

Produzione di metaboliti secondari da colture *in vitro* di piante aromatiche e medicinali

Laura Pistelli^{1*} e Luisa Pistelli²

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

² Dipartimento di Scienze farmaceutiche, Università di Pisa

***In vitro* culture of aromatic and medicinal plants for the production of secondary metabolites**

Abstract. Medicinal plants are the most important source of life saving drugs for the majority of world's population. The biotechnological tools are important to select, multiply and conserve the critical genotypes of medicinal plants. *In-vitro* regeneration holds tremendous potential for the production of high-quality plant-based medicine. *In-vitro* production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures has been reported from various medicinal plants. Bioreactors are the key step towards commercial production of secondary metabolites by plant biotechnology. Genetic transformation may be a powerful tool for enhancing the productivity of novel secondary metabolites; especially by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots. This article discusses the applications of biotechnology for plant regeneration and genetic transformation for enhance the secondary metabolite *in vitro* production from medicinal plants.

Key words: plant tissue culture; regeneration; bioreactors; genetic transformation; combinatorial biosynthesis.

Introduzione

Le piante sono considerate come fabbriche biochimiche, che costruiscono tutto ciò di cui hanno bisogno per sopravvivere, quindi sia metaboliti primari che secondari, a partire da acqua, aria, minerali ed energia proveniente dal sole. Molte di queste piante biosintetizzano e accumulano sostanze organiche estraibili, in quantità sufficiente per essere utilizzate sia come materie prime alimentari sia come materiali grezzi per varie applicazioni tecnologiche e scientifiche. I metaboliti secondari delle piante sono ormai noti possedere un ruolo importante nell'adattamento

delle piante al loro ambiente, ma rappresentano anche un'importante risorsa di prodotti d'interesse farmaceutico. Oggi i composti bioattivi (*phytochemicals*) sono usati sia come farmaci che come fitofarmaci, aromi e profumi, additivi alimentari e pesticidi. Basti pensare che il 70-80% della popolazione mondiale si affida alla medicina tradizionale, per lo più a base di piante medicinali, per le proprie necessità primarie di salute. Infatti le piante medicinali costituiscono ancora oggi una importante risorsa di materiale per l'industria farmaceutica, essendo inserite in circa il 25% dei farmaci prescritti.

Da molti anni ha suscitato notevole interesse l'utilizzo delle colture *in vitro* e in particolare delle colture cellulari per la produzione di composti naturali di interesse commerciale. Un certo numero di piante sono state utilizzate per produrre e propagare culture in sospensione, a partire da sistemi modello quali *Arabidopsis thaliana* per arrivare a piante coltivate, quali riso, soia, alfa-alfa e tabacco, fino alle piante di notevole interesse farmaceutico come il *Taxus* e il *Catharantus* (Vijaya Sree *et al.* 2010).

Per aumentare la resa produttiva dei metaboliti attivi, adatta agli scopi commerciali, sono stati fatti vari sforzi per migliorare l'estrazione, ottimizzando le condizioni culturali, selezionando linee ad alta resa o impiegando precursori, fino all'impiego di metodi di trasformazione e tecniche d'immobilizzazione. Anche le coltivazioni su larga scala costituiscono un'attraente alternativa rispetto ai metodi tradizionali di coltura, dato che offrono forniture controllate di composti biochimici indipendentemente dalla disponibilità della pianta.

Uno dei propositi principali delle ricerche biotecnologiche in corso è quello di aumentare la produzione di metaboliti bioattivi e di diminuirne il prezzo; le biotecnologie delle piante officinali dovrebbero aiutare a raggiungere questi obiettivi. Per questo motivo la scoperta di colture cellulari capaci di produrre composti medicinali specifici, a concentrazioni simili o superiori rispetto alla pianta intera, ha avuto un'accelerazione notevole negli ultimi anni. Nuove sostanze

* lpistelli@biologia.unipi.it

farmacologicamente attive sono state isolate e identificate attraverso screening guidati da saggi sull'attività ed è stato dimostrato come l'attività biosintetica di colture cellulari possa essere aumentata dalla regolazione di fattori ambientali, da selezioni artificiali e dall'induzione di cloni varianti. Molti dei composti medicinali che si trovano localizzati in tessuti specializzati o in organi di piante autoctone possono essere prodotti in coltura *in vitro* non solo attraverso tessuti specializzati, ma anche attraverso colture di cellule indifferenziate. Anche le sospensioni cellulari possono essere utilizzate per coltivare cellule vegetali su larga scala in modo da costituire una risorsa affidabile di prodotti naturali ed estrarne quantitativi apprezzabili. Inoltre queste produzioni potrebbero essere fatte dovunque, sotto condizioni strettamente controllate e con un alto grado di flessibilità.

Le colture transgeniche di *hairy roots* hanno comunque rivoluzionato il ruolo della coltura di tessuti per la produzione dei metaboliti secondari, poiché sono stabili dal punto di vista genetico e biosintetico più veloci nella crescita, e possono essere mantenute più facilmente.

Molti composti, appartenenti ad almeno 50 categorie di prodotti, sono stati identificati nelle colture di cellule *in vitro*, alcuni di questi in concentrazione uguale o maggiore rispetto alla pianta di partenza.

Recenti sviluppi nella tecnologia delle colture di tessuti indicano che i fattori di trascrizione sono strumenti molecolari efficienti per l'ingegneria metabolica vegetale al fine di aumentare la produzione di metaboliti commercialmente utili. La "biosintesi combinatoria" scaturisce dalla combinazione di geni di microorganismi differenti per la produzione di nuovi e interessanti metaboliti e sta emergendo come un nuovo strumento nella produzione di prodotti naturali rari e costosi (infatti sul mercato sono presenti composti molto costosi poiché si ritrovano solo in piante rare e spesso presenti in piccolissime concentrazioni, quali ad esempio alcaloidi (vinblastina e vincristina), terpenoidi (artemisina, paclitaxel) e flavonoidi.

Le colture di tessuti

Le colture *in vitro* riguardano la crescita e la moltiplicazione di cellule, tessuti e organi di piante su mezzi coltura solidi e liquidi, sotto condizioni asettiche e in ambiente controllato. La tecnologia commerciale si basa principalmente sulla micropropagazione, attraverso la quale si realizza una proliferazione rapida da talee, gemme ascellari e in piccola parte anche da ammassi di cellule sia in colture in sospensione che in bioreattori. Il processo di micropropagazione viene

di solito diviso in diversi stadi, quali la pre-propagazione, l'ottenimento dell'espianto, la subcoltura dell'espianto per la proliferazione, la moltiplicazione dei germogli, la radicazione e la resistenza all'ambiente esterno; tutti stadi applicabili anche su larga scala. La micropropagazione è ancora oggi utilizzata come un sistema biotecnologico avanzato per la produzione di piante esenti da patogeni in agricoltura e forestazione. Protocolli di clonaggio sono stati realizzati anche per numerose piante medicinali, tra le quali *Catharanthus roseus* (Apocinaceae), *Datura metel* (Solanaceae) e *Bacopa monnieri* (Scrophulariaceae) (Mousumi D et al. 2006). Più recentemente sono stati studiati anche i protocolli di micropropagazione, di fioritura e fruttificazione *in vitro* di *Withania somnifera*, una pianta medicinale dalle proprietà antitumorali, a partire da espiantri di gemme ascellari (Saritha et al., 2007).

Tuttavia la micropropagazione convenzionale è una tecnica di propagazione clonale intensiva e pertanto sono state messe a punto automazioni in bioreattori per cercare di ridurre i costi. I bioreattori furono realizzati per la prima volta nel 1981 per colture di *Begonia* e da allora applicati per varie tipologie di colture di germogli, gemme, microtuberi, ed embrioni somatici (Khan et al., 2009). I bioreattori possono essere divisi in due tipi: quelli in cui le colture sono immerse solo parzialmente o temporaneamente nel mezzo e quelle in cui tutte le colture sono continuamente sommerse. Queste apparecchiature consentono un controllo preciso della crescita vegetale, degli scambi gassosi, dell'intensità luminosa, agitazione del mezzo, temperatura e pH rispetto a quanto avviene nei contenitori convenzionali. Tutto questo consente di aumentare la velocità di moltiplicazione e crescita delle piante e di ridurre l'energia e il lavoro richiesto per la micropropagazione commerciale. Tra i sistemi principali di coltura in bioreattore si distinguono: (1) quelli che producono solo un aumento di biomassa (il prodotto finale è costituito da cellule o propaguli organo- o embriogenetici, germogli o radici), (2) quelli che producono metaboliti o enzimi vegetali, e (3) quelli che operano biotrasformazioni a partire da composti esogeni aggiunti (talvolta precursori della via metabolica). In questo modo sono stati sviluppati nuovi bioreattori con gorgogliamento o di ascensione di aria, che agitano e ossigenano in contemporanea la coltura di germogli o embrioni somatici (Ruffoni et al., 2010) Sono descritte molte applicazioni riguardanti le piante medicinali, ad esempio le colture in sospensione di *Papaver somniferum* per produrre quantitativi apprezzabili di sanguinarina (un alcaloide con proprietà antibatteriche utilizzato nei prodotti per l'igiene orale) anche attraverso l'uso di elicitori (Balazova et al., 2011).

La radice di *Panax ginseng* C.A. Mayer, chiamato ginseng, è largamente utilizzata fin dai tempi antichi come tonico, promotore di salute e longevità. Il ginsenoside Rg1 è uno di maggiori componenti tra i ginsenosidi, un gruppo di saponine triterpenoidiche, che costituiscono i composti bioattivi. In letteratura sono stati riportati molti studi circa la rigenerazione attraverso embriogenesi somatica in calli derivanti da radici. Anche l'effetto di diversi componenti del mezzo come il carbone, la concentrazione di azoto o di fosfato, o gli ormoni della crescita possono aumentare la produzione di ginsenosidi. Sono stati costruiti anche bioreattori da 2.000 a 20.000 litri per raggiungere produzioni di 500-700 mg/l al giorno. Attraverso la coltura di radici di ginseng, coltivate in bioreattori, sono state prodotte buone rese di saponine (500mg/litro/giorno) (Xiangling *et al.*, 2011). Inoltre la trasformazione delle radici di *Panax ginseng* con *Agrobacterium tumefaciens* ha fatto raggiungere una produttività di tre volte superiore rispetto alla coltura di callo (Mallol *et al.*, 2001). Più recentemente anche l'aggiunta di metiljasmonato e diidrometiljasmonato ha ulteriormente migliorato la produttività (Kim *et al.*, 2009).

Trasformazione con Agrobatterio

La tecnologia della trasformazione genetica è un ottimo strumento per la produzione di piante con caratteristiche desiderate: permette di superare problemi agronomici e ambientali che non possono essere risolti con i programmi di miglioramento convenzionali.

La trasformazione delle piante mediata da batteri gram negativi, patogeni del terreno, quali *Agrobacterium* spp. (appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*) è divenuto il mezzo più comune per introdurre geni esogeni nelle cellule vegetali e successiva rigenerazione delle piante transgeniche. *A. rhizogenes* e *A. tumefaciens* rappresentano dei veri e propri ingegneri metabolici naturali capaci di interagire e modificare il genoma delle cellule vegetali provocando modificazioni genetiche che possono risultare vantaggiose per stimolare o aumentare la produzione di metaboliti secondari. Molte colture sono state trasformate con successo, e buoni risultati sono stati raggiunti anche con piante medicinali, specie riguardo all'aumento del contenuto di metaboliti secondari. In questo modo sono state realizzate le trasformazioni di *Taxus* (yew) *Echinacea*, *Scrophularia* (figwort), *Digitalis* (foxglove), *Thalictrum* (meadowrues) e *Artemisia*. Le trasformazioni geniche mediate da *Agrobacterium* hanno il vantaggio di permettere un'integrazione stabile e definita del DNA nel genoma della pianta, che generalmente si manifesta con un

basso numero copie, bassi riarrangiamenti e stabilità dell'espressione anche su diverse generazioni rispetto ad altri metodi di transfezione.

Le colture di *hairy roots* (radici pelose avventizie) sono un'alternativa alle colture cellulari per la produzione di metaboliti secondari. Il sistema delle *hairy roots* è causato dall'infezione, a livello delle ferite delle piante, con *Agrobacterium rhizogenes*. La formazione di *hairy roots* è dovuta al trasferimento di un frammento di DNA (T-DNA) dal plasmide Ri, contenuto nel batterio, alla cellula vegetale. Questo T-DNA, che non è espresso nel batterio, si integra covalentemente nel DNA eucariotico e viene trascritto e tradotto con conseguente neoplasia organogenetica che si manifesta sotto forma di radici. Il fenotipo delle *hairy roots* è caratterizzato da una crescita ormone-indipendente, dalla mancanza di geotropismo, dalla formazione di ramificazioni laterali e dalla stabilità genetica (Pistelli *et al.*, 2010). Proprio per la loro elevata e stabile produttività, le colture di *hairy roots* sono studiate da anni per il loro potenziale nel produrre preziosi metaboliti secondari come alcaloidi da *Atropa belladonna* (Bonhomme *et al.*, 2000) e acido rosmarinico in colture di *Ocimum basilicum* (Bais *et al.*, 2002).

Piante di Iperico (*H. perforatum*, St. John's Wort) sono state rigenerate a partire da differenti linee di *hairy roots* (Bertoli *et al.*, 2008). La produzione dei composti bioattivi più noti è stata realizzata anche se con rese variabili. Due delle linee ottenute producevano iperoside (4,9-4,6 mg/g peso secco), mentre altre linee erano caratterizzate da alte produzioni di acido clorogenico (da 0,47 a 1,09 mg/g peso secco). Soprattutto una delle linee ottenute mostrò di produrre un contenuto di ipericine 10 volte superiore (0,25 mg/g peso secco) a quanto riportato in letteratura per le colture di germogli.

L'uso di elicitori ha consentito di migliorare ulteriormente le produzioni di metaboliti secondari. Gli elicitori di origine biotica (estratti proteici, omogenati fungini o batterici autoclavati, polisaccaridi, chitosano, glicoproteine) o abiotica (raggi UV, sali di metalli pesanti, agenti chimici di vario tipo) sono in grado di indurre stress nelle cellule e una volta aggiunti al mezzo di coltura, stimolano la produzione dei composti attivi (Ramachandra *et al.*, 2002). Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti del chitosano nell'elicitazione nella produzione di composti fenolici, per esempio nelle sospensioni di cellule di *Arabidopsis thaliana* (Chivasa *et al.*, 2003) e in piantine di *Ocimum basilicum* coltivate *in vitro* (Kim *et al.*, 2005), per la produzione di isoflavonoidi (dainzena e genisteina) in *Pueraria candollei* (Udomsuk *et al.*, 2010).

Biosintesi combinatoria

La “biosintesi combinatoria” scaturisce dalla combinazione di geni di microorganismi differenti per la produzione di nuovi e interessanti metaboliti o di prodotti naturali rari. Infatti sul mercato sono presenti composti molto costosi poiché sono contenuti in piante rare e spesso in piccole concentrazioni, quali ad esempio alcaloidi (vinblastina e vincristina), terpenoidi (artemisina, paclitaxel) e flavonoidi (Julsing *et al.*, 2006). Podofillotossina e R di patented (farmaci antitumorali) sono chiari esempi di prodotti farmaceutici che possono essere prodotti soltanto per estrazione e isolamento da materiale vegetale.

R di patented, il nome commerciale del taxolo, è un diterpenoide che si può trovare nelle cortecce e aghi di differenti specie di *Taxus*. La biosintesi parte dalla ciclizzazione del geranildifosfato (GGDP) e conduce al taxadiene. La maggior parte dei 19 step enzimatici conosciuti sono correlabili a idrossilazioni e altre reazioni di ossidazione dello scheletro del taxadiene. Sono stati identificati e isolati parecchi geni da differenti specie di *Taxus* responsabili della biosintesi e possono costituire la base per studi combinatoriali in microorganismi eterologhi; infatti tutti i geni che sono stati clonati in *E. coli* confermano la funzione degli enzimi isolati. Il primo intermedio taxadiene può essere prodotto oggi in *E. coli*. La coespressione della taxadienesintasi da *Taxus brevifolia* con la geranilgeranildifosfosintasi, isolata da *Erwinia herbicola*, isopentenildifosfosintasi proveniente da *Saccharomyces pombe* e la deossixilulosio-5-fosfosintasi esogena da *E. coli*, portano alla produzione di 1.3 mg/l di taxadiene in colture cellulari (Huang *et al.*, 2001). Questo sistema non ottimizzato conferma il principio secondo cui è possibile produrre taxani da *E. coli* geneticamente modificata, combinando stadi biosintetici con enzimi derivanti da organismi diversi.

