

**La cellula vegetale come  
biofabbrica di composti bioattivi di  
interesse farmacologico,  
agroalimentare e cosmetico**

# Laboratorio di biotecnologie cellulari vegetali



ICMS

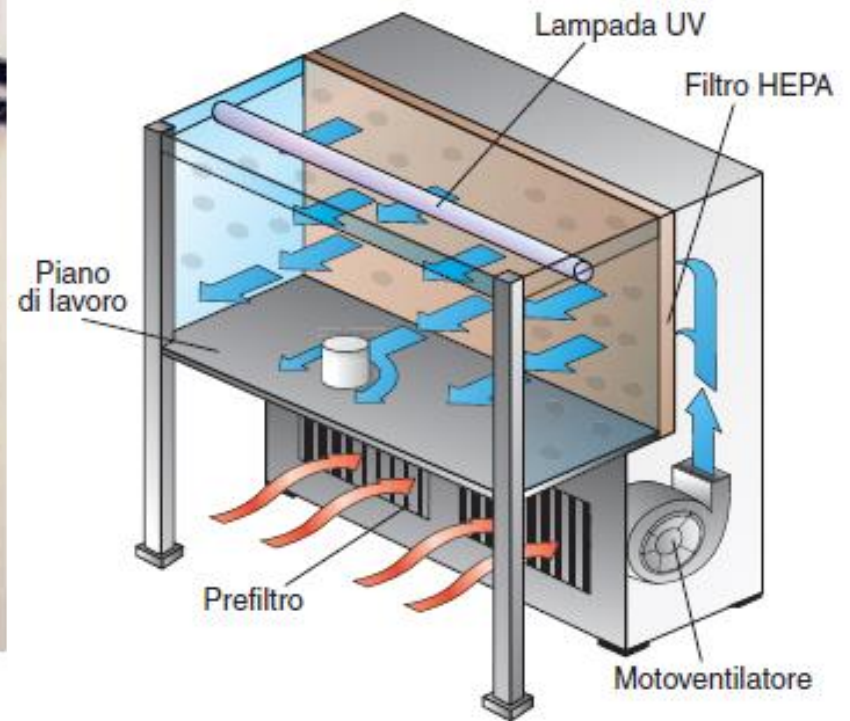
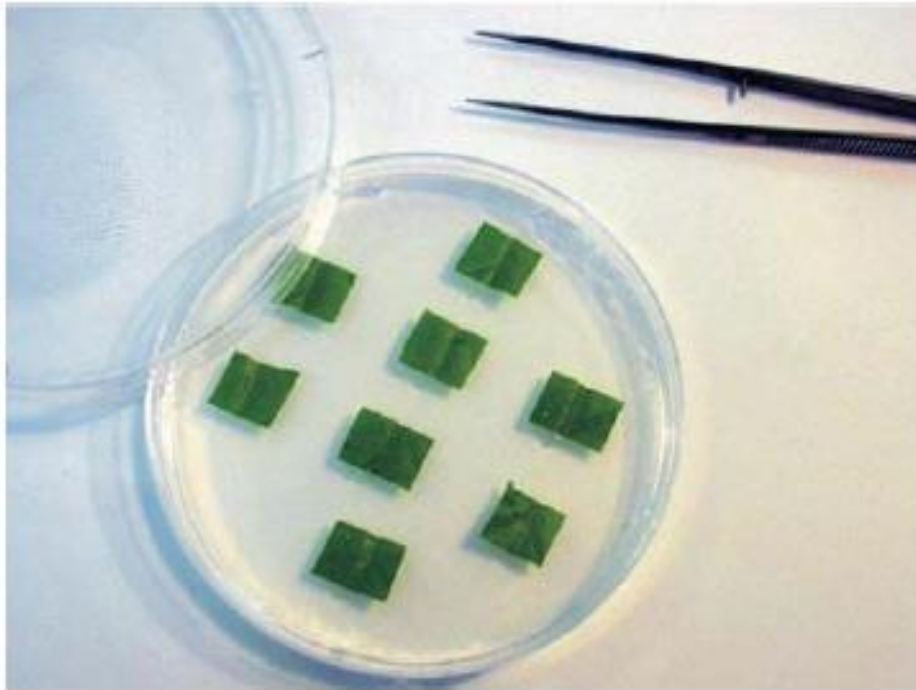
## Si inizia dalla scelta della pianta da cui prelevare gli espianti

- E' opportuno scegliere piante in ottime condizioni che non presentino danni da patogeni.
- E' meglio prelevare gli espianti da organi giovani.
- Tutte le tappe della coltura richiedono asepsi, cioè completa eliminazione di microrganismi dalla superficie degli espianti.

**Alcuni degli agenti antisettici più frequentemente impiegati per la sterilizzazione del materiale vegetale**

Agente	Concentrazione (%)	Tempo di disinfezione (min)
Ipoclorito di sodio (NaClO)	5-15	5-30
Perossido di idrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3-12	5-15
Etanolo (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	70-95	0,5-2
Nitrato di argento (AgNO <sub>3</sub> )	1	5-30
Cloruro di mercurio (HgCl <sub>2</sub> )	0,1-1	2-10

**Si deve lavorare in condizioni di massima sterilità, quindi sotto cappa a flusso laminare orizzontale ed usando strumenti sterili**



Components	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1968)	Nitsch (1951)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	134	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	720	500	250
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	200	-	-
KCl	-	65	-	1,500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-	150	25
$\text{KNO}_3$	1,900	80	3,000	2,000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	300	-	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16.5	150	250
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	-	27.8	-
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3	-	37.3	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	7	10 (1 $\text{H}_2\text{O}$ )	3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	3	2	0.5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.025	0.025
$\text{H}_2\text{SO}_4$	-	-	-	0.5
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	2.5	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.025	-
$\text{FeC}_6\text{O}_5\text{H}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	10
KI	0.83	0.75	0.75	0.5
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	1.5	3	0.5
$\text{Na}_2\text{M}_0\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	-	0.25	0.25

Components	Murashige-Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg (1968)	Nitsch (1951)
Sucrose	30,000	20,000	20,000	50,000
Glucose	-	-	-	or 36,000
Myo-Inositol	100	-	100	-
Nicotinic Acid	0.5	0.5	1.0	-
Pyridoxine HCl	0.5	0.1	1.0	-
Thiamine HCl	0.1-1	0.1	10	1
Ca-Pantothenate	-	1	-	-
Biotin	-	-	-	-
Glycine	2	3	-	-
Cysteine HCl	-	1	-	10

