riguardo all’efficienza predatoria, al tasso di fertilità e alla bassa mortalità durante l’allevamento.

La conservazione a temperature basse (prossime a 0°C) e ultrabasse (decine di gradi <0°C) dei BCA rappresenta una delle sfide e delle strategie più importanti utilizzate per facilitare il mantenimento, la produzione di massa e la loro applicazione per il controllo biologico e il controllo integrato dei fitofagi (GLENISTER e HOFFMAN, 1998; VAN LENTEREN, 2003). La conservazione a breve termine può aiutare il produttore a bilanciare le differenze momentanee tra l’offerta e la richiesta di BCA; lo stoccaggio a lungo termine può consentire il ripristino di un allevamento di tipo stagionale. In entrambi i casi, si ridurrebbero i costi di produzione. Una conservazione dei BCA a bassa temperatura potrebbe consentire (1) un prolungamento della loro longevità riducendo il tasso metabolico dell’organismo allevato, (2) una spedizione di BCA a

lunga distanza riducendo la mortalità per inedia, (3) una sincronizzazione delle abbondanze dell'antagonista e della preda/ospite (MORALES-RAMOS *et al.*, 2014).

La temperatura corporea degli artropodi, in quanto pecilotermi, fluttua direttamente con quella ambientale, rendendo questi organismi sensibili ai cambiamenti del clima locale (POWELL e LOGAN, 2005) anche se naturalmente capaci di resistere o adattarsi a condizioni critiche. Lo studio della resistenza al freddo di un BCA è un utile esercizio per fornire indicazione di come l'organismo possa sopravvivere in condizioni critiche che potrebbero essere applicate durante la conservazione a bassa temperatura e rispetto a un clima che potrebbe agire come fattore limitante indipendente, però, dall'influenza che potrebbe esercitare sull'incremento di densità della popolazione (BALE, 1991).

NOTE SULLA SUSCETTIBILITÀ ALLA BASSA TEMPERATURA DEGLI ARTROPODI

Per insetti ed acari, in modo affine, il fabbisogno termico è spesso modellizzato facendo riferimento alla temperatura giornaliera minima e massima (ALLEN, 1976). La resistenza al freddo, frequentemente espressa con l'indicazione di soglie numeriche, è la combinazione delle caratteristiche fisiologiche necessarie per evitare gli effetti dannosi sull'organismo delle basse temperature sperimentate, ad esempio, durante l'inverno (BALE, 1987).

Va riconosciuto come si sia sviluppato un notevole dibattito su quelle che sono le categorie cui ascrivere i vari organismi in base alla risposta alle basse temperature. La ricerca sulla tolleranza al freddo di insetti e acari e sulla possibilità di sfruttare temperature basse e ultrabasse per la conservazione di questi organismi e la loro successiva applicazione si è alimentata negli ultimi decenni di contributi e tentativi di standardizzazione delle definizioni. Tali ricerche hanno individuato convenzionalmente due strategie di sopravvivenza a freddo: (1) resistenza al congelamento, in genere rappresentata dalla temperatura limite sottozero a cui gli organismi sopravvivono e non si verifica la formazione di cristalli di ghiaccio nel loro corpo e (2) tolleranza al congelamento, rappresentata dalla temperatura limite sotto zero a cui gli organismi sopravvivono resistendo alla formazione di ghiaccio nel loro corpo (LEE, 1991; BALE, 2002).

Questo paradigma ha costituito il quadro entro il quale si sono sviluppati un numero di studi comparativi e su singole specie (ad esempio, quelli rivisti da LEE, 1991), in cui il punto di sovraraffreddamento (supercooling SCP: la temperatura alla quale un animale si congela) è stato enfatizzato come indicatore di "strategia", di temperatura inferiore letale e, di fatto,

di resistenza al freddo (BAUST e ROJAS, 1985). La riflessione avanzata da BAUST e ROJAS (1985) del SCP come misura fenomenologica e una successiva valutazione di BALE (1987) hanno portato a un maggiore scetticismo sulla dicotomia di tolleranza/intolleranza al congelamento come unico descrittore della resistenza. Da questo processo ne è derivato che SCP non era necessariamente correlato alla resistenza alla bassa temperatura in quegli animali che erano intolleranti al congelamento (BALE, 1993). La resistenza al freddo veniva definita come caratteristica degli organismi *in continuum* proponendo una nuova categorizzazione della tolleranza al freddo degli insetti, passando dal meno al più resistente al freddo, in base alla condizione a cui si verifica la loro morte (BALE, 1996), secondo il seguente ordine: *opportunistic*, specie opportunistiche che non possono entrare in uno stato inattivo e soccombono quando le temperature sono troppo basse per mantenere il normale metabolismo; *chill-susceptible*, specie sensibili al freddo che muoiono dopo un breve periodo di raffreddamento a temperature più o meno marcatamente sotto lo zero; *chill-tolerant*, specie altamente o moderatamente resistenti che muoiono dopo un raffreddamento prolungato a temperature sotto lo zero; *freeze-avoiding*, specie che possono anche sopravvivere per periodi discreti al di sotto del punto di sovrافusione ma soccombono al proprio punto di SCP; *freeze-tolerant*, le specie di insetti tolleranti al congelamento e che possono sopravvivere alla formazione di ghiaccio nei loro tessuti.

La citata classificazione è stata oggetto di discussione da parte di SINCLAIR (1999) il quale, basandosi sulla relazione tra punto di congelamento SCP e temperatura letale inferiore (*lower lethal temperature LLT*), ha argomentato (1) che la tolleranza al congelamento non è una parte di un continuum ma piuttosto una strategia distinta, parallela e, quindi, alternativa e messa in atto da quegli insetti che non possono sopravvivere al congelamento; (2) che all'interno della tolleranza al congelamento vi sono gruppi che rappresentano diverse tolleranze ambientali e forniscono focolai utili per la ricerca comparativa; (3) che questa visione può essere integrata nella descrizione di BALE (1996) della categoria *freeze-avoidance* (Fig. 1).

NOTE SULLA SUSCETTIBILITÀ DEGLI ACARI ALLA BASSA TEMPERATURA

Lo studio di ZHAO e AMRINE (1997) ha evidenziato come gli acari, in particolare i fitofagi eriofidi e tenuipalpidi, raccolti in seguito a precipitazioni nevose, oltre a essere potenzialmente trasportati a lunga distanza nell'atmosfera, riescano a resistere presumibilmente a temperature bassissime nelle nuvole in quota (Tab. 1). Già precedentemente, SLYKHUIS

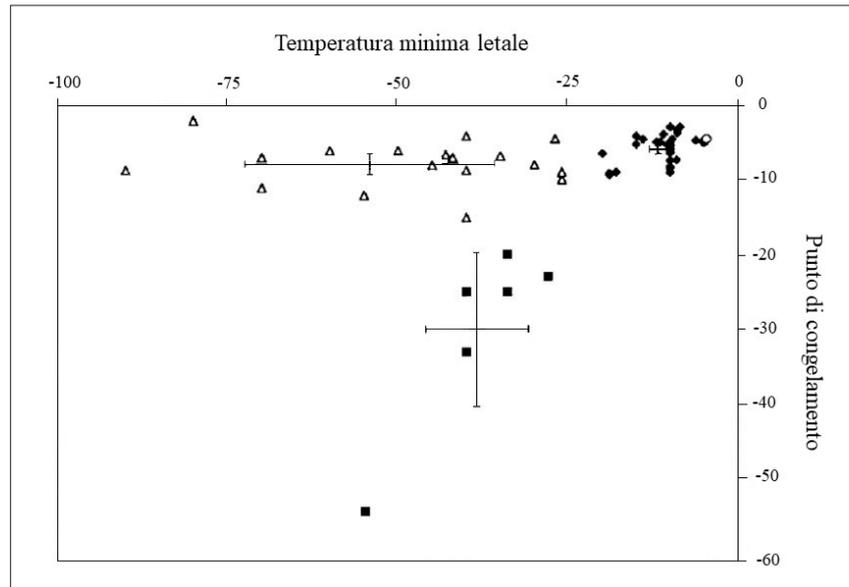


Fig. 1 – Relazione tra punto di congelamento e temperatura minima letale per 53 specie di insetti tolleranti al freddo. I gruppi sono stati definiti a priori quali: ○ = parzialmente tolleranti; ◆ = moderatamente tolleranti; △ = altamente tolleranti; ■ = tolleranti con basso punto di congelamento. (Modificato da SINCLAIR, 1999).