Riassunto

Negli ultimi anni molte ricerche sono state indirizzate verso la produzione di elevate quantità di metaboliti secondari dalle PAM per soddisfare il sempre più elevato fabbisogno mondiale di questi prodotti naturali, siano essi fitomedicine che nutraceutici.

Le biotecnologie applicate alle piante medicinali e aromatiche contribuiscono a fornire le tecniche più adeguate e moderne per rispondere a tali esigenze; infatti con i sistemi di coltivazione *in vitro* si può ottenere, in maniera continua ed indipendente dalle condizioni ambientali, una considerevole biomassa vegetale in grado di fornire i principi biologicamente attivi.

Accanto alle classiche colture di calli e alle colture cellulari in sospensione, si sta diffondendo anche la produzione di *hairy roots*, ottenute inoculando tessuti vegetali con *Agrobacterium rhizogenes*, in grado di generare elevate quantità di metaboliti di interesse.

L'utilizzo di tali nuove metodologie ha dato origine negli ultimi anni alla particolare attenzione verso la qualità e la sicurezza alimentare.

Parole chiave: colture di tessuti, rigenerazione, bioreattori, trasformazione genetica, genetica combinatoria.

Bibliografia

- KIM OK TAE, BANG KYONG HWAN, KIM YOUNG CHANG, HYUN DONG YUN, KIM MIN YOUNG, CHA SEON WOO, 2009. *Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate*. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 98: 25-33.
- BAIS PH, WALKER TS, SCHWEIZER HP, VIVANCO JM., 2002. *Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of Ocimum basilicum*. Plant Physiol. Biochem, 40:983-995.
- BALAZOVA A, BLANARIKOVA V, BILKA F, BILKOVA A, KINOVA SEPOVA H., 2011. *Effect of three different elicitors on sanguinarine production in suspension cultures of a low-morphine variety of the opium poppy (Papaver somniferum L.)* Ceska a Slovenska Farmacie, 60:237-240.
- BERTOLI A, GIOVANNINI A, RUFFONI B, DI GUARDO A, SPINELLI G, MAZZETTI M, PISTELLI L., 2008. *Bioactive constituent production in St. John's Wort in vitro hairy roots - regenerated plant lines*. J. Agric. Food Chem, 56(13): 5078-5082.
- BONHOMME V, LAURAIN-MATTAR D, LACOUX J, FLINIAUX MA, JACQUIN-DUBREUIL A., 2000. *Tropane alkaloid production by hairy roots of Atropa belladonna obtained after transformation with Agrobacterium rhizogenes 15834 and Agrobacterium tumefaciens containing rol A, B, C genes only*. J. Biotech., 81:151-158.
- CHIVASA S., BONGANI K.N., SIMON W.J., LINDSEY K., SLABAS A.R., 2005. *Extracellular ATP Functions as an Endogenous External Metabolite Regulating Plant Cell Viability*. Plant Cell, 17:3019-3034.
- HUANG Q., ROESSNER C.A., CROTEAU R., SCOTT A.I., 2001. *Engineering Escherichia coli for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol*. Bioorg. Med. Chem. 9, 2237-2242.
- JULSING M.K., KOULMAN A., WOERDENBAG H.J., QUAX W.J., KAYSER O., 2006. *Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites*. Biomolecular Eng. 23:265-279
- KHAN M.Y., ALIABBAS S., KUMAR V., RAIKUMAR S., 2009. *Recent advances in medicinal plant biotechnology*. Indian J Biotech, 8: 9-22
- KIM HJ, FENG CHEN, XI WANG, NIHAL C. RAJAPAKSE, 2005. *Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (Ocimum basilicum L.)*. J. Agric. Food Chem, 53: 3696-3701
- LI GANG ZHOU, JIAN YONG WU, 2006. *Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China*. Nat Prod Rep, 23: 789-810
- MALLOL A., CUSIDO R.M., PALAZON J., BONFILL M., MORALES C., PINOL M.T., 2001. *Ginsenoside production in different phenotypes of Panax ginseng transformed roots*. Phytochemistry, 57: 365-371.
- MOUSUMI D., MALIK C.P., BISEN P.S., 2006. *Micropropagation: a*

- tool for the production of high quality plant based medicines.* Curr Pharm. Biotechnol, 7: 33-49.
- PISTELLI LA, GIOVANNINI A., RUFFONI B., BERTOLI A., PISTELLI LU., 2010. *Hairy root cultures for secondary metabolites production.* Adv Exp Med Biol, 698: 167-84.
- RAMACHANDRA RAO S., RAVISHANKAR G.A., 2002. *Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites.* Biotech Advances, 20:101-153.
- RUFFONI B., PISTELLI LA., BERTOLI A., PISTELLI LU., 2010. *Plant cell cultures: bioreactors for industrial production.* Adv Exp Med Biol, 698: 203-221.
- SARITHA K.V., NAIDU C.V., 2007. *In vitro flowering of Withania somnifera Dunal.- An important antitumoral medicinal plant.* Plant Sci, 172: 847-851.
- UDOMSUK L., KANOKWAN J., TANAKA H., PUTALUN W., 2010. *Improved isoflavonoid production in Pueraria candollei hairy root cultures using elicitation.* Biotechnol Lett, 33:369-374
- VIJAYA SREE N., UDAYASRI P., ASWARI KUMAR Y.V.V., RAVI BABU B., PHANI KUMAR Y., VIJAY VARMA M., 2010. *Advancements in the production of secondary metabolites.* J Nat Prod, 3: 112-123.
- YOU XIANGLING, TAN XIAO, JIA HONGBAI, WU HAO, QU GUANZHENG, LI YUHUA, 2011. *Ginsenosides accumulation in adventitious roots of Panax ginseng cultured in small-type bioreactors.* Xibei Zhiwu Xuebao, 31: 1700-1705.
- ZEBARJADI A.R., NAJAFI SH., GHASEMPOUR H.R., MOTAMED J., 2011. *Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of Valeriana officinalis L. via Agrobacterium rhizogenes.* J Med Plants Res. 5: 4984-4992.

Colture *in vitro* e produzione di tassani

Mariangela Miele^{1,2} e Laura Ottaggio¹

¹ IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino, IST Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

² Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università di Genova

In vitro culture and taxanes production

Abstract. Taxanes are secondary metabolites mainly produced by *Taxus* species plants. The most well known taxanes, as they are employed as antineoplastic drugs, are Taxol (generic name paclitaxel), a natural compound originally extracted from the bark of *Taxus brevifolia* Nutt., with a low yield, and Taxotere (generic name docetaxel), a synthetic analog. Many attempts have been made to produce Taxol and other taxanes by chemical synthesis, semisynthesis and plant tissue cultures. However, to date, the availability of this compound is not sufficient to satisfy the commercial requirements and its cost remains very high. Presently, most of the drug for clinical use is produced by semisynthesis, starting from a natural precursor, 10-deacetylbaccatin III, which can be obtained from differentiated yew tissues, mainly leaves, with a relatively good yield. Semisynthesis is also used to produce Taxotere. The aim of the present work was to produce suspension cell cultures from plants not belonging to *Taxus genus* and to verify whether they produced Taxol and taxanes. For this purpose different explants of hazel (*Corylus avellana* L. species) were used to optimize the protocol for inducing *in vitro* callus, an undifferentiated tissue from which suspension cell cultures were established. Calli were successfully induced from stems, leaves and seeds grown in culture media with different hormone concentrations and combinations. Calli from seeds and leaves were used to establish suspension cell cultures. ELISA and HPLC analysis showed that media recovered from suspension cell cultures contained taxanes. Taxol, 10-deacetyltaxol and 10-deacetylbaccatin III were the main taxanes identified. Despite a certain variability, hazel and yew cultures have been found to produce taxanes in similar level, and to release them in the medium over a period of 100 days. Moreover, the production of taxanes in hazel cell cultures increased when elicitors, such as methyljasmonate and chitosan, were added to culture medium. In conclusion, we show that hazel cell cultures produce Taxol and taxanes under controlled conditions. This result suggests that hazel

possesses the enzymes for Taxol production, which until now has been considered to be a pathway particular to *Taxus genus*. The main benefit of producing taxanes through hazel cell cultures is that hazel is widely available, grows at a much faster rate *in vivo*, and it is easier to be cultivated *in vitro* than yew. In addition, the production of callus directly from hazel seeds shortens the culture time, and minimizes the probability of contamination. Therefore, hazel could become a commercial source of taxanes, both to be used as new therapeutic agents or as new precursors for Taxol semisynthesis.

Key words: Taxol, hazel, antineoplastic drugs, callus induction.

Introduzione

I tassani sono composti caratterizzati da una tipica struttura diterpenoica (Rowinsky, 1997). I tassani più noti per i loro impieghi in campo terapeutico sono il Tassolo (nome generico paclitaxel), composto naturale originariamente estratto dalla corteccia di *Taxus brevifolia* Nutt. (Wani *et al.*, 1971) e Tassotere (nome generico docetaxel), composto di sintesi impiegato come antitumorale in alternativa al Tassolo (Holton *et al.*, 1995).

Fin da quando il Tassolo è stato approvato come farmaco antitumorale dalla FDA nel 1992, esistono problemi di disponibilità di tale composto, principalmente dovuti al fatto che il *T. brevifolia* Nutt. così come altre specie di tasso, fornisce quantità molto limitate di tassani (Wani *et al.*, 1971). Inoltre la sintesi chimica di questo composto su scala industriale non sembra realistica, a causa della complessa struttura della molecola (Holton *et al.*, 1994). Nonostante i numerosi tentativi per rendere il prodotto disponibile su larga scala, la produzione di Tassolo non sembra soddisfare le richieste cliniche. La maggior parte del Tassolo utilizzato in terapia viene prodotto per semisintesi, a partire da un precursore biologico (10-deacetylbaccatina III) ottenuto con buona resa dalle foglie di *Taxus baccata* L. (tasso europeo). Il metodo per la semisintesi viene impiegato anche per la produzione

* mariangela.miele@istge.it

del Tassolere. Tuttavia l'approccio semisintetico presenta diverse limitazioni dovute all'estrazione ed all'isolamento del precursore da diversi tessuti, che possono contenere quantitativi variabili di metaboliti secondari a causa di fattori epigenetici ed ambientali.

Le colture cellulari vegetali sono quindi considerate uno degli approcci più promettenti per ottenere quantità soddisfacenti di Tassolo e composti correlati. Sono stati fatti diversi tentativi per produrre colture cellulari da diverse specie di tasso, anche impiegando elicitatori per aumentare la produttività ed il rilascio di Tassolo e tassani nel terreno di coltura (Fett-Neto *et al.*, 1992; Mirjalili e Linden 1996; Yukimune *et al.*, 1999). Tuttavia la disponibilità di questo farmaco è ancora limitata ed il suo costo è ancora molto elevato a causa delle problematiche associate alla coltivazione *in vitro* delle varie specie di tasso. Sono stati fatti anche tentativi per isolare e coltivare *in vitro* alcune specie di funghi endofiti, ma la resa di tassani è risultata ancora minore rispetto alle colture di tasso (Zhou *et al.*, 2010). Finora le uniche fonti da sfruttare per la produzione commerciale di tassani sono state le piante di tasso. Sebbene il Tassolo sia sempre stato considerato un prodotto peculiare del metabolismo del tasso, qualche anno fa è stato ritrovato anche in alcune varietà di nocciolo americano (Service 2000). Tuttavia gli autori dello studio avevano attribuito la presenza di Tassolo a contaminazioni fungine piuttosto che al metabolismo del nocciolo stesso (Hoffman *et al.*, 1998).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di definire le condizioni sperimentali per ottenere colture cellulari di nocciolo (*Corylus avellana* L.) e verificare se esse producevano Tassolo e tassani. A questo scopo è stato indotto callo da tessuti differenziati sia di nocciolo che di tasso per ottenere colture cellulari. I terreni di coltura sono stati poi analizzati per la presenza di tassani.

Materiali e metodi

Materiale vegetale e induzione di callo

Steli, foglie e semi di nocciolo (*C. avellana* L.) e di tasso (*T. baccata* L.) sono stati utilizzati per l'induzione di callo. I tessuti differenziati sono stati sterilizzati con NaClO 4% e trasferiti in piastre contenenti terreno MS (Murashige e Skoog 1962) pH 5.5 con 10 g/l di agar, 20 g/l di saccarosio e diverse concentrazioni e combinazioni di fitoregolatori quali acido 2,4-Diclorofenossiacetico (2,4-D), Benziladenina (BA) e acido naftalenacetico (NAA). Per ciascun tessuto (foglia, stelo e seme) sono state preparate almeno 24 piastre contenenti 8 diverse concentrazioni e combi-

nazioni di fitoregolatori. Ogni piastra conteneva 8-10 frammenti che sono stati mantenuti al buio in camera di crescita a 26 ± 1 °C. L'induzione di callo è stata valutata 30 giorni dopo la messa in coltura per il nocciolo e 60 giorni dopo la messa in coltura per il tasso. I calli venivano periodicamente trasferiti in terreno fresco con fitoregolatori e subcoltivati ogni 15 giorni. La media e la deviazione standard sono state calcolate su almeno 4 esperimenti per ciascun tessuto.

Colture cellulari

Le colture cellulari di nocciolo e di tasso sono state ottenute da callo mantenuto in coltura per circa 4 mesi. In particolare, circa 4 gr di callo bianco e friabile di nocciolo ottenuto da seme, cresciuto in terreno con 0,5 mg/l di 2,4-D più 1 mg/l di BA e circa 2 gr di callo bianco e friabile di tasso ottenuto da steli, cresciuto in terreno con 2 mg/ml di NAA, sono stati trasferiti in 50 ml di terreno liquido con la stessa concentrazione di fitoregolatori in cui è stato indotto il callo. La sospensione cellulare è stata mantenuta al buio in fiasche Erlenmeyer a 26 ± 1 °C in agitazione orbitale (velocità 125 rpm) e subcoltivata ogni 15 giorni. Prima di trasferire le colture in terreno fresco, 4 ml di sospensione cellulare sono stati centrifugati ed il soprannatante analizzato per la presenza dei tassani. L'analisi dei tassani è stata effettuata per circa 15 settimane. Almeno 4 fiasche con callo di nocciolo e 3 fiasche con callo di tasso sono state preparate per 4 diversi esperimenti.

Preparazione degli estratti ed analisi dei tassani

I tassani presenti in 4 ml di terreno di coltura cellulare di nocciolo e di tasso sono stati filtrati con filtri di nylon (Ketchum e Gibson 1995), quindi i filtri sono stati lavati con 300 µl di metanolo per eluire i tassani. I tassani sono stati quindi identificati e quantificati preliminarmente mediante il saggio ELISA competitivo TAO1 (Hawaii Biotech) e successivamente con HPLC Waters fornito di detector UV (Ottaggio *et al.*, 2008).

Elicitazione

Sei diverse sospensioni cellulari sono state preparate con callo di nocciolo indotto in terreno MS con 0.5 mg/l di 2,4-D più 1 mg/l di BA. Circa 2 g di callo derivato da seme è stato trasferito in fiasche Erlenmeyer contenenti 60 ml di terreno liquido con la stessa concentrazione e combinazione di fitoregolatori impiegata per l'induzione del callo.

Dopo 1 settimana le colture sono state divise in 3 fiasche con 30 ml di terreno fresco. Dopo 8 giorni sono stati aggiunti gli elicitatori. Sei fiasche sono state

trattate con 200 mM di metiljasmonato; 6 fiasche con 200 mM di metiljasmonato più 0,182 g/l di chitosano. Le restanti 6 fiasche sono state trattate con metanolo e usate come controllo. Dopo 2, 4, e 6 giorni di elicitazione 5 ml di sospensione cellulare sono stati centrifugati ed il soprannatante analizzato per la presenza dei tassani mediante HPLC (Linden e Phisalaphong 2000).

