

## Introduzione

L'incapsulamento è una tecnologia mediante la quale espianti *in vitro*-derivati di piccolissime dimensioni, vengono racchiusi in una *matrice* con funzione nutritiva (*endosperma artificiale*) e protettiva, di pochi millimetri di diametro, capace di mantenerne inalterata la vitalità e la capacità di crescita, anche dopo eventuale stoccaggio (Standardi e Micheli, 2013). Alcuni polisaccaridi naturali, come l'alginato, sono risultati particolarmente adatti alla creazione della matrice incapsulante: la loro solidificazione, che conduce alla formazione della capsula, avviene per "scambio ionico" (complessazione), che non provoca danni ai propaguli. Attualmente il metodo di scambio ionico è il più diffuso e l'agente incapsulante è rappresentato dall'*alginato di sodio* che consente di ottenere capsule uniformi (di dimensioni di circa 4-6 mm) grazie alla moderata viscosità, che riduce la tendenza a filare e alla rapidità di solidificazione. Per ottenere la gelificazione è sufficiente sostituire il sodio dell'alginato con un catione bivalente o trivalente: di solito si ricorre all'uso di *cloruro di calcio*. Tra le possibili applicazioni dell'incapsulamento si annovera la salvaguardia del germoplasma vegetale, sia mediante l'uso delle temperature ultrabasse (crioconservazione) che per la frigoconservazione. Obiettivo del nostro lavoro è stato, appunto, quello di verificare, in via preliminare, se sia possibile utilizzare questa tecnologia come strumento di salvaguardia di germoplasma locale di fruttiferi.

## Materiali e Metodi

Il materiale vegetale micropropagato ed impiegato nello studio proveniva da subcolture di Melo varietà *A Sonagli*, Pero varietà *Marzaiola* e Susino varietà *Montebello*, conservate presso la banca del germoplasma del Parco Tecnologico 3A-PTA di Pantalla (PG).

Dai germogli *in vitro*-derivati sono state prelevate porzioni uninodali di 3-4 mm di lunghezza, dotate di gemme ascellari (*microtalee*), che sono state sottoposte ad incapsulamento seguendo il protocollo descritto da Standardi e Micheli (2013): immersione delle microtalee per pochi secondi in una soluzione incapsulante caratterizzata dall'aggiunta di alginato di sodio (25 g/L) ad una soluzione nutritiva di base (*endosperma artificiale*) costituita dalla componente nutritiva usata nella fase di proliferazione, a metà concentrazione, addizionata di 50 g/L di saccarosio; trasferimento in una soluzione complessante, costituita dall'*endosperma artificiale* arricchito di cloruro di calcio (11 g/L) per 30 minuti; eliminazione dei sali in eccesso tramite una soluzione di lavaggio, identica all'*endosperma artificiale* priva di aggiunte, per tre risciacqui consecutivi di 15 minuti ciascuno.

Le capsule così ottenute sono state utilizzate per impostare la prova sperimentale composta da due controlli (*A-microtalee nude* e *B-capsule*, seminate su terreno privo di ormoni in cella climatica) e tre Tesi, in cui le capsule sono state sottoposte a frigoconservazione (+4°C al buio) per 1 mese (Th.1), 3 mesi (Th.2) e 6 mesi (Th.3). Al termine di ogni periodo le microtalee incapsulate sono state seminate in 4 vasi Magenta® (7x7x10cm), contenenti ciascuno 5 capsule, posizionate in un substrato di proliferazione senza ormoni e posti in cella climatica (+23°C, 16 ore di luce).

Tanto per i due controlli, quanto per le tre tesi, a 30 gg dalla semina è stato eseguito un rilievo (ripetuto dopo altri 10 gg) per valutare il tasso di ripresa (emissione di germogli vegetativi e radicali) delle capsule e registrare eventuali osservazioni. Quindi le capsule sono state poi trasferite su terreno completo (specifico per la specie) per valutarne la performance in termini di proliferazione, rilevando, dopo altri 40 gg i seguenti parametri: numero e lunghezza dei germogli, numero di nodi e lunghezza degli internodi, presenza di callo ed eventuali anomalie.

## Risultati e Discussione

Nella tabella 1 sono mostrati i risultati relativi alla ripresa degli espianti per le tre varietà per ciascuna tesi, rispetto ai due confronti.

Analizzando i risultati si evince per Melo una percentuale di ripresa crescente in funzione del periodo di permanenza in fitotrone e comunque sempre superiore (anche del 15-20%) rispetto ai due controlli. In Pero è stata raggiunta una ripresa totale per la tesi 2, mentre le tesi 1 e 3 mostrano valori intermedi rispetto ai controlli. Ben diversa la situazione in Susino, dove la ripresa completa dell'espianto è stata osservata per il controllo B, mentre per la tesi 2 sono stati registrati i valori più bassi. Va segnalato però che in Susino il liquido nutritivo in cui le capsule erano immerse durante la frigoconservazione è risultato, al momento del trasferimento in cella climatica, addensato e quasi al limite del congelamento, cosa che può aver influito sulla vitalità degli espianti. La causa forse è la presenza delle pectine nella composizione del substrato nutritivo, elemento viceversa assente nei substrati di Melo e Pero, dove tale fenomeno non è stato riscontrato.

