

REGIONE
TOSCANA



LR 64/04 - Tutela e valorizzazione del patrimonio di razze e
varietà locali di interesse agrario, zootecnico e forestale

**Linee guida per la corretta conservazione “ex situ”
di specie erbacee di interesse agrario della Toscana**
(Decreto n. 117 del 2 aprile 2008)

Anno 2008

A cura della Commissione tecnico-scientifica delle Specie Erbacee della LR 64/04



Linee guida per la corretta conservazione “ex situ” di specie erbacee di interesse agrario della Toscana - LR 64/04

Introduzione

I semi delle diverse specie vegetali necessitano di condizioni di stoccaggio specifiche al fine di poter conservare nel tempo una elevata germinabilità.

Durante la fase di conservazione delle sementi, le condizioni ambientali che influiscono sulla longevità della semente sono essenzialmente la temperatura di stoccaggio e l'umidità del seme. Generalizzando si può affermare che riducendo la temperatura e/o l'umidità di conservazione si aumenta la longevità del seme (tempo durante il quale la semente mantiene una percentuale di germinabilità ritenuta accettabile) ma come vedremo questo non è vero per tutte le specie e in tutte le condizioni. Oltre che dalle variabili ambientali, le condizioni di conservazione da considerarsi ottimali dipendono anche dalle finalità che la conservazione ex situ delle sementi si prefigge da un punto di vista temporale. Per poter individuare le più corrette modalità di stoccaggio è quindi importante comprendere se la conservazione dovrà garantire la vitalità della semente per mesi, anni o decine di anni. Per quello che riguarda la conservazione delle sementi presso la Banca regionale del germoplasma (prevedendo un ciclo di moltiplicazione dei semi ad opera dei coltivatori custodi ogni 3-4 anni) l'obiettivo che ci prefiggeremo sarà quello di conservare i semi delle diverse specie in modo che questi possano garantire una germinabilità molto elevata (95% circa) per un periodo di almeno 3-4 anni.

Semi: tipi fisiologici

Durante la fase di maturazione tutti i semi vanno naturalmente in contro ad una progressiva disidratazione che li porterà a raggiungere uno stato di quiescenza metabolica. Questa condizione permetterà la sopravvivenza del seme per lunghi periodi senza che ci sia la necessità di alcun input esterno al seme stesso. La capacità dei semi di disidratarsi senza subire danni varia largamente tra le diverse specie e i semi possono così essere classificati in base alla loro capacità di perdere acqua senza subire danni. Si possono quindi individuare tre principali gruppi di semi: semi *orthodox*, *recalcitrant* e tipi intermedi.

I semi *orthodox* possono essere disidratati fino ad un contenuto idrico molto basso senza subire alcuna diminuzione della vitalità. Si può affermare che la longevità dei semi *orthodox* aumenta al diminuire della temperatura e dell'umidità di conservazione del seme. Per i semi *orthodox*, date le condizioni di conservazione della semente (temperatura e umidità della cariosside), è possibile stimare mediante un'apposita equazione (Hong *et al.*, 1996) la longevità dei semi delle diverse specie.

Al contrario i semi *recalcitrant* non possono essere disidratati senza subire una drastica diminuzione della loro vitalità. Per questi semi è possibile individuare un contenuto idrico critico al di sotto del quale la vitalità del seme viene drasticamente ridotta. Tali semi vengono inoltre danneggiati da temperature di stoccaggio troppo basse. La conservabilità di questi semi risulta molto più difficoltosa rispetto ai semi *orthodox* ed è inevitabilmente molto limitata nel tempo. C'è comunque da sottolineare che i semi *recalcitrant* sono tipici di specie tropicali e non sono quindi comuni nei nostri ambienti.

Al terzo gruppo appartengono i semi che hanno caratteristiche intermedie tra i semi *orthodox* e *recalcitrant*. Sono semi che sono in grado di tollerare una disidratazione che li porta al 10-12% di contenuto idrico ma che vengono danneggiati da un processo di disidratazione più spinto.

Conservazione *ex situ* delle sementi: considerazioni generali

Dato che la stragrande maggioranza delle specie erbacee coltivate nei nostri climi presenta semi di tipo *orthodox*, faremo qui riferimento alla conservazione di questa tipologia di semi. Le informazioni relative alle modalità di conservazione di semi *recalcitrant*, con caratteristiche definibili intermedie e del materiale per la propagazione vegetativa (tuberi, bulbi ecc.) verranno riportate nella scheda colturale della specie relativa.

Come abbiamo precedentemente detto, temperatura di stoccaggio e umidità della cariosside sono le variabili ambientali che è fondamentale tenere in considerazione al fine una accurata conservazione delle sementi. E' possibile fare stime sulla conservabilità della semente di una data specie solo se questi due parametri sono noti e controllati durante tutto il periodo di conservazione. Volendo mettere i due parametri ambientali in ordine di importanza si può affermare che piccole variazioni nel contenuto % di umidità del seme incidono sulla sua longevità come grandi variazioni della temperatura di stoccaggio. Ad esempio nel fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) una riduzione del contenuto di umidità dall'11 al 7% causa un aumento di dieci volte della longevità della semente (da uno a dieci anni circa a 25°C). Per ottenere un simile aumento della longevità operando solo sulla temperatura di stoccaggio di semi di fagiolo con l'11% di umidità si dovrà abbassare la temperatura di stoccaggio fino a 5°C (valori ricavabili mediante l'equazione di vitalità dei semi; Hong et al., 1996). Da questo esempio risulta chiaro che, anche a causa degli alti costi di gestione delle camere fredde, risulterà essenziale immagazzinare le sementi delle varie specie alla più corretta contenuto di umidità in contenitori impermeabili al vapor d'acqua.