Tabella 1 – Screening e distribuzione degli acari reperiti nel materiale nevoso caduto in West Virginia (modificato da ZHAO e AMRINE, 1997).

Taxa	Numero di specie	Numero di individui	Taxa	Numero di specie	Numero di individui
Phytoptidae			Mesostigmata		
<i>Trisetacus</i>	1	1	Phytoseiidae	2	2
<i>Nalepella</i>	2	3			
Eriophyidae			Prostigmata		
<i>Abacarus</i>	1	1	Anystidae	1	1
<i>Acarelliptus</i>	1	6	Cheyletidae	1	3
<i>Aceria</i>	4	5	Tarsonemidae	4	43
<i>Aculops</i>	1	1	Tetranychidae	4	4
<i>Aculus</i>	13	17	Tydeidae	4	3
<i>Anthocoptes</i>	3	5	Astigmata		
<i>Cecidophyes</i>	1	1	Chaetodactylidae	1	1
<i>Epitrimerus</i>	5	5	Glycyphagidae	2	4
<i>Neorhynacus</i>	1	1	Saproglyphidae	1	1
<i>Phyllocoptes</i>	1	3	Sarcoptidae	1	1
<i>Tetra</i>	6	9			
<i>Vasates</i>	11	29	Cryptostigmata	9	12

(1955) aveva osservato una rilevante tolleranza di *Aceria tulipae* al freddo in quanto questo eriofide era risultato capace di sopravvivere su piante test per 1 giorno a -20°C e 8 giorni a -10°C.

L'approccio biomolecolare di XU *et al.* (2018), avente come modello l'acaro fitoseide *Neoseiulus barkeri* (Hughes), ha consentito di esplorare l'espressione di quattro geni codificanti proteine dello shock termico in un ceppo convenzionale e in un ceppo adattato alle alte temperature. Il cDNA di questi quattro geni è stato clonato e caratterizzato. L'espressione di questi geni è stata indagata con l'esposizione delle popolazioni a stress da caldo e da freddo di breve durata. I risultati hanno evidenziato che l'acclimatazione alla temperatura ambientale, pur modellando parzialmente la variabilità intraspecifica delle risposte alle variazioni termiche (ZHANG *et al.*, 2018), riduce la tolleranza al freddo

negli acari adattati alle alte temperature. Ne deriva una diversità nella tolleranza al freddo tra i due ceppi di *N. barkeri* saggiati e suggerisce di considerare questo aspetto nella selezione delle popolazioni da destinare alla commercializzazione per il controllo biologico dei fitofagi in condizioni climatiche più favorevoli a una o all'altra popolazione.

PROSPETTIVE DI UTILIZZO DI CEPPI SELEZIONATI DI FITOSEIDI

I modelli di fenologia degli insetti e degli acari dipendenti dalla temperatura consentono di esaminare il suo impatto sulle distribuzioni geografiche, sulla dinamica della popolazione e loro gestione, sulla vitalità in prossimità della soglia termiche. La misu-

razione della risposta dello sviluppo, della sopravvivenza e della riproduzione degli insetti e degli acari alla temperatura è stata sovente riportata in contesti di ampia variabilità e non in condizioni di massima verosimiglianza: ad esempio, si riportano evidenze derivanti da individui che passano solo una parte del loro sviluppo ad una temperatura estrema (vicino alla soglia) e vengono quindi posti in condizioni ottimali per completare il loro sviluppo con un più alto tasso di sopravvivenza. La resistenza a un veloce raffreddamento (*Rapid cold hardening*, RCH) può essere indotta attraverso una breve esposizione, da minuti a poche ore, a condizioni di stress subletale quali alte e basse temperature o perdita di contenuto idrico (BROUFAS e KOVEOS, 2001; KHODAYARI *et al.*, 2013). La protezione dell'organismo è normalmente associata alla produzione di sostanze a funzione protettiva quali glicerolo e alla modifica della permeabilità di membrana (BRYON *et al.*, 2017). La protezione acquisita durante la fase RCH viene rapidamente perduta con il ritorno alle normali condizioni ambientali (LEE e DENLINGER, 2010) e, se non vi è una stagione particolarmente rigida, può essere ristretta a uno specifico stadio di sviluppo (LEE, 1991). È da auspicare un approccio che renda possibile lo sviluppo di studi basati sulla fenologia comprensiva e sull'uso integrale delle informazioni disponibili che aiuteranno lo sviluppo di potenti strumenti per analizzare il comportamento di una popolazione di insetti, a partire dalle loro pullulazioni, e la risposta ai cambiamenti climatici (RÉGNIERE *et al.*, 2012)

Date le caratteristiche biologiche dei fitoseidi, per plasticità biologica e adattabilità ambientale, e il loro sempre più marcato interesse commerciale e largo impiego nella difesa delle colture (MCMURTRY *et al.*, 2015), si ritiene di significativa utilità approfondire e possibilmente definire nel modo più oggettivo possibile il rapporto di questi predatori rispetto a temperature basse, ultrasbasse e cadute termiche repentine, oltre agli altri studi finalizzati alla loro caratterizzazione biologica ed ecologica. Nel caso dei fitoseidi sembra opportuno identificare le potenzialità e i feedback delle specie commercializzate o potenzialmente tali rispetto alle condizioni termiche meno favorevoli per rispondere alla duplice aspettativa di disporre di un allevamento che possa perdurare nel tempo e di ottenere un predatore efficiente a copertura anche di condizioni estreme di temperatura. In questo contesto, appare fondamentale anche la capacità delle specie di fitoseidi di “riconoscere” gli indizi delle condizioni invernali in arrivo ed entrare nello stato ipometabolico di diapausa per aumentare la probabilità di sopravvivenza. Per prevenire lo stabilimento al di fuori della serra, è necessario esaminare la fisiologia degli agenti di controllo biologico candidati per poter sopravvivere alle tipiche condizioni invernali. Se la specie incontra

temperature al di sopra della soglia di sviluppo durante l'inverno, il ciclo di vita può essere completato, nuove generazioni sopravvivere e mantenersi per lungo periodo (HATHERLY *et al.*, 2005).

Parallelamente, si è verificato come la tolleranza al freddo, combinandosi alla estensione delle isoterme degli areali geografici, sia uno dei fattori più rilevanti nel determinare la diffusione dei fitofagi più importanti, sia nel caso di specie aliene che nel caso di specie residenti che modificano la loro area di presidio (ZHAO e AMRINE, 1999; WHITE *et al.*, 2018) rappresentando causa di nuove emergenze fitosanitarie. Prendendo come esempio *Tetranychus urticae* Koch, acaro fitofago divenuto altamente invasivo e dannoso per l'agricoltura, si può affermare che sono stati e tuttora sono approfonditi l'abilità dell'acaro di sviluppare resistenza ai pesticidi, la sua risposta alle tossine delle piante, le modifiche nella gamma di piante ospiti e la differenziazione genetica tra le popolazioni (NAVAJAS *et al.*, 2000; van LEEUWEN *et al.*, 2010; DERMAUW *et al.*, 2013). Al contrario, la biologia termica di questa specie è meno ben caratterizzata, anche se ugualmente importante, perché, in regioni temperate, le temperature invernali possono essere considerate come uno dei fattori più importanti che influenzano il potenziale di adattamento degli artropodi e la conseguente adozione di antagonisti efficienti (VAN LENTEREN *et al.*, 2006).