Nella tabella 2 sono mostrati i dati di performance proliferativa misurati per le tesi 1 e 2 in tutte e le tre accessioni. I dati, analizzati con test *t-student*, non mostrano differenze statisticamente significative (per  $p < 0.05$ ). Esaminando nel dettaglio i valori si osserva che:

- in Melo la differenza maggiore tra le tesi ed il controllo si ha nella lunghezza degli internodi, per cui gli espianti sottoposti al protocollo presentano, a parità di lunghezza, un numero maggiore di nodi;
- in Pero la tesi 1 è quella che registra i valori più alti, mentre la tesi 2 (che aveva fatto registrare una ripresa completa delle capsule) mostra i valori più bassi, soprattutto in termini di lunghezza degli espianti;
- in Susino si osserva una corrispondenza più marcata tra % di ripresa delle capsule e performance degli espianti, dato che in entrambe le tesi 1 e 2 si registrano valori più bassi di quelli misurati nei due controlli.

In generale, le performance misurate per le tre specie risultano decisamente inferiori a quelle normalmente osservate nei normali cicli di proliferazione. Questo potrebbe essere imputabile alla estrema miniaturizzazione delle microtalee, necessaria all'incapsulamento, rispetto a quanto solitamente in uso nelle subcolture di proliferazione e rispetto anche a quanto osservato in precedenti studi condotti proprio su due delle tre specie qui saggiate (Concezzi *et al.*, 2010; Concezzi *et al.*, 2011). Tale miniaturizzazione potrebbe risultare eccessiva e ridurre sensibilmente la capacità di sviluppo delle plantule.

## Conclusioni

I risultati di questo studio preliminare, sebbene per alcuni aspetti ancora in fase di finalizzazione, mostrano un andamento contrastante: ai valori positivi di ripresa delle capsule infatti non sempre corrisponde una analoga performance proliferativa degli espianti. Ciò è valido in primo luogo per Pero e, anche se in misura leggermente inferiore, per Melo. Un discorso a parte invece per Susino, dove i risultati potrebbero essere stati influenzati negativamente da alcuni elementi presenti nel substrato nutritivo. Date però le potenzialità della tecnica dell'incapsulamento, anche nell'ottica di una diversificazione delle strategie di conservazione *ex situ*, è lecito ritenere che una ulteriore fase di studio potrebbe mettere in luce possibili soluzioni alle problematiche qui riscontrate.

## Bibliografia

- Concezzi L., Desantis F., Gramaccia M., Paladin C., 2010. *Le attività di conservazione di varietà locali di fruttiferi presso la Banca del germoplasma in vitro della Regione Umbria*. Poster presentato al Workshop "La coltura *in vitro* applicata alla conservazione e alla valorizzazione della biodiversità vegetale". L'Aquila, 30 settembre – 1 ottobre 2010.
- Concezzi L., Desantis F., Gramaccia M., Micheli M., Gardi T., Raggi L., Brigida C., Albertini E., Falcinelli M., 2011. *Effetti della conservazione alle basse temperature e controllo della stabilità genetica su germoplasma locale di melo in collezione presso la Banca del germoplasma in vitro della Regione Umbria*. Poster presentato al 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione. Sanremo, 7-9 novembre 2011.
- Standardi A., Micheli M. (2013). *Encapsulation of in vitro-derived explants: an innovative tool for nurseries*. In: Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. Methods in Molecular Biology 11013. M. Lambardi, A.E. Ozudogru and S.M. Jain (Eds.). Publisher Humana Press-Springer (Springer-Verlag GmbH Heidelberg, Germany): 397-418.

Tabella 1. Risultati (in percentuale) della ripresa delle microtalee incapsulate

TESI	Melo cv. A Sonagli	Pero cv. Marzaiola	Susino cv. Montebello
A (Controllo)	58,3	50	41,6
B (Controllo)	55	75,0	100
1 (30 gg a +4°C)	70	63,1	55
2 (90 gg a +4°C)	73,6	100	15
3 (180 gg a +4°C)	79,2	56,0	32

Tabella 2. Valori medi misurati al termine di 40 gg di proliferazione su substrato nutritivo completo, per le tesi 1 e 2 delle tre varietà

MELO cv. A Sonagli			
TESI	N° Germogli	Lunghezza Germogli (mm)	Lunghezza Internodi (mm)
A (Controllo)	1,00	5,67	1,08
B (Controllo)	0,67	7,33	1,32
1 (30 gg a +4°C)	1,13	9,00	0,67
2 (90 gg a +4°C)	0,59	6,50	0,76
PERO cv. Marzaiola			
TESI	N° Germogli	Lunghezza Germogli (mm)	Lunghezza Internodi (mm)
A (Controllo)	1,22	21,41	3,48
B (Controllo)	2,20	24,77	3,11
1 (30 gg a +4°C)	1,65	28,29	2,74
2 (90 gg a +4°C)	0,95	13,74	2,97
SUSINO cv. Montebello			
TESI	N° Germogli	Lunghezza Germogli (mm)	Lunghezza Internodi (mm)
A (Controllo)	0,75	9,33	1,47
B (Controllo)	1,20	11,07	1,20
1 (30 gg a +4°C)	0,22	4,00	2,05
2 (90 gg a +4°C)	0,15	7,50	0,70

