

ALVARO STANDARDI\*

## Una nuova tecnologia vivaistica *in vitro*

Lettura tenuta il 6 dicembre 2007

La globalizzazione del mercato coinvolge anche i prodotti vivaistici e presuppone ampia libertà di circolazione dei vegetali, o parti di essi, ma a ciò si contrappongono problematiche di ordine tecnico, come la difficoltà di introdurre piante in quei Paesi dove vigono, per problemi di ordine sanitario, ferree normative relative all'importazione di materiale vegetale. A fronte di tutto ciò, interessanti prospettive si intravedono nell'utilizzazione della coltura *in vitro*, quale tecnica per la propagazione delle piante, in quanto in grado di garantire disponibilità di materiale sano, omogeneo e di qualità. Tuttavia, l'impiego di materiale micropropagato, prodotto in condizioni di asepsi, poco maneggevole è inadatto alle consuete pratiche di stoccaggio e di trasporto a causa del deperimento e/o danneggiamento durante la movimentazione e perciò sembra presentare dei limiti, soprattutto di natura commerciale. Infatti, le piante *in vitro*-derivate presentano gli stessi problemi gestionali di quelle ottenute mediante i tradizionali metodi di propagazione e cioè debbono essere ambientate e razionalmente allevate in vista della loro commercializzazione altrimenti vanno incontro a deperimento. In quest'ottica, da alcuni anni, anche presso il Laboratorio di colture *in vitro* annesso al Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia, si sta tentando la messa a punto di nuove tecnologie in grado di coniugare i vantaggi della clonazione (elevata efficienza produttiva in spazi ridotti, certezza sanitaria, omogeneità e uniformità del materiale vegetale, rapidità del ciclo produttivo) con quelli propri dei semi gamici, quali maneggevolezza, conservabilità, dimensioni ridotte e facilità di trasporto (Standardi et al., 1999). Tali potenzialità vengono offerte dall'incapsulamento, tecnologia che si integra con la micropropaga-

\* Dipartimento Scienze Agrarie ed Ambientali, Università degli Studi di Perugia



Foto 1 *Prodotti della tecnologia dell'incapsulamento (Capsule e Semi sintetici)*

zione e che è definita come processo mediante il quale espianti *vitro*-derivati vengono racchiusi in una matrice con funzione nutritiva e protettiva, capace di mantenere inalterata la loro vitalità e la capacità di crescita, anche dopo eventuale stoccaggio (conservazione) e trasporto (foto 1).

Mediante l'incapsulamento, gli espianti vegetali vengono quindi dotati di un rivestimento consistente esterno (matrice incapsulante) contenente disciolte sostanze nutritive (endosperma artificiale) e il tutto consente di:

- proteggerli da eventuali danni meccanici durante la manipolazione e il trasporto e preservarli dal pericolo della disidratazione durante la conservazione (*funzione protettiva*);
- fornire loro elementi nutritivi, fonti energetiche, sostanze regolatrici della crescita ed eventuali prodotti per il controllo dei parassiti (*funzione trofica*).

Tra i metodi di incapsulamento studiati, quello della gelificazione ha fornito risultati promettenti e per la realizzazione della matrice gelatinosa della capsula nutritiva e protettiva l'alginato è risultato particolarmente adatto perché la sua solidificazione avviene in seguito ad un meccanismo di complessazione (scambio ionico) che generalmente non provoca danni ai propaguli (Redenbaugh et al., 1986 e 1987).

Nella foto 2 viene schematizzata la procedura di incapsulamento che prevede tre successive fasi, la prima delle quali comporta l'immersione dei

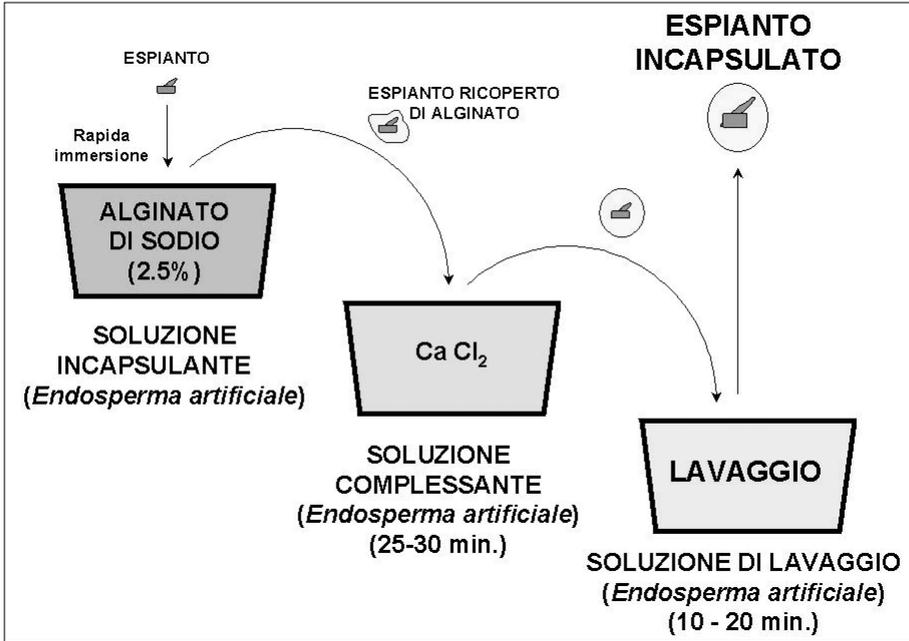


Foto 2 *Le tre fasi della procedura di incapsulamento di espianti vegetali ottenuti in vitro*

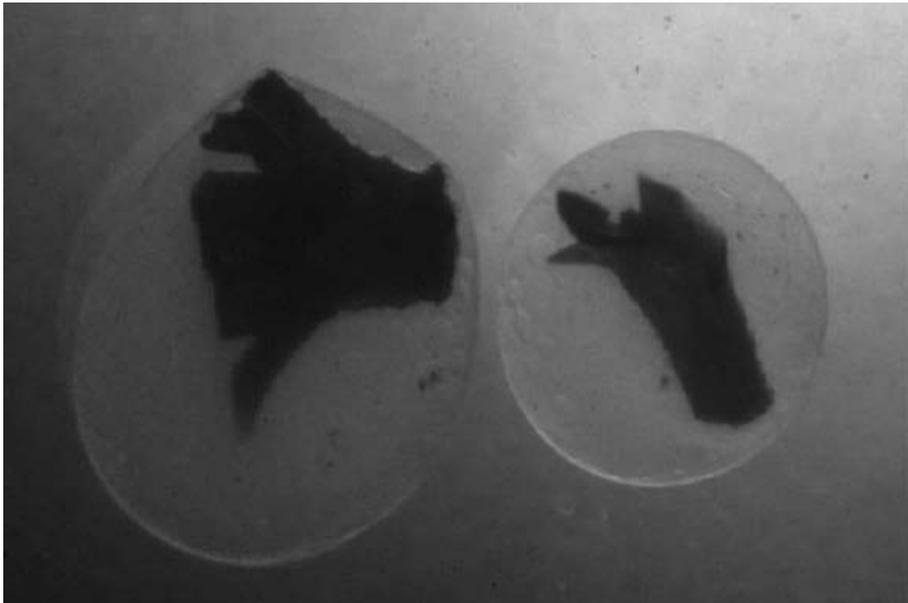


Foto 3 *Capsule con microtalee uninodali di olivo destinate a successiva micropropagazione*