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, J. C. 1976 – *A modified sine wave method for calculating degree days*. - Environ. Entomol., 5: 388-396.
- BALE J. S., 1987 – *Insect cold hardiness: freezing and supercooling: an ecophysiological perspective*. - J. Insect Physiol., 33: 899-908.
- BALE, J.S. 1991 – *Insects at low temperature: A predictable relationship?* - Funct. Ecol., 5: 291-298.
- BALE, J.S. 1993 – *Classes of insect cold hardiness*. - Funct. Ecol., 7: 751-753.
- BALE, J.S. 1996 – *Insect cold hardiness: A matter of life and death*. - Eur. J. Entomol., 93: 369-382.
- BALE J.S., 2002 – *Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance*. - Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 357(1423): 849-862.
- BAUST J.G., ROJAS R.R., 1985 – *Insect cold hardiness: Facts and fancy*. - J. Insect Physiol., 31: 755-759.
- BROUFAS G.D., KOVEOS D.S., 2001 – *Rapid cold hardening in the predatory mite Euseius (Amblyseius) finlandicus (Acari: Phytoseiidae)*. - J. Insect Physiol., 47(7): 699-708.
- BRYON A., KURLOVS ANDRE H., VAN LEEUWEN T., CLARK R.M., 2017 – *A molecular-genetic understanding of diapause in spider mites: current knowledge and future directions*. - Physiol. Entomol., 42: 211-224.
- DERMAUW W., WYBOUW N., ROMBAUTS S., MENTEN B., VONTAS J., GRBIC M., CLARK R.M., FEYEREISEN R., VAN LEEUWEN T., 2013 – *A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider Tetranychus urticae*. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - DOI: 10.1073/pnas.1213214110
- GLENISTER C.S., HOFFMANN M.P., 1998 – *Mass-reared natural enemies: scientific, technological, and informational needs and considerations*. In: R.L. Ridgway, M.P. Hoffmann, M.N. Inscoc and C.S. Glenister (eds), *Mass Reared Natural Enemies: Application, Regulation, and Needs*. Proceedings: Thomas Say Publications in Entomology, Entomol. Soc. America. Lanham, MD.:242-267.

- HATHERLY I.S., BALE J.S., WALTERS K.F.A., 2005 – *U.K. winter egg survival in the field and laboratory diapause of Typhlodromips montdorensis*. - *Physiol. Entomol.*, 30(1): 87-91.
- KHODAYARI S., MOHARRAMIPOUR S., LARVOR V., HIDALGO K., RENAULT D., 2013 – *Deciphering the Metabolic Changes Associated with Diapause Syndrome and Cold Acclimation in the Two-Spotted Spider Mite Tetranychus urticae*. – *PLOS One*, 8: e54025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054025>
- LEE R.E., 1991 – *Principles of Insect Low Temperature Tolerance*. In: *Insects at Low Temperature*, Lee R.E. & Denlinger D.L. (eds), Springer, Boston, MA.
- LEE R.E., DENLINGER D.L., 2010 – *Rapid cold-hardening: ecological significance and underpinning mechanisms*. In: *Low Temperature Biology of Insects*, Denlinger D.L. & Lee R.E. (eds), Cambridge: Cambridge University Press, pp. 35-58.
- MCMURTRY J.A., SOURASSOU N.F., DEMITE P.R., 2015 – *The Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) as Biological Control Agents*. In: *Series Progress in Biological Control - Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms*. Carrillo D., de Moraes G. J., Peña J. E. (eds), Springer International Publishing, 19: 133-149.
- MORALES-RAMOS J.A., GUADALUPE ROJAS M., SHAPIRO-ILAN D.I., 2014 – *Mass Production of Beneficial Organisms, Invertebrates and Entomopathogens*. Publisher: Academic Press Editor: J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, and D.I. Shapiro Ilan (eds) ISBN: 978-0-12-391453-8
- NAVAJAS M., TSAGKARAKOU A., LAGNEL J., PERROT-MINNOT M.J., 2000 – *Genetic differentiation in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): polymorphism, host races or sibling species?* – *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 365-376.
- POWELL J.A., LOGAN J.A., 2005 – *Insect seasonality - circle map analysis of temperature-driven life cycles*. - *Theor. Popul. Biol.*, 67:161-179.
- RÉGNÈRE J., POWELL J., BENTZ B., NEALIS V., 2012 – *Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling*. - *J. Insect Physiol.*, 58(5): 634-647.
- SIMONI, S., 2015 – *I fitoseidi, acari predatori: life style types e prospettive nel controllo di acari fitofagi*. - *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, Anno LXIII, 2015: 123-130.
- SINCLAIR B.J., 1999 – *Insect cold tolerance: How many kinds of frozen?* - *Eur. J. Entomol.*, 96: 157-164.
- SINCLAIR B.J., COELLO ALVARADO L.E., FERGUSON L.V., 2015 – *An invitation to measure insect cold tolerance: Methods, approaches, and workflow*. - *J. Therm. Biol.*, 53: 180-197.
- SLYKHUIS J.T., 1955 – *Aceria tulipae in relation to the spread of wheat streak mosaic*. - *Phytopathol.* 45: 116-128.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., DERMAUW W., TIRRY L., 2010 – *Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: a review*. - *Insect Biochem. Molec.*, 40: 563-572.
- VAN LENTEREN J.C., 2003 – *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*. - Wallingford, UK: CAB Int. 327 pp.
- VAN LENTEREN J.C., BALE J.S., BIGLER E., HOKKANEN H.M.T., LOOMANS A.J.M., 2006 – *Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests*. - *Ann. Rev. Entomol.*, 51: 609-634.
- WHITE N., BALE J.S., HAYWARD S.A.L., 2018 – *Life-history changes in the cold tolerance of the two-spot spider mite Tetranychus urticae: applications in pest control and establishment risk assessment*. - *Physiol. Entomol.*, 43: 334-345.
- XU Y.-J., LIU L., YANG Y., WANG X., TIAN C.-B., LI Y.-Y., CHEN H.-Q., LIU H., 2018 – *Identification of four heat shock protein genes and their expression in response to thermal stress in two strains of Neoseiulus barkeri (Acari: Phytoseiidae)*. - *Syst. Appl. Acarol.*, 23(4): 665-680.
- ZHANG G.-H., LI Y.-Y., TIAN C.-B., XU Y.-J., ZHOU H.-W., HUANG J., WANG J.-J., LIU H., 2018 – *Intraspecific variations on thermal susceptibility in the predatory mite Neoseiulus barkeri Hughes (Acari: Phytoseiidae): Responding to long-term heat acclimations and frequent heat hardenings*. - *Biol. Control*, 121: 208-215.
- ZHAO S., AMRINE J.W., 1997 – *Investigation of snowborne mites (Acari) and relevancy to dispersal*. - *Int. J. Acarol.*, 23: 209-213.

94 - Pagina bianca

TECNICHE PER LA CRIOCONSERVAZIONE DI MICRORGANISMI ENTOMOPATOGENI

GIAN PAOLO BARZANTI^a - VALERIA FRANCARDI^a

^a CREA – Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via Lanciola 12/a, 50125 Firenze, Italy; E-mail: gianpaolo.barzanti@crea.gov.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

Cryopreservation techniques for entomopathogenic micro-organisms.

The possibility of a long-term storage able to preserve the original characteristics of every isolate is necessary for studies on entomopathogenic fungi and for their possible use in field trials. In this paper, the most commonly used methods are presented together with a brief pros and cons discussion and some published examples. Results from a study on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* carried over at the Research Centre for Plant Protection and Certification of Firenze (CREA) are also reported and discussed.

KEY WORDS: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, long-term storage, metabolism.

INTRODUZIONE

Ogni serio studio micologico presuppone la disponibilità di colture fungine vitali e con caratteristiche costanti nel tempo. Ciò è particolarmente vero per gli studi che riguardano i funghi entomopatogeni con i quali si cerca di ottenere un controllo di tipo biologico dei tanti insetti dannosi alle colture agricole e alle piante in generale. Nel caso poi di isolati che risultino particolarmente interessanti, è necessario prevedere, per studi ed eventuali applicazioni future, una possibilità di conservazione a lungo termine tale da preservare la vitalità, la purezza e le caratteristiche morfo-fisiologiche e genetiche dell’esemplare. Questo problema è stato affrontato in molti modi diversi, ognuno con i suoi punti di forza e di debolezza. Non esistono quindi metodi universali per la conservazione a lungo termine delle colture fungine e dato che è praticamente impossibile escludere completamente la possibilità di causare danni collaterali indesiderati alle colture stesse, è sempre necessario bilanciare i vantaggi e gli svantaggi dei differenti metodi. Per queste ragioni è anche sempre consigliabile prevedere più di un metodo di conservazione per i propri isolati. Queste problematiche si pongono in modo particolarmente pressante per coloro che si trovano a gestire collezioni piuttosto consistenti di microrganismi (OLIVEIRA *et al.*, 2011; HUMBER, 2012; HOMOLKA, 2013; AYALA-ZERMENO *et al.*, 2017).