# PERCHE' AL MEZZO COLTURALE SI AGGIUNGONO I FITORMONI?

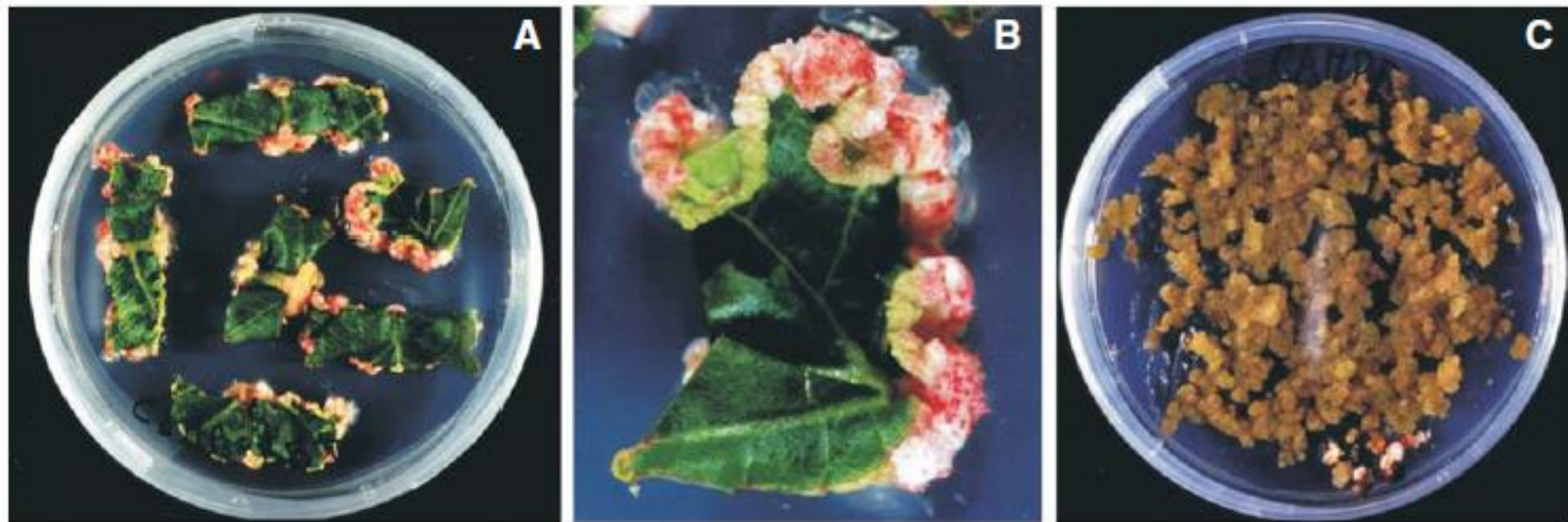
## *Auxine*

Il principale effetto delle auxine è la promozione della divisione e della distensione cellulare, la loro presenza è dunque richiesta per la callogenesi

La principale auxina naturale è l'acido indol-3-acetico (IAA), tuttavia questo composto è termo- e foto-labile, pertanto è più comune l'uso auxine sintetiche maggiormente stabili, come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D). Frequente è anche l'uso di acido indol-3-butirrico (IBA), un'auxina considerata fino a qualche anno fa come un composto di origine esclusivamente sintetica. Recentemente è stato dimostrato che può essere sintetizzato nella pianta. Il 2,4-D è molto efficace nell'induzione della formazione di callo

## Citochinine

Le citochinine naturali impiegate nelle colture *in vitro* includono zeatina e 2-isopenteniladenina (2iP); il loro uso non è, tuttavia, molto diffuso, in quanto sono composti costosi e poco stabili. Più frequente è l'impiego di citochinine sintetiche, come la 6-benzilaminopurina (BAP), anche chiamata benziladenina (BA), e la chinetina, anche detta cinetina. Le citochinine sono impiegate per stimolare la divisione cellulare, per indurre la formazione di apici caulinari (caulogenesi, par. 18.4.2), per stimolare lo sviluppo delle gemme laterali e per inibire la rizogenesi.



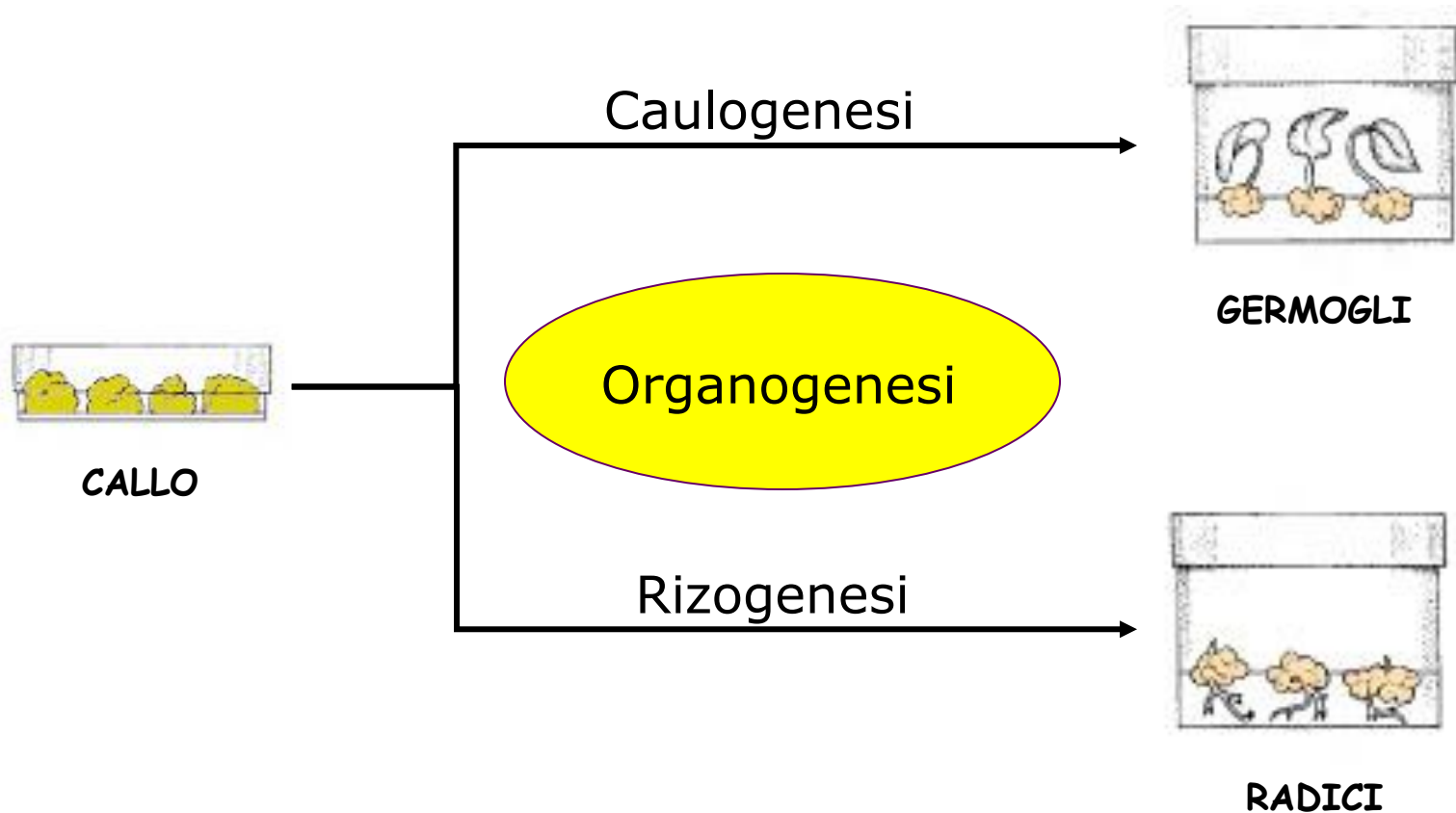
**Figura 18.4**

**Espianti fogliari dopo 20 giorni di coltura in un mezzo callogenico (A) e particolare (B).** In corrispondenza delle superfici di taglio è possibile distinguere la presenza di callo; il colore rosso è dovuto alla presenza di pigmenti antocianici nei vacuoli di alcune cellule. **Callo coltivato ad oscurità continua, dopo 5 subcolture (C)** (foto di A. Valletta).



