

## Produttività *in vitro* di *Artemisia annua* e *A. pontica* in presenza o in assenza di ormoni nel substrato

Mariateresa Cardarelli<sup>\*</sup>, Alessandra Vitali<sup>2</sup>, Alessandra Trincherà<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Agricoltura e Ambiente, Roma

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università della Tuscia, Viterbo

### ***In vitro* productivity of *Artemisia annua* and *A. pontica* on substrate with or without plant growth regulators**

**Abstract.** In this work, morphological and physiological parameters of *A. annua* and *A. pontica* shoots were analyzed on solid substrate (4.4 g/l MS, 3% sucrose, 0.7% agar), with and without plant growth regulators [6-Benzyladenine (BA) and 1-Naphtalenacetic acid (NAA)]. Both species showed an excellent adaptability to the standard conditions (25°C, photoperiod 16:8) without vitrification phenomena or necrosis. The biomass production, measured as growth index, was highest for shoots grown without BA and NAA whereas the hormones presence increased the shoots number with height >1.0 cm. Total phenols and flavonoids content, and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) value were highest without growth regulators in the medium; however, the observations of *A. pontica* shoots surface with the Scanning Electron Microscope showed highest number of glandular trichomes, and with largest size, in presence of BA and NAA, probably due to a major water content.

**Key words:** biomass, growth index, trichomes, scanning electron microscope

### Introduzione

Le piante officinali sono da sempre utilizzate per il loro contenuto in metaboliti secondari ad elevata attività biologica e per questo la loro domanda di mercato è in continuo aumento. A fronte di tale richiesta è necessario garantire un costante approvvigionamento

del materiale vegetale come nel caso di *Artemisia annua* e *A. pontica*. Le colture *in vitro* rappresentano per queste specie un interessante sistema di produzione sia di germogli per la propagazione che di biomassa da destinare all'estrazione di biomolecole. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare la risposta morfo-fisiologica di germogli di *A. annua* e *A. pontica* in coltura su substrato solido in presenza e in assenza dei regolatori di crescita 6-benziladenina (BA) e acido 1-naftalenacetico (NAA). La superficie fogliare di germogli di *A. pontica* è stata inoltre osservata al microscopio a scansione elettronica al fine di evidenziare un eventuale effetto del substrato sui tricomi ghiandolari di artemisia, quali siti di accumulo dei metaboliti secondari, caratterizzandone dimensione e numerosità.

### Materiali e metodi

Singoli germogli *in vitro* di *A. annua* e *A. pontica* sono stati posti all'interno di contenitori ECO2box su substrato solido (4,4 g/L MS, 30 g/L saccarosio, 7 g/L agar, pH 5,7) in presenza e in assenza di regolatori di crescita (2,5 µM BA e 0,57 µM NAA) (Inthima *et al.*, 2014). Al termine della subcoltura (5 settimane) sono stati rilevati i parametri morfologici (numero e altezza dei germogli, diametro e peso fresco dei cluster di germogli) e, sul materiale vegetale mantenuto a -80°C, sono stati misurati i metaboliti (polifenoli e flavonoidi) e il potere antiossidante totale (FRAP). La superficie fogliare dei germogli di *A. pontica* è stata inoltre osservata al microscopio elettronico a scansione EVO<sup>®</sup>-MA 10 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germania) in pressione variabile (VP), con sorgente di elettroni a LaB6, ad elevata brillantezza, EHT a 20 kV e pressione in camera a 20 Pa.

\* mteresa.cardarelli@crea.gov.it

## Risultati e discussione

I germogli di entrambe le specie hanno evidenziato una buona adattabilità *in vitro*, senza fenomeni di vitrificazione o necrosi. L'assenza di BA e NAA ha determinato un maggior accrescimento in altezza dei germogli e un più elevato indice di crescita (IC, misurato come incremento di peso fresco), senza differenze indotte dal genotipo (tab. 1). Per quanto riguarda l'altezza dei singoli germogli, parametro importante ai fini propagativi, *A. annua* ha sviluppato un maggior numero di germogli di altezza >1,0 cm all'interno dei cluster (con valori più elevati in presenza di fitoregolatori) rispetto ad *A. pontica*, mentre quest'ultima si è caratterizzata per cluster di diametro orizzontale medio maggiore, senza differenze significative indotte dal substrato. Sia i metaboliti (polifenoli e flavonoidi) che il potere antiossidante (misurato come FRAP) sono risultati più elevati per *A. annua* (Bryant *et al.*, 2015), anche se il contenuto di polifenoli totali non era significativamente diverso rispetto a quello di *A.*