Foto 4 Germoglio proveniente da *microtatea incapsulata* del portinnesto di melo M.2.6

propaguli o degli embrioni somatici in una soluzione di alginato di sodio, prelevandoli poi singolarmente con la goccia di gel che aderisce al loro intorno e facendoli quindi cadere nella soluzione complessante di cloruro di calcio dove si verifica, in 20-30 minuti, la graduale solidificazione del gel fino a ottenere un rivestimento esterno ai propaguli di consistenza idonea alla manipolazione, con resistenza alla pressione di rottura pari a circa 2-3 Kg (Redenbaugh et al., 1987). La funzione trofica dell'involucro nei confronti dei propaguli viene assicurata dall'aggiunta di elementi nutritivi alla soluzione di alginato riproducendo una sorta di endosperma artificiale si-

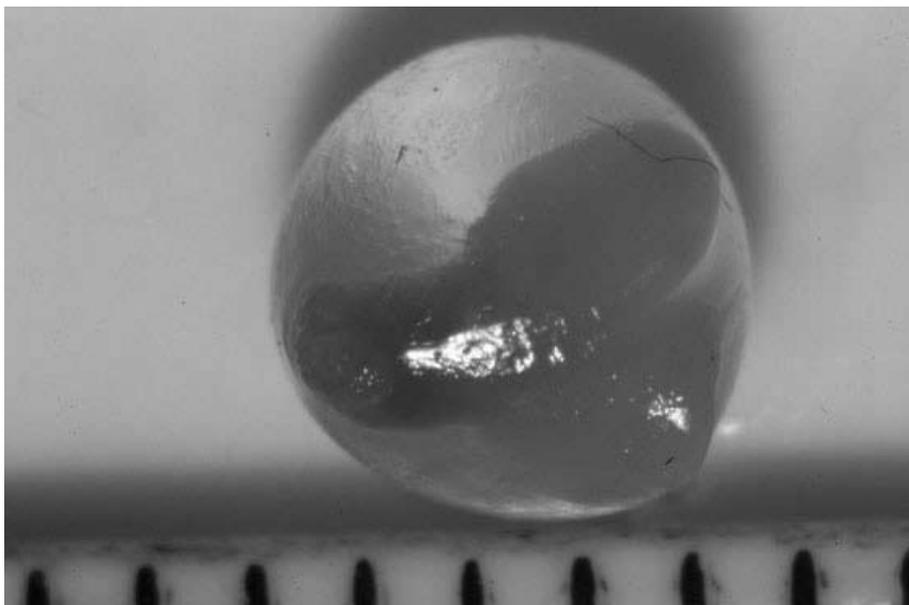


Foto 5 *Embrione somatico di "Clementine" destinato alla semina*

mile a quello dei semi zigotici (Bapat, 1993; Mathur et al., 1989; Standardi e Piccioni, 1998).

Le matrici incapsulanti e gli espianti vegetali in esse racchiuse, frutto di tale tecnologia, vengono definite "capsule" (foto 3) quando gli espianti verranno successivamente, nello stesso o altro laboratorio, nuovamente allevati nelle condizioni di coltura *in vitro* e quindi riutilizzati nella tecnica della micropropagazione (foto 4). Diviene "seme sintetico" se l'espianto all'interno della matrice è destinato a evolvere in plantula (*conversione*) a seguito di semina in condizioni di asepsi (*in vitro*) o in vivo (*ex vitro*) e quindi può essere potenzialmente impiegato dall'utilizzatore finale (foto 5).

Il concetto di seme sintetico nasce nel 1977, quando Murashige avanzò l'ipotesi di poter utilizzare l'embriogenesi somatica a fini applicativi. Egli formulò, in seguito (1978), la prima definizione di seme sintetico (*synthetic seed*) che però limita il campo di applicazione della tecnologia dell'incapsulamento solo a quelle specie per le quali si disponesse di un protocollo rigenerativo mediante embriogenesi somatica. Nella definizione originaria si faceva riferimento a un propagulo bipolare in grado di mantenere la capacità di evolvere in una plantula, quando racchiuso in un involucro artificiale con medesime funzioni dei tegumenti seminali. La conversione di un embrione

somatico è stata, quindi, definita come contemporanea crescita e sviluppo di organi ipogei ed epigei accompagnata da ridotta produzione di callo e diretta connessione vascolare tra radici e germoglio indirizzando l'uso di questo termine alla formazione di una plantula completa a partire da un seme sintetico (Redenbaugh, 1993). Le possibilità applicative dell'embriogenesi somatica sono però vincolate alla risoluzione di alcune problematiche ancora irrisolte, quali: la sincronizzazione dello sviluppo degli embrioni somatici, la variabilità somaclonale e i bassi livelli di conversione dei semi sintetici (Kozai et al., 1991). La sincronizzazione dello sviluppo degli embrioni somatici rimane un valido obiettivo della ricerca e sono stati ottenuti discreti risultati facendo ricorso a opportuni dosaggi ormonali o a tecniche quali la separazione in gradiente di densità e il setacciamento volumetrico. Attualmente, comunque, sembra difficile evitare, nella stessa coltura embriogenica, la contemporanea presenza di embrioni a diverso stadio di sviluppo (McKersie et al., 1995). La variabilità somaclonale, rischio che può accompagnare il processo embriogenetico, rappresenta il limite maggiore all'impiego degli embrioni somatici nell'attività vivaistica e quindi quali espianti da utilizzare nella tecnologia dell'incapsulamento (Falcinelli et al., 1993). Conseguentemente, la definizione di seme sintetico ha subito una serie di evoluzioni, fino ad estendere il concetto all'impiego di qualsiasi propagulo *vitro*-derivato in grado di evolvere in plantula, dopo averlo racchiuso in un involucro nutritivo e protettivo ed essere stato posto in condizioni adatte alla sua conversione, siano esse *in vitro* o *in vivo* (Aitken-Christie et al., 1995). Possono essere quindi incapsulati qualsiasi propagulo ottenuto *in vitro*, quali apici meristemati, meristemoidi, gemme apicali e ascellari di germogli proliferati *in vitro* (microtalee), microbulbi, protocormi, frammenti di rizoma e frammenti di radice, purché siano in grado di dare origine a una plantula. Questi espianti sono generalmente unipolari, cioè strutture dotate di un solo meristema, generalmente quello caulinare, in grado di dare origine a un germoglio (Mathur et al., 1989). Il ricorso a propaguli unipolari per l'allestimento di capsule destinate ad altri laboratori non comporta quindi alcun problema purché in essi l'involucro consenta il mantenimento della vitalità e capacità di ripresa una volta posti nuovamente nelle colture *in vitro* dopo trasporto e conservazione. Quando invece gli stessi espianti vengono destinati a evolvere in plantula (semi sintetici) è necessario formare *ex-novo* il meristema di cui sono privi, generalmente quello radicale, in modo da permettere l'ottenimento di plantule durante la fase di conversione, che può avvenire sia *in vivo* o *in vitro*. Il processo che porta alla formazione del meristema mancante è, a tutti gli effetti, un processo organogenetico, anche se in alcuni propaguli naturalmente prodotti dalla