# Organogenesi

Variando la concentrazione di ormoni, quali auxine e citochinine, si ottengono processi di organogenesi diversi



# Attività di ricerca



- Scoperta di prodotti naturali bioattivi nelle piante e loro caratterizzazione chimica

- Studio degli effetti dell'ambiente sulla biosintesi di metaboliti secondari

- Sviluppo di protocolli per colture cellulari propagazione clonale di piante e coltura di radici

- Ottimizzazione di processi per la produzione di composti bioattivi in sistemi in vitro.

# Problematiche che influenzano la raccolta in campo e la standardizzazione degli estratti



- Limitata distribuzione geografica di alcune specie
- Non coltivabilità di alcune specie fuori del loro habitat
- Difficoltà di standardizzare le pratiche colturali
- Alta variabilità della concentrazione dei composti negli estratti
- Sintesi dei prodotti limitata ad un particolare stadio di sviluppo della pianta o tessuto o organo specifici
- Contaminazione degli estratti vegetali con inquinanti come erbicidi o metalli pesanti e tossine.

## Inoltre...

lo sfruttamento intensivo delle risorse naturali potrebbe rappresentare una minaccia per la conservazione delle specie a rischio di estinzione

**Il Protocollo di Nagoya (ABS) sull'Accesso alle Risorse Genetiche e l'equa condivisione dei benefici derivanti dal loro utilizzo è uno strumento internazionale adottato dalla Conferenza delle Parti della CBD (Convenzione sulla Biodiversità Biologica) nel corso della sua X Riunione, il 29 ottobre 2010 a Nagoya, in Giappone ed è stato aperto alla firma il 2 febbraio 2011.**

**L'obiettivo del Protocollo consiste nella giusta ed equa condivisione dei benefici che derivano dall'utilizzazione delle risorse genetiche, ivi incluso l'appropriato accesso alle risorse genetiche e l'appropriato trasferimento delle relative tecnologie, tenendo in considerazione tutti i diritti riguardanti quelle risorse e quelle tecnologie e i fondi opportuni, contribuendo in tal modo alla conservazione della diversità biologica e all'uso sostenibile dei suoi componenti.**

# Perché le cellule staminali vegetali sono così interessanti per la cosmesi?

**Le biotecnologie cellulari vegetali rappresentano uno strumento valido per lo sviluppo di nuovi prodotti cosmetici di origine vegetale**



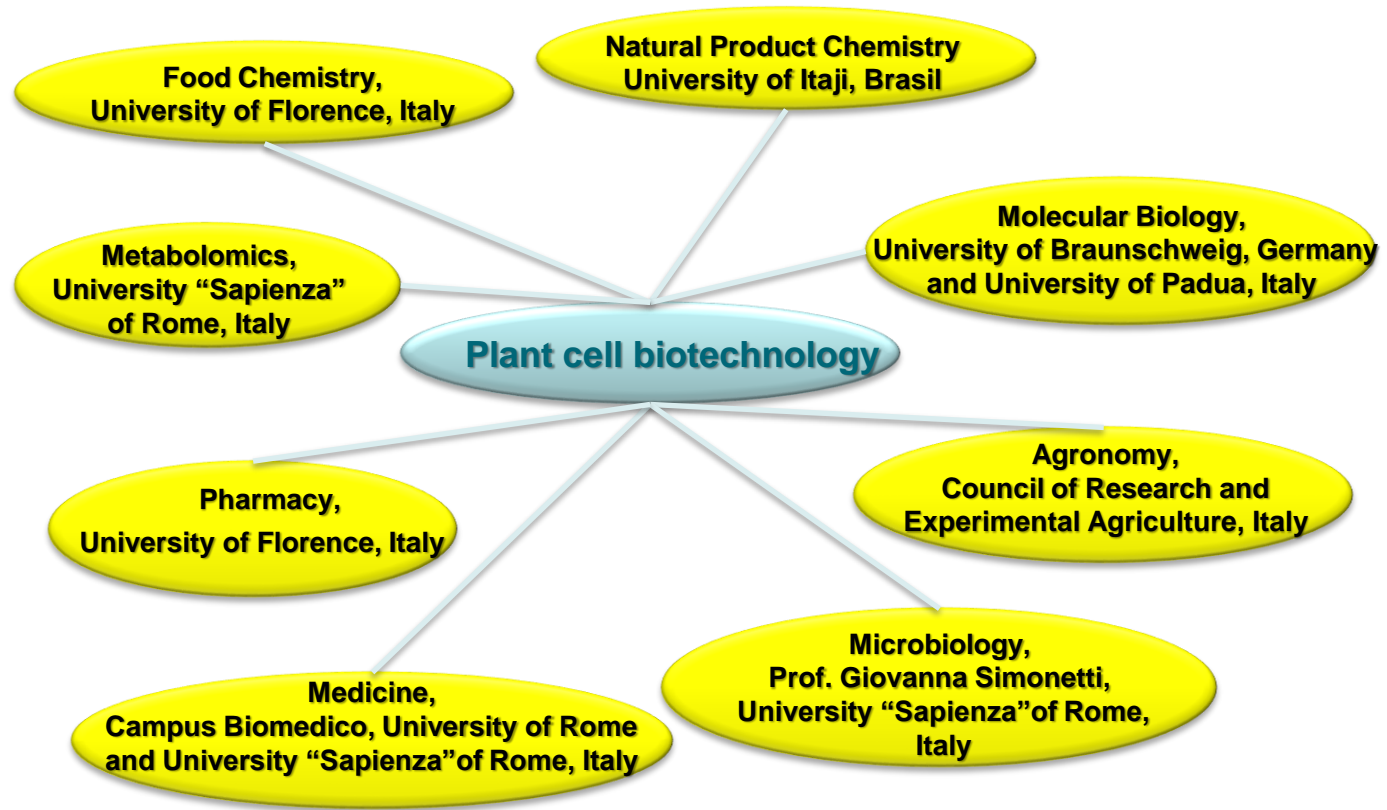
**La produzione di estratti bioattivi ed ingredienti da colture di cellule vegetali è:**

- Costante nel tempo e indipendente da variazioni stagionali
- La composizione degli estratti è standardizzabile
- Gli estratti da colture cellulari sono liberi da contaminanti che possono essere presenti in material vegetale da piante cresciute in campo (tossine, pesticidi, metalli pesanti)
- E' migliorabile la concentrazione dei metaboliti desiderati attraverso trattamenti con elicitori fisici e chimici

**Inoltre...**

**Attraverso processi di biotrasformazione cellule vegetali producono nuove molecole a partire da precursori a basso costo**

## Network di collaborazioni



# Colture cellulari

Principali parametri chimico-fisici dell'ambiente culturale:

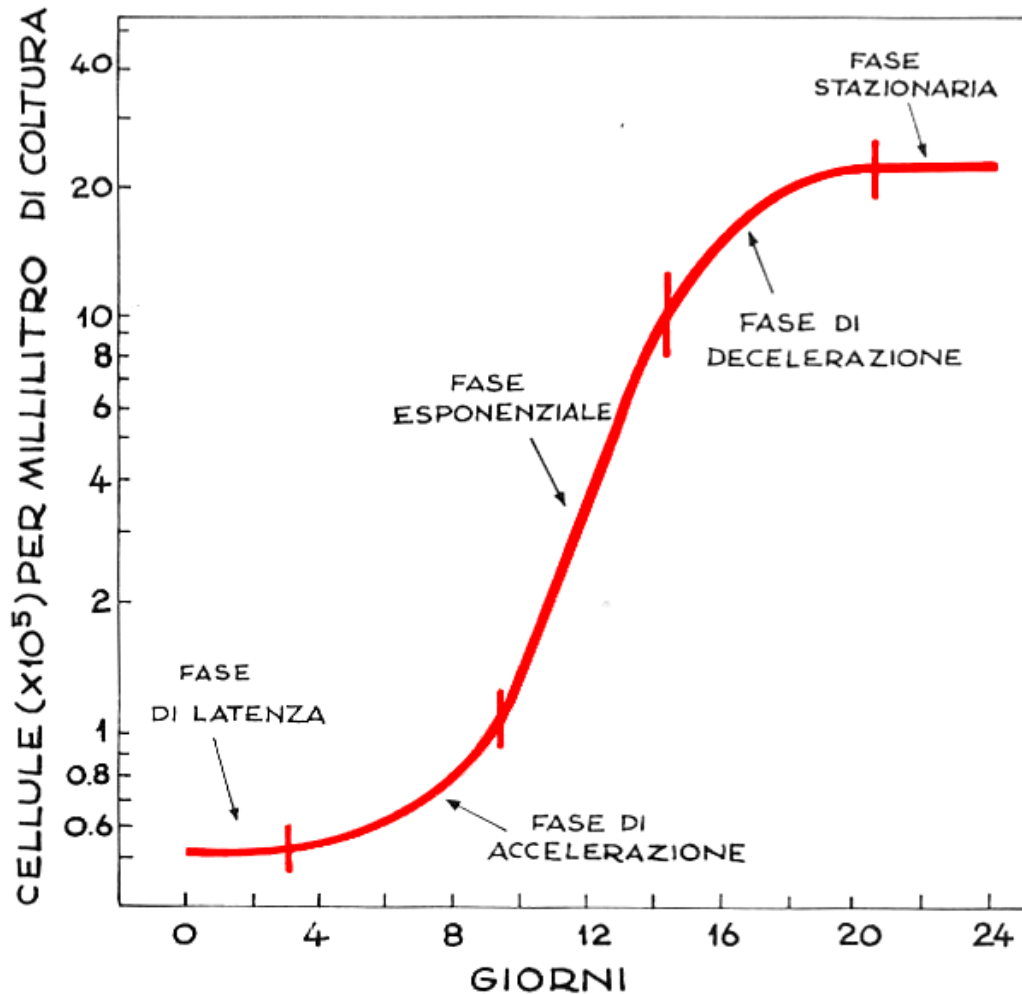


**Cellule vegetali allevate  
in mezzo liquido**

- **Luce** (composizione spettrale, intensità e fotoperiodo)
- **Temperatura**
- **Composizione chimica del mezzo** (nutrienti minerali, carboidrati, vitamine, regolatori di crescita)
- **Densità della popolazione cellulare** (numero di cellule per unità di volume)



# Colture cellulari



Per valutare la crescita della popolazione cellulare nel tempo (incremento di **biomassa**) si costruisce una curva di crescita

# Colture cellulari

In natura le condizioni ambientali variano nello spazio e nel tempo interagendo tra loro in modo complesso e difficilmente interpretabile

- **SI RICORRE ALLE BIOTECNOLOGIE QUANDO LA PIANTA È:**  
**Rara** (difficile da reperire e/o protetta)

- **Di difficile coltivazione**

- **A crescita lenta** (piante legnose)

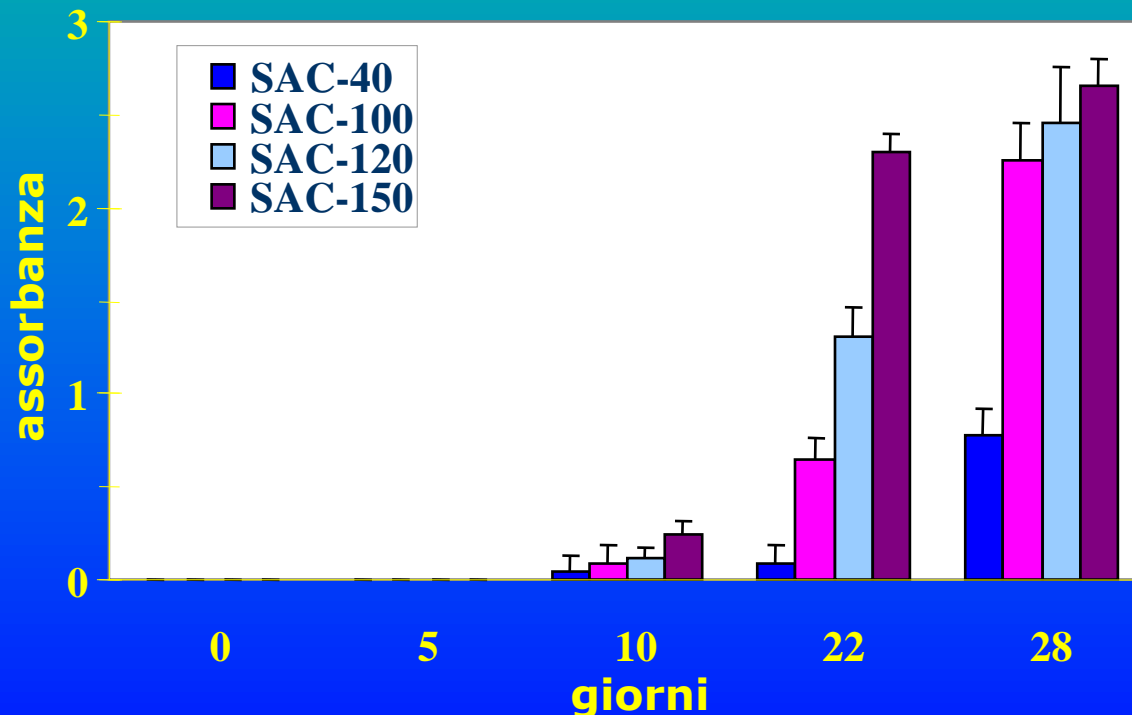
*INOLTRE: In vitro* è possibile variare uno specifico fattore ambientale (mantenendo inalterati gli altri) per studiare la sua influenza su particolari aspetti della biologia cellulare

Si può, ad esempio, indagare il ruolo di un componente chimico del mezzo colturale su una specifica via biosintetica