*pontica* (tab. 2). Su substrato privo di fitoregolatori entrambe le specie hanno fatto rilevare una maggiore quantità di polifenoli totali e flavonoidi. Le osservazioni al microscopio a scansione elettronica delle foglie *in vitro* di *A. pontica* hanno mostrato un maggior numero di tricomi ghiandolari per unità di superficie fogliare ed un incremento del loro diametro in presenza di BA e NAA rispetto al controllo senza fitoregolatori (Ø~55mm e Ø~48 mm in presenza e in assenza di ormoni, rispettivamente) (fig. 1) anche se tali risultati morfo-anatomici non sono correlabili alla produzione di metaboliti che, invece, risultano più elevati in assenza di fitoregolatori nel substrato (Nguyen *et al.*, 2013).

## Riassunto

Obiettivo del lavoro era valutare l'effetto dei fitoregolatori sulla risposta morfo-fisiologica di germogli di *Artemisia annua* e *A. pontica* ed è stato osservato, in entrambi i genotipi, un maggior numero di germo-

Tab. 1- Parametri morfo-fisiologici di germogli di *Artemisia annua* e *A. pontica* cresciuti *in vitro* in assenza o in presenza di 2,5 µM BA e 0,57 µM NAA.

Tab. 1 - Morphological and physiological parameters of *Artemisia annua* and *A. pontica* shoots grown *in vitro* with or without 2.5 µM BA and 0.57 µM NAA.

Genotipo	Ormoni nel substrato	Altezza massima germogli (cm)	Diametro massimo cluster di germogli (cm)	N. germogli > 1cm	IC
<i>A. annua</i>	-	6,79 a	2,07	4,73	4,7
	BA + NAA	3,35 b	1,97	8,78	1,8
<i>A. pontica</i>	-	6,97 a	3,02	3,57	6
	BA + NAA	2,39 b	2,9	6,66	2,8
<i>Significatività</i>					
Genotipo (G)		NS	***	*	NS
Substrato (S)		***	NS	***	*
G x S		*	NS	NS	NS

\*, \*\*, \*\*\* indicano effetti significativi rispettivamente per  $P \geq 0,05$ ,  $P \geq 0,01$  e  $P \geq 0,001$ ; NS indica effetti non significativi. Le medie nella stessa colonna seguite da lettere differenti sono significativamente diverse per  $p = 0,05$  (test di Duncan).

Tab. 2 - Polifenoli, flavonoidi e potere antiossidante (FRAP) su germogli di *Artemisia annua* e *A. pontica* cresciuti *in vitro* in assenza o in presenza di 2,5 µM BA e 0,57 µM NAA.

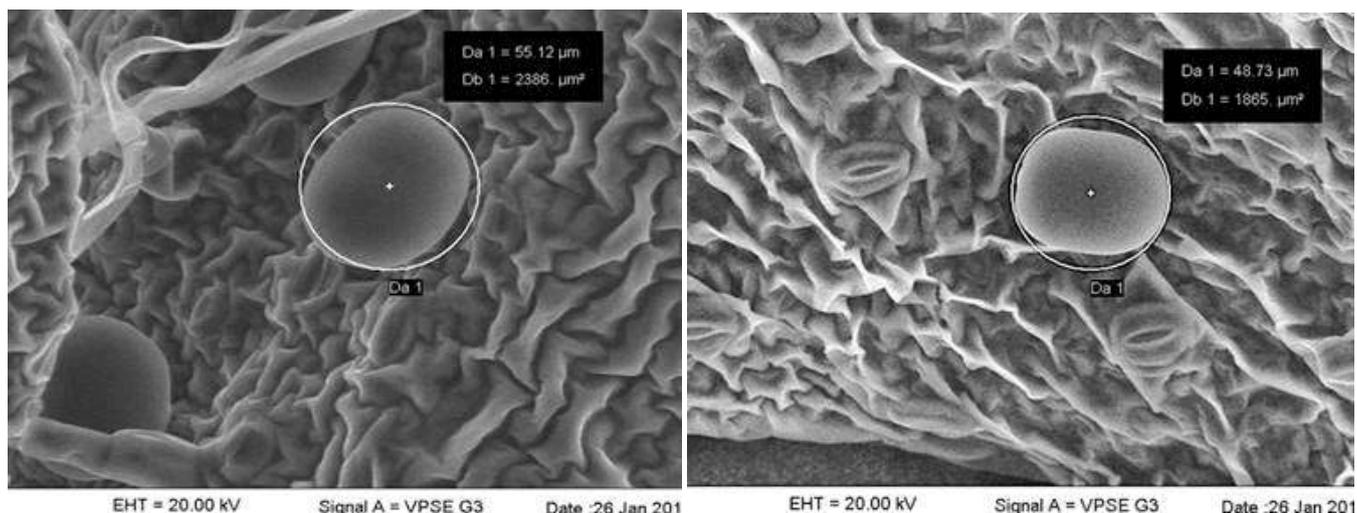
Tab. 2 - Polyphenols, flavonoids and antioxidant power (FRAP) of *Artemisia annua* and *A. pontica* shoots grown *in vitro* with or without 2.5 µM BA and 0.57 µM NAA.