Da principio le collezioni fungine venivano mantenute attraverso successivi trasferimenti delle

colonie da un substrato nutritivo esaurito ad uno più fresco: è un metodo ancora usato, soprattutto in certe condizioni, ma sicuramente richiede molto tempo, presenta alti rischi di contaminazione delle colture e non garantisce contro modificazioni genetiche e fisiologiche (degenerazione, invecchiamento) nel caso di trasferimenti frequenti e protratti nel tempo (HOMOLKA, 2013). Nel 1939 Castellani propose di conservare i funghi in acqua distillata sterile: da quel momento in poi molti metodi sono stati studiati, proposti e migliorati nel tempo (PASARELL e MCGINNIS, 1992). Secondo GALLO *et al.* (2008), questi possono essere suddivisi in due gruppi a seconda che il metabolismo dei microrganismi venga mantenuto, almeno parzialmente, attivo o che risulti più o meno completamente sospeso.

A parte il trasferimento di sotto-colture su substrato agarizzato, di cui si è già detto, al primo gruppo appartengono i metodi di che si basano sulla conservazione in acqua sterile, sotto uno strato di olio minerale, a basse temperature (5-8°C) o sul congelamento (-20°C).

La sospensione del metabolismo degli isolati fungini può essere invece ottenuta tramite essiccazione su gel di silice, liofilizzazione, conservazione a ultrabasse temperature in congelatori meccanici (-70/-80°C) o in azoto liquido (-196°C). Secondo il recentissimo lavoro di AYALA-ZERMENO *et al.* (2017), i metodi appartenenti a questo secondo gruppo sono i migliori per la conservazione a lungo termine dei funghi entomopatogeni, ma i risultati possono variare a seconda dell’uso o meno di crioprotettivi, del loro

tipo e, in generale, del protocollo utilizzato. Come crioprotettivi possono essere utilizzati sia agenti penetranti, che attraversano rapidamente la membrana cellulare e proteggono le cellule dall'interno e dall'esterno (glicerolo, dimetil-solfossido DMSO), sia agenti non penetranti, che proteggono le cellule restando all'esterno della membrana cellulare (saccarosio, lattosio, glucosio e altri). Per i funghi, i più efficaci sembrano essere glicerolo e DMSO (NAKASONE *et al.*, 2004).

Tutti questi metodi si sono rivelati capaci di mantenere vitali le colture per uno o più anni senza ricorrere a continui trasferimenti: i problemi sorgono con l'innata variabilità di alcuni dei microrganismi che si vogliono conservare (non tutti gli esemplari di una stessa specie rispondono allo stesso modo) e con la eventuale modificazione delle iniziali caratteristiche fisiologiche e genetiche (PASARELL e MCGINNIS, 1992).

Come già accennato, vari sono i parametri che si possono testare per verificare l'efficacia di un metodo di conservazione delle colture fungine. Il primo, e il più ovvio, è la vitalità, ma non è certo sufficiente a stabilire il successo di un dato procedimento. Fondamentale è il mantenimento delle caratteristiche genetiche e fisiologiche come crescita, morfologia e produzione di metaboliti (HOMOLKA, 2013). Per valutare l'insorgenza di possibili alterazioni genetiche su basidiomiceti e funghi micorrizici, VOYRON *et al.* (2009) e LALAYMIA *et al.* (2013) hanno utilizzato la tecnica AFLP (amplified fragment length polymorphisms), mentre con *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, RYAN *et al.* (2001) si sono basati sulle ISSRs (inter-simple sequence repeats). Markers AFLP sono stati utilizzati anche da AYALA-ZERMENO *et al.* (2017) per valutare la stabilità genetica post-conservazione di altre sei specie di funghi entomopatogeni. In altri casi, su funghi commestibili (SINGH *et al.*, 2004), sono stati confrontati i profili RAPD (random amplified polymorphic DNA) e ITS (internal transcribed spacer) pre- e post-conservazione. Secondo HOMOLKA (2013), però, per individuare piccolissime (anche puntuali) ma importanti mutazioni è necessario ricorrere al sequenziamento (HOMOLKA *et al.*, 2010). Nel caso dei funghi entomopatogeni, è molto importante verificare il mantenimento delle caratteristiche di patogenicità dei singoli isolati, ma non sono molti gli studi riguardanti questo aspetto: MARQUES *et al.* (2000) hanno verificato il mantenimento della virulenza di un isolato di *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin fino a 80 mesi di conservazione a -7°C; RYAN *et al.* (2001) hanno verificato gli effetti di liofilizzazione e crioconservazione di *M. anisopliae* e altri funghi sulla produzione di metaboliti secondari e di enzimi extra-cellulari; Toegel *et al.* (2010)

hanno studiato l'effetto della liofilizzazione sulla produzione di metaboliti secondari come destrusina A e B e oosporeina in *B. brognartii* (Sacc.) Petch e *M. anisopliae*.

Seguendo questo filone d'indagine, presso il nostro Centro (dove è conservata una collezione di quasi 500 isolati fungini in massima parte entomopatogeni) sono stati studiati gli effetti di crioconservazione e liofilizzazione nei confronti di *B. bassiana* e *M. anisopliae*. In particolare è stata presa in considerazione la capacità patogenica nei confronti di larve di *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e l'attività enzimatica delle proteasi totali, e delle proteasi Pr1 (proteasi di tipo "subtilisina") e Pr2 (proteasi di tipo "tripsina") che sembrano svolgere un ruolo molto importante nella fase di penetrazione della cuticola dell'insetto ospite (GILLESPIE *et al.*, 1998; SHAH *et al.*, 2005).

UN CASO PRATICO

MATERIALI E METODI

Il nostro studio (CITO *et al.*, 2015) ha interessato tre isolati di *B. bassiana* (B 13/I03, B 13/I57,

B 13/I63) e tre di *M. anisopliae* (M 13/I05, M 13/I12, M 13/I33) ottenuti da larve, pupe e adulti di *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae), il punteruolo rosso delle palme, raccolti in Toscana e Sicilia nel corso del 2013. Gli isolati sono stati purificati, messi in coltura su substrato agarizzato e identificati tramite sequenziamento della regione ITS (internal transcribed spacer, primer universali ITS1 e ITS4).

Prima di sottoporre gli isolati a crioconservazione e liofilizzazione, sono state analizzate alcune caratteristiche morfo-fisiologiche (crescita radiale delle colonie, produzione conidica e loro germinabilità) e l'attività enzimatica (proteasi totali, Pr1 e Pr2). Sono stati anche eseguiti dei saggi di entomopatogenicità nei confronti di larve di *T. molitor*, classico insetto test da laboratorio.

Contemporaneamente, tasselli prelevati dalle stesse colonie utilizzate per le analisi suddette sono stati sottoposti alle procedure di conservazione. Per la crioconservazione, singoli tasselli di colonia fungina sono stati posti in criotubi da 1,5 ml contenenti una soluzione sterile di glicerolo al 10% in acqua e trasferiti in freezer a -80°C. Per la liofilizzazione, invece, i singoli tasselli sono stati posti in provette tipo "ependorf" da 1,5 ml, messi in congelatore a -20°C per 24 h, liofilizzati e nuovamente trasferiti a -20°C. Dopo 7 mesi, le colture sottoposte a crioconservazione e liofilizzazione sono state rivitalizzate trasferendole in incubatore a 25°C, al buio, su substrato agarizzato

fresco. Dopo 15 giorni di incubazione sono state nuovamente valutate la crescita radiale, la produzione di conidi e la loro germinabilità, così come sono stati ripetuti i saggi sull'attività enzimatica e le prove di entomopatogenicità su larve di *T. molitor*.