Primi trattamenti post-raccolta

I semi raccolti in campo, prima della consegna alla banca, vanno conservati in un luogo fresco, asciutto ed ombreggiato, cercando di seguire quanto segue:

- non lasciare il materiale alle alte temperature ed esposto alla luce diretta
- mantenere sempre elevata la ventilazione nel locale dove si trova il seme; utilizzare solo ed esclusivamente di buste di carta o di sacchetti in cotone, in grado di garantire una corretta traspirazione
- verificare sempre la corretta chiusura delle buste e dei sacchetti al fine di evitare la perdita e/o la contaminazione del germoplasma raccolto
- chiudere le buste preferibilmente con spilli o graffette; se si usa nastro adesivo avere cura di applicarlo solo all'esterno dell'involucro
- "etichettare" ciascun campione di seme (con lapis o pennarello indelebile): riportare la data di raccolta, il luogo, il nome del coltivatore, il peso del campione
- in nessun caso congelare il germoplasma prima di averlo consegnato alla banca
- nel caso siano stati raccolti frutti carnosì al giusto grado di maturazione, è bene privarli della polpa il più rapidamente possibile subito dopo la raccolta per evitare fermentazioni che in alcuni casi sono dannose alla germinazione

Ingresso del germoplasma nella banca

Il materiale pervenuto alla Banca deve essere sottoposto ad una serie di controlli prima di essere inviato alla definitiva conservazione. Prima di tutto all'interno dei locali adibiti allo stoccaggio viene registrato e catalogato il campione; successivamente si provvede a controllarne lo stato fitosanitario ed a verificare l'integrità e la validità del germoplasma raccolto. Non è infatti raro trovare, anche in accessioni perfettamente pulite e trattate, materiale che presenta danneggiamenti o organismi dannosi in grado di compromettere il germoplasma.

Superate queste prime valutazioni, il materiale viene sottoposto alle necessarie operazioni di pulizia attraverso le quali dai semi vengono eliminate le impurità residue come polveri, residui resinosi, semi vuoti o abortivi, semi compromessi da insetti e/o intaccati e quindi non conservabili. Tali operazioni possono essere manuali e/o meccaniche a seconda della quantità e della tipologia del campione. Esistono delle piccole macchine da laboratorio in grado di lavorare anche modeste quantità di seme. Le più comuni attuano una selezione di tipo gravimetrico, sfruttando un flusso d'aria regolabile che separa

le impurità dalle sementi e allo stesso tempo i semi vitali da quelli vuoti, standardizzando conseguentemente i semi per dimensione e peso. In alcuni casi, le tecniche automatizzate non sono in grado di svolgere perfettamente il lavoro, in quanto la ridottissima dimensione dei semi è simile alla dimensione delle polveri o dei tessuti finemente sminuzzati o ridotti in polvere. A tal fine si utilizza una batteria di setacci con diametro di intermaglia variabile da 1 cm a 0,1 mm, per favorire l'eliminazione selettiva di impurità. Nei casi più complessi i semi vengono separati manualmente con l'ausilio di pinzette e utensili da laboratorio. L'impiego combinato di tecniche manuali e meccaniche riguarda quei casi in cui ad una prima pulizia manuale grossolana ne segue una meccanica e successivamente un'altra manuale di precisione e rifinitura.

Test iniziali finalizzati alla valutazione del materiale in entrata

Se il campione lo consente, una volta passato dai locali di stoccaggio e di pulizia, si possono eseguire una serie di test (germinazione, vitalità, calcolo dell'umidità interna, etc.).

Attraverso l'analisi della germinabilità viene determinato il potenziale di germinazione di campione, espresso come la percentuale in numero di semi puri capaci di produrre germinelli normali, potenzialmente in grado di svilupparsi in piante normali in condizioni favorevoli di coltura. Per realizzare queste analisi sono necessari appositi materiali (substrati, carta da filtro, sabbia) ed attrezzature (armadi climatici, capsule Petri, vaschette, parafilm, pinze in acciaio, bisturi, stiletto, spatola in legno, lampade con lenti da tavolo) ("Metodi ufficiali di analisi delle sementi" Ministero Agricoltura e Foreste, 1993; *International Rules for Seed Testing* dell'*International Seed Testing Association* ISTA, 2006).

Un altro parametro utile per indicare le caratteristiche germinative del materiale è rappresentato dall'energia germinativa, espressa come tempo medio di germinazione (T.M.G.): ha lo scopo di individuare l'andamento della germinazione attraverso la conta dei semi germinati quotidianamente a partire dal giorno successivo a quello di inizio della prova, indicando quanto tempo impiega il seme a compiere il processo germinativo.

Altro parametro fondamentale ai fini di una corretta conservazione del campione è rappresentato dall'umidità: esso corrisponde alla perdita in peso del campione quando viene asciugato in conformità a determinate regole. Essa viene espressa come percentuale del peso del campione originario. Le attrezzature necessarie per svolgere questa analisi sono costituite da appositi contenitori che devono essere di vetro o di metallo, dotati di coperchi ermetici per impedire variazioni di umidità; bilance analitiche di precisione, sensibili al milligrammo; stufa a riscaldamento elettrico provvista di regolatore termostatico, con precisione di $\pm 1^\circ\text{C}$; essiccatore di vetro contenente un idoneo essiccante; macinino per la triturazione dei semi, setacci (con maglie di 0.50 mm, 1.00 mm, 4.00 mm) ("Metodi ufficiali di analisi delle sementi" Ministero Agricoltura e Foreste, 1993; *International Rules for Seed Testing* dell'*International Seed Testing Association* ISTA, 2006).