Risultati e discussione

Per ottimizzare il protocollo per la coltura di cellule *in vitro* è stata indotta la produzione di callo da espianti di tessuti differenziati di *C. avellana* L. Steli, foglie e semi coltivati su terreno addizionato con diverse concentrazioni e combinazioni di fitoregolatori hanno sviluppato callo a partire dal 10° giorno di coltura, con una certa variabilità rispetto alla concentrazione del fitoregolatore ed al tipo di espianto usato. La tabella 1 mostra la percentuale di callo derivata dai diversi espianti dopo 30 giorni di coltura. Quasi tutte le combinazioni di fitoregolatori erano in grado di indurre callo con una preferenza per 2,4-D, da solo o in combinazione con BA. L'induzione di callo derivato da semi era elevata (più del 50%) anche quando NAA veniva usato in combinazione con BA. Le migliori fonti di espianti sono stati gli steli ed i semi. Parte degli espianti da semi coltivati in terreno con fitoregolatori hanno poi prodotto embrioni somatici dopo diversi giorni di coltura, con un massimo di formazione di embrioni somatici a 14-18 giorni di coltura. Lo sviluppo degli embrioni somatici non sembra dipendente dalla concentrazione/combinazione dei fitoregolatori; tuttavia gli espianti da seme cresciuti in

Tab. 1 - Induzione di callo da espianti di *C. avellana* L. dopo 30 giorni di coltura su terreno MS con diverso contenuto in fitoregolatori. Per ogni tesi si riporta i valori medi \pm deviazione standard.

Tab. 1 - *Callus induction from C. avellana* L. explants after 30 days of culture on MS medium with different growth regulators. For each thesis mean values \pm standard deviation are reported.

Fitoregolatori (mg/l)	Induzione di callo (% espianti con callo)*		
	Foglie	Steli	Semi
2,4-D (1)	37,6 \pm 22,2	73,5 \pm 33,9	52,6 \pm 29,2
2,4-D (0,5)	42,7 \pm 17,9	72,1 \pm 35,9	54,2 \pm 18,6
BA (1)	13,8 \pm 6,1	21,2 \pm 20,9	20,9 \pm 14,9
BA (0,5)	11,4 \pm 7,8	-	19,9 \pm 12,7
2,4-D (0,5) + BA (1)	34,5 \pm 24,3	53,8 \pm 28,8	67,9 \pm 27,6
2,4-D (1) + BA (0,5)	42,9 \pm 16,2	73,0 \pm 34,1	64,7 \pm 23,9
NAA (2)	27,1 \pm 14,9	21,6 \pm 4,1	39,4 \pm 19,2
NAA (2) + BA (0,5)	41,1 \pm 16,6	35,8 \pm 19,6	56,5 \pm 30,8

* I valori percentuali sono stati elaborati con trasformazione angolare prima di effettuare la media e la deviazione standard secondo Bartlett (1947).

terreno senza fitoregolatori non sviluppavano embrioni (dati non mostrati).

In parallelo sono stati usati per indurre colture di callo gli stessi tipi di espianti di *T. baccata* L. La formazione di callo da espianti di tasso, che avviene a partire dal 30° giorno di coltura, ha mostrato generalmente crescita più lenta. La tabella 2 mostra l'induzione di callo dopo 60 giorni di coltura. Gli espianti più produttivi erano gli steli e le foglie. I calli derivati da seme erano meno produttivi, in accordo con quanto già riportato in letteratura (Wickremesinha *et al.*, 1993; Parc *et al.*, 2002).

Le colture cellulari di *C. avellana* L. sono state preparate da callo friabile ottenuto da seme e da foglia e mantenute in terreno liquido addizionato con diverse concentrazioni di fitoregolatori. Parallelamente sono state preparate colture cellulari derivate da callo ottenuto da steli di *T. baccata* L. cresciute in terreno liquido con 2mg/l di NAA, una condizione di crescita già dimostrata ottimale per la produzione di colture cellulari da tasso (Gibson *et al.*, 1993; Cusidò *et al.*, 1999). Nonostante una certa variabilità, il livello di tassani recuperato nel terreno di coltura di nocciolo e di tasso è risultata simile. L'analisi dei tassani effettuata mediante ELISA ha evidenziato che le colture cellulari sia di tasso che di nocciolo producevano elevati livelli di tassani dopo 100 giorni dalla messa in coltura (fig. 1). Ulteriori studi sono necessari per spiegare la variabilità nella produzione di tassani delle colture cellulari analizzate.

Per identificare i principali tassani trovati nelle colture di nocciolo, il terreno raccolto da colture di 30 giorni, già dimostrato positivo per la presenza di tas-

Tab. 2 - Induzione di callo da espianti di *T. baccata* L. dopo 60 giorni di coltura su terreno MS con diverso contenuto in fitoregolatori. Per ogni tesi si riporta i valori medi \pm deviazione standard.

Tab. 2 - *Callus induction from T. baccata* L. explants after 60 days of culture on MS medium with different growth regulators. For each thesis mean values \pm standard deviation are reported.

Fitoregolatori (mg/l)	Induzione di callo (% espianti con callo)*		
	Foglie	Steli	Semi
2,4-D (1)	50,6 \pm 34,2	61,0 \pm 28,5	37,5 \pm 9,0
2,4-D (0,5)	72,0 \pm 23,1	55,1 \pm 17,7	41,4 \pm 4,7
BA (1)	14,5 \pm 4,3	15,0 \pm 4,1	-
BA (0,5)	13,2 \pm 4,6	21,0 \pm 12,3	34,8 \pm 4,1
2,4-D (0,5) + BA (1)	14,3 \pm 5,2	28,9 \pm 7,1	27,2 \pm 10,7
2,4-D (1) + BA (0,5)	35,3 \pm 13,7	42,3 \pm 10,9	23,3 \pm 7,2
NAA (2)	28,3 \pm 15,7	64,2 \pm 44,7	46,2 \pm 15,2
NAA (2) + BA (0,5)	18,4 \pm 2,0	22,7 \pm 9,0	20,8 \pm 4,8

* I valori percentuali sono stati elaborati con trasformazione angolare prima di effettuare la media e la deviazione standard secondo Bartlett (1947).

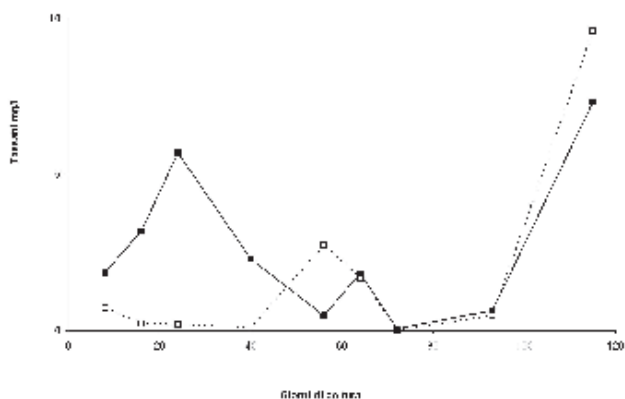


Fig. 1 - Rilascio di tassani nel terreno di colture cellulari di nocciolo (□) e tasso (■) a diversi giorni di coltura. I tassani considerati sono: Tassolo, 10-decetilbaccatina III, Baccatina III, 10-deacetiltassolo, 7-xilosiltassolo.

Fig. 1 - Release of taxanes in medium cell culture of hazel (□) and taxus (■) at different culture times. Taxanes considered are: Taxol, 10-deacetylbaecatin III, Baecatin III, 10-deacetyltaxol, 7-xylosyltaxol.

sani con il test ELISA, è stato sottoposto ad analisi mediante HPLC. Tale analisi ha permesso di valutare che i terreni di coltura del nocciolo contengono principalmente Tassolo, 10-deacetiltassolo e 10-deacetilbaccatina III.

Culture cellulari di nocciolo ottenute da callo derivato da semi sono state successivamente elicitate con metiljasmonato o metiljasmonato più chitosano. Il terreno recuperato da queste colture cellulari 2, 4 e 6 giorni dopo l'elicitazione è stato sottoposto ad analisi HPLC. La produzione di tassani totali, inclusi Tassolo, 10-deacetiltassolo, 10-deacetilbaccatina III, baccatina III e 7-xilosiltassolo, aumentava dopo 6 giorni di elicitazione (fig. 2). I trattamenti con metiljasmonato più chitosano erano più efficaci nell'aumentare la produzione di tassani del trattamento con il solo metiljasmonato. Questi dati suggeriscono che un periodo più lungo di elicitazione costituirebbe un buon sistema per aumentare la produzione di Tassolo e composti correlati in colture di cellule di nocciolo.

Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che, sviluppando le appropriate metodologie, il nocciolo potrebbe diventare una nuova fonte commerciale di tassani da impiegare come nuovi farmaci o come precursori per la semisintesi del Tassolo e/o Tassotere. Nel presente lavoro abbiamo mostrato alcune evidenze sulla base delle quali si può ipotizzare che colture cellulari di nocciolo producono tassani. Ulteriori studi dovrebbero essere indirizzati a confermare con analisi chimiche appropriate la produzione

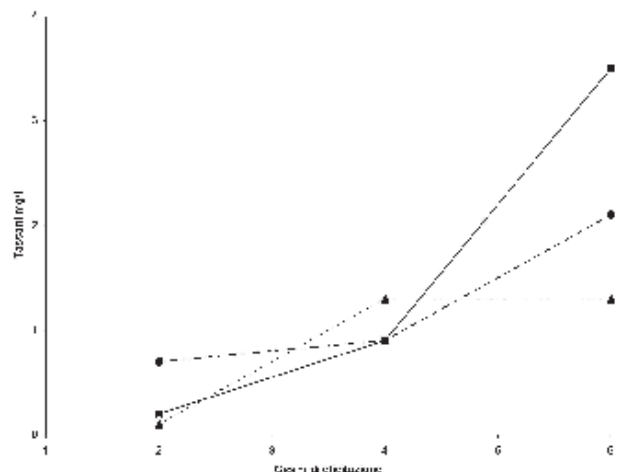


Fig. 2 - Tassani recuperati dal terreno di coltura di nocciolo dopo 2, 4 e 6 giorni di elicitazione. Controllo (▲); trattamento con 200 µM di metiljasmonato (●); trattamento con 200 µM di metiljasmonato e 182 µg/ml di chitosano (■). I tassani considerati sono: Tassolo, 10-decetilbaccatina III, Baccatina III, 10-deacetiltassolo, 7-xilosiltassolo.

Fig. 2 - Taxane recovered in the medium of hazel suspension cultures after 2, 4 and 6 days of elicitation. Control (▲); treatment with 200 µM methyljasmonate (●); treatment with 200 µM methyljasmonate and 182 µg/ml chitosan (■). Taxanes considered are: Taxol, 10-deacetylbaecatin III, Baecatin III, 10-deacetyltaxol, 7-xylosyltaxol.

dei composti di interesse ed ad identificare nel nocciolo gli enzimi coinvolti nella biosintesi del Tassolo, un metabolismo fino ad ora considerato una peculiarità del tasso. La caratterizzazione di questi enzimi è anche un passo essenziale per la futura ingegnerizzazione delle colture cellulari di nocciolo. L'uso di colture cellulari in sospensione di una specie a crescita più veloce e di più ampia diffusione quale il nocciolo è più promettente che l'utilizzo di colture di tasso. Inoltre la produzione di callo direttamente dal seme di nocciolo riduce il tempo di coltura, oltre che ridurre la probabilità di contaminazione della coltura stessa.

Riassunto

I tassani sono composti antitumorali considerati prodotti peculiari del metabolismo delle piante appartenenti al genere *Taxus*; tuttavia sono stati recentemente ritrovati anche in altre specie vegetali. Principale obiettivo del presente studio è stato individuare nuove risorse per la produzione di tassani. A tale scopo sono state definite le condizioni sperimentali per l'allestimento di colture cellulari da tessuti differenziati di *Corylus avellana* L. Il terreno di coltura analizzato periodicamente conteneva tassani la cui produzione è stata incrementata utilizzando elicitori. In conclusione, sviluppando adeguate metodologie, specie più facilmente coltivabili *in vitro* rispetto al tasso potrebbero diventare nuove fonti commerciali di tassani.

Parole chiave: Tassolo, nocciolo, farmaci antitumorali, induzione di callo.

Lavoro parzialmente finanziato da un progetto della Compagnia di S. Paolo.

Bibliografia

- BARTLETT M.S., 1947. *The use of transformations*. Biometrics 3: 39-52.
- CUSIDÒ R.M., PALAZÓN J., NAVIA-OSORIO A., MALLOL A., BONFILL M., MORALES C., PINOL M.T., 1999. *Production of Taxol and baccatin III by selected Taxus baccata callus line and its derived cell suspension cultures*. Plant Science 146: 101-10.
- EXPÓSITO O., BONFILL M., MOYANO E., ONRUBIA M., MIRJALILI M.H., CUSIDÒ R.M., PALAZÓN J., 2009. *Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects*. Anticancer Agents Med. Chem. 9(1): 109-121.
- FETT-NETO A.G., DICOSMO F., REYNOLDS W.F., SAKATA K., 1992. *Cell Culture of Taxus as a Source of the Antineoplastic Drug Taxol and Related Taxanes*. Bio/Technology 10: 1572-1575.
- GIBSON D.M., KETCHUM R.E.B., VANCE N.C., CHRISTEN A.A., 1993. *Initiation and growth of cell lines of Taxus brevifolia (Pacific yew)*. Plant Cell Rep. 12: 479-482.
- HOFFMAN A., KHAN W., WORAPONG J., STROBEL G., GRIFFIN D., ARBOGAST B., BAROFKY D., BOONE R.B., NING L., ZHENG P., DALEY P., 1998. *Bioprospecting for Taxol in Angiosperm plant extracts*. Spectroscopy 13: 22-32.
- HOLTON R.A., BIEDIGER R.J., BOATMAN P.D., 1995. *Semisynthesis of taxol and taxotere*. In *Taxol Science and Applications* Edited by: Suffness M. CRC Press, Boca Raton: 97-121.
- HOLTON R.A., KIM H.B., SOMOZA C., LIANG F., BIEDIGER R.J., BOATMAN P.D., VU P., TANG S., ZHANG P., MURTHI K.K., GENTILE L.N., LIU J.H., 1994. *First total synthesis of taxol 2. completion of the C and D rings*. J. Am. Chem. Soc. 116(4): 1599-1600.
- KETCHUM R.E.B., GIBSON D.M., 1995. *A Novel Method of Isolating Taxanes from Cell Suspension Cultures of Yew (Taxus Spp.)* J. Liq. Chromatogr. 18 (6): 1093-1111.
- LINDEN J.C., PHISALAPHONG M., 2000. *Oligosaccharides potentiate methyl-jasmonate-induced production of paclitaxel in Taxus Canadensis*. Plant Sci. 158:41-51.
- MIRJALILI N., LINDEN J.C., 1996. *Methyl jasmonate-induced production of Taxol in suspension cultures of Taxus cuspidata: Ethylene interaction and induction models*. Biotechnol. Prog. 12: 110-116.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. Plant Physiol. 15:473-97.
- OTTAGGIO L., BESTOSO F., ARMIROTTI A., BALBI A., DAMONTE G., MAZZEI M., SANCANDI M., MIELE M., 2008. *Taxanes from shells and leaves of Corylus avellana*. J Nat. Prod. 71(1):58-60.
- PARC G., CANAGUIER A., LANDRE P., HOCQUEMILLER R., CHRIQUI D., MEYER M., 2002. *Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected Taxus genotypes*. Phytochemistry 59: 725-720.
- ROWINSKY E.K., 1997. *The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents*. Annu. Rev. Med. 48: 353-74.
- SERVICE R.F., 2000. *Hazel trees offer new source of cancer drug*. Science 288: 27-28.
- WANI M.C., TAYLOR H.L., WALL M.E., COGGON P., MCPHAIL A.T., 1971. *Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol. A novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. 93: 2325-2327.
- WICKREMESINHE E.R.M., ARTECA R.N., 1993. *Taxus callus cultures: initiation growth optimization, characterization and taxol production*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 181-193.
- YUKIMUNE Y., TABATA H., HIGASHI Y., HARA Y., 1999. *Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in Taxus cell suspension cultures*. Natl. Biotechnol. 14: 1129-1132.
- ZHOU X., ZHU H., LIU L., LIN J., TANG K., 2010. *A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86(6): 1707-17.

Utilizzo di due ceppi di *Agrobacterium rhizogenes* per la trasformazione di *Ocimum basilicum* L.: risultati preliminari

Francesca D'Angiolillo¹, Fulvia Maria Dos Santos², Sara Barberini^{1,3}, Luisa Pistelli², Laura Pistelli* e Barbara Ruffoni³

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

² Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Pisa

³ CRA-FSO, Unità per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

Preliminary results on comparison of two *Agrobacterium rhizogenes* strains for the transformation of *Ocimum basilicum* L.