RISULTATI

Per quanto riguarda gli aspetti morfologici, i 7 mesi di conservazione con le due differenti tecniche non hanno portato a significative variazioni dei parametri (Tabella 1). L'attività enzimatica delle proteasi totali ha avuto un calo significativo solo in due isolati di *B. bassiana* (B 13/I57 e B 13/I63) sottoposti a crioconservazione (Figura 1.1). Escludendo l'isolato di *M. anisopliae* M 13/I05 sottoposto a liofilizzazione, in tutti gli altri casi si è avuta una riduzione significativa dell'attività enzimatica di Pr1 a seguito del periodo di conservazione alle condizioni testate (Figura 1.2). Lo stesso discorso vale per l'attività enzimatica di Pr2 con la sola esclusione, anche in questo caso, dell'isolato M 13/I05 sottoposto a liofilizzazione (Figura 1.3). Riguardo ai saggi di entomopatogenicità, le percentuali di mortalità a 20 giorni causate dai vari isolati hanno mostrato un calo significativo solo nel caso dell'isolato di *B. bassiana* B13/I63 sottoposto sia a crioconservazione che a liofilizzazione (Tabella 2).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In conclusione, il nostro studio ha messo in evidenza come i due metodi di saggiati siano risultati, in generale, entrambi validi per la conservazione di *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Infatti, pur registrando un calo nelle attività enzimatiche di Pr1 e Pr2, gli isolati utilizzati nelle prove hanno mantenuto le proprie caratteristiche morfo-fisiologiche e, con l'eccezione di un isolato di *Beauveria*, le proprie capacità entomopatogene. I nostri risultati

confermano, a questo proposito, anche la presenza di variabilità intraspecifica riguardo alla capacità di ogni isolato di reagire allo stress dovuto al processo di conservazione e la necessità quindi di valutarne l'esito caso per caso. Nonostante Pr1 e Pr2 siano risultati, in studi precedenti (GILLESPIE *et al.*, 1998), enzimi importanti nel processo di pene-

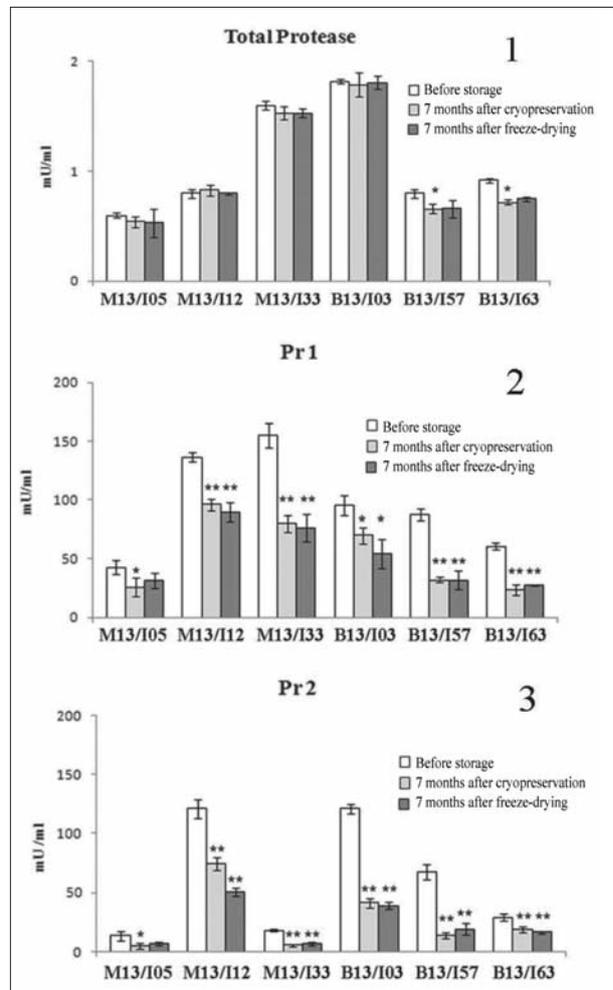


Figura 1 – Attività enzimatica delle proteasi totali (1), Pr1 (2) e Pr2 (3). Ogni valore riportato rappresenta la media (media ± deviazione standard) di tre replicati. Significatività statistica: * p < 0.05; ** p < 0.01.

Tabella 1 – Crescita radiale delle colonie, produzione conidica e tasso di germinabilità degli isolati di *B. bassiana* e *M. anisopliae* valutati prima e dopo i sette mesi di conservazione con i due differenti metodi.

Fungal strains	Daily Radial Growth (mm/day ⁻¹)			Conidia Production (number of conidia/mL ⁻¹)			Germination rate (%) ^a		
	Before storage	Cryo.	Freeze-drying	Before storage	Cryo.	Freeze-drying	Before storage	Cryo.	Freeze-drying
M 13/I05	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.7 ± 1.4	2.4 ± 1	2.6 ± 1.3	96 ± 2.2	93 ± 5.2	98 ± 1.1
M 13/I12	2.0 ± 0.6	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.4	98 ± 5.9	99 ± 0.8	99 ± 0.1
M 13/I33	1.8 ± 0.7	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.7 ± 0.4	2.6 ± 1.4	2.6 ± 1.6	98 ± 3.1	99 ± 0.4	98 ± 2.2
B 13/I03	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.5	1.7 ± 0.7	1.6 ± 0.8	1.4 ± 0.3	97 ± 1.1	98 ± 0.9	98 ± 1.1
B 13/I57	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.9	2.6 ± 0.2	98 ± 1.9	99 ± 0.4	99 ± 0.3
B 13/I63	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.3	1.9 ± 0.4	3.0 ± 0.7	2.5 ± 0.5	2.4 ± 1.2	99 ± 1.1	99 ± 0.5	99 ± 0.8

^a data were processed after Arcsin transformation

Tabella 2 – Risultati delle prove contro le larve di *Tenebrio molitor*.

Fungal strains	Mortality 20 days after inoculation (%) ^a		
	Before storage	7 months after cryopreservation	7 months after freeze-drying
M 13/I05	95	95	99
M 13/I12	98	93	85
M 13/I33	98	90	88
B 13/I03	77	70	68
B 13/I57	80	75	70
B 13/I63	98	65**	55**

^a data were processed after Arcsin transformation.
Statistical significance * p < 0.05; ** p < 0.01.

trazione all'interno dell'ospite da parte di *M. anisopliae*, nel nostro caso, la riduzione della loro attività conseguente al periodo di conservazione non sembra avere avuto influenza sulla capacità di aggressione degli isolati saggiati. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'entomopatogenicità di *B. bassiana* e *M. anisopliae* sia un fenomeno complesso che coinvolge diversi meccanismi e che sebbene le proteasi capaci di degradare la cuticola, specialmente Pr1 e Pr2, siano importanti fattori di virulenza, non siano quelli predominanti. Al contrario, l'attività delle proteasi totali è in generale ben conservata indipendentemente dall'isolato e dal metodo di conservazione considerato. Va però tenuto conto del fatto che in due isolati di *Beauveria* (B 13/I57 e B 13/I63) la crioconservazione alle nostre condizioni ha comunque portato ad una riduzione significativa di attività, anche se solo nel caso del secondo isolato tale riduzione si è abbinata ad una perdita di virulenza e questo sottolinea ancor una volta la complessità dei fenomeni di cui stiamo parlando.

Come ultima annotazione c'è da sottolineare che in un lavoro non ancora pubblicato, abbiamo potuto verificare il mantenimento delle capacità entomopatogene in altri due isolati di *B. bassiana* dopo averli conservati liofilizzati a -20°C per 36 mesi.

In conclusione, anche se i funghi entomopatogeni risultano relativamente “facili” da conservare, le tecniche scelte ed i protocolli operativi devono essere valutati attentamente, possibilmente per ogni singolo ceppo da sottoporre al trattamento, se si vogliono evitare perdite “dolorose”.

BIBLIGRAFIA

AYALA-ZERMEÑO M.A., GALLOU A., BERLANGA-PADILLA A.M., ANDRADE-MICHEL G.Y., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ J.C., ARREDONDO-BERNAL H.C., MONTESINOS-MATÍAS R., 2017 – *Viability, purity and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods*. - Fungal Biology (2017), doi: 10.1016/j.funbio.2017.07.007.

CASTELLANI A., 1939 – *The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water*. - Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 42: 225-226.

CITO A., FRANCARDI V., BARZANTI G.P., STRANGI A., SIMONI

S., ROVERSI P.F., 2015 – *Effects of cryopreservation and freeze-drying on proteases enzymatic activity of entomopathogenic strains of Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin and Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin*. - REDIA, 98: 49-55.

GALLO M.B.C., GUIMARÃES D.O., MOMESSO L. DA S., PUPO M.T., 2008 – *Natural products from endophytic fungi*. In: Microbial Biotechnology, Volume 4, Jain S. Ed., Publishing Agency, New Delhi, pp. 139-147.