Metodi di analisi e trattamento dei semi

Misura del contenuto di umidità del seme

Si definisce contenuto di umidità (CU) di un seme il contenuto di acqua (in peso) espresso come percentuale del peso totale del seme (peso fresco). Il CU è così calcolabile:

$$\text{CU} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso secco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

Per la misura accurata del CU di una accessione sarà necessario replicare la misura due volte. A tale scopo si determinerà, per mezzo di una bilancia analitica, il peso fresco di due campioni di seme di 0,5-1 g (nel caso di semi grandi un minimo di 10 semi per replica) che verranno poi essiccati. Nel caso di semi non oleaginosi l'essiccazione verrà effettuata a 130°C per 1-4 ore (4 ore per il mais, 2 ore per gli altri cereali e 1 ora per le altre specie). Nel caso di semi oleosi l'essiccazione dovrà essere effettuata a 103°C per 17 ore (tabella 1). Alla fine dell'essiccazione i campioni verranno estratti dalla stufa e lasciati a raffreddare per 45 minuti in un essiccatore contenente gel di silice. A questo punto i campioni verranno nuovamente pesati per la determinazione del peso secco. Il CU misurato nelle due repliche non dovrebbe differire più dello 0,2%.

Per alcune tipologie di seme (tabella 2), al fine di ottenere un'essiccazione uniforme e una corretta determinazione del CU sarà necessario tritare grossolanamente ma uniformemente la granella prima della determinazione del CU.

Tabella 1. Specie oleaginose che richiedono essiccazione a 103°C per 17 ore (ISTA, 2005)

<i>Brassica spp.</i>	<i>Camelina spp.</i>	<i>Sesamum spp.</i>
<i>Ricinus spp.</i>	<i>Linum spp.</i>	<i>Glycine spp.</i>
<i>Capsicum spp.</i>	<i>Arachis spp.</i>	<i>Gossypium spp.</i>
<i>Allium spp.</i>	<i>Solanum spp.</i>	<i>Raphanus spp.</i>

Tabella 2. Specie i cui semi devono essere tritati prima della misura del CU (ISTA, 2005).

<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Gossypium spp.</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Avena spp.</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Secale cereale</i>
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lathyrus spp.</i>	<i>Sorghum spp.</i>
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Lupinus spp.</i>	<i>Triticum spp.</i>
<i>Fagopyrum esculentum</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Vicia spp.</i>
<i>Glycine max</i>	<i>Phaseolus spp.</i>	<i>Zea mays</i>

La metodologia di misura del CU ora descritta è distruttiva e, durante la procedura, i semi utilizzati perdono completamente la loro germinabilità. Alternativamente il CU può essere misurato anche in maniera non distruttiva mediante l'uso di misuratori rapidi di umidità (misurano la conducibilità elettrica del seme stimando così il CU). Questi strumenti devono essere tarati per ciascuna specie e consentono una misura solo approssimativa del CU. Non è buona norma usarli per la determinazione del CU prima dell'immagazzinamento dei campioni presso la Banca del germoplasma. Questa tipologia di strumenti è, al contrario, molto utile per la determinazione del corretto momento di raccolta dei semi e/o per determinare rapidamente il CU sui semi al momento dell'arrivo presso la Banca del germoplasma in modo da poter meglio pianificare le operazioni successive.

Essiccazione della semente

Prima dell'immagazzinamento l'essiccazione della semente è un requisito fondamentale al fine di preservarne la germinabilità dei semi per lunghi periodi. A tal fine è importante che l'essiccazione dei semi avvenga a bassa temperatura. Nel caso di semi con CU maggiore del 16-17% sarà necessario procedere ad una essiccazione preliminare in un ambiente fresco (circa 20 °C) e ben ventilato (se disponibili si possono utilizzare anche sistemi di ventilazione forzata) e solo successivamente si procederà all'essiccazione definitiva. Le condizioni ritenute ottimali per l'essiccazione delle sementi sono 10-15% di umidità relativa e 10-25 °C di temperatura (FAO/IPGRI, 1994). Tali condizioni possono essere ottenute trattando l'aria di un piccolo locale ben isolato mediante un condizionatore di temperatura e un deumidificatore ad assorbimento. In mancanza di un tale equipaggiamento si provvederà a disporre i semi in contenitori ermetici posizionati in un ambiente fresco (25°C) e contenenti al loro interno gel di silice (rapporto seme-gel 1:1 in peso) o una soluzione satura di cloruro di calcio (30% UR a 25°C). Il contenitore dovrà essere realizzato in modo che l'aria al suo interno venga tenuta in movimento (mediante un piccolo ventilatore a batterie) e che non vi sia contatto diretto tra il gel di silice o la soluzione satura e i semi. I semi verranno lasciati nell'essiccatore fino al raggiungimento del CU richiesto e verranno successivamente impacchettati e stoccati nella camera fredda della Banca del germoplasma.

Test della germinabilità dei semi

Il metodo più semplice per valutare la vitalità di un seme è quello di testarne la germinabilità. Esistono varie metodologie per effettuare i test di germinabilità. Qui ci soffermeremo a descrivere il test su carta assorbente (preferibile per semi più piccoli di 2 mm) e quello tra fogli di carta assorbente (per semi tra 2 mm e 1 cm). Per provare una accessione è necessario effettuare il test su 200 semi (2 repliche da 100 semi ciascuna). Nel caso in cui la disponibilità di semi sia ridotta si opterà per due repliche da 50 o 25 semi ciascuna.