Abstract. *Ocimum basilicum* L. is one of the most famous plant used in the Mediterranean foods. It is rich in terpenoidic compounds like estragol, linalool, camphor, eugenol and in the well studied antioxidant molecule Rosmarinic Acid. Protocols for tissue culture and genetic transformation were set up with the aim to obtain in vitro biomass cell culture and/or hairy roots (HR), for secondary metabolite extraction in controlled conditions. In vitro transformation of *O. basilicum* was performed by leaf co-cultivation (for 15 or 30 minutes) with *A. rhizogenes* strains LBA 9402 and ATCC 15834. Then the explants were transferred onto basal medium MS for 48 hours in light. Afterward they were transplanted onto Petri dishes with MS medium added with cefotaxime 100 mg/L. After 20 days 100% of leaves treated with LBA 9402 strain developed new roots; these roots showed the characteristic hairy root behaviour and grew fast. Only 10% of leaves treated with 15834 strain developed putative HR roots. More than 15 HR clonal lines showed the characteristic transgenic morphology and had a high and fast growth rate. The presence of a fragment of *rolC* gene, was confirmed in a HR putative transformed line.

Key words: Basil, Hairy roots, LBA9402, ATCC 15834.

Introduzione

Il basilico (*Ocimum basilicum* L.), pianta appartenente alla famiglia delle Labiate, è una delle specie più conosciute ed utilizzate nell'area mediterranea a

scopi alimentari. L'olio essenziale estratto dalle foglie fresche e dai fiori è usato come additivo o aroma nei cibi, nei prodotti farmaceutici e nei cosmetici. Esso è infatti ricco in composti terpenici quali estragolo, linalolo, canfora, eugenolo: il contenuto fitochimico finale dipende comunque sia dalla varietà che dall'origine geografica (chemotipo) della pianta. Come molte labiate, inoltre, questa specie è ricca in Acido Rosmarinico (RA) (*o*-caffeoil-3-4-acido diidrossifenilattico), uno fra i più noti antiossidanti di origine naturale. Il basilico è inoltre famoso nella medicina naturale per le sue proprietà antivirali, antiossidanti e antibatteriche (Chamila *et al.*, 2003; Chiang *et al.*, 2005).

I metaboliti secondari possono essere estratti in condizioni controllate da tessuti di piante cresciute *in vitro*; in questo caso le colture di radici trasformate (*hairy roots* - HR), ottenute a seguito dell'inserimento del T-DNA dal plasmide *Ri* (*Root inducing*) di *Agrobacterium rhizogenes* nel genoma della pianta ospite, hanno il vantaggio di possedere sia una crescita veloce sia un'alta e stabile produzione di metaboliti secondari senza l'aggiunta di fitoregolatori nel mezzo (Pistelli *et al.*, 2010). Lo sviluppo e l'analisi fitochimica di radici aeree di *O. basilicum* è stato riportato per la prima volta da Tada e collaboratori (1996), mentre analisi più approfondite sullo sviluppo delle HR e il contenuto di RA sono state riportate da Bais e collaboratori (2002). L'analisi dell'estratto in diclorometano di colture di HR in basilico è stata recentemente condotta da Marzouk (2009). Nei lavori citati, le foglie o i germogli di basilico sono stati trasformati con il ceppo ATCC 15834, considerato nella letteratura quello a più alta virulenza per numerose specie erbacee (Saleh and Thuc, 2009; Akramian *et al.*, 2008; Bonhomme *et al.*, 2004).

Nel presente lavoro è stata messa a confronto l'efficienza di trasformazione di ATCC 15834 con quella di un altro ceppo LBA 9402 (Hamill *et al.*, 1986) al fine di migliorare la percentuale di sviluppo di HR e

* lpistelli@biologia.unipi.it

di ottenere linee di radici trasformate con differenti pattern metabolici. Tali obiettivi rientrano nelle linee di azione del progetto internazionale INTERREG - ALCOTRA 2007-2013 "AROMA" n.68, sviluppato tra Italia e Francia, il cui fine è quello di ottenere in condizioni controllate produzione di biomassa per l'estrazione di metaboliti specifici da piante aromatiche.

Materiali e metodi

Coltura in vitro

Germogli di *O. basilicum* sono stati posti su mezzo di moltiplicazione composto da sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) con l'aggiunta di 0,5 mg l⁻¹ di Benzilamminopurina (BA), 30 gl⁻¹ di saccarosio e 8 gl⁻¹ di agar; il pH è stato aggiustato a 5,7 prima dell'autoclavazione del terreno (20 minuti a 120 °C, 1 atm). Gli espianti sono stati posti in barattoli di vetro (volume 500 ml) con chiusura in plastica trasparente e contenenti 80 ml di mezzo ciascuno. Le condizioni colturali in camera di crescita sono state le seguenti: temperatura di 23±1 °C, fotoperiodo di 16 ore con 35 mmol m⁻²s⁻¹ PAR (luce foto sinteticamente attiva) ottenuta da lampade Osram Lumilux White. Per la trasformazione sono state utilizzate foglie intere prelevate dagli espianti; in seguito sono state tagliate sulla loro superficie con una lama.

Trasformazione batterica

Sono stati utilizzati: il ceppo selvatico di *A. rhizogenes* ATCC 15834 (*American Type Culture Collection*) e il ceppo ipervirulento LBA 9402 (per gentile concessione del Dr. David Tepfer, INRA Versailles, Francia). La sospensione batterica (0.1 OD a 600 nm) in mezzo liquido sterile è stata ottenuta da colonie coltivate su Piastre Petri in mezzo NB (Nutrient Broth) per ATCC 15834 e YMB per LBA 9402. Gli espianti fogliari sono stati immersi nella sospensione batterica (15 o 30 minuti), lavati (2 min) in acqua sterile e asciugati su filtri di carta bibula. Come controllo sono stati utilizzati espianti immersi solamente in acqua. Cinque repliche (2 ripetizioni) sono state analizzate in ogni esperimento con il ceppo batterico corrispondente. Gli espianti infettati e i controlli sono stati poi posti su mezzo agarizzato (8 gl⁻¹) MS senza ormoni (MS0) per 2 giorni, poi su mezzo MSCX (MS0 con l'aggiunta di 100 mg l⁻¹ dell'antibiotico cefotaxime) e lasciati nelle stesse condizioni di coltura precedentemente descritte. La percentuale delle foglie putativamente trasformate e il numero di primordi radicali formati sono stati monitorati dopo 20 giorni di coltura su MSCX. Dieci giorni dopo, le radici putative trasformate sono state subcolturate

separatamente su Petri con MSCX. Le osservazioni morfologiche sono state effettuate su 18 linee clonali diverse mostranti caratteri peculiari delle HR. Il tasso di crescita è stato determinato attraverso un'analisi visiva utilizzando i seguenti coefficienti di sviluppo dell'area radicale: 1 = assenza di crescita, 2 = incremento del doppio, 3 = incremento di tre volte, 4 = incremento di quattro volte.

Analisi molecolare delle radici trasformate

L'analisi molecolare è stata condotta su DNA genomico estratto e purificato a partire da 3 g (peso fresco) di HR, seguendo uno specifico protocollo di estrazione per piante che producono metaboliti secondari (Khanuja *et al.*, 1999). La quantità estratta è stata quantizzata spettrofotometricamente (Nanodrop® 2000, Fisher Scientific). Il DNA di *A. rhizogenes* è stato estratto con il metodo sviluppato da Klimyuk (1993). L'amplificazione del DNA è stata ottenuta con un Eppendorf thermal cycler. Ogni reazione di PCR (15 µl) conteneva: 250 ng di DNA genomico o DNA plasmidico, 7,5 µl di Go Taq Green Master Mix, 1X (200 µM) dNTPs e 1,5 Mm MgCl₂, 0.5 µM di primers. Il ciclo di amplificazione prevedeva: denaturazione iniziale a 94 °C per 4 min seguito da 30 cicli di 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 55 s a 72 °C con una estensione finale di 5 min a 72 °C. I seguenti *RolC* primers sono stati usati per confermare l'integrazione del T-DNA di *A. rhizogenes*: (ROL F 5' - CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC - 3' e ROL R 5' - TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA - 3'). La conferma dell'avvenuta trasformazione è stata ottenuta visualizzando le bande attese su gel di agarosio.

Risultati e discussione

Tutte le foglie co-coltivate hanno mostrato una completa vitalità dopo il trattamento e alcune hanno sviluppato radici dall'aspetto HR-simile (fig. 1); le foglie utilizzate come controllo sono diventate necrotiche, senza radici e dopo un mese di coltura sono morte. Le *hairy roots* sono state ottenute sulle foglie trattate con entrambi i ceppi, seppur con spiccate differenze. LBA 9402 ha indotto lo sviluppo di nuove radici nel 100% delle foglie trattate (tab. 1) con caratteristiche riconducibili alle HR quali la rapida crescita, la formazione di nuove radici secondarie e l'elevata tomentosità in assenza di fitoregolatori nel mezzo (fig. 2). Dopo 20 giorni dalla co-coltivazione, il ceppo ATCC 15834 ha indotto la trasformazione solo in un 20% delle radici trattate, ed esclusivamente dopo 15 minuti di co-coltivazione (tab. 1). Il numero dei primordi radicali per foglia era inoltre più basso per gli

Tab. 1 - Efficienza di trasformazione dei due ceppi di *A. rhizogenes* su foglie di basilico, dopo 2 diversi tempi di immersione (15 o 30 min).
 Tab. 1 - Transformation efficiency of two *A. rhizogenes* strains on Basil leaves, after two different soaking times (15 or 30 minutes).

Ceppo di <i>A. rhizogenes</i>	Tempo di immersione (min)	Foglie trasformate (putative) (%)	Primordi radicali/foglia (media dopo 20 giorni)	N° totale di foglie putativamente trasformate dopo 30 giorni
ATCC 15834	15	20	3	3
	30	0	0	0
LBA 9402	15	100	4,6	18
	30	100	5,6	17



Fig. 1 - Sviluppo delle radici aeree dopo co-coltivazione delle foglie di *O. basilicum* con *A. rhizogenes* LBA 9402; 20 giorni dopo il trattamento.

Fig. 1 - Development of putative transformed roots after co-cultivation of *O. basilicum* leaf fragments with *A. rhizogenes* LBA 9402 strain; 20 days after treatment.



Fig. 2 - Particolare di radice aerea cresciuta dopo la trasformazione con il ceppo LBA9402 su mezzo privo di ormoni (MS0), alla fine della seconda subcoltura

Fig. 2 - HR clone line after *A. rhizogenes* LBA 9402 transformation, growing in MS hormone-free medium, end of the second subculture.

espianti trattati con questo ceppo piuttosto che con LBA9402 (3 contro 4,6 o 5,6 rispettivamente) (tab. 1). Dopo 30 giorni su MSCX è stato possibile dividere le radici dal tessuto madre in modo da crescere separatamente. Sono stati isolati 35 cloni di HR dal trattamen-

to con LBA 9402 e 3 da quello con ATCC 15834 (tab. 1). La valutazione morfologica è riportata in tabella 2: il geotropismo negativo e l'alta densità dei tricomi, specialmente nelle radici di nuova formazione, confermano che l'evento organogenetico deve essere associato all'integrazione del genoma batterico. La crescita di 18 HR (per LBA 9402) e 3 HR (per ATCC 15834) è stata monitorata visivamente comparando le immagini delle radici prese ogni 5 giorni. Nel periodo di 15 giorni, 5 cloni su 18 sono cresciuti più in fretta e hanno aumentato la loro area di espansione di 4 volte; 8 su 18 di tre volte e 5 su 18 di due volte (tab. 3). Come ulteriore conferma, la banda di amplificazione (586 pb) per il gene *RolC* presente sul T-DNA è stata riscontrata nelle putative HR ma non nel controllo (fig. 3).

L'uso di LBA 9402 su varie altre specie ha dato risultati non omogenei: Consoli *et al.*, (1995),

Tab. 2 - Valutazione morfologica delle radici sviluppatasi da ogni foglia trattata, dopo 30 giorni di co-coltivazione.

Tab. 2 - Morphological evaluation of the putative HR clusters developing from each treated leaf, 30 days after co-cultivation.

Ceppo LBA9402					
15 min (immersione)					
	Leaf 1	Leaf 2	Leaf 3	Leaf 4	Leaf 5
Geotropismo negativo	si	si	si	si	si
Callo	-	-	-	-	-
Tricomi	++	+++	+	+++	+++
Mortalità (%)	0	0	25	0	0
30 min (immersione)					
Geotropismo negativo	si	si	si	si	si
Callo	-	si	-	-	si
Tricomi	+++	+++	++	++	++
Mortalità (%)	25	0	25	33	0
ceppo ATCC 15834					
15 min (immersione)					
Geotropismo negativo	si	nt	nt	nt	si
Callo	-	nt	nt	nt	-
Tricomi	+	nt	nt	nt	+
Mortalità (%)	50	nt	nt	nt	0

Tab. 3 - Crescita dei cloni di HR indotto dal ceppo LBA9402; indice di crescita, valutato 15 giorni dopo la prima subcoltura dei singoli cloni, usando il seguente coefficiente per lo sviluppo dell'area radicale: 1 = assenza di crescita, 2 = incremento del doppio, 3 = incremento di tre volte, 4 = incremento di quattro volte.

Tab. 3 - Growth of Hairy Root clones induced by LBA 9402 hypervirulent *A. rhizogenes* strain; growth index, evaluated 15 days after the first subculture of single clones, using the following area development coefficient: 1 = absence of growth, 2 = twofold increase, 3 = threefold increase, 4 = fourfold increase.

clone HR	Tasso	clone HR	Tasso	clone HR	Tasso	clone HR	Tasso	clone HR	Tasso
1/A	4	2/A	3,5	3/A	3	4/A	3	5/A	3
1/B	2	2/B	2			4/B	4	5/B	4
1/C	3	2/C	2			4/C	4	5/C	3
1/D	2					4/D	2		
1/E	3								
1/F	4								
1/G	3								

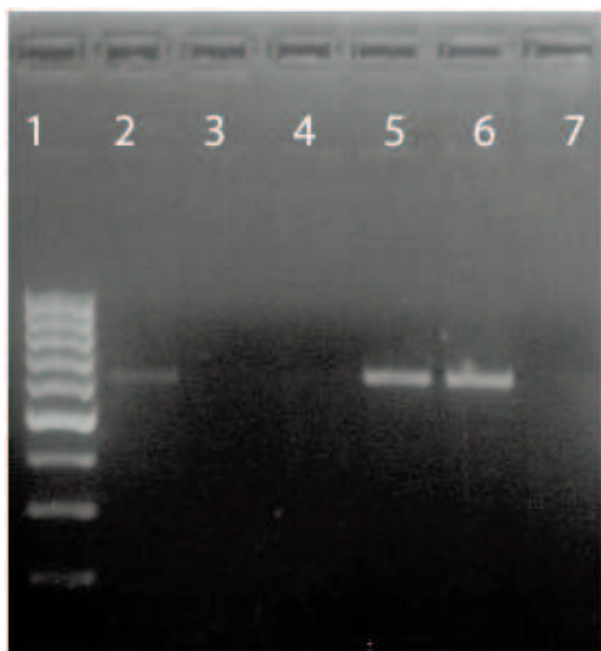


Fig. 3 - Amplificazione tramite PCR del gene *rolC* (freccia: 586 bp). Linea 1-marker 100 pb DNA ladder; linee 2 e 5: cloni HR numero 4 e 16; linee 3 e 4: foglie non trasformate di *O. basilicum*; linea 6: ceppo LBA9402; linea 7: bianco

Fig. 3 - PCR amplification of genomic DNA of Hairy Root of *Ocimum basilicum*. Amplified product of *rolC* (arrow, ~586 bp). Lanes 1 - marker 100 pb DNA Ladder; lanes 2 and 5 - HR clones 4 and 16; lane 3 and 4 non-transformed leaves of *Ocimum basilicum*; lane 6 - *A. rhizogenes* LBA 9402; lane 7, blank.

Tab. 4 - Crescita dei cloni di HR indotti dal ceppo ATCC 15834; indice di crescita, valutato 15 giorni dopo la prima subcoltura dei singoli cloni, usando il seguente coefficiente per lo sviluppo dell'area radicale: 1 = assenza di crescita, 2 = incremento del doppio, 3 = incremento di tre volte, 4 = incremento di quattro volte

Tab. 4 - Growth of Hairy Root clones induced by ATCC 15834 *A. rhizogenes* strain; growth index, evaluated 15 days after the first subculture of single clones, using the following area development coefficient: 1 = absence of growth, 2 = twofold increase, 3 = threefold increase, 4 = fourfold increase.

clone HR	Tasso	clone HR	Tasso
1/A	2	5/A	3
		5/B	2

Ionkova e collaboratori (1997), Bonhomme *et al.*, (2004) e il gruppo di ricerca di Bandyopadhyay (2007) hanno mostrato buoni risultati nella trasformazione di piante medicinali usando il ceppo selvatico; Diop e collaboratori nel 2007 hanno avuto successo col protocollo di trasformazione in *L. aestivum* con l'ausilio del ceppo 9402 ipervirulento.