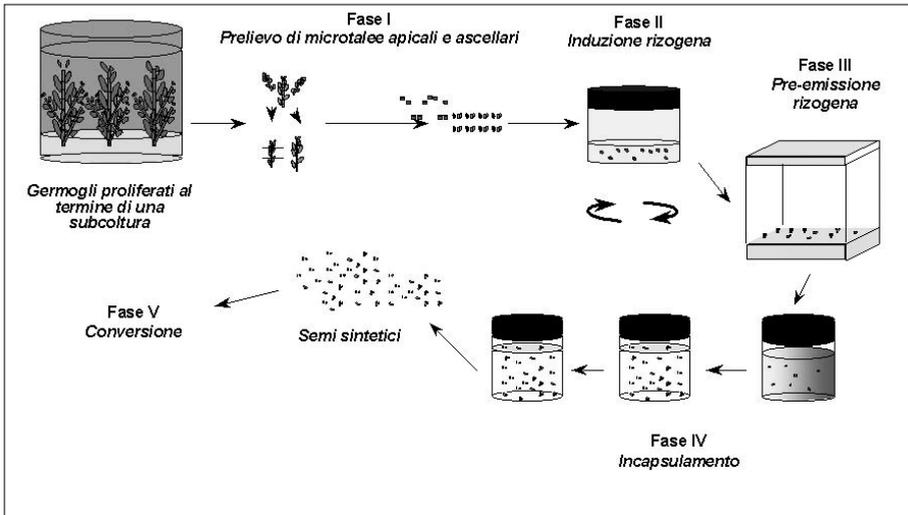


Foto 6 Procedura per ottenere semi sintetici da espianti unipolari (microtalie)

specie sono presenti dei meristemi latenti (ad es. meristemi radicali nel disco basale dei microbulbi) che, una volta attivati, portano alla formazione della parte mancante e alla completa conversione (Standards e Piccioni, 1998). Le gemme delle microtalie tendono a sviluppare facilmente il germoglio, ma non sempre manifestano un'elevata attitudine per ciò che riguarda la rizogenesi. In molte specie, al germogliamento non si accompagna una contemporanea formazione di radici avventizie a causa della ridotta attitudine rizogena del materiale, ragione per cui i livelli di conversione di gemme incapsulate sarebbero nulli o, comunque, molto bassi se non si fosse intravista la possibilità di ricorrere a trattamenti induttivi la radicazione (Piccioni e Standards, 1995). La procedura dell'incapsulamento viene quindi arricchita di ulteriori fasi tendenti a indurre l'emissione di radici: conseguentemente al prelievo delle microtalie da germogli in proliferazione seguono trattamenti induttivi la rizogenesi prima che le stesse vengano incapsulate e destinate alla commercializzazione e semina, previa eventuale conservazione (foto 6).

La tecnica del seme sintetico presenta delle peculiarità che possono apportare notevoli vantaggi nella propagazione delle piante, ma anche alcuni problemi che al momento rappresentano dei limiti alla diffusione a livello applicativo, richiedendo alla ricerca soluzioni efficaci volte a:

1. ottimizzare il protocollo per l'allestimento dei semi sintetici, con particolare riferimento alla funzione trofica e protettiva della capsula e alla reale possibilità di conservazione delle capsule;

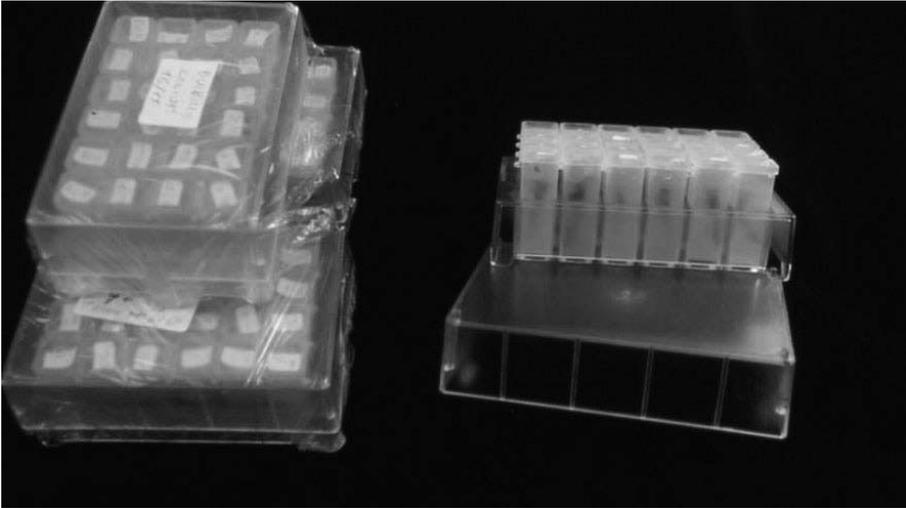


Foto 7 Contenitori per frigo-conservazione e trasporto di capsule e semi sintetici

2. individuare opportune procedure in grado di indurre la rizogenesi e la ripresa vegetativa di espianti unipolari incapsulati a livelli soddisfacenti (conversione);
3. verificare la possibilità di ricorrere all' *ex vitro* per la conversione dei semi sintetici e, quindi, di indurre nella capsula resistenza ai patogeni;
4. limitare il ricorso a interventi manuali nell'allestimento dei semi studiando sistemi di automazione o semi-automazione delle diverse fasi.

Questi aspetti sono attualmente oggetto di attività di ricerca e relativamente al primo, allo stato attuale viene impiegata, quale formulazione in grado di soddisfare esigenze trofiche in fase di ripresa o conversione degli espianti incapsulati, la stessa usata per allestire il substrato di rigenerazione *in vitro*, con variazioni più o meno marcate che prevalentemente interessano la componente ormonale. È opportuno tenere in attenta considerazione la natura degli espianti e la destinazione degli stessi e cioè se si debbono soddisfare esigenze connesse con la conservazione, commercializzazione o direttamente impiegati; sulla base di ciò è infatti emerso, sebbene preliminarmente, che variando la composizione dei substrati e le condizioni di semina, i tempi e l'entità di conservazione e di ripresa vengono sensibilmente influenzati (Micheli et al., 1998, 2000 e 2007). La funzione protettiva è sicuramente prioritaria quando le capsule vengono trasportate; queste dovranno manifestare, infatti, maggior resistenza a manipolazioni e trasporto e maggior consistenza può essere conseguita innalzando la concentrazione degli agenti gelificanti

(alginato di sodio e cloruro di calcio); a ciò fanno però seguito maggiori difficoltà, da parte degli espianti in fase di ripresa e/o conversione, per “rompere” il rivestimento incapsulante. È necessario pertanto individuare procedure e mezzi in grado di coniugare efficienza protettiva della capsula con rapidità e facilità di ripresa e/o conversione degli espianti incapsulati. Dagli studi in atto ci si attende inoltre la soluzione di un ulteriore problema connesso con i rischi di disidratazione a cui gli espianti possono andare incontro durante il trasporto e la conservazione delle capsule all'interno delle quali sono racchiusi. In merito, il rivestimento dell'involucro con una pellicola impermeabile può rappresentare una possibile soluzione ma ciò impedirebbe anche scambi gassosi con conseguenti rischi di devitalizzazione del materiale vegetale. Una possibile soluzione, tutt'ora in corso di validazione sperimentale, prevede che, per la conservazione e per il trasporto, le capsule, potrebbero essere poste all'interno di piccoli contenitori all'interno nei quali dovrà essere consentito un ambiente sterile e un elevato livello di umidità (foto 7).