Se si va a testare semi con CU inferiore all'8% sarà necessario inumidirli prima del test al fine di evitare il possibile danneggiamento del seme dovuto a un'imbibizione troppo rapida. A tal fine si disporranno i semi all'interno di capsule petri aperte, poggiate su della carta inumidita e chiuse all'interno di un recipiente a tenuta. I semi, così sistemati, verranno incubati per 24 ore (sarà fondamentale impedire il contatto diretto tra la carta umida e il seme). Prima di testare la germinabilità dei semi è poi necessario sterilizzarli al fine di evitare la proliferazione di funghi durante il test. E' inoltre necessario sterilizzare con ipoclorito di sodio o alcol 70-95% tutte le superfici e gli utensili utilizzati durante il test. I semi verranno sterilizzati mediante immersione per 1 minuto in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% sotto agitazione (la comune varechina è una soluzione di ipoclorito di sodio al 4-5%). I semi verranno poi risciacquati con abbondante acqua distillata. Nel caso si opti per il test di germinazione su carta assorbente si provvederà ad inserire un disco di carta Whatman 181 (altri tipi di carta possono contenere sostanze tossiche per il seme) in una capsula petri (o in un germinatoio), ad inumidirlo in maniera uniforme ma non eccessiva e a porvi sopra i semi sterilizzati in modo che non si tocchino tra loro. La capsula petri verrà poi chiusa, etichettata e inserita in un sacchetto di plastica non sigillato (si deve consentire il passaggio dell'ossigeno). Le capsule petri verranno ora inserite nella cameretta termostata alle condizioni e per il tempo indicato in tabella 3. E' fondamentale controllare periodicamente l'umidità della carta assorbente ed evitare che questa si secchi durante la prova. Al termine del test si provvederà alla conta dei semi che hanno germinato regolarmente.

Se al contrario si opta per il test di germinazione tra fogli di carta assorbente si procederà così: scrivere con un lapis l'identificazione dell'accessione su un foglio di carta Whatman 3663, inumidirlo, voltarlo e disporvi sopra i semi a 4 cm dal bordo esterno e spaziatli tra loro, adagiare sopra i semi un secondo foglio inumidito della medesima carta, arrotolare il tutto in maniera non troppo serrata e fermare con 2 elastici. I rotoli così composti verranno posti verticalmente in un recipiente contenente sul fondo circa 3 cm di acqua distillata. Il recipiente verrà poi inserito nella cameretta termostata come indicato in tabella 3 per le diverse specie. Si provvederà a spruzzare periodicamente i rotoli per impedire che questi si secchino. Alla fine della prova si aprirà il rotolo e si procederà alla conta dei semi germinati (la germinabilità verrà espressa in percentuale).

Se al termine di un test i semi si presentano ben rigonfiati non muffiti ma non germogliati è probabile che questi siano in stato di dormienza e sarà necessario ripetere il test dopo aver applicato la corretta procedura di interruzione della dormienza (vedi tabella 3). Nel caso si proceda a testare semi appena raccolti sarà sempre necessario applicare la procedura per l'interruzione della dormienza prima di procedere con il test di germinazione.

E' importante sottolineare che quando si procede con la conta si dovranno considerare come non germinati i semi che, pur essendo germogliati, presentino delle malformazioni a livello radicale e/o dell'epicotile. I test di germinazione deve infatti fornirci un'informazione chiara circa la percentuale di semi che germogliando saranno in grado di dar vita a piante adulte.

Stoccaggio presso la Banca regionale del germoplasma

Per la conservazione delle sementi (semi *orthodox*) presso la Banca regionale del germoplasma della Regione Toscana si provvederà all'immagazzinamento delle accessioni delle diverse specie alla temperatura di 4°C in sacchetti sigillati e impermeabili al vapor d'acqua. All'interno di ciascuna scheda colturale (e nella tabella qui allegata) è riportato il CU che, a questa temperatura di stoccaggio, garantirà per ciascuna specie una germinabilità molto elevata (95% circa) per almeno 3-4 anni.

Impacchettamento ed etichettatura dei semi

L'impacchettamento in contenitori impermeabili all'umidità e ben sigillati è indispensabile al fine di mantenere costante l'umidità della semente in ambienti in cui l'umidità ambientale non è controllata. A tal fine i semi saranno impacchettati sotto vuoto all'interno di sacchetti multistrato termosaldabili (rivestimento esterno – alluminio $\geq 9 \mu\text{m}$ – polietilene $\geq 90 \mu\text{m}$) impermeabili all'umidità e all'ossigeno atmosferico. La conservazione in condizioni di vuoto serve a ridurre al minimo l'attività di eventuali fitofagi che possono aver infestato la semente e a rendere agevole il controllo dell'effettiva ermeticità delle confezioni (requisito fondamentale ai fini della corretta conservazione dei semi; se il sacchetto non fosse sigillato, i semi, venendo a contatto con l'umidità esterna, assorbirebbero acqua e la loro longevità verrebbe così inevitabilmente ridotta).

L'etichettatura delle diverse accessioni dovrà contenere le seguenti informazioni: numero dell'accessione, genere e specie, numero del contenitore, peso dei semi e data di immagazzinamento. Una etichetta contenente queste informazioni verrà inserita all'interno del sacchetto, una seconda verrà applicata all'esterno della confezione.