Al contrario, Banerjee e collaboratori (1998) hanno riportato in letteratura una bassa efficienza di trasformazione con il ceppo selvatico in *V. wallichii*. Saleh e collaboratori nel 2009 avevano dimostrato in un'altra specie appartenente alla famiglia delle Labiate (*S. scutellaroides*), che la maggiore percentuale di trasformazione veniva ottenuta utilizzando il ceppo ATCC 15834 rispetto ad LBA 9402.

Anche nel caso dell'*Agrobacterium* sembra chiaro che esiste una differente interazione tra ceppo e specie vegetale che, in vitro, si riflette nella diversa percentuale di sviluppo di HR.

Le HR a veloce tasso di crescita permettono di sviluppare culture in sospensione. Da questo tipo di colture, Bais e collaboratori (2002) avevano ottenuto un'elevata produzione di RA utilizzando 15834 HR di basilico; tuttavia essi non avevano testato ceppi alternativi. Questo è il primo lavoro in cui viene valutato l'effetto del ceppo LBA 9402 su basilico e l'elevato tasso di crescita delle HR può essere considerato un ottimo punto di partenza per la futura messa a punto di colture in sospensione per usi futuri della biomassa prodotta da basilico da utilizzare in bioreattore.

Conclusioni

LBA 9402 sembra rappresentare un ottimo ceppo di *Agrobacterium* per la trasformazione di foglie di basilico. L'alta virulenza è incoraggiante per ulteriori analisi con molecole elicitori e per controllare la produzione di metaboliti secondari in differenti condizioni di crescita.

Riassunto

Ocimum basilicum L. è una pianta mediterranea ricca in composti terpenici e largamente utilizzata come aromatica, medicinale, additivo per cibi e per le sue proprietà antivirali e antisettiche. La produzione di biomassa di radici aeree è stata ottenuta con un protocollo di trasformazione di foglie utilizzando due diversi ceppi di *A. rhizogenes*: ATCC 15834 e LBA 9402. A seguito di infezione con il secondo ceppo, il 100% delle foglie ha prodotto radici aeree; con entrambi i ceppi batterici, le radici prodotte hanno mostrato un veloce tasso di crescita e riproduzione. La conferma della trasformazione è stata ottenuta tramite PCR.

Parole chiave: Basilico, Hairy roots, LBA 9402, ATCC 15834.

Bibliografia

- AKRAMIAN M., TABATABEI, S.M.F., MIRMASOUMI M., 2008. *Virulence of different strains of Agrobacterium rhizogenes on genetic transformation of four Hyoscyamus species*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 3 (5): 759-763.
- BAIS H.P., WALKER, T.S., SCHWEITZER H.P., VIVANCO J.M. 2002. *Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of Ocimum basilicum*. Plant Physiol. Biochem. 40: 983-995.
- BANDYOPADHYAY M., JHA, S., TEPFER, D. 2007. *Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of Withania somnifera*. Plant Cell Rep. 26: 599-609.
- BANERJEE S., RAHMAN, L., UNİYAL, G.C., AHİJA P.S. 1998. *Enhanced production of valepotriates by Agrobacterium rhizogenes induced hairy root cultures of Valeriana Wallichii* D.C. Plant Sci. 131: 203-208.
- BONHOMME V., LAURAIN-MATTAR, D. AND FLINIAUX, M.A. 2004. *Hairy root induction of Papaver somniferum var. album, a difficult-to-transform plant, by A. rhizogenes LBA 9402*. Planta 218:890-893.
- CHAMILA J., NAOHIRO G., TOMOKO A., SHUN W. 2003. *Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (Ocimum basilicum L.)*. J. Agr. Food Chem. 51(15): 4442-4449.
- CHIANG L.C., NG L.T., CHENG P.W., CHIANG W., LIN C.C. 2005. *Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of Ocimum basilicum*. Clin. Exp. Pharma. Phys. 32: 811-16.
- CONSOLI L., GAZIOLA S.A. AND VIEIRA M.L.C. 1995. *Plant transformation mediated by Agrobacterium rhizogenes: optimization of the infection process*. Rev. Brasil. Genet. 18(1): 115-119.
- DIOP M.F., HEHN A., PTAK A., CHRETIEN F., DOERPER S., GONTIER E., BOURGAUD F., HENRY M., CHAPLEUR Y., LAURAIN-MATTAR D., 2007. *Hairy roots and tissue culture of Leucojum aestivum L. - relationships to galanthamine content*. Phytochem. Rev. 6:137-141.
- HAMILL J.D., PARR A.J., ROBINS R.J., RHODES M.J.C., 1986. *Secondary product formation by cultures of Beta vulgaris and Nicotiana rustica transformed with A. rhizogenes*. Plant Cell Reports 5: 111-114.
- IONKOWA I., KARTNIG T., ALFERMANN W., 1997. *Cycloartane saponin production in hairy root cultures of Astragalus mongholicus*. Phytochem. 8:1597-1600.
- KHANUJA S., SHASANY A., DAROKAR M.P., KUMAR S., 1999. *Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plant producing large amounts of secondary metabolites and essential oils*. Plant Mol. Biol. Rep. 17:1-7.
- KLIMYUK V.I., CARROL B.J., THOMAS C.M., JONES J.D.G., 1993. *Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis*. The Plant Journal 3:493-494.
- MARZOUK A.M., 2009. *Hepatoprotective triterpenes from hairy root cultures of Ocimum basilicum*. L.Z.Naturforsch. C. 64 (3-4): 201-209.
- MURASHIGE T., SKOOG K., 1962 *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant. 15: 473-597.
- PISTELLI L., GIOVANNINI A., RUFFONI B., BERTOLI A., PISTELLI L., 2010. *Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production*. Adv Exper Med Biol, 698: 167-184 (doi: 10.1007/978-1-4419-7347-4_13
- SCORZA R., ZIMMERMAN T.W., CORDIS J.M., FOOTEN K.J., RAVELONANDRO M., 1994. *Horticultural characteristics of transgenic tobacco expressing the rolC gene from A. rhizogenes*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 119(5):1091-1098.
- SAVONA M., MASCARELLO C., BISIO A., ROMUSSI G., PROFUMO P., WARCHOL M., BACH A., RUFFONI B. 2003 *S. cinnabarina Martens et Galeotti: optimisation of the extraction of a new compound, tissue culture and hairy root transformation*. Agr. Med. 133: 28-35.
- SALEH N.M., THUC L.V. 2009. *Assessment of hairy roots induction in Solenostemon scutellarioides leaves by different strains of Agrobacterium rhizogenes*. Afr. J. Biotech. 8(15): 3519-3523.
- TADA H., MURAKAMI Y., OMOTO T., SHIMOMURA K., ISHIMARU K. 1996. *Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of Ocimum basilicum*. Phytochem 42(2):431-434.

Micropropagazione di genotipi di melograno (*Punica granatum* L.) e caratterizzazione del contenuto di acido ellagico e fenoli

Francesco Scarpino¹, Cinzia Forni¹, Paolo Nota², Simona Lucioli², Andrea Frattarelli², Danilo Ceccarelli², Stefano Cherubini², Pierin Preka², Elisa Catenaro², Carmine Damiano² e Emilia Caboni^{2*}

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata"

² CRA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Evaluation of *in vitro* potential and determination of total phenols and ellagic acid in pomegranate genotypes

Abstract. Pomegranates contain phenolic compounds with antioxidative and putative antitumoral effects either in fruits and vegetative tissues. The aim of this study was to compare the potential for *in vitro* multiplication and rooting of 6 genotypes, 1 Italian cultivar and a wild genotype of pomegranate (*Punica granatum* L.) and to evaluate content in total phenols and ellagic acid in their *in vitro* grown shoots. The multiplication rates ranged from 2 to 5 and the rooting percentage from 55% to 85%, in relation to the genotype. The ellagic acid and total phenol content was shown to be genotype dependent as well as. This preliminary characterisation gave information for the choice of the most suitable genotypes to be used for future application in production of bioactive compound from *in vitro* shoot cultures in this species

Key words: bioactive compounds, *in vitro* proliferation, rooting.

Introduzione

Le qualità fitoterapiche del melograno sono note da tempo nella tradizione popolare. Studi recenti condotti su questa specie (Seeram *et al.*, 2005) hanno evidenziato la presenza di contenuti elevati di composti fenolici, tra cui acido ellagico (Jurenka, 2008). Tali composti hanno mostrato *in vitro* un effetto antiossidativo e inibente la crescita di cellule tumorali (Kulkarni *et al.*, 2007), suggerendone un potenziale utilizzo *in vivo* (Heber, 2008).

Protocolli per la moltiplicazione *in vitro* di questa specie sono già disponibili (Damiano *et al.* 2008; Naik *et al.*, 1999; Patil *et al.*, 2011) e prevedono l'uti-

lizzo di sali MS (Murashige e Skoog, 1962) o QL (Quoirin *et al.*, 1977) e benziladenina (BA) o zeatina; tuttavia, la risposta sia di proliferazione che di radicazione rimane genotipo dipendente.

Lo scopo di questo lavoro è stato di caratterizzare la capacità di proliferazione e radicazione di genotipi di melograno (*Punica granatum* L.) e quantificare spettrofotometricamente il contenuto in fenoli totali e acido ellagico degli estratti ottenuti dai germogli delle colture *in vitro* con il fine di valutare la loro potenzialità per l'utilizzo nella produzione *in vitro* di acido ellagico e altri composti fenolici.

Materiali e metodi

Gemme ascellari di melograno (*Punica granatum* L.), cultivar italiana Profeta Partanna, un genotipo selvatico e sei genotipi originari dell'areale mediterraneo presenti presso il Centro di collezione del germoplasma frutticolo del CRA-FRU, sono state prelevate da piante adulte, in pieno campo, in primavera e sterilizzate, in successione, con etanolo per 60', con una soluzione di ipoclorito di sodio (NaOCl 8% cloro attivo) al 15% per 20 min e, infine con sodio mertiolato (0,05%) per 20'. Sono stati effettuati 3 risciacqui in acqua demineralizzata sterile dopo ogni trattamento. I germogli di ciascun genotipo sono stati moltiplicati *in vitro* su un terreno di coltura QL (Quoirin *et al.*, 1977) modificato da Damiano *et al.* (2008) e contenente come fitoregolatori 0,2 o 0,4 mg/l BA e 0,05 mg/l acido indolbutirrico (IBA). Le colture sono state mantenute a 25 °C con un fotoperiodo di 16 ore e un'intensità luminosa di 40 µmol m⁻²s⁻¹ e sub-colturate ogni 21 giorni.

Per valutare la capacità rizogena dei genotipi, germogli singolarizzati (1-1,5 cm), prelevati a fine subcoltura, sono stati trasferiti su un terreno MS (Murashige e Skoog, 1962) con sali dei macroelementi ridotti a metà concentrazione e contenente 2 mg/l IBA. Gli espianti sono stati mantenuti alla luce nelle condizioni standard di coltura per tutto il periodo di

* emilia.caboni@entecra.it

radicazione.

Negli esperimenti di moltiplicazione è stato valutato il tasso medio di moltiplicazione dopo 3 subcolture. I rilievi di radicazione sono effettuati dopo 3 settimane dal trasferimento degli espianti nel terreno di coltura. Sono stati usati in tutto 60 germogli per genotipo (3 contenitori con 20 espianti ciascuno).

Sulle colture di germogli prelevati durante la fase di moltiplicazione di tutti i genotipi in condizioni standard di coltura è stato valutato, mediante analisi spettrofotometriche, il contenuto in fenoli totali (Waterman e Mole, 1994) e in acido ellagico, dopo un'estrazione in DMSO e NaNO₂ (Ozer *et al.*, 2007), opportunamente modificata. Ogni analisi è stata effettuata in triplicato e sulle medie è stato calcolato l'errore standard.

Risultati e discussione

Tutti i genotipi di melograno sono stati messi in coltura e moltiplicati con successo. Il terreno di coltura contenente 0,4 mg/l di BA si è dimostrato più idoneo sia nella fase di allestimento della coltura che nella fase di moltiplicazione (fig. 1) permettendo di ottenere un tasso di proliferazione da 2 a 5, in relazione al genotipo. Tutti i genotipi hanno mostrato capacità rizogena con percentuali di radicazione dal 55% all'85% in presenza di IBA, come precedentemente riportato in altre cultivar (Naik *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2011).

Dai risultati ottenuti dalle analisi spettrofotometriche si è evidenziato che il contenuto di fenoli e di acido ellagico nei tessuti vegetativi è variabile in relazione al genotipo (figg. 2 e 3), come precedentemente

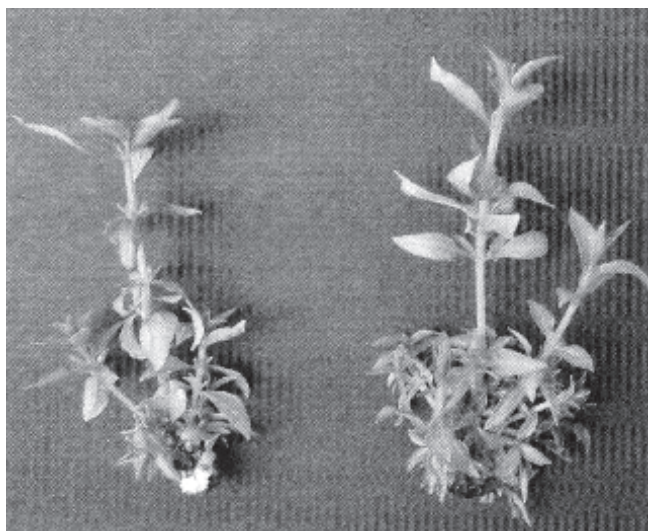


Fig. 1 - Cv Profeta Partanna in moltiplicazione con 0,2 (sin) o 0,4 mg/l BA (dx).

Fig. 1 - Cv Profeta Partanna in multiplication phase with 0.2 (left) or 0.4 mg/l BA (right).

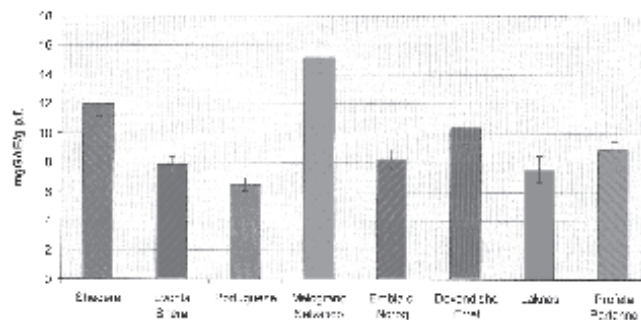


Fig. 2 - Contenuto di fenoli totali (±E.S.) in germogli di melograno.

Fig. 2 - Total phenol content (± S.E.) in pomegranates.

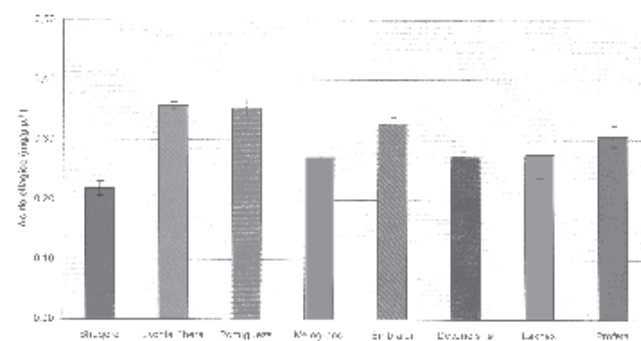


Fig. 3 - Contenuto di acido ellagico (±E.S.) in germogli di melograno.

Fig. 3 - Ellagic acid content (± S.E.) in pomegranate shoots.

evidenziato per i frutti (Cristofori *et al.*, 2011). Il genotipo selvatico è risultato il più ricco in fenoli totali, mentre il contenuto più elevato in acido ellagico è stato osservato nei genotipi Evonta Shera e Profeta Partanna che hanno mostrato circa il 20% in più rispetto al contenuto medio di tutti i genotipi esaminati.

Queste indagini preliminari hanno consentito di individuare i genotipi che meglio si adattano alla micropropagazione e che possono essere i più idonei per la produzione di composti bioattivi da utilizzare in preparati erboristici, cosmetici e farmaceutici. Sono in corso ulteriori caratterizzazioni e analisi cromatografiche (HPLC) per acquisire informazioni più dettagliate sul profilo dei composti fenolici prodotti anche attraverso l'applicazione alle colture *in vitro* di elicitori.