Genotipo	Ormoni nel substrato	Polifenoli totali (mg acido gallico/g pf)	Flavonoidi (mg quercetina/g pf)	FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> /g pf)
<i>A. annua</i>	-	2,61	2,26	25,5a
	BA + NAA	1,96	1,9	27,2a
<i>A. pontica</i>	-	2,52	1,38	19,87b
	BA + NAA	2,11	1,05	13,66c
<i>Significatività</i>				
Genotipo (G)		NS	***	**
Substrato (S)		**	***	NS
G x S		NS	NS	*

\*, \*\*, \*\*\* indicano effetti significativi rispettivamente per  $P \geq 0,05$ ,  $P \geq 0,01$  e  $P \geq 0,001$ ; NS indica effetti non significativi. Le medie nella stessa colonna seguite da lettere differenti sono significativamente diverse per  $p = 0,05$  (test di Duncan).

Fig. 1 - Misurazione di un tricoma ghiandolare sulla superficie fogliare di *Artemisia pontica* ottenuta *in vitro* su (a) substrato contenente 2,5  $\mu\text{M}$  BA e 0,57  $\mu\text{M}$  NAA (Mag: 1kX) e (b) substrato in assenza di ormoni (Mag: 1kX).

Fig. 1 - Measurement of a glandular trichome on leaf surface of *Artemisia pontica* obtained *in vitro* (a) with 2.5  $\mu\text{M}$  BA e 0.57  $\mu\text{M}$  NAA (Mag: 1kX) or (b) on hormone-free medium (Mag: 1kX).



gli di altezza superiore a 1 cm in presenza degli stessi, mentre la loro assenza ha determinato un aumento della biomassa. Il contenuto di metaboliti (polifenoli e flavonoidi) e il potere antiossidante (misurato come FRAP) erano più elevati in assenza di fitoregolatori; tuttavia le osservazioni al microscopio a scansione elettronica di *A. pontica* hanno mostrato tricomi ghiandolari più numerosi e di maggiore dimensione in presenza di fitoregolatori, probabilmente per un maggior contenuto di acqua.

**Parole chiave:** biomassa, indice di crescita, tricomi, microscopio elettronico a scansione elettronica.

## Bibliografia

- BRYANT L., FLATLEY B., PATOLE G., BROWN D., CRAMER R., 2015. *Proteomic analysis of Artemisia annua – towards elucidating the biosynthetic pathway of the antimalarial pro-drug artemisinin*. Plant Biology 15: 175.
- INTHIMA P., OTANI M., HIRANO T., HAYASHI Y., ABE T., NAKANO M., SUPAIBULWATANA K., 2014. *Mutagenic effects of heavy-ion beam irradiation on in vitro nodal segments of Artemisia annua L.* Plant Cell Tiss Organ Cult 119: 131-139.
- NGUYEN K.T., TOWLER M.J., WEATHERS P.J., 2013. *The effect of roots and media constituents on trichomes and artemisin production in Artemisia annua L.* Plant Cell Rep 32: 207-218.