Protocollo per il trattamento dei semi

Considerazioni generali

E' importante che, dopo la raccolta, i semi vengano conferiti alla Banca del germoplasma nel minor tempo possibile. E' infatti essenziale che la semente venga portata alla più corretta umidità e temperatura di stoccaggio in breve tempo onde evitare gravi perdite di vitalità dovute ad errate, anche se transitorie, condizioni di stoccaggio. Alti contenuti di umidità della granella si possono verificare a causa di una raccolta troppo anticipata della semente o a causa di temporaneo stoccaggio in ambiente troppo umido. A titolo di esempio riportiamo che cariossidi di grano tenero (*Triticum aestivum*) ad un contenuto di umidità del 17% e conservate a temperatura ambiente (25°C) raggiungono il 50% di germinabilità in soli 20 giorni (valori ricavabili mediante l'equazione di vitalità dei semi; Hong *et al.*, 1996).

Protocollo

Non appena i semi raggiungono la Banca del germoplasma si provvederà alla misura rapida del CU mediante il misuratore digitale. Nel caso l'umidità della semente sia maggiore del 16-17% si procederà con l'essiccamento preliminare (vedi metodi). In caso contrario si procederà a prelevare due campioni di seme per la misura accurata del CU mediante metodo distruttivo (in stufa). Subito dopo il prelievo dei campioni i semi verranno divisi in sacchetti non troppo grandi (al fine di consentire una rapida essiccazione della massa) e permeabili e il peso dei semi contenuti in ciascun sacchetto verrà registrato. Fatto questo si procederà a mettere i sacchetti nella camera di essiccazione o negli essiccatori contenenti gel di silice (o la soluzione di CaCl₂).

Non appena saranno disponibili i risultati della misura esatta del CU sarà possibile calcolare e prevedere quale sarà il peso dei sacchetti in essiccazione quando il CU che ci siamo posti come obiettivo (vedi schede culturali e tabella riassuntiva in allegato) sarà stato raggiunto. Per il calcolo si può utilizzare la seguente formula:

$$\text{Peso finale dei semi} = \text{peso iniziale dei semi} \times \frac{(100 - \text{CU iniziale})}{(100 - \text{CU richiesto})}$$

Una volta che si è calcolato quale sia il peso finale al di sotto del quale ciascun sacchetto in essiccazione dovrà scendere, si provvederà alla periodica pesata dei vari sacchetti fino a quando non si sia raggiunto il peso (e il conseguente CU) che ci siamo posti come obiettivo. Quando questo sarà stato raggiunto si preleverà un campione di circa 200 semi per effettuare il test di germinabilità e si provvederà all'impacchettamento sotto vuoto dei restanti semi. I semi di ciascuna accessione verranno così impacchettati: in un sacchetto si conserverà la maggior parte dell'accessione mentre due campioni di circa 200 semi ciascuno verranno impacchettati in due piccoli sacchetti (con identiche caratteristiche rispetto al sacchetto più grande) in modo tale che, durante il periodo di stoccaggio, sia possibile effettuare test di germinazione senza dover aprire la confezione contenente l'accessione. Nelle 24 ore successive all'impacchettamento i sacchetti verranno conservati all'interno di essiccatori in modo sia possibile controllare che questi garantiscano una tenuta perfetta senza che il seme rischi di inumidirsi. Se il sacchetto manterrà il vuoto efficientemente sarà finalmente stoccato all'interno della cella a +4°C fino alla successiva fase di propagazione (si consiglia di controllare periodicamente la tenuta dei sacchetti). Al terzo anno di conservazione presso la Banca del germoplasma, nel caso non sia possibile procedere alla propagazione *in situ* di tutte le accessioni, sarà necessario effettuare nuovi test di germinazione al fine di individuare le accessioni che presentano una bassa germinabilità e quindi un più stringente bisogno di essere moltiplicate.

Tabella 3. Linee guida per l'esecuzione del test di germinazione. Per ciascuna specie è stata indicata la temperatura di germinazione, le condizioni di luce, il giorni da attendere prima della conta dei semi germinati e le specifiche per il trattamento dei semi duri o dormienti (Ministero dell'agricoltura e foreste, 1965, ISTA 2005). C, semi su carta; TC, semi tra due fogli di carta; 20/30, necessaria alternanza giornaliera di temperatura (8 ore a 30°C e 16 a 20°C); --, luce non necessaria; L, necessarie 8 ore giorno di illuminazione (750-1250 lux da una lampada fluorescente bianca, corrispondente a 10-17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); KNO_3 , bagnare la carta assorbente (solo la prima volta) con nitrato di potassio 0,2%; GA_3 , bagnare la carta assorbente (solo la prima volta) con acido gibberellico 0,05%.