Riassunto

I composti fenolici hanno acquisito negli ultimi anni grande rilievo come componenti nutraceutici nell'alimentazione e per il loro potenziale utilizzo in campo farmaceutico, cosmetico ed erboristico. In questo studio sono stati allestiti e moltiplicati *in vitro* una cultivar italiana (Profeta Partanna), sei genotipi dell'areale mediterraneo presenti presso il Centro di conservazione del germoplasma del CRA-FRU e un genotipo selvatico italiano. Sono state applicate 2 concentrazioni

di BA sia nella fase di allestimento della coltura asettica che nella fase di moltiplicazione e, per valutare la capacità rizogena dei genotipi, i germogli sono stati trasferiti su un terreno MS con macroelementi ridotti a metà e contenente 2 mg/l IBA. Sulle colture di germogli dei genotipi è stato valutato, mediante analisi spettrofotometriche, il contenuto in fenoli totali e in acido ellagico. Il terreno di coltura contenente 0,4 mg/l di BA si è dimostrato più idoneo sia alla fase di allestimento che alla fase di moltiplicazione permettendo di ottenere un tasso di proliferazione da 2 a 5, in relazione al genotipo. Anche la risposta rizogena si è mostrata genotipo dipendente con variazioni della percentuale di radicazione dal 55% all'85%. Il contenuto in fenoli totali e in acido ellagico sono risultati variabili in funzione del genotipo e il selvatico ha mostrato il valore più elevato in fenoli totali nei germogli, mentre il contenuto in acido ellagico più elevato è stato osservato in Evonta Shera e Portoguese.

Parole chiave: composti bioattivi, moltiplicazione *in vitro*, radicazione.

Bibliografia

- CRISTOFORI V., CARUSO D., LATINI G., DELL'AGLI M., CAMILLI C., RUGGINI E., BIGNAMI C., MULEO R. 2011. *Fruit Quality of Italian pomegranate (Punica granatum L.) autochthonous varieties*. Eur Food Res. Technol. 232: 397-403
- DAMIANO C., ARIAS PADRÓ M.D., FRATTARELLI A., 2008. *Propagation and establishment in vitro of myrtle (Myrtus communis L.), pomegranate (Punica granatum L.) and mulberry (Morus alba L.)*. Propag. Ornamental Plants 8(1): 3-8.
- HEBER D.H. 2008. *Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins*. Cancer Lett. 269 (2): 262-268.
- JURENKA, J., 2008. *Therapeutic applications of pomegranate (P. granatum L.): a review*. Alternative Medicine Review, 13 (2): 128-144.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NAIK S.K., CHAND P.K., 2011. *Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: a review*. Plant Cell Rep. 30: 707-721.
- NAIK S.K., PATTNAIK S., CHAND P.K. 1999. *In vitro propagation of pomegranate (Punica granatum L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree*. Sci. Hort., 79 (3/4): 175-183.
- ÖZER Ö., MUTLU B., KIVCAK B. 2007. *Antityrosinase Activity of Some Plant Extracts and Formulations Containing Ellagic Acid*. Pharmaceutical Biology 45 (6): 519-524.
- PATIL V.M., DHANDE G.A., DIPAK M. THIGALE D.M. RAJPUT J.C. 2011. *Micropropagation of pomegranate (Punica granatum L.) 'Bhagava' cultivar from nodal explant*. African Journal of Biotechnology Vol. 10(79): 18130-18136
- PLUMB G.W., DE PASCUAL-TERESA S., SANTOS-BUELGA C., RIVAS-GONZALO J.C., WILLIAMSON G.M. 2002. *Antioxidant properties of gallocatechin and prodelphinidins from pomegranate peel*. Redox Rep. 7: 41-46.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P. BOXUS P.H. 1977. *Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de meristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux*. IN: COMPTE RENDU DES RECHERCHES 1976-1977. Station des cultures fruitières et maraichères pp. 93-117.
- SEERAM N.P., ADAMS L.S., HENNING S.M., NIU Y., ZHANG Y., NAIR M.G. HEBER D. 2005. *In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice*. J. Nutr. Biochem. 16: 360-367.
- WATERMAN P.G., MOLE S. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. ISBN 0-632-02969-2 Oxford, Blackwell Scientific Pub.: 83-85.

Influenza di campi magnetici a bassa frequenza (ELF-MFS) sull'accrecimento *in vitro* di callo di *Salvia officinalis* "Maxima"

Marcello Airò^{1*}, Giulia Camerata Scovazzo², Massimo Caruso³, Sara Barberini⁴, Giovanni Iapichino², Pietro Buccheri³, Barbara Ruffoni⁴ e Giovanvito Zizzo¹

¹ CRA-SFM Unità di ricerca per il recupero e la valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria (PA)

² Dipartimento dei Sistemi Agro-ambientali, Università di Palermo

³ Dipartimento di Ingegneria Elettrica, Elettronica e delle Telecomunicazioni, Università di Palermo

⁴ CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

Effect of static magnetic fields (SMF) on *in vitro* growth of *Salvia officinalis* "Maxima" callus

Abstract. The positive effect of low-strength magnetic field on plant cell tissue culture has been documented on both *in vivo* and *in vitro* experiments. Although, the mechanism of action has not been clarified, Recent studies showed that plant and cell tissue cultures are influenced by the changes in strengths of magnetic field and that the rate of cell division increases in cells exposed to magnetic field (MF). In the present study, calli from leaf explants of *Salvia officinalis* were cut into fragments (400 mg) and grown on a medium which consisted of Murashige and Skoog inorganic salts and vitamins and supplemented with 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D and 0,5 mg L⁻¹ kinetin. Calli fragments were exposed for 0, 1, 2, 3, 4, or 5 min to a MF of 50 mT. The relative growth rate (RGR) was calculated after 40 day culture. RGR was positively correlated to MF time exposure. RGR at 4 min (0.72) was significantly different from control (0.17) and from those at 1, 2 or 3 minutes, 0.26, 0.37 and 0.59 RGR, respectively. The highest exposure time (5 min) caused a reduction in this parameter.

Key words: Electromagnetic field; relative growth rate, undifferentiated cells.

Introduzione

Diversi studi effettuati sia *in vivo* che *in vitro* hanno evidenziato i possibili effetti derivanti dall'esposizione dei tessuti vegetali a campi elettromagnetici a bassa frequenza (Carbonell *et al.*, 2000; Stange *et al.*, 2002; Atak *et al.*, 2003; Yacyli e Alikamanoglu,

2005). Sebbene i meccanismi di azione alla base di tale risposta non siano ancora chiari, studi a livello cellulare hanno evidenziato che sia la sintesi di RNA e delle proteine che il tasso di divisione cellulare sono positivamente influenzati dall'esposizione a flussi elettromagnetici (Fomicheva *et al.*, 1992; Phirke *et al.*, 1996; Muraji *et al.*, 1998; Negishi *et al.*, 1999; Atak *et al.*, 2000). La produzione *in vitro* di metaboliti secondari in tessuti callosi non organizzati derivati da organismi vegetali è divenuta una promettente alternativa alla produzione di composti sintetici. Lo sviluppo di questo settore di ricerca è strettamente collegato sia alla selezione di specifiche colture cellulari dotate di elevata capacità di sintesi sia alla introduzione di metodologie in grado di aumentare l'efficienza di accumulo dei metaboliti.

L'obiettivo della presente ricerca è stato quello di verificare la risposta di crescita di una coltura cellulare di *Salvia officinalis* sottoposta a campi magnetici stazionari di diversa durata.

Materiali e metodi

L'esperimento ha previsto l'utilizzo di una coltura di cellule indifferenziate (callo) di *Salvia officinalis* 'Maxima' genotipo "SOF 2" (fig. 1) originata da espianti fogliari e selezionata presso il CRA - FSO di Sanremo per l'elevata capacità antiossidante (Ruffoni *et al.*, 2009). Il callo è stato mantenuto presso il CRA-SFM di Bagheria (PA) mediante subcolture su un substrato contenente i macro e i microelementi di Murashige e Skoog (1962), 30 g l⁻¹ di saccarosio, 0,5 mg l⁻¹ 2,4-D, 0,5 mg l⁻¹ chinetina, 8 g l⁻¹ di agar tecnico (OXOID 3) all'interno di capsule Petri Iwaki® (Sterilin, Bibby Scientific). Le colture sono state poste in camera di crescita ad una temperatura di 24 °C e con un fotoperiodo di 16 ore di luce (30 µmol m⁻² s⁻¹). Il protocollo sperimentale ha previsto l'esposizione

* marcello.airo@entecra.it

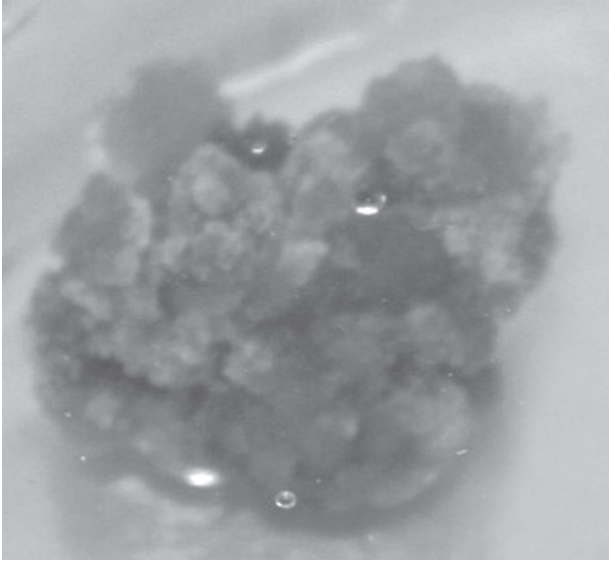


Fig. 1 - Callo di *S. officinalis* "Maxima".
Fig. 1 - *S. officinalis maxima* callus.

della coltura cellulare ad un flusso magnetico della densità di 50 milliTesla (mT) per la durata di 0, 1, 2, 3, 4 o 5 minuti, per valutare il tasso di crescita relativo (TCR) dopo 40 giorni. Lo schema sperimentale adottato ha previsto tre scatole Petri, contenenti ciascuna circa 400 mg di callo, ripetute tre volte. L'esperimento è stato condotto presso il Dipartimento di Ingegneria Elettrica, Elettronica e delle Telecomunicazioni dell'Università di Palermo (DIEETCAM) mediante le apparecchiature di seguito elencate.

A. - *Circuito di Potenza (fig. 2)*

A. 1 - Elettromagnete di prova, costituito da espansioni polari in ferro laminato e da elementi

di raccordo in lamiera saldata. Le espansioni polari delimitano un volume di circa $15 \times 15 \times 15 \text{ cm}^3$ entro il quale è stato possibile stabilire un campo continuo d'induzione magnetica B del valore prefissato di 50 mT. In tale volume sono state collocate le capsule contenenti i calli da sottoporre al trattamento.

A. 2 - Alimentatore stabilizzato ELIND, alimentazione da rete 230 V, 50 Hz.; tensione d'uscita regolabile: 0 , 600 V cc; corrente d'uscita regolabile: 0 , 6 A cc. per l'alimentazione del circuito magnetico e la realizzazione di un campo d'induzione B regolabile in ampiezza e costante nel tempo.

A. 3 - Trasformatore separatore 400/400 V, per la sicurezza dell'operatore.

A. 4 - Autotrasformatore variabile, alimentazione da rete 400 V ca, 32 A; uscita regolabile 0 , 450 V ca. Per l'alimentazione dell'elettromagnete e la realizzazione di un campo d'induzione B regolabile in ampiezza e variabile nel tempo alla frequenza di 50 Hz.

A. 5 - Sistema di commutazione ca/cc, per l'alimentazione dell'elettromagnete.

A. 6 - Voltmetro CGS cc/ca classe 0,5 per il controllo della tensione di alimentazione dell'elettromagnete.

A. 7 - Amperometro SIEMENS cc/ca, classe 1,5 per il controllo della corrente di alimentazione dell'elettromagnete.

A. 8 - N. 2 sonde termometriche ONSET per la misura della temperatura ambiente e della temperatura nella zona del trattamento.

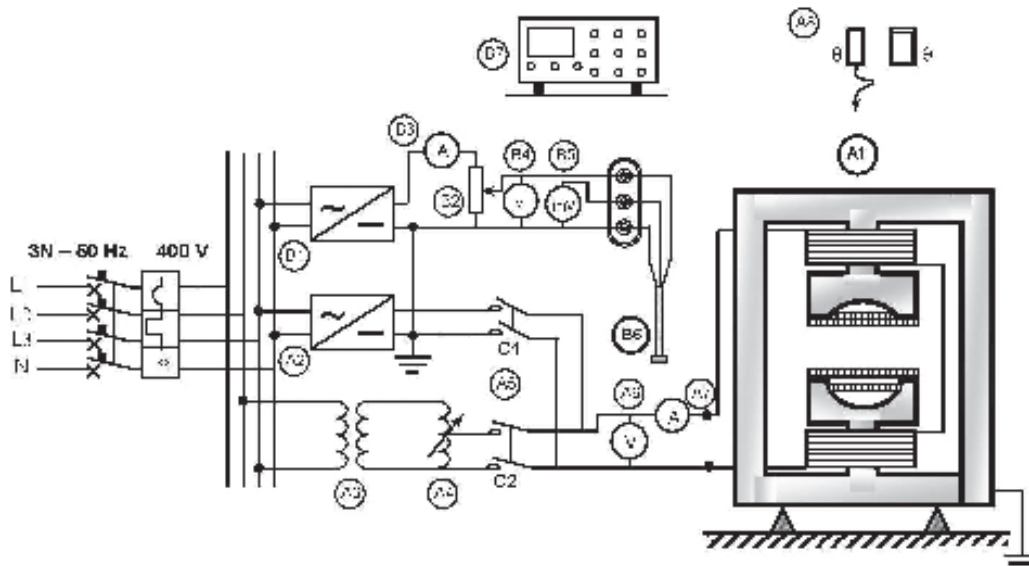


Fig. 2 - Schema elettrico dei circuiti di potenza e di misura.
Fig. 2 - Electric scheme of the power and measuring circuit.

B. - Circuito di misura dell'induzione magnetica B al transfero

È stata impiegata una sonda ad effetto Hall, che fornisce l'intensità ed il verso del vettore induzione magnetica B. Il circuito elettronico di cui la sonda è equipaggiata permette di eseguire misure anche in regime sinusoidale.

È stato adottato uno schema sperimentale a blocco randomizzato con 4 blocchi ciascuno dei quali costituito da 4 capsule di Petri contenenti 5 porzioni di callo per capsula. Sono state utilizzate porzioni di callo aventi ciascuna un peso fresco iniziale prima del trattamento di 400 mg. Ogni capsula è stata sigillata con Parafilm per evitare perdite di umidità. Dopo il trattamento le capsule sono state riportate nelle condizioni di luce e temperatura su menzionate. Dopo 40 giorni dal trattamento è stato calcolato il tasso di crescita relativo del callo applicando la seguente espressione logaritmica formula:

$$TCR = \ln(PF) - \ln(PI)$$

in cui con TCR è stato indicato il *Tasso di crescita relativo*, con PF il *Peso fresco finale* del callo misurato al termine prefissato (40 giorni) e con PI il *Peso fresco iniziale* del callo. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza ed il confronto delle medie è stato effettuato mediante il metodo Fisher.

Risultati e discussione

Il TCR, parametro indicativo del ritmo di accrescimento della coltura di cellule indifferenziate di salvia, è risultato influenzato dall'esposizione temporanea all'induzione magnetica costante di valore prefissato (fig. 3). L'esposizione per la durata di 1 minuto ha fatto registrare un indice di accrescimento pari a 0,26,

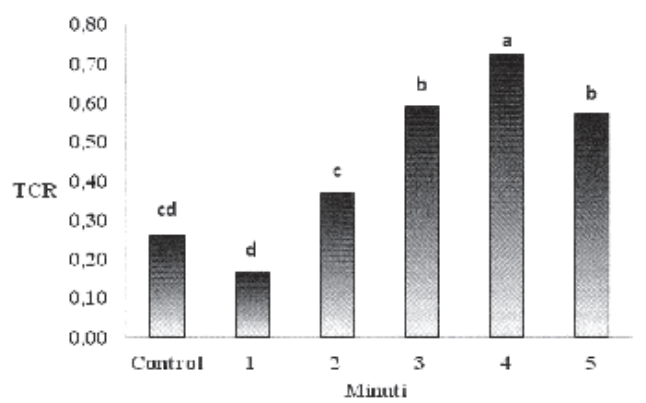


Fig. 3 - Tasso di crescita relativo (TCR) di callo di *S. officinalis maxima* dopo 40 giorni dal trattamento. Valori aventi lettere diverse differiscono statisticamente per $P \leq 0,05$ secondo il test delle MDS di Fisher.