Affinché la tecnologia dell'incapsulamento possa esprimere quelle potenzialità applicative che ci si attende è necessario che il prodotto, specialmente il seme sintetico, possa essere impiegato dall'utilizzatore finale e cioè dai vivaisti o agricoltori, presso strutture che non possono garantire il rispetto di rigide condizioni di asepsi. In altre parole, è necessario mettere a punto metodologie che consentano l'utilizzazione dei semi sintetici nelle normali condizioni vivaistiche e/o di coltivazione. Per conseguire tale obiettivo è necessario dotare i semi sintetici di adeguata protezione contro patogeni fungini e/o batterici in grado di permettere la conversione anche in ambienti non sterili; a tal fine sono proponibili possibili interventi come l'aggiunta di specifici prodotti all'agente incapsulante, trattamenti di “concia” pre-semina, trattamenti specifici al letto di semina e il ricorso ad antagonisti biologici (Micheli et al., 2002; Germanà et al., 2007).

Un ulteriore problema che si frappone all'impiego industriale della tecnologia dell'incapsulamento è rappresentata dall'elevato onere che richiede in quanto elevato è l'intervento manuale, soprattutto per la preparazione degli espianti e cioè la preparazione, in asepsi, delle singole microtalee, di 3-4 mm, dai germogli proliferati *in vitro*; mentre le fasi dell'incapsulamento possono essere automatizzate, affidandosi a procedure e tecnologie assimilabili a quelle che da tempo vengono impiegate nella microbiologia alimentare ed enologica.

Dai tentativi sperimentali preliminari, tendenti a meccanizzare la preparazione degli espianti da sottoporre a incapsulamento e in grado di convertire a plantula anche dopo incapsulamento sono scaturite interessanti prospettive

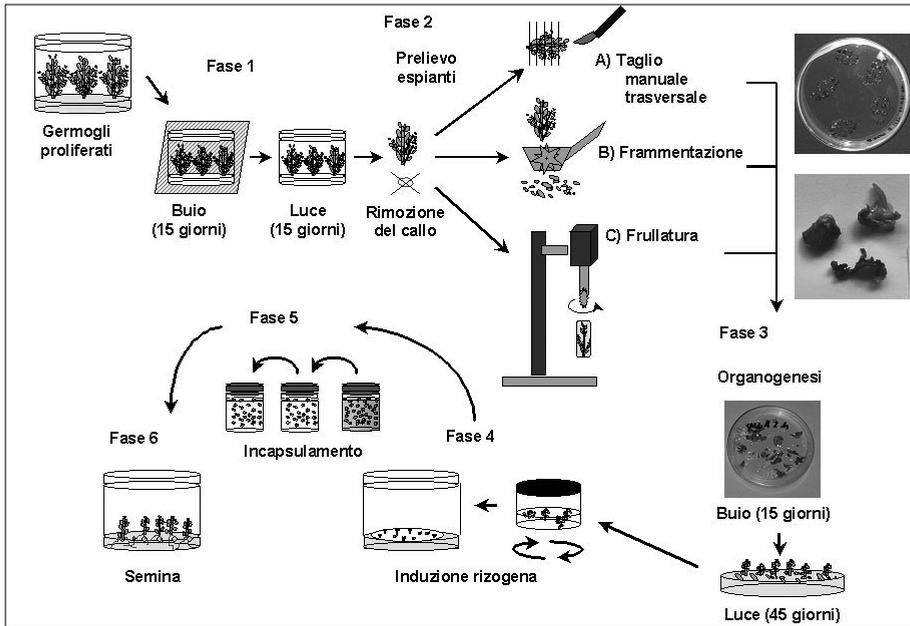


Foto 8 Procedura per l'ottenimento "automatizzato" di espianti organogenetici idonei per allestire semi sintetici

mettendo in evidenza che il ricorso alla organogenesi diretta, quale processo di rigenerazione, potrebbe rappresentare una soluzione alternativa che, tuttavia dovrà essere attentamente verificata; nella foto 8 viene schematizzata la procedura che conduce all'ottenimento "automatizzato" di espianti organogenetici idonei per essere incapsulati e convertire in plantula (Sicurani et al., 2001; Brischia et al., 2002).

In conclusione, l'auspicio è, ovviamente, che quanto prima la tecnologia dell'incapsulamento possa dimostrare la sua validità ed essere efficacemente utilizzata nell'industria vivaistica; a tal fine il gruppo di lavoro che da tempo opera all'interno del laboratorio di colture *in vitro* del Dipartimento Scienze Agrarie ed Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia continuerà nel proprio impegno in modo da arricchire le conoscenze su questo interessante e recente strumento tecnologico (tabb. 1 e 2).

NOME COMUNE	GENOTIPO/ SPECIE	TIPOLOGIA DI PROPAGULO	CAPSULE			SEMI SINTETICI	
			CONSERVAZIONE			CONDIZIONI DI SEMINA	
			4°C	8°C	TEMPERATURA AMBIENTE	IN ASEPSI	EX VITRO
Melo	M.26	Microtalea	•	•	•	•	•
	M.27	Microtalea					
	'Moscatella'	Microtalea	•	•	•		
	'Trevi'	Microtalea	•	•	•		
	'Muso di bue'	Microtalea					
Olivo	'Frantoio'	Microtalea					
	'Dolce Agogia'	Microtalea	•	•	•		
	'Coratina'	Microtalea					
	'Raggia'	Microtalea	•	•	•		
	'Nebbia'	Microtalea					
	'Cucco'	Microtalea					
	'Correggiolo'	Microtalea	•	•	•		
	'Moraiolo'	Microtalea				•	
Pesco x Mandorlo	GF 677	Microtalea	•			•	
Actinidia	'Hayward'	Microtalea				•	•
	'Tomuri'	Microtalea					
Lauroce- raso		Microtalea	•	•	•		
Carciofo	'Romanesco'	Cespo basale	•	•	•	•	
Erba medica		Embrione somatico				•	•
Scotano		Microtalea					
Narciso		Microbulbo				•	
Giglio	<i>Lilium longi- florum</i>	Microbulbo	•			•	
	<i>Lilium mar- tagom</i>	Microbulbo				•	
	<i>Lilium bulbi- ferum</i>	Microbulbo				•	
Asparago	<i>Asparagus acutifolius</i>	Microtalea		•	•		
Rotala	<i>Rotala rotun- difolia</i>	Microtalea			•	•	
Cryptoco- ryne	<i>Cryptocoryne lutea</i>	Microtalea				•	
	<i>Cryptocoryne beckettii</i>	Microtalea				•	
Eusteralis	<i>Eusteralis stellata</i>	Microtalea					