Specie	Test	°C	Luce	Giorni	Trattamento di semi duri o dormienti
<i>Allium cepa</i>	C	20	--	12	Prerefrigerazione a 10°C per 2 giorni
<i>Allium Porrum</i>	C	20	--	14	Prerefrigerazione a 10°C per 2 giorni
<i>Asparagus officinalis</i>	TC	20/30	--	28	Prerefrigerazione a 5°C per 5 giorni
<i>Avena sativa</i>	C	20	--	10	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Beta vulgaris</i>	TC	20/30	--	10	Prelavaggio per 2 ore a 25°C e scatur a
<i>Brassica juncea</i>	C	20/30	L	7	Prerefrigerazione a 10°C per 7 giorni
<i>Brassica napus</i>	C	20/30	L	7	
<i>Brassica nigra</i>	C	20/30	L	7	Prerefrigerazione a 10°C per 3 giorni; KNO_3
<i>Brassica oleracea</i>	C	20/30	L	10	Prerefrigerazione a 5-10°C per 3 giorni; KNO_3
<i>Capsicum frutescens</i>	C	20/30	L	14	Prerefrigerazione a 5-10°C per 3 giorni; KNO_3
<i>Carthamus tinctorius</i>	TC	20	--	14	Pretrattamento con luce a 15°C
<i>Cicer arietinum</i>	TC	20	--	8	
<i>Cichorium intybus e endivia</i>	C	20/30	L	14	KNO_3
<i>Citrullus lanatus</i>	TC	20/30	--	14	
<i>Cucumis melo</i>	TC	20/30	--	10	
<i>Cucumis sativus</i>	TC	20/30	--	7	
<i>Cucurbita maxima</i>	TC	20/30	--	7	
<i>Cucurbita pepo e moschata</i>	TC	20/30	--	7	
<i>Cynara cardunculus</i>	TC	20/30	--	21	
<i>Daucus carota</i>	C	20/30	--	14	GA_3 50 ppm
<i>Fagopyrum esculentum</i>	C	20/30	--	6	
<i>Glycine max</i>	TC	20/30	--	8	
<i>Helianthus annuus</i>	TC	20/30	--	7	
<i>Hordeum vulgare</i>	C	20	--	7	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Lactuca sativa</i>	C	20	L	7	Prerefrigerazione a 10°C per 3 giorni
<i>Lathyrus sativus</i>	TC	20	--	14	Scarificazione meccanica dei semi duri
<i>Lens culinaris</i>	TC	20	--	10	Scarificazione meccanica dei semi duri
<i>Linum usitatissimum</i>	C	20/30	--	7	
<i>Lupinus angustifolius e albus</i>	TC	20	--	10	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	C	20/30	L	14	KNO_3
<i>Medicago sativa</i>	C	20	--	7	Scarificazione meccanica dei semi duri
<i>Melilotus albus</i>	C	20	--	7	
<i>Ocimum basilicum</i>	C	20	L	14	KNO_3
<i>Pennisetum glaucum</i>	C	20/30	--	7	
<i>Phaseolus lunatus</i>	TC	20/30	--	9	
<i>Phaseolus vulgaris e coccineus</i>	TC	20/30	--	8	
<i>Pisum sativum</i>	TC	20	--	8	
<i>Raphanus sativus</i>	C	20/30	--	6	
<i>Ricinus communis</i>	TC	20/30	--	14	
<i>Secale cereale</i>	C	20	--	7	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Solanum melongena</i>	C	20/30	L	14	Prerefrigerazione a 10°C per 3 giorni; KNO_3
<i>Sorghum bicolor</i>	C	20/30	--	10	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Trifolium pratense</i>	C	20	--	10	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Trifoliumalexandrinum</i>	C	20	--	7	
<i>Triticosecale</i>	C	20	--	7	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Triticum aestivum e durum</i>	C	20	--	7	Prerefrigerazione a 5-10°C per 5 giorni
<i>Vicia faba</i>	TC	20	--	14	Prerefrigerazione a 10°C per 3 giorni
<i>Vicia sativa</i>	C	20	--	10	
<i>Vigna mungo e sinensis</i>	TC	20/30	--	7	
<i>Vigna unguiculata</i>	TC	20/30	--	8	
<i>Zea mays</i>	TC	20/30	--	7	

Attrezzatura

- Camera fredda per lo stoccaggio dei semi (+4°C)
- Congelatore
- Macchina per insacchettamento sotto vuoto.
- Due termoigrografi digitali con datalogger.
- Sacchetti multistrato per confezionamento.
- Stampante per etichette adesive indelebili.
- Agitatore magnetico e relative ancorine.
- Distillatore (o acqua distillata).
- Carta da filtro Whatman 181.
- Carta Whatman 3663 *for seed testing*.
- Capsule petri o germinatoi.
- Cameretta con controllo della temperatura giorno/notte e dell'illuminazione interna.
- Bilancia analitica.
- Bilancia tecnica.
- Vagli.
- Stufa munita di controllo della temperatura ($\pm 1^\circ\text{C}$).
- Misuratore digitale di umidità dei semi.
- Camera per essiccazione semi (+15°C e 15% di umidità relativa).

oppure

Contenitori di essiccazione contenenti gel di silice, o soluzione satura di CaCl_2 e muniti di ventilazione interna.

Conservazione

Il materiale ritenuto idoneo a costituire un campione di seme da conservazione, viene infine posto in contenitori perfettamente ermetici (meglio sottovuoto) e posto nella cella di conservazione. Questa può essere costituita da un locale opportunamente coibentato oppure da frigoriferi o incubatori ad alta precisione, di capienza variabile in funzione della dimensione della banca del germoplasma. L'attrezzatura deve essere caratterizzata da un'elevata uniformità di temperatura in ogni punto della camera interna attraverso un meccanismo di ventilazione forzata che garantisca il mantenimento e l'accuratezza della temperatura selezionata. Oltre al controllo della temperatura è indispensabile il monitoraggio dell'umidità: questi due parametri devono essere compresi tra 4-7°C e 40-50%, rispettivamente per temperatura ed umidità.

Indicazioni per specie

***Allium cepa* L. (cipolla)**

FAMIGLIA: Alliaceae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. E' opportuno ridurre l'umidità del seme al 7%. In queste condizioni, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 200 g.

***Allium porrum* L. (porro)**

FAMIGLIA: Alliaceae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. E' opportuno ridurre l'umidità del seme al 7%. In queste condizioni, sempre

in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 200 g.