# Colture cellulari

## Ricerca di base

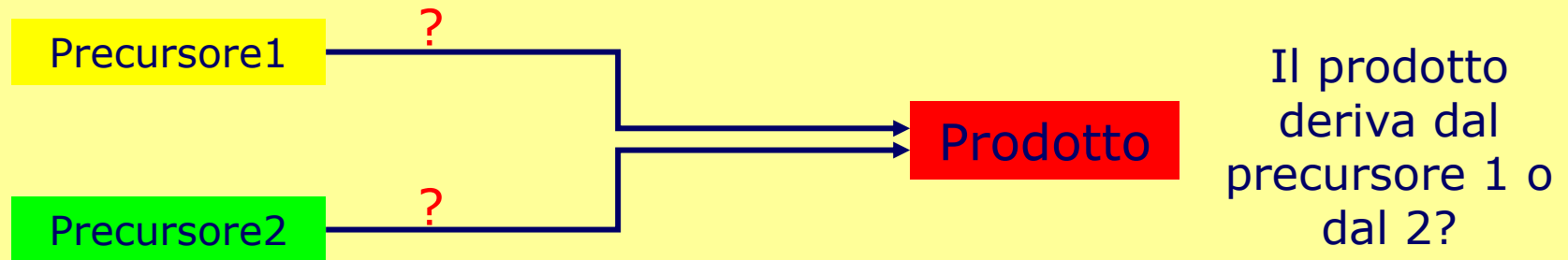
Influenza della concentrazione di saccarosio sulla biosintesi di antociani



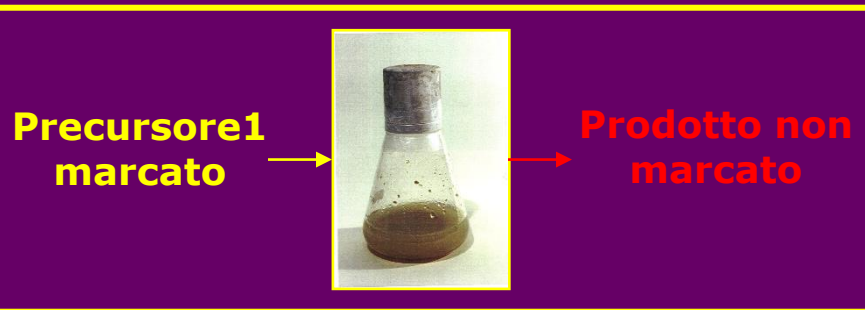
La produzione di antociani aumenta all'aumentare della concentrazione di saccarosio nel mezzo colturale

# Colture cellulari

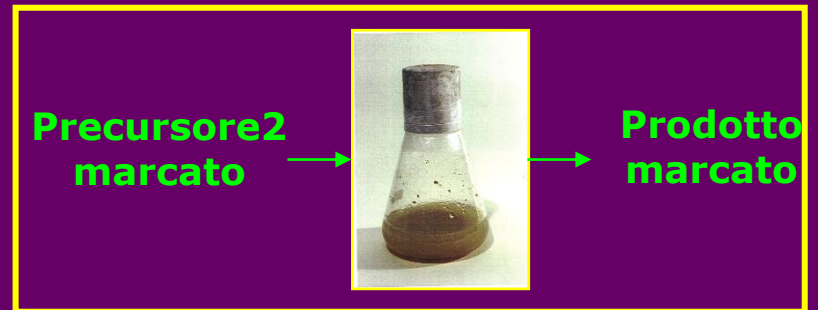
Le colture cellulari possono essere impiegate per lo studio di specifiche vie biosintetiche



## Esperimento 1



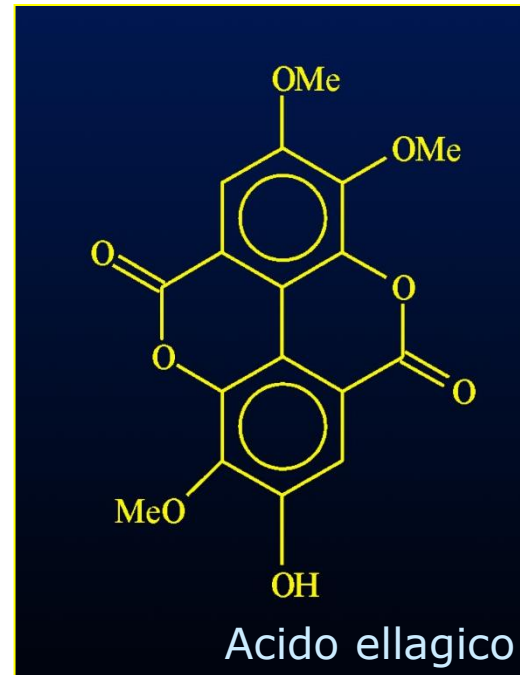
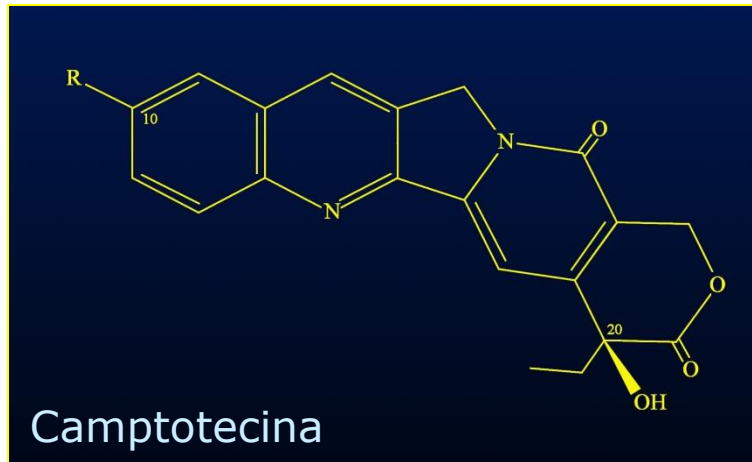
## Esperimento 2



Il prodotto deriva dal precursore2

# Colture cellulari

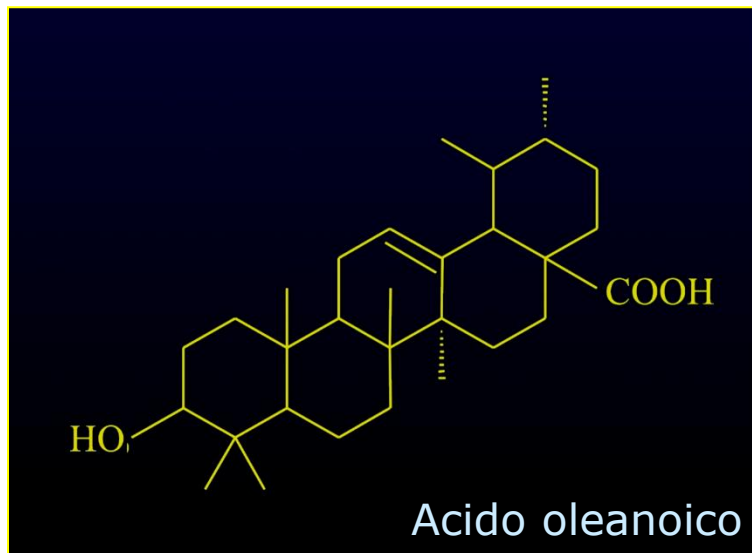
interesse applicativo: metaboliti secondari