GILLESPIE J.P., BATEMAN R., CHARNLEY A.K., 1998 – *Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of Metarhizium spp. for the desert locust, Schistocerca gregaria*. - Journal of Invertebrate Pathology, 71: 128-137.

HOMOLKA L., 2013 – *Methods of cryopreservation in fungi*. In: Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology, Gupta V.K. et al. Eds., Fungal Biology, DOI 10.1007/978-1-4614-2355-3, pp. 9-16.

HOMOLKA L., LISA L., EICHLEROVA I., VALASKOVA V., BALDRIAN P., 2010 – *Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics*. - Fungal Biology, 114: 929-935.

HUMBER R.A., 2012 – *Preservation of entomopathogenic fungal cultures*. In: Manual of techniques in invertebrate pathology. Second edition, Lacey L.A. Ed., Academic Press., Amsterdam, pp. 317-328.

LALAYMIA I., DECLERCK S., CRANENBROUCK S., 2013 – *Cryopreservation of in vitro-produced Rhizophagus species has minor effects on their morphology, physiology, and genetic stability*. - Mycorrhiza, 23: 675-682.

MARQUES E.J., ALVES S.B., MARQUES I.M.R., 2000 – *Virulence of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. to Diatraea saccharalis (F.) (Lepidoptera: Crambidae) after conidia storage at low temperature*. - An. Soc. Entomol. Brasil., 29(2): 303-307.

NAKASONE K.K., PETERSON S.W., JONG S.-C., 2004 – *Preservation and distribution of fungal cultures*. In: Biodiversity of Fungi, Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. Eds., Academic Press, Washington DC, pp. 37-47.

OLIVEIRA I., PEREIRA J.A., BENTO A., BAPTISTA P., 2011 – *Viability of Beauveria bassiana isolates after storage under several preservation methods*. - Annals of Microbiology, 61/2: 339-344. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0147-8>

PASARELL L., MCGINNIS M.R., 1992 – *Viability of Fungal Cultures Maintained at -70°C*. - Journal of Clinical Microbiology, 30/4: 1000-1004.

SHAH F.A., WANG C.S., BUTT T.M., 2005 – *Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. - FEMS Microbiology Letters, 251: 259-266.

RYAN M.J., JEFFRIES P., BRIDGES P.D., SMITH D., 2001 – *Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function*. - Cryoletters, 22: 115-124.

SINGH S.K., UPADHYAY R.C., KAMAL S., TIWARI M., 2004 – *Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability*. - CryoLetters, 25: 23-32.

TOEGEL S., SALAR-BEHZADI S., HORACZEK-CLAUSEN A., VIERNSTEIN H., 2010 – *Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi Beauveria brongniartii and Metarhizium anisopliae during lyophilization*. - Journal of Invertebrate Pathology, 105: 16-23.

VOYRON S., ROUSSEL S., MUNAUT F., VARESE G.C., GINEPRO M., DECLERCK S., FILIPELLO MARCHISIO V., 2009 – *Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation*. - Mycological Research, 113: 1027-1038.

TEMPERATURE ULTRABASSE E PROTOCOLLI CRYO PER LA COSTITUZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI DI NEMATODI ENTOMOPATOGENI

SILVIA LANDI^a - GIULIA TORRINI^a - EUSTACHIO TARASCO^b

^a CREA – Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via Lanciola 12/a, 50125 Firenze, Italy

^b Di.S.S.P.A. – Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro.

Autore corrispondente: silvia.landi@crea.gov.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interse agroforestale”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

Ultra-low temperatures and cryopreservation protocols for the maintenance of entomopathogenic nematodes in live collection

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are important biological control agents for various economically important pests. Large-scale application of these nematodes requires multiple generations reared in mass quantities and stored for variable periods of time. Routine sub-culturing of EPNs can lead to trait deterioration. The cryopreservation of EPNs at ultra-low temperature is a useful strategy that can assure the preservation for long periods without genetic alteration or loss of functional characteristics. The first attempts to cryopreserve EPNs date back to the 90s. To date the most used protocol provides: storage of IJs in distilled water for two weeks at 12°C after their emergence from *Galleria mellonella* larvae, incubation in glycerol (hours number and solution concentration are specific for each specie), 10 min in 70% methanol at 0°C, several minutes in liquid nitrogen and finally storage in a mechanical freezer at -140°C. Moreover, in this review some bioassays to verify the virulence efficiency are reported.

KEY WORDS: cryoprotective agents, infective juveniles, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, virulence assays.

INTRODUZIONE

L’utilizzo dei nematodi entomopatogeni (EPNs) quali agenti di controllo di un ampio spettro di insetti nocivi, è in continua crescita. I generi *Steinernema* e *Heterorhabditis* hanno ricevuto la maggiore attenzione tra tutti i nematodi studiati perché portano a morte velocemente l’insetto target, possono essere applicati con attrezzature convenzionali, sono sicuri per l’ambiente e hanno un bassissimo impatto sulle specie no-target. Inoltre, gli EPNs e i loro batteri associati non mostrano effetti sui mammiferi né sugli esseri umani.

L’applicazione su larga scala degli EPNs richiede la loro continua moltiplicazione, che solitamente avviene in bioreattori su substrato liquido, e lo stoccaggio per un periodo variabile di tempo, mentre, in laboratorio, le diverse popolazioni di EPNs vengono rinnovate utilizzando insetti esca, come *Galleria mellonella* L., e stoccati in acqua in celle climatiche a 9-12°C. La continua moltiplicazione degli EPNs può determinare la perdita di importanti caratteristiche genetiche (inbreeding, deriva genica e selezione involontaria) o di fattori non genetici (malattie, carenze nutrizionali) e un decremento nella capacità di controllo biologico (SHAPIRO *et al.*,

1996; WANG e GREWAL, 2002) per la progressiva perdita di virulenza, la riduzione di adattamento all’ambiente, la riduzione della capacità di riprodursi e di ricercare l’ospite (SHAPIRO *et al.*, 1996; BAI *et al.*, 2005; BILGRAMI *et al.*, 2006). La conservazione dei ceppi di EPNs a basse temperature e la loro moltiplicazione solo quando è necessario, possono minimizzare la perdita di queste fondamentali caratteristiche.

La crioconservazione offre la possibilità di conservare gli EPNs per un lungo periodo riducendo il rischio di contaminazione degli isolati con altri ceppi (NUGENT *et al.*, 1996) ed ha il vantaggio di essere meno costosa in quanto richiede meno ore di laboratorio e necessita di spazi minori per lo stoccaggio dei nematodi (BRIDGE e HAM, 1985). Inoltre, mediante la creazione di criobanche si può accrescere la possibilità di utilizzo di un maggior numero di ceppi. Infatti, finora nella lotta biologica sono utilizzati principalmente ceppi non autoctoni e quindi non ben adattati alle condizioni climatiche locali, riducendone così la loro efficacia. Viceversa, l’utilizzo di isolati indigeni può essere vantaggioso per accrescere la loro efficacia e al contempo migliorare la biodiversità. Le varie specie e/o ceppi di EPNs hanno una gamma diversa di ospiti, diversità di comportamento e tolleranza alle alte o

basse temperature (TARASCO *et al.*, 2015). Purtroppo, ad oggi, malgrado gli indubbi vantaggi che la crioconservazione può portare, i ceppi mantenuti in criobanche sono pochi. Due sono i principali fattori che ostacolano l'utilizzo di questa tecnica su larga scala. Innanzitutto, ogni specie ha una diversa adattabilità al mantenimento criogenico, pertanto, i protocolli da utilizzare devono essere stabiliti empiricamente caso per caso (JAMES, 2004; NUGENT *et al.*, 1996). Inoltre, l'uso di sostanze criogeniche tossiche impone precauzioni che ne sfavoriscono l'utilizzo.