***Allium sativum* L. (aglio)**

FAMIGLIA: Alliaceae

Conservazione: i bulbi ben secchi si conservano in locali ventilati ed asciutti: si mantengono tali a temperature di 0°C con umidità non superiore al 70% per circa 6 mesi. Temperature comprese tra 15 e 18°C favoriscono il germogliamento del bulbo ed una percentuale di umidità relativa elevata favorisce lo sviluppo di marciumi.

Quantità di bulbi in collezione nella banca del germoplasma: 5 kg.

***Asparagus officinalis* L. (asparago)**

FAMIGLIA: Asparagaceae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 500 g.

***Beta vulgaris* L. (bietola)**

Beta vulgaris L. var. *cycla* L. Ulrich

FAMIGLIA: **Chenopodiaceae**

Conservazione: il seme prodotto ed essiccato (10% di umidità) deve essere conservato in confezioni impermeabili all'aria, alla temperatura di 5-10°C. In queste condizioni, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 2 kg di glomeruli.

***Brassica oleracea* L. (cavolo)**

FAMIGLIA: **Cruciferae**

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 300 g.

***Cicer arietinum* L. (cece)**

FAMIGLIA: **Leguminosae**

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 1 kg.

***Cichorium intybus* L., *Cichorium endivia* L. (radicchio, cicoria)**

FAMIGLIA: **Compositae**

Conservazione: il seme ben essiccato (umidità 10%) deve essere conservato in contenitori ermetici in ambiente termoregolato, con temperature massime di 10°C. In queste condizioni, mantiene inalterate le sue caratteristiche germinative per circa 3 anni.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 100 g.

***Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. (cocomero)**

FAMIGLIA: Cucurbitaceae

Conservazione: il seme prodotto ed essiccato (10% di umidità) deve essere conservato in confezioni impermeabili all'aria, a temperatura di 5-10°C. In queste condizioni, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 500 g.

***Cucumis melo* L. (melone)**

FAMIGLIA: Cucurbitaceae

Conservazione: il seme prodotto ed essiccato (9% di umidità) deve essere conservato in confezioni impermeabili all'aria, a temperatura di 5-10°C. In queste condizioni, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 500 g.

***Cucurbita pepo* L. (zucchino)**

***Cucurbita maxima* Duch., *C. moschata* Duch., *C. mixta* Pang. (zucca da inverno)**

FAMIGLIA: Cucurbitaceae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma:

***Cynara cardunculus* L. var. *altilis* D.C. (cardo)**

FAMIGLIA: Compositae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 3 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 500 g.

***Daucus carota* L. (carota)**

FAMIGLIA: Umbelliferae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C quando l'umidità del seme viene abbassata a circa il 7%. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 50 g.

***Hordeum vulgare* L. (Orzo)**

FAMIGLIA: Graminaceae (Poaceae)

Conservazione: il seme è di tipo *orthodox* e deve essere conservato ad un contenuto di umidità massimo del 10% alla temperatura di 4 °C in confezioni sigillate e completamente impermeabili al vapor d'acqua. A queste condizioni la semente manterrà una germinabilità molto elevata per almeno 3-4 anni.

Quantità di seme in collezione presso la Banca del germoplasma: 9-12 kg.

***Isatis tinctoria* L.** (guado)

FAMIGLIA: Brassicaceae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato, una volta essiccato, in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 3 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 200 g seme; 1 kg silique.

***Lactuca sativa* L.** (lattuga)

FAMIGLIA: Compositae

Conservazione: il seme ben essiccato (umidità 10%) deve essere conservato in contenitori ermetici in ambiente termoregolato, con temperature massime di 10°C. In queste condizioni, mantiene inalterate le sue caratteristiche germinative per circa 5 anni.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 100g.

***Lycopersicon lycopersicum* (L.) Farw.** (pomodoro)

FAMIGLIA: Solanaceae

Conservazione: il seme prodotto deve essere conservato, una volta essiccato (8% di umidità), in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 200 g.

***Medicago sativa* L.** (erba medica)

FAMIGLIA: Leguminosae

Conservazione: il seme prodotto che non deve possedere un'umidità superiore al 10% deve essere lavorato e selezionato meccanicamente. Piccoli quantitativi possono mantenersi in celle frigo da 5 a 10°C. A questa temperatura, in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 15 kg.

***Ocimum basilicum* L.** (basilico)

FAMIGLIA: Labiatae

Conservazione: il seme prodotto, essiccato, deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 1 kg.

***Phaseolus vulgaris* L.** (Fagiolo)

FAMIGLIA: Fabaceae

Conservazione: il seme è di tipo *orthodox* e deve essere conservato ad un contenuto di umidità massimo del 11,5% alla temperatura di 4 °C in confezioni sigillate e completamente impermeabili al vapor d'acqua. A queste condizioni la semente manterrà una germinabilità molto elevata per almeno 3-4 anni. Dato che la raccolta dei fagioli viene effettuata al 18-20% di umidità sarà essenziale provvedere allo loro essiccazione prima dello stoccaggio presso la Banca del germoplasma. Per prevenire o ridurre lo sviluppo del tonchio, i semi essiccati, messi in un sacchetto di plastica chiuso ermeticamente, vengono messi a -18 °C per circa 48 ore e poi, quando avranno raggiunto la temperatura ambiente, impacchettati e stoccati a 4 °C.

Quantità di seme in collezione presso la Banca del germoplasma: 0,6-1,8 kg.

***Pisum sativum* L. (pisello)**

FAMIGLIA: Leguminosae

Conservazione: per una buona conservazione l'umidità del seme deve essere inferiore all'11-12%. È bene che vengano conciatati con prodotti insetticidi e fungicidi (Thiram 100-150 g di principio attivo per quintale di seme). Possono essere effettuate fumigazioni sottovuoto per la disinfestazione degli insetti di magazzino.