I metaboliti secondari appartengono a tre classi di composti chimici:

- **alcaloidi**
- **fenoli**
- **terpeni**

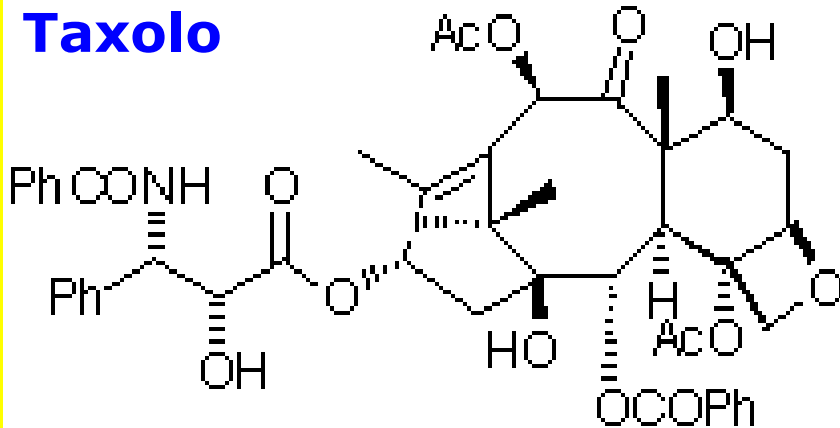
I metaboliti secondari giocano spesso un ruolo nella **difesa chimica della pianta**



# Colture cellulari

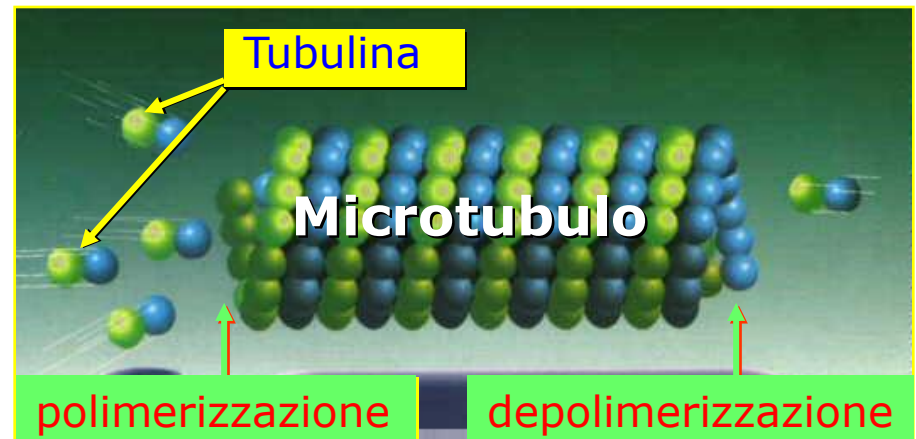
interesse applicativo: taxolo

## Taxolo



Il **Taxolo**, estratto dalla corteccia di *Taxus brevifolia* e *T. baccata*, è un principio attivo impiegato nella terapia antitumorale

Il taxolo, inibendo la depolimerizzazione della tubulina, provoca il **blocco della mitosi** e impedisce così la proliferazione delle cellule tumorali



# Colture cellulari

interesse applicativo: taxolo

Il taxolo è accumulato soprattutto nella **corteccia** e l'estrazione diretta comporta la distruzione della pianta



***Taxus brevifolia***

Il tasso è una **specie protetta** (a rischio di estinzione) e **a crescita lenta** (gimnosperma legnosa)

È una molecola relativamente complessa, quindi la **sintesi chimica** risulterebbe troppo dispendiosa

Negli ultimi anni sono state messe a punto metodologie per la **produzione di taxolo per via biotecnologica** (da colture cellulari di *Taxus*)

# Colture cellulari

strategie per il miglioramento della produzione

**Biotrasformazioni**

**Elicitazione**

**Bioingegneria**

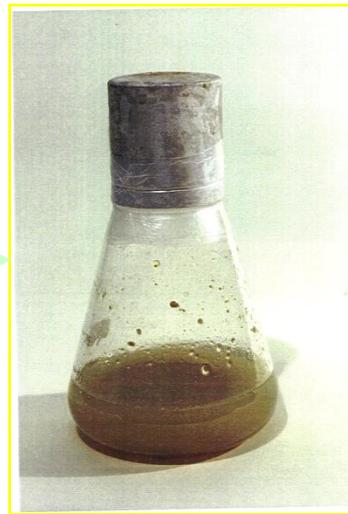


# Colture cellulari

## biotrasformazioni

Uno dei principali fattori limitanti per la biosintesi di taluni metaboliti è rappresentato dalla disponibilità di precursori

Aggiunta di precursori a basso costo



Produzione di composti ad alto valore

# Colture cellulari

## elicitazione

Le piante sono in grado di produrre, in seguito a stress, metaboliti secondari coinvolti nella difesa chimica

Risposta



Diversi composti (elicitori) mimano stress biotico o abiotico inducendo una risposta difensiva

Alcuni elicitori biotici largamente impiegati sono acido giasmonico, chitosano, acido acetil salicilico ed estratti di lievito

Elicitori abiotici: molecole chimiche, UV, ultrasuoni, ecc

*Table 1. Classification of elicitor for the production of secondary metabolites*

A) Nature of Elicitor	
Biotic elicitors	Abiotic elicitors
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Directly released by microorganisms and recognized by the plant cell (enzymes, cell wall fragments)</li> <li>- Formed by action of microorganisms on plant cell wall (fragments of pectins etc.)</li> <li>- Formed by the action of plant enzymes on microbial cell walls (chitosan, glucans)</li> <li>- Compounds, endogenous and constitutive in nature, formed or released by the plant cell in response to various stimuli.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Of physical or chemical nature working via endogenously formed biotic elicitors</li> <li>- UV light</li> <li>- Windfall</li> <li>- Denatured proteins (RNase)</li> <li>- Freezing and thawing cycles</li> <li>- Non essential components of media (agarose, tin, etc.)</li> <li>- Heavy metals</li> <li>- Chemicals               <ul style="list-style-type: none"> <li>- With high affinity to DNA</li> <li>- With membrane-destroying activities like detergents: xenobiochemicals</li> <li>- Fungicides (Maneb, Butylamine, Benomyl)</li> <li>- Herbicides (Acifluorfen)</li> </ul> </li> </ul>
B) Origin of Elicitor	
Exogenous elicitors	Endogenous elicitors
<ul style="list-style-type: none"> <li>- originated outside the cell, including the reaction immediately or via endogenous mediators</li> <li>- Polysaccharides: Glucmannose, Glucans, Chitosan</li> <li>- Peptides as poly cations: Monilicolin, Poly-L-lysine, Polyamines, Glycoproteins</li> <li>- As enzymes: Polygalacturonase, Endo-polygalacturonic acid lyase, Cellulase</li> <li>- Fatty acids: Arachidonic acid, Eicosapentanoic acid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- formed via secondary reactions induced by a signal of biotic or abiotic nature in the cell - dodeca-<math>\beta</math>-1,4-D-galacturonide</li> <li>- hepta-<math>\beta</math>-glucosides</li> <li>- alginate oligomers</li> </ul>