MESSA A PUNTO DI PROTOCOLLI DI CRIOCONSERVAZIONE DEGLI EPNs

La crioconservazione è una tecnica che consente di interrompere i processi biochimici del metabolismo cellulare e quindi il mantenimento della vitalità cellulare per un tempo prolungato tramite congelamento a temperature ultra-basse che generalmente corrispondono a -196°C , il punto di ebollizione dell'azoto liquido. Questo è possibile solo se si evita la formazione di cristalli di ghiaccio a livello intra-cellulare, che causerebbero un danno irreversibile alle membrane cellulari, distruggendo la loro semi-permeabilità. La vitrificazione è il processo fisico mediante il quale una soluzione acquosa passa da uno stato liquido ad uno stato solido amorfo (vetroso), senza cristallizzare, in quanto l'acqua contenuta all'interno del corpo non fa in tempo a formare cristalli di ghiaccio, grazie all'elevata velocità di abbassamento delle temperature ($10.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e alla viscosità della soluzione data dall'utilizzo di sostanze crioprotettive. Affinché la crioconservazione abbia successo è necessario che le cellule sopravvivano non solo alla fase di raffreddamento, ma anche alla fase di scongelamento (MAZUR, 2004; PANIS e LAMBARDI, 2005). Il glicerolo e il Dimethyl sulfoxide (DMSO) sono i più comuni agenti crioprotettivi utilizzati per gli EPNs (PANIS e LAMBARDI, 2005) per il loro basso peso molecolare, la non tossicità e l'economicità.

I primi studi inerenti alla crioconservazione degli EPNs risalgono agli anni '90. SMITH *et al.* (1990) eseguirono una estesa serie di analisi con vari crioprotettivi testando diversi stadi di sviluppo di *Steinernema feltiae*, e conclusero che i migliori risultati si ottenevano se questa tecnica era applicata agli stadi larvali giovanili, in particolare la larva di terza età che rappresenta l'unico stadio che conduce vita libera nel suolo ed è lo stadio infettivo (IJs). POPIEL e VASQUEZ (1991) conducendo prove su *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora* dimostrarono, innanzitutto, che i crioprotettivi, come il glicerolo, agivano anche senza la rimozione della cuticola delle larve del secondo stadio che gli EPNs mantengono nel terzo

stadio come guaina protettiva, per evitare la perdita di acqua durante la fase a vita libera. Inoltre, misero a punto un protocollo impiegando due diverse procedure di incubazione abbinata sequenzialmente. Inizialmente le larve di terza età dei nematodi erano immerse in una soluzione di glicerolo al 22 e 14%, rispettivamente per le due specie, per 24 ore, successivamente venivano trasferite in una soluzione di metanolo al 70% per 10 minuti. Ottennero così la sopravvivenza del 50% e 80% degli individui, rispettivamente per *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*. Con questa procedura, che ancora oggi rappresenta la base con cui si crioconservano gli EPNs, misurarono un decremento costante di glicogeno autoprodotta dai nematodi, compensato da un incremento di glicerolo, glucosio e di trealosio. L'autoproduzione di molecole crioprotettive da parte degli stessi animali probabilmente è la chiave per la riuscita della procedura di crioconservazione. Il trealosio rappresenta, sicuramente, il più importante protettore naturale prodotto dai nematodi in condizione di stress da disidratazione e raffreddamento (BEHM, 1997). Riguardo al ruolo del metanolo nella crioconservazione si ipotizza che riduca il tasso di raffreddamento richiesto per la vitrificazione; in pratica il metanolo protegge dal raffreddamento lento ed è vantaggioso quando è necessario crioconservare grandi volumi di materiale. In questa direzione, uno studio di NUGENT *et al.* (1996) dimostrò che la sopravvivenza aumentava se i nematodi venivano filtrati piuttosto che lasciati in sospensione, in questo modo, infatti, si riduceva il volume di materiale da crioconservare e, inoltre, lo scongelamento avveniva in modo rapido impedendo così la formazione di cristalli. BAI *et al.* (2004) aumentarono ulteriormente la sopravvivenza utilizzando una sospensione con una concentrazione di 12.000 individui/ml, dimostrando che in *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* esiste una correlazione positiva tra sopravvivenza dei nematodi al processo di crioconservazione e la concentrazione degli individui durante le fasi di incubazione.

Studi successivi hanno ulteriormente perfezionato la procedura di crioconservazione. IRDANI *et al.* (2006) e COSI *et al.* (2008) hanno dimostrato che una volta raffreddati in azoto liquido, i nematodi possono essere conservati in un freezer meccanico alla temperatura di -140°C , riducendo così i costi per il loro mantenimento. TORRINI *et al.* (2016) hanno ottenuto una maggiore sopravvivenza di *S. carpocapsae* crioconservando IJs stoccati in acqua distillata a 12°C per 15 giorni una volta fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella*, prima dell'immersione in glicerolo; inoltre, TORRINI *et al.* (2016) hanno visto che solo dopo la prima settimana di stoccaggio a -140°C si ha una riduzione della sopravvivenza, la quale si stabilizza poi al 74-75% e rimane costante.

Riepilogando, il protocollo standard per gli EPNs può essere così schematizzato: i nematodi al loro stadio

infettivo (IJs), una volta fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella* sono stoccati in acqua distillata per 15 giorni prima di essere incubati a in glicerolo e successivamente per 10 minuti in metanolo al 70%. Gli stadi infettivi (IJs) sono poi immersi per alcuni minuti in azoto liquido e infine stoccati in freezer.

Il tempo di incubazione in glicerolo e la relativa concentrazione sono i due parametri che devono essere stabiliti per le singole specie. In Tabella 1 si riportano i valori ricavati dalla bibliografia che permettono i più alti tassi di sopravvivenza.

Infine, il successo di questa procedura è condizionato da un ultimo parametro: CURRANT (1992) trovò una relazione inversa tra biomassa del nematode e sopravvivenza dopo la crioconservazione. Pertanto, i nematodi di grandi dimensioni come *Steinernema apuliae* hanno una più bassa sopravvivenza rispetto a quelli piccoli come *S. carpocapsae* (TORRINI, 2015).

Tabella 1 – Tempo di incubazione in glicerolo e concentrazione glicerolo per alcune specie di *Steinernema* e *Heterorhabditis*.

Specie	Tempo di incubazione (h)	Concentrazione glicerolo (%)
<i>Steinernema carpocapsae</i>	48	18
<i>Steinernema affine</i>	48	18
<i>Steinernema feltiae</i>	48	18
<i>Steinernema apuliae</i>	24	18
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	48	25

PERFORMANCE DEGLI EPNs DOPO LA CRIOCONSERVAZIONE

La virulenza degli EPNs si esplica tramite il rilascio di microrganismi simbiotici. Gli IJs contengono il loro simbionte batterico nel tratto intestinale: i batteri appartenenti al genere *Photorhabdus* colonizzano principalmente la regione anteriore dell'intestino di *Heterorhabditis*, appena posteriormente al bulbo basale, mentre i batteri del genere *Xenorhabdus* colonizzano una vescicola intestinale bilobata specializzata in *Steinernema*. La crioconservazione deve mantenere la virulenza e quindi oltre al nematode deve essere assicurata anche la sopravvivenza del simbionte. Il biosaggio di virulenza è il metodo più utilizzato per verificare se i simbiotici sono sopravvissuti alla crioconservazione e se il nematode è ancora in grado di portare a morte l'ospite e riprodursi in esso. Il metodo più semplice è quello di inoculare una sospensione di acqua distillata di 250 µl contenente circa 200 IJs in una capsula Petri (diam. 3,5 cm) contenente due filtri di carta bibula e una larva di *G. mellonella*. La piastra viene conservata a 24 °C al buio e la mortalità delle larve è valutata ogni 24 ore per una settimana. Per valutare se il processo di crioconservazione riduce o meno la capacità riproduttiva degli EPNs può essere effettuato il conteggio della progenie della prima

generazione (IJs fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella*, inoculate con gli EPNs precedentemente crioconservati) e quella della seconda generazione (IJs fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella*, inoculate con gli EPNs della prima generazione). TORRINI *et al.* (2016) hanno evidenziato che il potenziale riproduttivo di *S. carpocapsae* dopo la crioconservazione era più basso negli individui crioconservati rispetto a quelli di controllo solo nella prima progenie, ma dalla seconda non c'era più alcuna differenza.