Tab. 1 (Segue)

Camo- milla		Microtalea		•
Lavanda		Microtalea		
Gelso	'Fontanarossa nera'	Microtalea	•	
Manda- rino	'Tardivo di Ciaculli'	Embrione somatico	•	• •
Clemen- tine	'Monreal'  'Nules'	Embrione somatico  Embrione somatico	•  •	
Limone cedrato		Embrione somatico	•	
Vite	'Gamay del Trasimeno'	Microtalea		
Lampone	Selezione 1401	Microtalea	•	•
Pero	'San Bartolo- meo'	Microtalea		

Tab. 1 *Specie vegetali oggetto di sperimentazione connessa con la tecnologia dell'incapsulamento (Il simbolo • indica i parametri valutati)*

Prof. ALVARO STANDARDI (Professore Ordinario) Dr. TIZIANO GARDI (Ricercatore) Dr. MAURIZIO MICHELI (Ricercatore) Dr. FRANCESCO PROSPERI (Tecnico) Sig. GIORGIO SISANI (Tecnico)	
Tesi inerenti l'incapsulamento svolte presso il laboratorio di colture <i>in vitro</i>	
Tesi di Laurea	
Emanuele Piccioni	Prospettive dell'organogenesi, dell'embriogenesi e dell'incapsulamento nella micropropagazione
Adriano Giansante	Indagini preliminari sull'incapsulamento di propaguli di melo ottenuti <i>in vitro</i>
Laura Luzi	Indagine sul seme sintetico: incapsulamento di propaguli vitro-derivati di specie vegetali
Francesco De Biase	Indagini sulla ripresa di bulbilli di <i>Lilium vitro</i> -derivati in seguito a incapsulamento
Elda Gasbarro	Indagine sulle potenzialità applicative del seme sintetico del portinnesto M.27 e nel <i>Lilium</i>
Paolo Pizzichelli	Micropropagazione e seme sintetico del melo: indagine sulla ripresa di gemme ascellari e apicali
Giovanni Capuano	Indagine sulla "conversione" (germinazione) del seme sintetico nel portinnesto di melo M.26
Melissa Sicurani	Micropropagazione e seme sintetico nel portinnesto M.26: possibilità applicative della meccanizzazione per la produzione degli espianti
Marco Adriani	Il seme sintetico in <i>Actinidia</i> : indagini sulla ripresa e sulla conversione <i>in vitro</i>
Romina Brischia	Micropropagazione e seme sintetico nel portinnesto M.26: possibilità applicative della meccanizzazione per l'allestimento del seme sintetico
Salvatore Pellegrino	Indagine sull'incapsulamento di microtalee apicali per la costituzione del seme sintetico nel portinnesto del melo M.26
Andrea Menghini	Indagine preliminare sull'incapsulamento di espianti micropropagati di olivo
Chiara Paladin	Indagine sul germogliamento di microtalee di olivo incapsulate
M. Cinta Romay Alvarez	Estudio de la conversión de microestaquillas vitro-derivadas encapsuladas de <i>Rubus idaeus</i> L. (Selección 1401) y <i>Actinidia deliciosa</i> Liang & Ferguson (Selección TS-178) de cara a la obtención de semilla sintética
Luca Lucaccioni	Indagini preliminari sull'incapsulamento di microtalee vitro-derivate di GF677
Michelangelo Bacconi	Micropropagazione e seme sintetico nel portinnesto M.26: possibilità applicative della meccanizzazione per la produzione degli espianti
Laura Casucci	Conversione <i>in ex vitro</i> di semi sintetici del portinnesto di melo M.26
Angela Ventura	Influenza dell'incapsulamento sulla ripresa di due portinnesti di melo micropropagati

Tab. 2 *Segue*

Michele Paladino	Studi sullo stoccaggio di propaguli vitro-derivati di specie di interesse agrario mediante incapsulamento
Nicola Bazzurri	Ricerca sulla conversione di semi sintetici di olivo ( <i>Olea europaea</i> L.), cv. Moraiolo
Paola Russo	Indagini preliminari sull'impiego di colture in vitro di due varietà autoctone di olivo
Alessandro Mazzetti	La tecnica dell'incapsulamento nel settore vivaistico
Michele Meoni	Nuove tecniche di coltura in vitro per la salvaguardia di risorse vegetali della Valnerina
Laura Pulcini	Prove preliminari sulla utilizzazione ex vitro di semi sintetici di <i>Citrus reticulata</i> Blanco
Michele Ceccarini	Seme sintetico negli agrumi: studio sulle dimensioni degli embrioni somatici
Errico Bozzella	La coltura in vitro per la conservazione di germoplasma di vecchie varietà di susino ( <i>Prunus domestica</i> L.)
Alessandro Gemma	Indagini preliminari sulla propagazione in vitro della <i>Lobelia cardinalis</i> L., pianta tropicale d'acqua dolce
Tesi di Dottorato	
Maurizio Micheli	Ricerche sull'incapsulamento di espianti vitro-derivati di olivo ( <i>Olea europaea</i> L.)

Tab. 2. *Staff e tesisti del Laboratorio di Colture in vitro annesso al Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali (DSAA)*

#### RIASSUNTO

La tecnologia dell'incapsulamento consiste nel racchiudere espianti vegetali micropropagati di qualche millimetro in involucri protettivi e nutritivi di alginato di sodio con lo scopo di facilitarne la conservazione e lo scambio di materiale vegetali tra Paesi e/o Continenti senza incorrere ai limiti imposti dalla "quarantena". Tale tecnologia conduce alla formazione di capsule se il materiale vegetale che racchiude è destinato a laboratori di coltura in vitro presso i quali riattivare la micropropagazione. Il prodotto della tecnologia è invece seme sintetico se l'espianto vegetale incapsulato è in grado di evolvere (convertire) in plantula in condizioni di coltura in vitro o ex-vitro o in-vivo. La nota affronta le problematiche che limitano l'utilizzazione su scala industriale della tecnologia dell'incapsulamento, specialmente quando questa viene applicata ai fini del seme sintetico; fra queste ci si è soffermati sui rischi connessi con il ricorso agli embrioni somatici, quali espianti incapsulati, sui trattamenti induttivi idonei per indurre adeguate risposte rizogene, quando vengono incapsulate microtalee uninodali, sulla possibilità di poter utilizzare i semi sintetici direttamente in condizioni di ex-vitro e su quella di poter ricorrere alla automazione per ridurre i costi dell'incapsulamento, ritenuti elevati dagli operatori del settore vivaistico.