Per una migliore difesa dagli insetti che attaccano il seme durante la conservazione e considerato che alla raccolta si possono trovare le uova del tonchio (*Bruchus rufimanus*) si consiglia tenere il seme ben essiccato (10% di umidità) per una settimana nel surgelatore (-18 °C). Per essere più sicuri è bene ripetere l'operazione dopo circa dieci giorni dalla prima

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 3-5 kg.

***Raphanus sativus* L. (ravanello)**

FAMIGLIA: Brassicaceae

Conservazione: il seme prodotto una volta essiccato (9%) deve essere conservato in confezioni a tenuta di umidità, a temperatura di 5-10°C. A questa temperatura, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 500 g.

***Secale cereale* L. (Segale)**

FAMIGLIA: Graminaceae (Poaceae)

Conservazione: il seme è di tipo *orthodox* e deve essere conservato ad un contenuto di umidità massimo del 9% alla temperatura di 4 °C in confezioni sigillate e completamente impermeabili al vapor d'acqua. A queste condizioni la semente manterrà una germinabilità molto elevata per almeno 3-4 anni.

Quantità di seme in collezione presso la Banca del germoplasma: 9-12 kg.

***Solanum melongena* L. (melanzana)**

FAMIGLIA: Solanaceae

Conservazione: sebbene comunemente è noto che i semi di melanzana hanno una durata della capacità germinativa di 4-5 anni, alcune prove hanno dimostrato che un'ottima vitalità può essere conservata per 10 anni purché il vigore iniziale sia elevato e la conservazione dei semi stessi sia effettuata in modo adeguato: dopo un accurato essiccamento, in recipienti a tenuta, a bassa temperatura (5°C). Il lavaggio con acqua o la sua disinfestazione esterna con ipoclorito di sodio (4% di cloro attivo per 5-10 minuti) e successivo accurato lavaggio e idonea essiccazione fino all'8% di umidità del seme sono molto efficaci nel ridurre la frequenza di semi contaminati quando la localizzazione del patogeno è superficiale.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 300 g.

***Solanum tuberosum* L. (Patata)**

FAMIGLIA: Solanaceae

Conservazione: i tuberi devono essere conservati alla temperatura di 5-6 °C in celle ben ventilate in modo da consentire la cicatrizzazione di eventuali ferite subite durante la raccolta ed evitare la condensazione di acqua sui tuberi. Temperature maggiori di 5-6 °C possono causare il germogliamento dei tuberi durante la fase di stoccaggio. Al contrario temperature più basse causano un eccessivo accumulo di zuccheri semplici all'interno del tubero.

Quantità di seme in collezione presso la Banca del germoplasma: 180-200 tuberi.

***Triticum aestivum* L. (Frumento tenero)**

FAMIGLIA: Graminaceae (Poaceae)

Conservazione: il seme è di tipo *orthodox* e deve essere conservato ad un contenuto di umidità massimo del 9% alla temperatura di 4 °C in confezioni sigillate e completamente impermeabili al vapor d'acqua. A queste condizioni la semente manterrà una germinabilità molto elevata per almeno 3-4 anni.

Quantità di seme in collezione presso la Banca del germoplasma: 9-12 kg.

***Triticum monococcum* L. (Farro piccolo)**

***Triticum dicoccum* Schübler (Farro medio, Farro)**

***Triticum spelta* L. (Farro grande, Spelta)**

FAMIGLIA: Graminaceae (Poaceae)

Conservazione: il seme è di tipo *orthodox* e deve essere conservato ad un contenuto di umidità massimo del 9% alla temperatura di 4 °C in confezioni sigillate e completamente impermeabili al vapor d'acqua. A queste condizioni la semente manterrà una germinabilità molto elevata per almeno 3-4 anni.

Quantità di seme in collezione presso la Banca del germoplasma: 12-14 kg.

***Vicia faba* L. (fava e favino)**

Vicia faba L. var. *major* (Harz) Beck

Vicia faba L. var. *minor* (Peterm.em.Harz) Beck

FAMIGLIA: Fabaceae

Conservazione: il seme prodotto ed essiccato (10% di umidità) deve essere conservato in confezioni impermeabili all'aria, a temperatura di 5-10°C. In queste condizioni, sempre in contenitori ermetici o sottovuoto, il seme può essere conservato anche per 5 anni senza subire gravi danni alle caratteristiche germinative.

Per una migliore difesa dagli insetti che attaccano il seme durante la conservazione e considerato che alla raccolta si possono trovare le uova del tonchio (*Bruchus rufimanus*), si consiglia tenere il seme ben essiccato per una settimana nel surgelatore (-18 C°). Per essere più sicuri è bene ripetere l'operazione dopo circa dieci giorni dalla prima.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 1 kg per la varietà *major*;

5 kg per la varietà *minor*.

***Zea mays* L. (mais)**

FAMIGLIA: Graminaceae

Conservazione: il seme essiccato confezionato in contenitori ermetici, può essere conservato per circa 5 anni a temperatura compresa tra 5 e 10 °C.

Quantità di seme in collezione nella banca del germoplasma: 3 kg.

Bibliografia

FAO/IPGRI, 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome.

Hong , T.D., Linington, S.H. and Ellis, R.H. 1996. Seed storage behaviour: A compendium. Handbooks for Genebanks No. 4 IPGRI, Roma.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.

Ministreo dell'agricoltura e foreste. 1965. Metodi ufficiali di analisi delle sementi. Istituto poligrafico dello stato, Roma.