Fig. 3 - Relative growth rate of *S. officinalis maxima* calli after 40 days treatment.

statisticamente non significativo rispetto a quello rilevato negli aggregati cellulari non esposti al campo magnetico (0,17); tuttavia, un tempo di esposizione di 2 minuti ha determinato un innalzamento significativo del TCR (0,37). L'esposizione per 4 minuti ha fatto registrare il più elevato TCR (0,72). Un ulteriore aumento di durata (5 minuti) ha tuttavia determinato un decremento del TCR paragonabile a quello riscontrato sottoponendo la coltura a 3 minuti di esposizione. Diversi autori (Martinez *et al.*, 2000; Carbonell *et al.*, 2000) hanno evidenziato la positiva correlazione esistente tra i tempi di esposizione a campi elettromagnetici e la risposta delle colture di tessuti vegetali di varia natura. È stato dimostrato che i campi magnetici hanno effetti positivi sul processo di rigenerazione in piante di soia (Atak *et al.*, 2003) e che inducono la rigenerazione radicale e la formazione di gemme avventizie in *Aloe arborescens* (Corneanu *et al.*, 1994). Yaycili e Alikamanoglu (2005) hanno osservato che il tasso di rigenerazione di cellule di *Paulownia tomentosa* e *P. fortunei in vitro*, è superiore in cellule trattate con campi magnetici rispetto a cellule non trattate. I risultati preliminari emersi dal presente esperimento pongono i presupposti per l'avviamento di ulteriori ricerche volte a verificare la risposta di crescita delle colture sottoposte a flussi magnetici di diversa intensità, sia valutando la stabilità genetica delle colture sottoposte al trattamento sia valutando il contenuto di metaboliti secondari a seguito dell'esposizione al campo magnetico, che può essere considerato un elicitore fisico in grado di determinare una modifica del metabolismo secondario.

Riassunto

La presente ricerca ha avuto lo scopo di valutare la risposta di una coltura cellulare di *Salvia officinalis* sottoposta ad un flusso magnetico della densità di 50 millitesla per la durata di 0, 1, 2, 3, 4 o 5 minuti. Il callo è stato allevato su substrato agarizzato di Murashige e Skoog addizionato con 0,5 mg l⁻¹ 2,4-D e 0,5 mg l⁻¹ chinetina. Dopo il trattamento le colture sono state poste in camera di crescita ad una temperatura di 24 °C ed in presenza di 16 ore di luce. Il tasso di crescita relativo, parametro indicativo del ritmo di accrescimento della coltura di cellule indifferenziate, è risultato crescente all'aumentare del periodo di esposizione al campo magnetico, raggiungendo dopo 4 minuti il valore massimo (0,72). Superando tale durata l'indice di riferimento si è ridotto. I risultati preliminari ottenuti in questa ricerca lasciano intravedere le notevoli potenzialità della metodologia adottata.

Parole chiave: campo elettromagnetico, coltura di cellule indifferenziate, tasso di crescita.

Bibliografia

- ATAK C., EMIROGLU Ö. , ALIKAMANOGLU S., RZAKOULIVE A., 2003. *Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (Glycine max L. Merrill) tissue cultures*. J. Cell Mol. Biol. 2:113-119.
- ATAK C., ALIKAMANOGLU S., DANILOV V.I., RZAKOULIEVA A., YURTTAS B., TOPCUL F., 2000. *Effect of magnetic field on Paulownia seeds*. Com. J.I.N.R. Dubna: 1-14.
- CARBONELL M.V., MARTINEZ E., AMAYA J.M., 2000. *Stimulation of germination in rice (Oryza sativa L.) by a static magnetic field*. Electro. Magnetobiol. 19: 121-128.
- CORNEANU M., CORNEANU G., BADICA C., MINEA R., BICA D., VEKAS L., 1994. *In vitro organogenesis at Aloe arborescens (Liliaceae)*. Revue Roumanie de Biologie. Serie de Biologie Vegetale 39: 45-52.
- FOMICHEVA V.M. GOVORUN R.D., DANILOV V.I. 1992. *Proliferative activity and cell reproduction in the root meristems of the pea, lentil and flax in the conditions of screening the geomagnetic field*. Biophysics 37: 645-648.
- IPEKCI Z., ALTINKUT A., KAZAN K., BAJROVIC K., GOZUKIRMIZI N. 2001. *High frequency plant regeneration from nodal explants of Paulownia elongata*. Plant Biol. 3: 113-115.
- MARTINEZ E., CARBONELL M.V., AMAYA J.M., 2000. *A static magnetic field of 125 mT stimulates the initial growth stages of barley (Hordeum vulgare L.)*. Electro. Magnetobiol. 19: 271-277.
- MURAJI M., ASAI T., TATEBE W. 1998. *Primary root growth rate of Zea mays seedlings grown in an alternating magnetic field of different frequencies*. Bioelectrochem. Bioenerg. 44: 271-273.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant 15: 473-497.
- NEGISHI Y., HASHIMOTO A., TSUSHIMA M., DOBROTA C., YAMASHITA M., NAKAMURA T., 1999. *Growth of pea epicotyl in low magnetic field implication for space research*. Adv. Space Res. 23: 2029-2032.
- PHIRKE P.S., KUBDE A.B., UMBARGAR S.P. 1996. *The influence of magnetic field on plant growth*. Seed Sci. Tech. 24: 375-392.
- RUFFONI B., RAFFI D., RIZZO A., OLESZEK W., GIARDI M.T., BERTOLI A., PISTELLI L. 2009. *Establishment of in vitro salvia cell biomass for the controlled production of antioxidant metabolites*. Proc. VI Int. Symp. In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Acta Hort. 829: 423-427.
- STANGE B.C., ROWLAND R.E., RAPLEY B.I., PODD J.V. 2002. *ELF magnetic fields increase amino acid uptake into Vicia faba L roots and alter ion movement across the plasma membrane*. Bioelectromagnetics 23: 347-354.
- YAYCILI O. E ALIKAMANOGLU S., 2005. *The effect of magnetic field on Paulownia tissue cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2005) 83: 109-114.

Colture *in vitro* e produzione di composti fenolici in *Vaccinium corymbosum* L.

Sara Tirone¹, Cinzia Forni¹, Simona Lucioli², Massimiliano Meneghini², Paolo Nota², Flavio Roberto De Salvador², Mario Giorgioni², Elisa Catenaro², Andrea Frattarelli², Danilo Ceccarelli² e Emilia Caboni^{2*}

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata"

² CRA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

In vitro cultures for the production of phenolic compounds in *Vaccinium corymbosum* L.

Abstract. Increasing concentrations (0.9 - 1.8 - 2.7 μM) of benzyladenine or zeatine were applied to in vitro growing shoots of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), cv 'Brigitta Blue', to optimise the multiplication phase. The highest proliferation rate with absence of hyperdricity was obtained with 1.8 μM zeatine. Micro-shoots were subsequently induced to root in vitro in presence of 10 μM IAA, IBA or NAA. The highest rooting response (73%) was obtained with IBA and rooted microcuttings were successfully acclimatised. Interest for phenolic compounds has been increased in the last years for their antioxidant and antimicrobial activity. Thus, elicitation treatments with red light, blue light or darkness with or without 10.32 μM methyljasmonate (MJ) were applied to calli obtained from leaves excised from in vitro grown shoots of the cultivar to evaluate the effects in promotion the synthesis of secondary metabolites. Total phenols, anthocyanins and ellagic acid content was measured spectrophotometrically. MJ in standard light conditions was effective in increasing anthocyanin calli production, and, when used in darkness, positively affected either anthocyanin or total phenol content, while the content of ellagic acid increased when MJ was applied to calli maintained in darkness or in red light.

Key words: calli cultures, elicitors, micropropagation, secondary metabolites, spectrophotometry.

Introduzione

Il genere *Vaccinium* L. (famiglia *Ericaceae*) contiene circa 400 specie che producono frutti caratterizzati da elevati contenuti di sostanze bioattive, tra cui

le antocianine che mostrano attività antiossidante, antinfiammatoria e antitumorale (Ross *et al.*, 2007 e referenze incluse). La coltivazione del *V. corymbosum* è particolarmente importante in Canada e in USA, ma negli anni recenti produzioni consistenti vengono anche effettuate in Europa, nei Paesi Bassi e dell'Est, e anche in Italia l'interesse per questa specie è rapidamente cresciuto (Bounous *et al.*, 2006). Esso viene propagato per talee, ma sono anche disponibili protocolli di micropropagazione (Debnath, 2006; Gajdosova *et al.*, 2006; Gonzales *et al.*, 2000; Meiners *et al.*, 2007; Litwinczuk e Wadas, 2008; Tetsumura *et al.*, 2008). Nonostante la recente diffusione della produzione commerciale di piante micropropagate, rimangono ancora aspetti delle fasi della coltura da ottimizzare al fine di migliorare la qualità degli espianti e la loro capacità rizogena.

L'accertamento dell'efficacia terapeutica e/o preventiva di una vasta gamma di composti fenolici ha portato negli ultimi anni la ricerca a trovare condizioni culturali che ne stimolino il loro accumulo nelle piante coltivate. Infatti, in molti tessuti vegetali il livello dei flavonoidi è modulato in risposta ad un'ampia varietà di stimoli esterni, tra cui radiazioni UV, alta intensità luminosa, disponibilità di zuccheri esogeni (Nishiyama *et al.*, 2004). Un esempio evidente riguarda il cambio della colorazione nella buccia della frutta, in relazione alla quantità di luce disponibile, dovuto al controllo della biosintesi e accumulo di antociani (Treutter, 2010). Anche l'interesse verso l'utilizzo delle colture *in vitro* per la produzione di sostanze bioattive è in rapida crescita (Ruffoni *et al.*, 2009). Le colture cellulari rappresentano una risorsa per la produzione di metaboliti secondari consentendo una continuità di produzione delle sostanze bioattive in condizioni controllate (Lila, 2004; Ruffoni *et al.*, 2009). Inoltre, poiché la sintesi di alcuni composti può essere indotta come risposta a condizioni di stress, le colture *in vitro* consentono la manipolazione controllata delle condizioni di crescita e l'applicazio-

* emilia.caboni@entecra.it

ne di stimoli fisici e chimici (elicitori) che possano favorire la produzione di metaboliti secondari (Blando *et al.*, 2004; Poulev *et al.*, 2003;). Tra gli elicitori chimici, alcuni studi hanno mostrato l'accumulo di metaboliti secondari *in vitro* grazie a strategie che prevedono l'utilizzo del MJ, che svolge un ruolo di rilievo nel sistema di risposta della pianta agli stress (Matkowski, 2008 e referenze incluse; Zhang *et al.*, 2002).

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare l'effetto dei fitoregolatori nella micropropagazione della cultivar di mirtillo gigante americano (*Vaccinium corymbosum* L.) Brigitta Blue al fine di definire il miglior protocollo di moltiplicazione e radicazione. Dalle foglie dei germogli coltivati *in vitro*, inoltre, sono stati ottenuti calli a cui sono stati applicati trattamenti di elicitazione allo scopo di promuovere la produzione di composti fenolici.

Materiali e metodi

Micropropagazione

In questo lavoro sono stati utilizzati germogli coltivati *in vitro* di mirtillo (*Vaccinium corymbosum* L.), cv Brigitta Blue, ottenuti da gemma ascellare prelevate da piante adulte presenti nei campi sperimentali del CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma. I germogli sono stati moltiplicati su un terreno di coltura messo a punto precedentemente da Damiano *et al.* (2008) per altri frutti minori e contenente FeNaEDTA (66,7 mg/l), benziladenina (BA), saccarosio (3%) e agar (0,6% B&V Italia). Le colture sono state mantenute a 25 °C con un fotoperiodo di 16 ore e un'intensità luminosa di 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (condizioni standard).

Per valutare l'effetto del tipo e della concentrazione di citochinina sul tasso di moltiplicazione dei germogli, sono state applicate concentrazioni crescenti (0,9 - 1,8 - 2,7 μM) di BA o zeatina (ZEA), mentre, per la fase di radicazione, sono state messe a confron-

to, utilizzando lo stesso terreno basale, varie auxine, 10 μM acido indolacetico (IAA), acido indolbutirrico (IBA) o acido naftalenacetico (NAA). Le plantule radicate sono state ambientate in serra, in tunnel, in condizioni di umidità e temperatura controllate.

Produzione di composti fenolici

Porzioni di foglia prelevate da germogli in fase di moltiplicazione e private di picciolo e bordi, sono state trasferite su terreno basale Gresshoff e Doy (1972) contenente NAA (10 μM) e kinetina (K, 4,6 μM), per ottenere tessuto indifferenziato. Gli espianti sono stati mantenuti al buio per tre settimane e successivamente trasferiti alla luce, alle condizioni di coltura standard e sub-culturati su terreno fresco ogni 20 giorni.

Sui calli ottenuti (fig. 1) sono stati applicati trattamenti di elicitazione eseguiti utilizzando un tubo a fluorescenza per luce rossa (620-750 nm) o per luce blu-UV (450 nm) con un fotoperiodo di 8 ore in presenza o assenza di 10,32 $\mu\text{l/l}$ metiljasmonato (MJ, Sigma) nel terreno di coltura (Tassoni *et al.*, 2005).

Il contenuto in antocianine è stato determinato sui calli (300 mg) mediante lettura allo spettrofotometro (Dong *et al.*, 1995). Inoltre, è stato valutato, sempre mediante analisi spettrofotometriche, il contenuto dei fenoli totali (Bray e Thorpe, 1954) e di acido ellagico, dopo un'estrazione in DMSO ed aggiunta di NaNO_2 , secondo il metodo di Ozer e collaboratori (2007).

Risultati e discussione

Gonzalez *et al.* (2000) e Litwinczuk e Wadas (2008) hanno messo in evidenza che una soddisfacente proliferazione di germogli può essere ottenuta in alcune cultivar di *V. corymbosum* utilizzando N6-[2-isopentenyl] adenine (2iP), mentre i risultati di Ostrolucká *et al.*, (2004) suggeriscono la ZEA come miglior citochinina da utilizzare in fase di moltiplica-

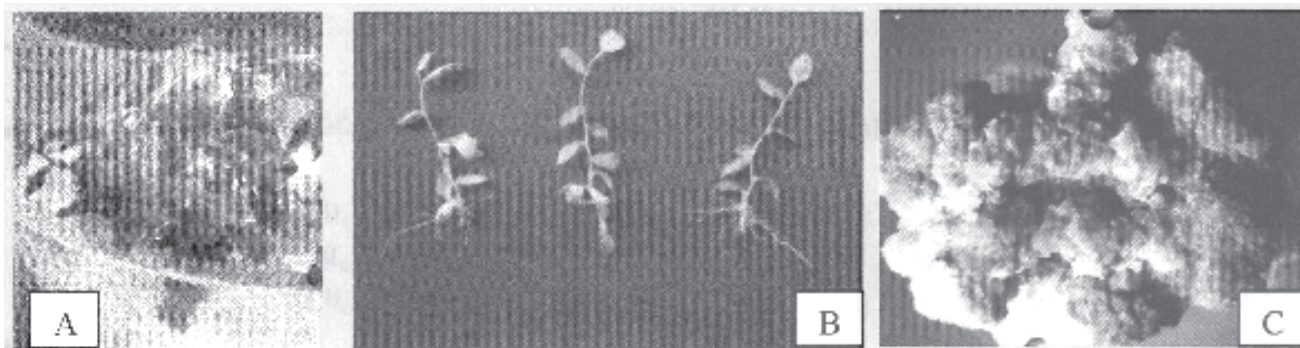


Fig. 1 - Cv Brigitta Blue. A. Germogli in moltiplicazione su terreno contenente zeatina (1,8 μM). B. Espianti radicati con 10 μM IBA. C. Callo ottenuto da foglia (30 giorni).

Fig. 1 - Cv Brigitta Blue. A. Shoots in multiplication phase on medium with zeatine (1.8 μM). B. Explants rooted with 10 μM IBA. C. Calli after 30 days of culture.

zione per ottimizzare la produzione di germogli da gemma ascellare. Dai risultati ottenuti in questo lavoro (tab. 1, fig. 1) si è evidenziato che il terreno di coltura contenente ZEA, 1,8 µM, è il più idoneo alla fase di moltiplicazione della cv Brigitta Blue permettendo di ottenere i tassi di moltiplicazione più elevati ed espianti non iperidrici, come anche precedentemente dimostrato in altre cultivar da Eccher e Noè (1989).