## ABSTRACT

*A new in-vitro technology for nurseries.* The encapsulation technology consists of coating vitro-derived plant explants (few millimeters long) by a protective and nutritive sodium alginate covering matrix. The goal is to simplify the storage of plant material and the exchange between Countries or Continents overcoming the quarantine problems. This technology allows the production of capsules employed in the tissue culture laboratories to re-introduce the micropropagation. On the other hand, the products of the encapsulation can be used as synthetic seeds if they are able to convert in whole plantlets either in aseptic (in vitro) or in ex vitro (in vivo) conditions. The report concerns with the problems related to the large-scale application of the encapsulation technology, in respect of the synthetic seed particularly: the risks connected with the use of the somatic embryos, as encapsulated explants; the inductive treatments for inducing satisfactory levels of rooting of the uninodal microcuttings; the possibility to use the synthetic seeds directly in non aseptic environment; the potentiality of the automation systems to reduce the costs of the encapsulation technology, evaluated (considered) quite high by the nursery operators.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., TAKAYAMA S. (1995): *Automation in plant tissue culture. General introduction and overview*, in *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, J. Aitken-Christie, T. Kozai and M. Smith (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-18.
- BAPAT V.A. (1993): *Studies on synthetic seeds of sandalwood (Santalum album L.) and mulberry (Morus indica L.)*, in *Syseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, K. Redenbaugh (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton (USA).
- BRISCHIA R., PICCIONI E., STANDARDI A. (2002): *Micropropagation and synthetic seeds in M.26 apple rootstock. II: A new protocol for production of encapsulated differentiating propagules*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 68, pp. 137-141.
- FALCINELLI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (1993): *Il seme sintetico nelle piante agrarie: problemi e prospettive*, Sementi Elette, XXXIX, 6, pp. 3-12.
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., PULCINI L., STANDARDI A. (2007): *Perspectives of the encapsulation technology in the nursery activity of Citrus*, «Caryologia», 60 (1), pp. 192-195.
- KOZAI T., TING K.C., AITKEN-CHRISTIE J. (1991): *Considerations for automation of micropropagation systems*, Trans. of the ASAE, 35, pp. 503-517.
- MATHUR J., SINGH AHUJA P., LAL N., KUMAR MATHUR A. (1989): *Propagation of Valeriana wallichii DC. using encapsulated apical and axial shoot buds*, «Plant Science», 60, pp. 111-116.
- MCKERSIE B.D., VAN ACKER S., LAI F.M. (1995): *Role of maturation and desiccation of somatic embryos in the production of dry artificial seed*, in *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed*, Y.P.S. Bajaj (ed.), «Biotechnology in Agriculture and Forestry», Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germania, I, 30, , pp. 152-169.
- MICHELI M., HAFIZ I.A., STANDARDI A. (2007): *Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (Olea europaea L. cv. Moraiolo). II: Effects of storage on capsule and derived shoots performance*, «Scientia Horticulturae», 113 (3), pp. 286-292.
- MICHELI M., MENCUCCINI M., STANDARDI A. (1998): *Encapsulation of in vitro proliferated buds of olive*. Advances in Horticultural Science, 12: 163-168.

- MICHELI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (2000): *Tecniche di incapsulamento di espianti unipolari micropropagati di specie arboree per la produzione del seme sintetico*, V Giornate Scientifiche soi (Sirmione, 28-30 marzo), pp. 603-604.
- MICHELI M., PELLEGRINO S., PICCIONI E., STANDARDI A. (2002): *Effect of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion of M.26 apple rootstock*, «Journal of Microencapsulation», 19 (3), pp. 347-356.
- MURASHIGE T. (1977): *Plant cell and organ cultures as horticultural practises*, «Acta Hortic.», 78, pp. 17-30.
- MURASHIGE T. (1978): *The impact of tissue culture in agriculture*, in *Frontiers of Plant Tissue Culture*, International Association for Plant Tissue Culture, A. Thorpe (ed.), Calgary (Canada).
- PICCIONI E., STANDARDI A. (1995): *Encapsulation of micropropagated buds of six woody species*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 42, pp. 221-226.
- REDENBAUGH K. (1993): *Introduction*, in *Syseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, K. Redenbaugh (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton (USA).
- REDENBAUGH K., SLADE D., VISS P., FUJII J.A. (1987): *Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats*. «Horticultural Science», 22 (5), pp. 803-809.
- REDENBAUGH K., PAASCH B., NICHOL J., ROSSLER M., VISS P., WALKER R. (1986): *Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos*, «Biotechnology», 4, pp. 797-801.
- SICURANI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (2001): *Micropropagation and synthetic seeds in M.26 apple rootstock. I: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 66, pp. 207-216.
- STANDARDI A., PICCIONI E. (1998): *Recent perspectives on the synthetic seed technology using non-embryogenic vitro-derived explants*, «International Journal of Plant Sciences», 159 (6), pp. 968-978.
- STANDARDI A., PICCIONI E., MICHELI M. (1999): *Recent strategies in plant biotechnology micropropagation and synthetic seed*, in *New Trends in Agrobiotechnology Education*, Tempus(Phare) CME 03066-97 (Bucharest, march 15-22), pp 38-53.

#### BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE SULL'INCAPSULAMENTO

- AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., TAKAYAMA S. (1995): *Automation in plant tissue culture. General introduction and overview*, in *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, J. Aitken-Christie, T. Kozai and M. Smith (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-18.
- BALLESTER A., JANEIRO L.V., VIEITEZ A.M. (1997): *Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of Camellia japonica L. and Camellia reticulata Lindley*, «Scientia Horticulturae», 71, pp. 67-78.
- BAJAJ Y.P.S. (1995): *Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement*, in Y.P.S. Bajaj (ed.), «Biotechnology in Agriculture and Forestry», Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germania, I, 30, pp. 105-125.
- BAPAT V.A. (1993): *Studies on synthetic seeds of sandalwood (Santalum album L.) and mulberry (Morus indica L.)*, in *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, K. Redenbaugh (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Ca (USA), pp. 381-407.