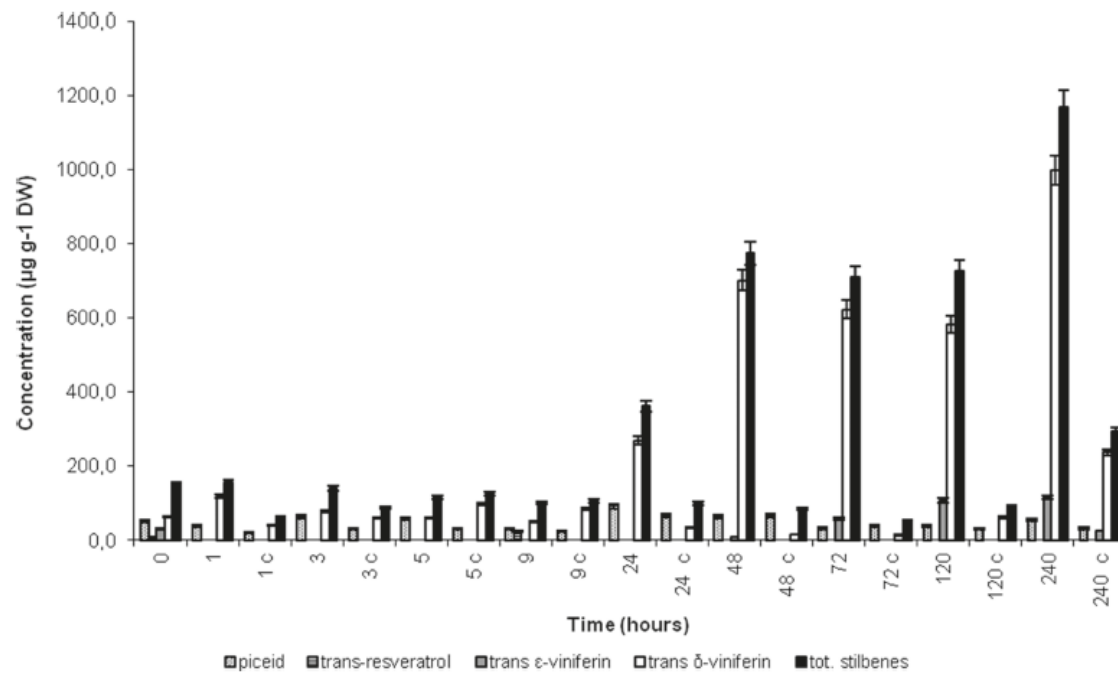
## Effects of Elicitors on the Production of Resveratrol and Viniferins in Cell Cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia

Anna Rita Santamaria,<sup>†</sup> Nadia Mulinacci,<sup>‡</sup> Alessio Valletta,<sup>†</sup> Marzia Innocenti,<sup>‡</sup> and Gabriella Pasqua<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Department of Environmental Biology, “Sapienza” University of Rome, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

<sup>‡</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, Via Ugo Schiff 6, 50019, Sesto Fiorentino, Florence, Italy

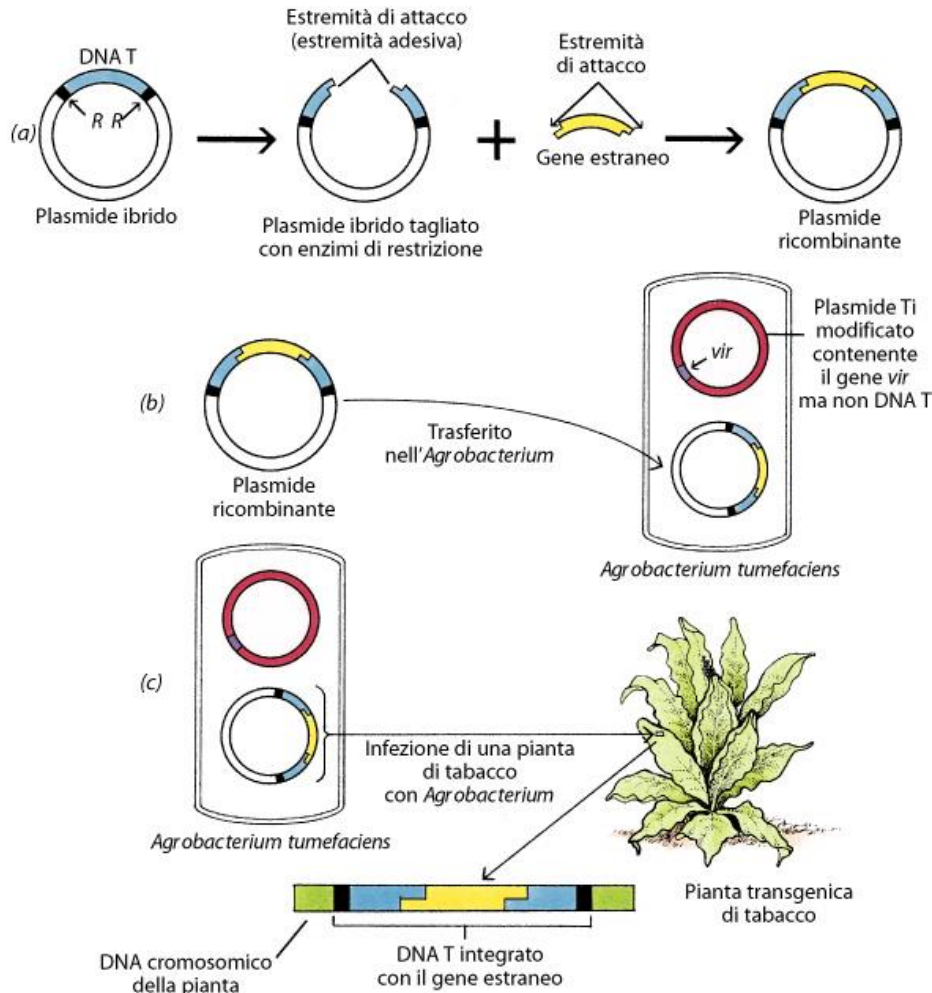
**ABSTRACT:** Methyl jasmonate, jasmonic acid and chitosan were tested as elicitors on cell suspension cultures obtained from *Vitis vinifera* cv Italia to investigate their effect on stilbene production. Stilbene accumulation in the callus, grown under nonelicited conditions, was also investigated. Calli and cell suspensions were obtained in a B5 culture medium supplemented with 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA and 1 mg L<sup>-1</sup> KIN. Stilbene determination was achieved by HPLC/DAD/MS. Whereas callus biosynthesized only piceid, cell suspensions elicited with jasmonates produced several stilbenes, mainly viniferins. In suspended cells, methyl jasmonate and jasmonic acid were the most effective in stimulating stilbene biosynthesis, whereas chitosan was less effective; in fact, the amount of stilbenes obtained with this elicitor was not significantly different from that obtained for the control cells. The maximum production of total stilbenes was at day 20 of culture with 0.970 and 1.023 mg g<sup>-1</sup> DW for MeJA and JA, respectively.