I test illustrati permettono di fare un primo screening in laboratorio, ma l'efficacia in campo può essere molto diversa perché influenzata da diversi fattori associati al nematode (tasso di invasione e rilascio dei batteri), al batterio (tasso di insediamento e moltiplicazione), all'ospite (comportamento e risposta autoimmune) e all'ambiente (localizzazione dell'insetto, temperatura, umidità, pH e tessitura del suolo) (GLAZER e LEWIS, 2000). A questo proposito sono stati messi a punto dei biosaggi che si propongono di valutare in laboratorio quale può essere la risposta delle larve di EPNs alle condizioni di campo. Il saggio di penetrazione (CAROLI *et al.*, 1996) intende valutare la capacità di penetrare l'ospite. Utilizzando piastre di coltura a 12 pozzetti (COSTAR®) vengono inoculati 200 IJs in 0,5 µl di acqua in ogni pozzetto contenente due fogli di carta bibula e una larva di *G. mellonella*. Dopo 48 ore dalla morte dell'ospite si verifica l'infezione mediante dissezione. Il saggio del tempo di esposizione (GLAZER, 1991) permette di misurare il tempo minimo necessario per penetrare l'ospite. In piastre di coltura a 12 pozzetti (COSTAR®) vengono inoculati 400 IJs in 0,5 µl di acqua in ogni pozzetto contenente due fogli di carta bibula e una larva di *G. mellonella*; si effettuano controlli a cadenza di 20 minuti fino a 180 min. Il saggio uno a uno (MILLER, 1989) consente di fare una valutazione globale del processo di infezione. Su piastre di coltura a 12 pozzetti (COSTAR®) viene inoculato un solo esemplare di IJ in 0,5 µl di acqua per larva di *G. mellonella*. Si effettuano controlli dopo un tempo di esposizione di 24, 48 e 72 ore. Infine, il saggio della colonna di sabbia (GRIFFIN e DOWNES, 1994) si propone di misurare la capacità del nematode di ricercare e penetrare l'ospite. In un contenitore di plastica si pone una larva di *G. mellonella* sul fondo e si riempie poi il contenitore con sabbia sterile bagnata per un'altezza di 10 cm; nella parte alta si mettono 100 IJs in 100 µl di acqua. Si verifica l'avvenuta infezione dopo 24 ore. I biosaggi sono stati utilizzati per la prima volta per valutare la performance degli IJs dopo la crioconservazione da TORRINI *et al.* (2016). Nessuna differenza è stata evidenziata nell'infettività tra nematodi crioconservati e controllo, tanto che anche gli EPNs crioconservati infettavano velocemente l'ospite e la mortalità degli insetti era prossima al 100%.

PROSPETTIVE FUTURE

Gli studi più recenti sulla crioconservazione degli EPNs sono indirizzati principalmente a semplificare e standardizzare ulteriormente i protocolli ed eliminare o ridurre l'impiego di sostanze tossiche quali il metanolo. I primi esperimenti in proposito, però, non hanno dato risultati incoraggianti. GUIDE *et al.* (2016) hanno impiegato un protocollo che prevedeva la sola incubazione in glicerolo su *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* e *Heterorhabditis amazonensis*. Solo per *S. feltiae* la sopravvivenza ha raggiunto il 57% con l'incubazione in glicerolo al 15% per 48 h. Il dato più allarmante, però, è stata la perdita di virulenza, dopo 168 h in azoto liquido si è avuta una riduzione dell'infettività del 90%.

BIBLIOGRAFIA

- BAI C., SHAPIRO-ILAN D.I., GAUGLER R., HOPPER K.R., 2005 – *Stabilization of beneficial traits in Heterorhabditis bacteriophora through creation of inbred lines.* - *Biological Control*, 32: 220-227.
- BAI C., SHAPIRO-ILAN D.I., GAUGLER R., SHUXIA Y., 2004 – *Effect of entomopathogenic nematode concentration on survival during cryopreservation in liquid nitrogen.* - *Journal of Nematology*, 36 (3): 281-284.
- BEHM C., 1997 – *The role of trehalose in the physiology of nematodes.* *Int. J. Parasitol.*, 27: 215-229.
- BILGRAMI A.L., GAUGLER R., SHAPIRO-ILAN D.I., ADAMS B.J., 2006 – *Source of trait deterioration in entomopathogenic nematodes Heterorhabditis bacteriophora and Steinernema carpocapsae during in vivo culture.* *Nematology*, 8 (3): 397-409.
- BRIDGE J., HAM J., 1985 – *A technique for the cryopreservation of viable juveniles of Meloidogyne graminicola.* - *Nematologica*, 31: 185-189.
- CAROLI L., GLAZER I., GAUGLER R., 1996 – *Entomopathogenic nematode infectivity assay: multi variable comparison of penetration into different hosts.* - *Biocontrol Science and Technology*, 6: 227-233.
- COSI E., TRIGGIANI O., IRDANI T., MARASCO E., ROVERSI P.F., 2008 – *First results of entomopathogenic nematodes cryopreservation in liquid nitrogen and storage at .* - *REDIA*: 181-183.
- CURRAN J.C., GILBERT C., BUTLER K., 1992 – *Routine cryopreservation of isolates of Steinernema and Heterorhabditis spp.* *Journal of Nematology*, 24: 269-270.
- GLAZER I., 1991 – *Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects.* - *Journal of Invertebrate Pathology*, 59: 90-94.
- GLAZER I., LEWIS E.E., 2000 – *Bioassays for entomopathogenic nematodes.* In: Navon A & Ascher KR S, (Eds). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes.* Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 229-247.
- GRIFFIN C.T., DOWNES M.J., 1994 – *Recognition of low temperature active isolates of the entomopathogenic nematode Heterorhabditis.* - *Nematologica*, 37: 83-91.
- GUIDE B.A., ALVES V.S., FERNANDES T.A.P., FERREIRA F.P., NEVES P.M.O.J., 2016 – *Glycerol as a cryoprotectant agent to the entomopathogenic nematodes Heterorhabditis spp. and Steinernema spp.* *Ciências Agrárias, Londrina*, 37: 3017-3026.
- IRDANI T., CARLETTI B., AMBROGIONI L., ROVERSI P.F., 2006 – *Rapid-cooling and storage of plant nematodes at .* - *Cryobiology*, 52: 319-322.
- JAMES E.R., 2004 – *Parasite cryopreservation by vitrification.* *Cryobiology*, 49: 201-210.
- MAZUR P., 2004 – *Principles of cryobiology.* In: Fuller B.J., Lane N., Benson E.E. (Eds.), *Life in the Frozen State*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.3-65.
- MILLER R.W., 1989 – *Novel pathogenicity assessment technique for Steinernema and Heterorhabditis entomopathogenic nematodes.* - *Journal of Nematology*, 21: 574.
- NUGENT M.J., O LEARY S., BURNELL A.M., 1996 – *Optimised procedures for the cryopreservation of different species of Heterorhabditis.* - *Fundamental and Applied Nematology*, 19: 1-6.
- PANIS B., LAMBARDI M., 2005 – *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources.* - *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*: 1-12.
- POPIEL I., VASQUEZ E.M., 1991 – *Cryopreservation of Steinernema carpocapsae and Heterorhabditis bacteriophora.* - *Journal of Nematology*, 21: 432-437.
- SMITH B.S., HODGSON-SMITH A., POPIEL , MINTER D.M., JAMES E.R., 1990 - *Cryopreservation of the entomogenous parasite Steinernema feltiae (=Neoaplectana carpocapsae).* *Cryobiology*, 27: 319-327.
- SHAPIRO D.I., GLAZER I., SEGAL D., 1996 - *Trait stability of and fitness of the heat-tolerant entomopathogenic nematode Heterorhabditis bacteriophora IS5 strain.* - *Biological Control*, 6: 238-244.
- TARASCO E., CLAUSI M., RAPPAZZO G., PANZAVOLTA T., CURTO G., SORINO R., ORESTE M., LONGO A., LEONE D., TIBERI R., VINCIGUERRA M.T., TRIGGIANI O., 2015 – *Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy.* - *Journal of Helminthology*, 89:359-366.
- TORRINI G. – 2015. *Cryopreservation of entomopathogenic nematodes.* - Tesi Dottorato di Ricerca in "Insect Science and Biotechnology" XXVII Ciclo 2012-2015 Università degli Studi di Napoli Federico II, pp 103.
- TORRINI G., LANDI S., TARASCO E., ROVERSI P.F., 2016 – *Evaluation of Steinernema carpocapsae survival and infectivity after cryoconservation.* - *Biocontrol*, 61(4): 461-469.
- WANG X.D., GREWAL P.S., 2002 – *Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance.* - *Biological Control* 23: 71-78.