- BAPAT V.A., RAO P.S. (1990): *In vivo growth of encapsulated axillary buds of mulberry (Morus indica L.)*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 20, pp. 67-70.
- BARBOTIN J.N., NAVA SAUCEDO J.E., BAZINET C., KERSULEC A., THOMASSET B., THOMAS D. (1993): *Immobilization of whole cells and somatic embryos: coating process and cell-matrix interaction*, in *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, K. Redenbaugh (ed.), CRC Press Inc, Boca Raton, Ca, pp 65-103.
- CANGAHUALA-INOCENTE G.C., DAL VESCO L.L., STEINMACHER D., TORRES A.C., GUERRA M.P. (2007): *Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (Acca sellowiana (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds*, «Scientia Horticulturae», 111, pp. 228-234.
- FABRE J., DEREUDDRE J. (1990): *Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips*, «Cryo-letters», 11, pp. 413-426.
- FUJII J.A.A., SLADE D., AGUIRRE-RASCON J., RUZIN S.E. REDENBAUGH K. (1992): *Field planting of alfalfa artificial seed*, «Vitro Cell. Dev. Biol.», 28, pp. 73-80.
- GANAPATHI T.R., SUPRASANNA P., BAPAT V.A. RAO P.S. (1992): *Propagation of banana through encapsulated shoot tips*, «Plant Cell Rep.», 11, pp. 571-575.
- MACHII H., YAMANOUCHI H. (1993): *Growth of mulberry synthetic seeds on vermiculite, sand and soil media*, «The Journal of Sericultural Science of Japan», 62 (1), pp. 85-87.
- MALLÓN R., BARROS P., LUZARDO A., GONZÁLEZ M.L. (2007): *Encapsulation of moss buds: an efficient method for the in vitro conservation and regeneration of the endangered moss Splachnum ampullaceum*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 88, pp. 41-49.
- MARUYAMA E., I. KINOSHITA K. ISHII, H. SHIGENAGA K. OHBA, SAITO A. (1997): *Germplasm conservation of the tropical forest trees, Cedrela odorata L., Guazuma crinita Mart., Jacaranda mimosaeifolia D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C*, «Plant Cell Reports», 16, pp. 393-396.
- MATHUR J., SINGH AHUJA P., LAL N., KUMAR MATHUR A. (1989): *Propagation of Valeriana wallichii DC. using encapsulated apical and axial shoot buds*, «Plant Science», 60, pp. 111-116.
- MONDAL T.K., BHATTACHARYA A., SOOD A., AHUJA P.S. (2002): *Propagation of tea (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze) by shoot proliferation of alginate-encapsulated axillary buds stored at 4°C*, «Current Science», 83 (8), pp. 941-944.
- NYENDE A.B., SCHITTENHELM S., MIX-WAGNER G., GREEF J.M. (2003): *Production, storability and regeneration of shoot tips of potato (Solanum tuberosum L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads*, «Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.», 39, pp. 540-544.
- NYENDE A.B., SCHITTENHELM S., MIX-WAGNER G., GREEF J.M. (2005): *Yield and canopy development of field grown potato plants derived from synthetic seeds*, «Europ. J. Agronomy», 22, pp. 175-184.
- PATEL A.V., PUSCH I., MIX-WAGNER G., VORLOP K.D. (2000): *A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds*, «Plant Cell Rep.», 19, pp. 868-874.
- PATNAIK S.K., SAHOO Y., CHAND P.K. (1995): *Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees*, «Scientia Horticulturae», 61, pp. 227-239.
- PREECE J.E., WEST T.P. (2006): *Greenhouse growth and acclimatization of encapsulated Hibiscus oscheutos nodal segments*, «Plant Cell Tissue Organ Cult.», 87, pp. 127-138.
- REDENBAUGH K. (1993): *Introduction*, in *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, K. Redenbaugh (ed.), pp. 3-7, CRC Press Inc., Boca Raton, Ca (USA).

- REDENBAUGH K. PAASCH B., NICHOL J., ROSSLER M., VISS P., WALKER R., (1986): *Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos*, «Biotechnology», 4, pp. 797-801.
- ROUT G.R., DAS G., SAMANTARY S., DAS P. (2001): *Micropropagation of Plumbago zeylanica L. by encapsulated nodal explants*, «J. Hort. Science & Biotechnology», 76 (1), pp. 24-29.
- SAKAMOTO Y., MASHIKO T., SUZUKI A., KAWATA H., IWASAKI A. (1992): *Development of encapsulation technology for synthetic seeds*, «Acta Horticulturae», 319, pp. 71-76.
- SOUMENDRA K. NAIK, PRADEEP K. CHAND (2006): *Nutrient-alginate encapsulation of in vitro nodal segments of pomegranate (Punica granatum L.) for germplasm distribution and exchange*, «Scientia Horticulturae», 108, pp. 247-252.
- SUPRASANNA P., GANAPATHI T.R., RAO P.S. (1996): *Artificial seeds in rice (Oryza sativa L.): encapsulation of somatic embryos from mature-embryo callus cultures*, «Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology», 4 (2), pp. 90-93.
- TANG S.H. (1996): *Studies on artificial seeds derived from encapsulated axillary buds of sweet viburnum (Viburnum odoratissimum)*, «Journal of Southwest Agricultural University», 18 (4), pp. 383-386.
- TSVETKO V I., HAUSMAN J.F. (2005): *In vitro regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of Quercus sp.*, «Scientia Horticulturae», 103, pp. 503-507.

ELENCO PUBBLICAZIONI PRODOTTE CON IL CONTRIBUTO  
DEI COMPONENTI LO STAFF

- ADRIANI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (2000): *Effects of different treatments on the conversion of "Hayward" kiwifruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of vitro-derived buds*, «New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science», 29, pp. 59-67.
- BRISCHIA R., PICCIONI E., STANDARDI A. (2002): *Micropropagation and synthetic seeds in M.26 apple rootstock. II: A new protocol for production of encapsulated differentiating propagules*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 68, pp. 137-141.
- CAPUANO G., PICCIONI E., STANDARDI A. (1998): *Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seed obtained from encapsulated apic and axillary micropropagated buds*, «Journal of Horticultural Science and Biotechnology», 73 (3), pp. 299-305.
- CASUCCI L., GARDI T., MICHELI M., STANDARDI A. (2004): *Il seme sintetico di M.26: studi preliminari sulla conversione in condizioni di ex vitro*, VII Giornate Scientifiche SOI, (Napoli, 4-6 maggio).
- FALCINELLI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (1997): *Il seme sintetico nelle piante agrarie: stato attuale della ricerca*, «Sementi Elette», 1, pp. 9-17.
- GARDI T., PICCIONI E., STANDARDI A. (1999): *Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species*, «Journal of Microencapsulation», 16 (1) pp. 13-25.
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., STANDARDI A. (2004): *Preliminary studies on encapsulation of gametic and somatic embryos of Citrus clementina Hort. Ex Tan. And Citrus reticulata BLANCO: effect of cold storage*, in *Gametic Cells and Molecular Breeding for Crops Improvement Cost*, Action 851, (Palermo, november 11-13).
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., STANDARDI A. (2005): *Preliminary results on ex-vitro conversion of encapsulated somatic embryos of citrus reticulata blanco (cv. Mandarino di Ciac-*