La radicazione può essere effettuata sia *ex vitro* previa immersione dei germogli in una soluzione contenente IBA (Gonzalez *et al.*, 2000; Noè e Eccher, 1994) che *in vitro* utilizzando sia NAA che IBA (Meiners *et al.*, 2007 e citazioni riportate), tuttavia la riposta rizogena è genotipo dipendente. Nella radicazione della cultivar Brigitta Blue il miglior risultato (73%) è stato ottenuto con IBA, mentre l’NAA ha indotto un’abbondante formazione di callo (tab. 2), come anche precedentemente riportato da Zhao e collaboratori per un ibrido di *V. corymbosum* (2011). Le piante ottenute sono state successivamente trasferite in serra (65% di piante ambientate). Il protocollo è attualmente in applicazione sulla cultivar Blue Crop.

Per quanto riguarda il trattamento *in vitro* dei calli per incrementare la produzione di metaboliti secondari, dai risultati ottenuti si è evidenziato un effetto promotore del MJ: da solo sulla produzione di antociani e in combinazione con il trattamento di buio sul contenuto di antociani e fenoli totali (tab. 3). Per quanto riguarda l’acido ellagico, le combinazioni MJ e buio e MJ e luce rossa sono state le più efficaci nell’incrementarne la sintesi, rispetto al controllo.

Questi risultati confermano i risultati ottenuti in

Tab. 1 - Cv Brigitta Blue. Effetto dei fitoregolatori (BA e ZEA) sulla moltiplicazione *in vitro*.

Tab. 1 - Cv Brigitta Blue. Effect of growth regulators (BA and ZEA) on *in vitro* multiplication.

Citochinina (µM)	Tasso di moltiplicazione	Condizione espianti
BA	0,9	x2
	1,8	x2
	2,7	x3
Iperidricità		
ZEA	0,9	x3
	1,8	x8
	2,7	x9
Iperidricità		

Tab. 2 - Cv Brigitta Blue. Effetto dei fitoregolatori (10µM IAA, IBA o NAA) sulla radicazione *in vitro*.

Tab. 2 - Cv Brigitta Blue. Effect of growth regulators (10µM IAA, IBA o NAA) on *in vitro* rooting.

Auxina	% Radicazione	N. Radici/Esp.	Callo
IAA	15	2	-
IBA	73	6	+
NAA	28	2	+++

Tab. 3 - Effetto dell’elicitazione fisica e chimica dei calli sulla produzione di metaboliti secondari.

Tab. 3 - Effects of physical and chemical elicitors on secondary metabolite production in calli.

	Antociani	Acido ellagico	Fenoli
CK	0,09±0,01	0,39±0,08	1,34±0,07
L. BLU	0,03±0,00	0,55±0,20	1,96±0,26
L. ROSSA	0,08±0,00	0,71±0,26	2,14±0,21
MJ	0,13±0,01	0,32±0,05	1,73±0,47
MJ BUIO	0,16±0,03	1,90±0,26	3,65±0,65
MJ L. BLU	0,03±0,00	0,54±0,13	1,26±0,48
MJ L. ROSSA	0,09±0,00	2,07±0,10	2,00±0,70

altre specie con il MJ (Matkowski, 2008; Verpoorte, 2002) e mettono in luce le potenzialità dell’utilizzo di questo elicitore anche nella promozione della produzione di molecole bioattive in colture *in vitro* di *Vaccinium corymbosum*.

Riassunto

Culture *in vitro* di mirtillo gigante americano (*Vaccinium corymbosum* L.), cv ‘Brigitta Blue’, sono state trattate con concentrazioni crescenti (0,9 - 1,8 - 2,7 µM) di benziladenina o zeatina durante la fase di moltiplicazione mentre, per la fase di radicazione, sono state messe a confronto varie auxine: IAA, IBA o NAA (10 µM). Dai risultati ottenuti si è evidenziato che il terreno di coltura contenente zeatina, 1,8 µM, è il più idoneo alla fase di moltiplicazione della cultivar permettendo di ottenere un elevato tasso di proliferazione ed espianti non iperidrici. Per la fase di radicazione il miglior risultato (73%) è stato ottenuto con IBA e le piante ottenute sono state trasferite in serra. I composti fenolici hanno acquisito negli ultimi anni grande rilievo data la loro efficacia come antiossidanti ed antimicrobici, caratteristica interessante per il loro utilizzo in campo farmaceutico ed erboristico. Pertanto, su calli ottenuti da foglie di germogli cresciuti *in vitro*, sono stati applicati trattamenti di elicitazione con luce standard, blu, rossa o buio, in presenza o assenza di 10,32 µM metilgiasmonato (MJ), per promuovere la produzione di fenoli totali, antociani e acido ellagico. Dai risultati ottenuti si è evidenziato un effetto promotore del MJ, da solo, sulla produzione di antocianine e, in combinazione con il trattamento di buio, sul contenuto di antociani e fenoli totali. Le combinazioni MJ - buio e MJ - luce rossa sono state le più efficaci nell’incrementare la sintesi di acido ellagico.

Parole chiave: colture di callo, elicitori, metaboliti secondari, micropropagazione, spettrofotometria

Bibliografia

- BLANDO F, GERARDI C, NICOLETTI I. *Sour Cherry* (*Prunus cerasus L*) *Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods* J Biomed Biotech. 5: 253-258.
- BOUNOUS G., BECCARO G.L., BAUDINO M., CARLINI A., DE SALVADOR F.R., ECCHER T., GIORDANO R., MEZZETTI B., PITITTO A., UGHINI V. 2006. *Mirtillo gigante*. L'informatore agrario 23:60-61.
- BRAY H. G., THORPE W. V. 1954. *Estimation of Phenols: Methods of Biochemical Analysis* (Ed. by D. Glick), pp. 27-55.
- DAMIANO C, ARIAS PADRÓ M. D., FRATTARELLI A. 2008. *Propagation and establishment in vitro of myrtle* (*Myrtus communis L.*), *pomegranate* (*Punica granatum L.*) and *mulberry* (*Morus alba L.*). Prop. Ornam. Plants 8(1): 3-8.
- DEBNATH S.C. 2006. *Propagation of Vaccinium in vitro: a review*. Intern. J. Fruit Sci 6: 47-71.
- DONG Y. H., KOOTSTRA A., LISTER C., LANCASTER J., MITRA D. 1995. *Postharvest stimulation of skin colour in Royal Gala apple*. J. Am. Society Hort. Sci. 120: 95-100.
- ECCHER T, NOE` N. 1989. *Comparison between 2ip and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry* (*Vaccinium corymbosum*). Acta Hort. 241: 185-190.
- GAJDOŠOVÁ A., OSTROLUCKÁ M.G., LIBIAKOVÁ G., ONDRUŠKOVÁ E. AND ŠIMALA D. (2006) *Microclonal propagation of Vaccinium sp. and Rubus sp. and detection of genetic variability in culture in vitro*. J. Fruit Ornam. Plant Res. 14: 103-118.
- GRESSHOFF P. M., DOY C. H., 1972. *Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum (tomato)*. Planta 107: 161-170
- LILA M.A. 2004. *Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach*. J. Biomed Biotech 5: 306-313.
- MAZZA G., FUKUMOTO L., DELAQUIS P., GIRARD B., EWERT B. 1999. *Anthocyanins, phenolics, and colour of Cabernet franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia*. J. Agr. Food Chem. 47: 4009-4017.
- MATKOWSKI A. 2008. *Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review*. Biotech. Adv. 26 (6): 548–560.
- MEINERS J, SCHWAB M, SZANKOWSKI I. 2007. *Efficient in vitro regeneration system for Vaccinium species*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 89:169–176.
- NISHIYAMA Y. AND YAMAKAWA T. 2004. *Effect of medium composition on the production of anthocyanins by hairy root cultures of Ipomoea batatas*. Plant Biotech. 21(5): 411–414.
- NOÈ N., ECCHER T. 1994. *Influence of irradiance on in vitro growth and proliferation of Vaccinium corymbosum (Highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo*. Physiol. Plant. 91 (2): 273–275.
- OSTROLUCKÁ, M. G., GAJDOŠOVÁ A., LIBIAKOVÁ G. 2002. *Influence of zeatin on microclonal propagation of Vaccinium corymbosum L*. Prop. Ornam. Plants 2 (2): 14-18.
- ÖZER Ö., MUTLU B., KIVCAK B. 2007. *Antityrosinase Activity of Some Plant Extracts and Formulations Containing Ellagic Acid*. Pharm. Biol. 45(6): 519-524
- POULEV A., O'NEAL J.M., LOGENDRA S., POULEVA R.B., TIMEVA V., GARVEY A.S., GLEBA D., JENKINS I.S., HALPERN B.T., KNEER R., CRAGG G.M., RASKIN I. 2003. *Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery*. J. Med. Chem. 46: 2542-2547
- REED B. M., ABDELNOUR-ESQUIVEL A. 1991. *The use of zeatin to initiate in vitro cultures of Vaccinium species and cultivars*. Hort Sci. 26: 1320-1322.
- RUFFONI B., PISTELLI L., BERTOLI A., PISTELLI L. 2009. *Plant Cell Cultures: Bioreactors for industrial Production*. in *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Ed. M. T. Giardi, G. Rea e B. Berra. Landes Bioscience and Springer Science Business Media. Book 2943/chapter 4450:203-221
- SUDHA G. AND RAVISHANKAR G.A. 2003. *Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of Daucus carota and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid*. Acta Physiol. Plant. 25, 249-256.
- TASSONI A., FORNALÈ S., FRANCESCHETTI M., MUSIANI F., MICHAEL A. J., PERRY B., BAGNI N., 2005. *Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in Vitis vinifera cv Barbera cell cultures*. New Phytol. 166, 895–905
- TETSUMURA T, MATSUMOTO Y, SATO M, ET AL. 2008. *Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars*. Sci. Hort. 2008; 119: 72-4.
- TREUTTER D. 2010. *Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding visions and constraints*. Int. Journal of Molecular Sciences, 11(3): 807–857.
- VERPOORTE R., CONTIN A., MEMELINK J. 2002. *Biotechnology for the production of plant secondary metabolites* Phytochem. Rev. 1(1): 13-25.
- ZHANG W., CURTIN C., KIKUCHI M., FRANCO C. 2002. *Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in Vitis vinifera suspension cultures*. Plant Sci. 162: 459-468.
- ZHAO X., ZHANG L., ZHOU X. 2011. *In vitro high-frequency regeneration of half-highbush 'Northland' blueberry*. New Z. J. Crop Hort. Sci. Vol. 39 (1): 51-59.

Propagazione, conservazione e caratterizzazione terpenica *in vitro* di germoplasma di Timo (*Thymus* spp.)

Elif Aylin Ozudogru^{1,2}, Ergun Kaya², Marco Michelozzi³, Gabriele Cencetti³ e Maurizio Lambardi¹

¹ CNR IVALSÀ, Istituto per la valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Sesto Fiorentino (FI)

² GYTE Gebze Institute of Technology, Gebze, Kocaeli (Turchia)

³ CNR IGV Istituto di Genetica Vegetale, Sesto Fiorentino (FI)

Il timo (*Thymus* spp.) è una fonte naturale di oli essenziali, di estratti freschi e secchi ed è usato nel mondo per scopi medici e nell'industria cosmetica ed alimentare. Peraltro, le popolazioni naturali di timo non sono sufficienti a soddisfare un tale sfruttamento intensivo e la relativa domanda di prodotti derivati. Il presente studio si è pertanto posto l'obiettivo di sviluppare efficienti protocolli di propagazione e conservazione *in vitro* (in crescita rallentata e mediante crioconservazione) di germoplasma di timo (*T. vulgaris*, *T. longicaulis* e *T. cariensis*), a partire da espunti giovani (semenzali) e maturi (apici di germogli prelevati da piante mature). Il *T. cariensis*, in particolare, è una specie endemica è minacciata della Turchia che grandemente si avvarrebbe di tecniche innovative di propagazione e conservazione. Attraverso una serie di prove sperimentali che hanno saggiato numerose combinazioni di citochinine, auxine e acido gibberellico, è stata ottimizzata una procedura di micropropagazione basata sull'impiego di substrato semi-solido MS addizionato, in fase di proliferazione, di 1 mg l⁻¹ di kinetina e 0.3 mg l⁻¹ di GA₃, ottenendo con tutte le specie percentuali di rigenerazione superiori al 95% e fino a 9 germogli per espunto (*T. vulgaris*). Le condizioni di coltura erano di 23°C e fotoperiodo 16h (con 75 μmol m⁻² sec⁻¹ di intensità luminosa). E' stata poi facilmente ottenuta sia la radicazione dei germogli (su substrato privo di regolatori di crescita o contenente auxina), sia la successiva acclimatazione delle plantule in contenitori da 250 cc e sotto controllo dell'umidità relativa. Le colture di germogli in proliferazione sono

poi state sottoposte a conservazione in crescita rallentata (a 4°C e oscurità), mantenendone fino a 12 mesi la capacità di ricrescita al ritorno a condizioni standard di coltura. Per la crioconservazione del *T. vulgaris* sono state confrontate tre tecniche basate sulla vitrificazione e l'immersione diretta di apici meristemati in azoto liquido (vitrificazione con PVS2, incapsulazione-vitrificazione e congelamento in goccia). I migliori risultati (80% e 18% di ricrescita in *T. vulgaris* e *T. cariensis*, rispettivamente) sono stati ottenuti con la tecnica del congelamento in goccia, attraverso una procedura che prevedeva l'acclimatazione per 2 settimane delle colture di germogli a 4°C, 48 h di precoltura degli apici meristemati su substrato MS contenente 0.25M di saccarosio, trattamento di 90 min con PVS2 in goccia, immersione diretta in azoto liquido delle strisce d'alluminio contenenti le gocce con espunti, crioconservazione per almeno 1 h, scongelamento e piastratura degli espunti in substrato di ricrescita. In considerazione del grande valore di alcuni oli essenziali di timo (tra i quali timolo e carvacrolo sono considerati in assoluto tra i "top 10" oli essenziali per importanza), è stata inoltre avviata un'indagine tesa alla caratterizzazione della composizione terpenica volatile *in vitro* di colture di germogli di differenti cloni di *T. vulgaris*. E' attualmente in corso la determinazione della composizione monoterpica mediante gas-cromatografia per spazio di testa, evidenziando già variabilità di emissione tra i diversi cloni per quanto concerne i maggiori costituenti [(-)-β-pinene, (+)-β-pinene, camphene, myrcene, p-cymene e g-terpinene].

Coltivazione *in vitro* di *Rosmarinus officinalis* per la produzione di acido carnosico

Sara Barberini^{1 3}, Michele Leonardi², Luisa Pistelli², Laura Pistelli³ e Barbara Ruffoni¹

¹ CRA-FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (IM)

² Dipartimento di Scienze farmaceutiche, Università di Pisa

³ Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

Il progetto “AROMA” (INTERREG ALCOTRA n°68 – Le piante aromatiche tra ambiente ed attività produttive) ha fra i suoi obiettivi l'utilizzo di piante aromatiche e medicinali per valorizzare la biodiversità della riviera franco-italiana e sfruttare le potenzialità ornamentali, medicinali e nutrizionali delle stesse per l'ottenimento di nuovi prodotti.

Il rosmarino (*R. officinalis*) è un arbusto della flora mediterranea utilizzato fin dall'antichità per le sue proprietà organolettiche e nella medicina popolare. Fra le sue numerose varietà coltivate c/o il CRA-FSO di Sanremo, quattro genotipi scelti per l'elevato impatto ornamentale sono stati messi *in vitro* per la produzione di biomassa e per la valutazione del contenuto in acido carnosico.

L'acido carnosico è una molecola con documentata attività antibatterica su patogeni umani e vegetali;

la sua biosintesi chimica risulta essere costosa e risulta quindi interessante identificare una fonte rinnovabile di produzione.

Espianti fogliari di quattro varietà (*R. officinalis* “M.G. Bianco”, “Bianco”, “M.G.” e “Israeli”) sono stati sterilizzati con ipoclorito di sodio e posti in tre diversi terreni di coltura: le percentuali di inquinamento e di mortalità si sono rivelate molto elevate. Tuttavia la varietà “Bianco” ha mostrato una buona produzione di tessuto indifferenziato (callo) e una buona capacità organogenetica (radici) su mezzo MS contenente 1 mg/l di NAA. Analisi fitochimiche hanno confermato la presenza in elevate quantità (3,3 mg/g peso secco) di acido carnosico nei calli durante il loro ciclo colturale; in particolare la massima produzione è stata misurata dopo 30 giorni di coltura su mezzo di induzione, ovvero alla fine della subcultura.