

**“Indagini sulle relazioni cipresso-allergie. Riduzione dell'impatto allergenico del cipresso: selezione di cloni a ridotta produzione di polline e induzione di androsterilità attraverso tecniche di coltura in vitro”.**

Il cipresso comune (*Cupressus sempervirens*) è una specie arborea ad alto valore paesaggistico e ambientale, molto utilizzata anche in parchi ed aree verdi urbane per il particolare effetto ornamentale. La sua impollinazione anemofila determina la dispersione di ingenti quantità di polline durante la fioritura, che avviene nei mesi invernali. Il polline di questa specie contiene degli allergeni responsabili delle pollinosi invernali, che causano l'insorgere di infiammazioni a carico dell'apparato aero-respiratorio durante i mesi di febbraio-marzo, nonché l'aumento della predisposizione alle allergie respiratorie primaverili in soggetti sensibilizzati. Nelle regioni del centro Italia il 62 % della popolazione allergica è sensibilizzata al polline di cipresso e la sensibilizzazione è legata all'esposizione a crescenti quantità di polline in concomitanza con l'inquinamento dell'aria nelle città. L'impiego di piante non allergizzanti per l'allestimento del verde pubblico è un tema cui le Amministrazioni sono sempre più sensibili.

L'obiettivo generale del programma di ricerca è stato quello di portare avanti una selezione di piante di cipresso comune ad alto valore ornamentale con scarsa o nulla produzione di polline al fine di ridurre l'impatto allergenico sulla popolazione e mantenere alta la produzione vivaistica di questa specie. Per il raggiungimento di questo obiettivo sono stati seguiti due diversi percorsi: 1) la selezione in campo di cloni di cipresso ipo-produttori di polline, avvalendosi della variabilità intraspecifica osservata per la produzione di fiori maschili; 2) l'utilizzo delle biotecnologie vegetali ed in particolare della coltura in vitro per l'induzione di androsterilità (assenza di formazione degli organi riproduttori maschili) in genotipi selezionati di *C. sempervirens*.

#### 1. Selezione intraspecifica in *C. sempervirens*

Nell'arco del triennio 2013-15 sono stati eseguiti rilievi fenologici per il monitoraggio delle fasi di fioritura di 700 cloni di *C. sempervirens* var. *stricta* presenti nelle collezioni sperimentali dell'IPSP-CNR. A partire dai risultati ottenuti, sono stati scelti per il presente progetto di ricerca 101 cloni (per un totale di circa 400 piante) che avevano mostrato una ridotta produzione di fiori maschili (microsporofilli). I rilievi sono stati condotti su cloni presenti nei campi sperimentali di Spello (PG) e per il primo anno anche di Roselle (GR), rappresentati da piante di 12-18 anni derivati da innesto.

Obiettivo dello studio è quello di valutare l'effetto del genotipo, dell'ambiente e dell'andamento stagionale sulla produzione di fiori maschili (e quindi di polline) e di arrivare a selezionare cloni ipoproduttori di polline che siano sufficientemente stabili (mantengano il loro carattere in condizioni ambientali diverse e da una stagione a un'altra).

I rilievi delle fioriture, osservati per ogni singola pianta e analizzati statisticamente in base al clone, hanno interessato: a) il numero di fiori prodotti, valutati grazie ad apposite tabelle colorimetriche con la percentuale di copertura florale per chioma; b) il polline prodotto dai singoli microsporofilli (fiori maschili), valutato con analisi microscopiche e conteggio tramite emocitometro; c) la durata della fioritura, monitorata nell'arco dei tre mesi grazie ad una tabella delle fasi fenologiche di maturazione del fiore in *C. sempervirens*. L'estensione delle osservazioni per più anni è necessaria per valutare l'effetto dell'andamento climatico sulla fenologia floreale.

**Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante**

Ogni pianta è stata caratterizzata per percentuale di fioritura e periodo di emissione pollinica ed è stata messa in relazione con le altre appartenenti allo stesso clone. Le analisi statistiche effettuate utilizzando anche i dati relative alle campagne degli anni precedenti, hanno messo in evidenza come vi sia una variabilità fra i diversi cloni (interclonale) ma anche all'interno dello stesso clone (intraclonale), indipendentemente dalla stagionalità. Non è stata riscontrata alcuna differenza fra il numero di granuli pollinici prodotti da ogni cono maschile nelle piante ipo-produttrici e in quelle iper-produttrici, rivelando come sia la sola produzione (in numero) di coni maschili a fare la differenza.

Al momento abbiamo individuato 5-6 cloni che sono classificati come ipo-produttori di polline e che sembrano mantenere questa caratteristica in successive stagioni. Rimangono ancora da completare i rilievi per il 2016.

2. Utilizzo della coltura in vitro per l'ottenimento di cloni androsterili

L'utilizzo della coltura in vitro nel miglioramento genetico delle conifere si basa sulla possibilità di manipolare geneticamente del tessuto giovanile in grado di proliferare e produrre tessuti differenziati per la formazione di una nuova pianta adulta, clone della pianta madre. Le conifere sono recalcitranti alla coltura in vitro, in particolare per quanto riguarda i tessuti adulti. Le conifere sono recalcitranti alla coltura in vitro, in particolare per quanto riguarda i tessuti adulti; per questo negli ultimi 30 anni tutti i protocolli di miglioramento genetico sono stati ottenuti attraverso l'embriogenesi somatica, ovvero la produzione di embrioni a partire da tessuto somatico, evitando la fecondazione. I calli embriogenici ottenuti dalla dedifferenziazione di tessuti adulti possono essere sottoposti a trasformazioni. Nel nostro caso si tratta di regolare i geni coinvolti nella formazione del granulo pollinico, attraverso la tecnologia del DNA ricombinante. Su una delle linee embriogeniche ottenute è stato provato il "metodo biolistico" di trasformazione genica: frammenti di DNA plasmidico contenenti il gene reporter GUS sono stati iniettati direttamente nelle cellule di callo immaturo.

E' stato messo a punto un protocollo per la produzione di embrioni somatici e la rigenerazione delle plantule a partire dai cinque cloni elite di partenza (selezionati per la resistenza al cancro). Per quanto riguarda la specie Cupressus, questo è in assoluto il primo protocollo ottenuto per la rigenerazione di piante a partire da embrioni somatici. In particolare, il clone brevettato "Mediterraneo" ha dato i migliori risultati in tutte le fasi di sviluppo: induzione, maturazione, germinazione e conversione. A seguito di problemi sorti durante l'acclimatazione delle plantule in serra, sarà necessario sviluppare la sperimentazione per implementare la fase di ambientamento all'esterno delle plantule prodotte. Infine, tra le varie linee embriogeniche sono state scelte due linee ad alta proliferazione (a livello di embrioni immaturi) e ad elevata capacità produttiva di embrioni maturi: su queste linee sono in fase di completamento degli esperimenti di "crioconservazione", ovvero il mantenimento a basse temperature (-196°C) della linea cellulare interessata per il suo successivo utilizzo al momento necessario.

Sesto Fiorentino, 8.3.2016

Roberto Danti