- ulli), XII International Conference On Plant Embryology (Cracow, Poland, september 5-7), Polish Academy of Sciences. Kon Tekst. Publishing House, Cracow, «Acta Biologica Cracoviense», Serie Botanica, 47 (1), pp. 55.
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., STANDARDI A. (2007): *La tecnologia dell'incapsulamento nella gestione del germoplasma vegetale*, VIII Giornate Scientifiche soi, (Sassari, 8-11 maggio), p. 182.
- GERMANÀ M.A., PICCIONI E., STANDARDI A. (1999): *Effect of encapsulation on Citrus reticulata Blanco somatic embryo conversion to plantlets*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 55, pp. 235-237.
- GERMANÀ M.A., HAFIZ I.A., MICHELI M., STANDARDI A. (2007): *In-vitro and ex-vitro conversion of encapsulated somatic embryos of Citrus reticulata Blanco, cv. Mandarino Tardivo di Ciaculli*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 88, pp. 117-120.
- GERMANÀ M.A., MICHELI M., PULCINI L., STANDARDI A. (2007): *Perspectives of the encapsulation technology in the nursery activity of Citrus*, «Caryologia», 60 (1), pp. 192-195.
- LUCACCIONI L., MICHELI M., STANDARDI A. (2005): *Incapsulamento di microtalee proliferate in vitro di GF 677 per l'allestimento di semi sintetici*, V Convegno Nazionale sulla peschicoltura meridionale, (Locorotondo, Bari, 29-30 settembre), pp. 139-146.
- MENGHINI A., MICHELI M., STANDARDI A. (1999): *Indagine preliminare sull'incapsulamento di gemme di olivo (Olea europea L.) vitro-derivate*, «Italus Hortus», 6 (6), pp. 3-9.
- MICHELI M., GARDI T., STANDARDI A. (2003): *La tecnologia dell'incapsulamento per la diffusione e/o la conservazione di materiale vivaistico*, «Italus Hortus», 10 (4), pp. 259-262.
- MICHELI M., STANDARDI A. (2005): *Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (cv. Moraiolo). I: Effects of pretreatments, their size and the coating*, «Current Topics in Biotechnology», 2, pp. 81-86.
- MICHELI M., GERMANÀ M.A., STANDARDI A. (2007): *Esperienze di incapsulamento di propaguli vitro-derivati di germoplasma vegetale*, 102° MEETING OF THE ITALIAN BOTANICAL SOCIETY (SBI) (Palermo, 26-29 settembre), p. 143.
- MICHELI M., HAFIZ I.A., STANDARDI A. (2007): *Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (Olea europea L. cv. Moraiolo). II: Effects of storage on capsule and derived shoots performance*, «Scientia Horticulturae», 113, pp. 286-292.
- MICHELI M., MENCUCCHINI M., STANDARDI A. (1998): *Encapsulation of in vitro proliferated buds of olive*, «Advances in Horticultural Sciences», 12, pp. 163-168.
- MICHELI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (1996): *Conversion of synthetic seeds of M.26 clonal apple rootstock on different substrata*, Proc. World Congress on in vitro Biology, San Francisco, (CA, USA), june 22-27, «Vitro Cellular & Developmental Biology», 32 (3-part II), 92A-93A.
- MICHELI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (2000): *Tecniche di incapsulamento di espianti unipolari micropropagati di specie arboree per la produzione del seme sintetico*, V Giornate Scientifiche soi (Sirmione, 28-30 marzo), pp. 603-604.
- MICHELI M., DELL'ORCO P., MENCUCCHINI M., STANDARDI A. (2002): *Preliminary studies on the synthetic seed and encapsulation technologies of olive vitro-derived explants*, Fourth International Symposium on Olive Growing (Bari, september 25-30), «Acta Horticulturae», 586 (2), pp. 911-914.
- MICHELI M., HAFIZ I.A., BAZZURRI N., STANDARDI A. (2006): *Methodological development for synthetic seeds production of "Moraiolo"*, Olivebioteq – Second International Seminar on "Biotechnology and Quality of Olive Tree Products around the Mediterranean Basin", Mazara del Vallo (Trapani-Italy), november 5-10, pp. 155-158.

- MICHELI M., PELLEGRINO S., PICCIONI E., STANDARDI A. (2002): *Effect of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion of M.26 apple rootstock*, «Journal of Microencapsulation», 19 (3), pp. 347-356.
- PICCIONI E., STANDARDI A. (1995): *Encapsulation of micropropagated buds of six woody species*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 42, pp. 221-226.
- PICCIONI E., FALCINELLI M., STANDARDI A. (1995): *La germinazione del seme sintetico in erba medica (Medicago sativa L.)*, «Agronomia», 29 (4), pp. 567-573.
- PICCIONI E., STANDARDI A., FALCINELLI M. (1999): *Estimations of somatic embryogenesis and the synthetic seed technology in alfalfa seed production*, Proceedings Fourth International Herbage Seed Conference, (Perugia, may 23-27), pp. 193-197.
- PICCIONI E., STANDARDI A., MICHELI M., MENCUCINI M. (1996): *Il seme sintetico nel melo e nell'olivo*, XL Convegno Annuale SIGA, (Perugia, 18-21 settembre), p. 52.
- ROMAY A.C., GARDI T., STANDARDI A. (2002): *Plantlets from encapsulated in vitro-derived microcuttings of kiwifruit (cv. Top Star)*, «Agricoltura Mediterranea», 3-4 (132), pp. 246-252.
- ROMAY A.C., GARDI T., STANDARDI A. (2003): *Indagine sulla conversione di microtalee vitro-derivate ed incapsulate di lampone (Rubus idaeus L.)*, «Italus Hortus», 10 (1), pp. 29-34.
- RUSSO G., STANDARDI A., MICHELI M., RUSSO P. (2004): *Preliminary results on the encapsulation of vitro-derived explants in olive*, 5th International Symposium on In vitro culture and horticultural breeding, (Debrecen, Hungary, september 12-17), p. 190.
- SICURANI M., PICCIONI E., STANDARDI A. (2001): *Micropropagation and synthetic seeds in M.26 apple rootstock. I: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation*, «Plant Cell Tissue and Organ Culture», 66, pp. 207-216.
- STANDARDI A. (2001): *Olivo: le nuove frontiere della ricerca*, «Olivo & Olio», 3, pp. 34-36.
- STANDARDI A., PICCIONI E. (1996): *Rooting induction in encapsulated buds of M.26 apple rootstock for synthetic seed*, II Inter. Symp. on Biol. of Root Form. and Dev., (Jerusalem, june 23-28).
- STANDARDI A., PICCIONI E. (1997): *Rooting induction in encapsulated buds of M.26 apple rootstock for syntehtic seed*, in *Biology of Root Formation and Development*, A. Altman and Y. Waisel, New York, Plenum Publishing Company (United States), pp. 309-314.
- STANDARDI A., PICCIONI E. (1998): *Recent perspectives on synthetic seed technology usin non-embryogenic vitro-derived explants*, «International Journal of Plant Sciences», 159 (6), pp. 968-978.
- STANDARDI A., MICHELI M., PICCIONI E. (1995): *Incapsulamento in alginato di espianti micropropagati*, «Italus Hortus», 2 (1-2), pp. 46-52.
- STANDARDI A., MICHELI M., PICCIONI E. (1998): *Propagazione in vitro dell'olivo: acquisizioni e prospettive*, «Frutticoltura», 7/8, pp. 19-23.
- STANDARDI A., PICCIONI E., MICHELI M. (1999): *Recent strategies in plant biotechnology: Micropropagation and synthetic seed*, International Conference Tempus(Phare) CME 03066-97 (Bucharest, march 15-22), pp. 38-53.