**Figure 5.** Stilbene production over time in cells of cv Italia elicited with MeJA; the total amount refers only to the sum of *trans*-resveratrol, piceid,  $\epsilon$ - and  $\delta$ -viniferins. Data ( $\mu\text{g g}^{-1}$  DW) are expressed as the mean of three independent experiments. The letter “c” indicates the control.

# Colture cellulari

## Bioingegneria in colture cellulari e piante rigenerate *in vitro*



Mediante vettori batterici o virali è possibile introdurre nelle cellule vegetali dei transgeni che possono essere integrati nel genoma vegetale

Se si conoscono le vie biosintetiche e i geni che ne sono coinvolti è possibile incrementare la produzione dei metaboliti di interesse

# Colture cellulari

## interesse applicativo

Non sempre le cellule in coltura, indifferenziate, producono i metaboliti di interesse, talune vie biosintetiche sono:

- **cellula-specifiche**: si esprimono solo in cellule specializzate (idioblasti, laticiferi, ghiandole, ecc.)
- **tessuto-specifiche**: sono espresse in specifici tessuti (epitelio di dotti e cavità secretorie, tegumento, parenchima corticale, ecc.)
- **organo-specifiche**: sono localizzate in uno specifico organo (radice, fusto, foglia, fiore, frutto)

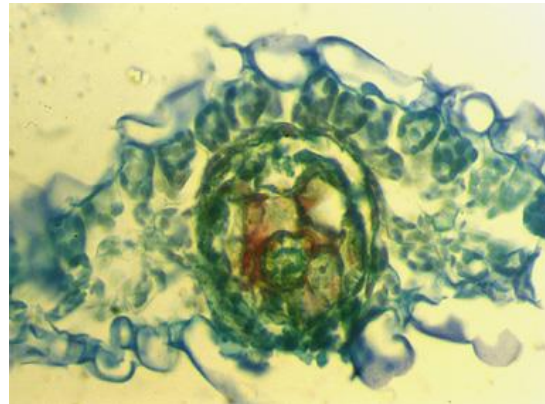
# Colture cellulari

## interesse applicativo

Un esempio di biosintesi cellula-specifica



*Hypericum perforatum*



*Globulo nero*

In *Hypericum perforatum* ipericina e iperforina sono prodotti esclusivamente in cellule di strutture secretorie localizzate nella foglia (**globuli neri**)

Le **cellule indifferenziate** coltivate *in vitro* **non sono** in grado di sintetizzare questi composti



# Colture cellulari

## interesse applicativo

Un esempio di biosintesi organo-specifica



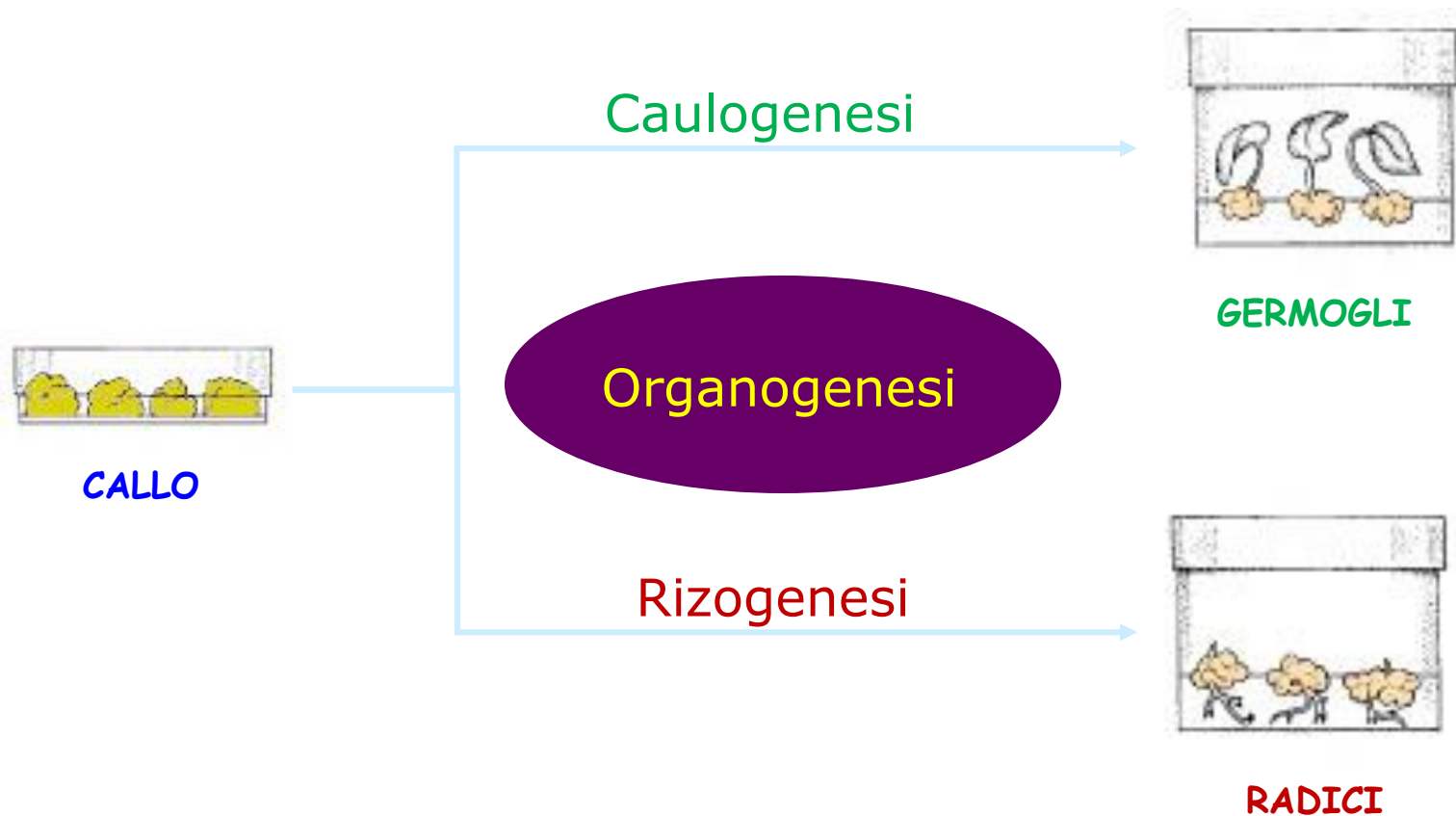
*Atropa belladonna*

In ***Atropa belladonna*** gli alcaloidi **scopolamina** e **atropina** sono prodotti esclusivamente nella **radice**

Anche in questo caso le **cellule indifferenziate non sono** in grado di sintetizzare questi composti

# Organogenesi

I metaboliti non prodotti da cellule indifferenziate possono essere prodotti da organi rigenerati *in vitro*



# Organogenesi

Il rapporto tra concentrazione di auxine e citochinine è il principale fattore che guida il programma morfogenetico

Organogenesi  
in *Nicotiana  
tabacum*

**Callo**



1:1

**Germogli**



1:2

**Radici**



2:1

**Radiaz germogli**

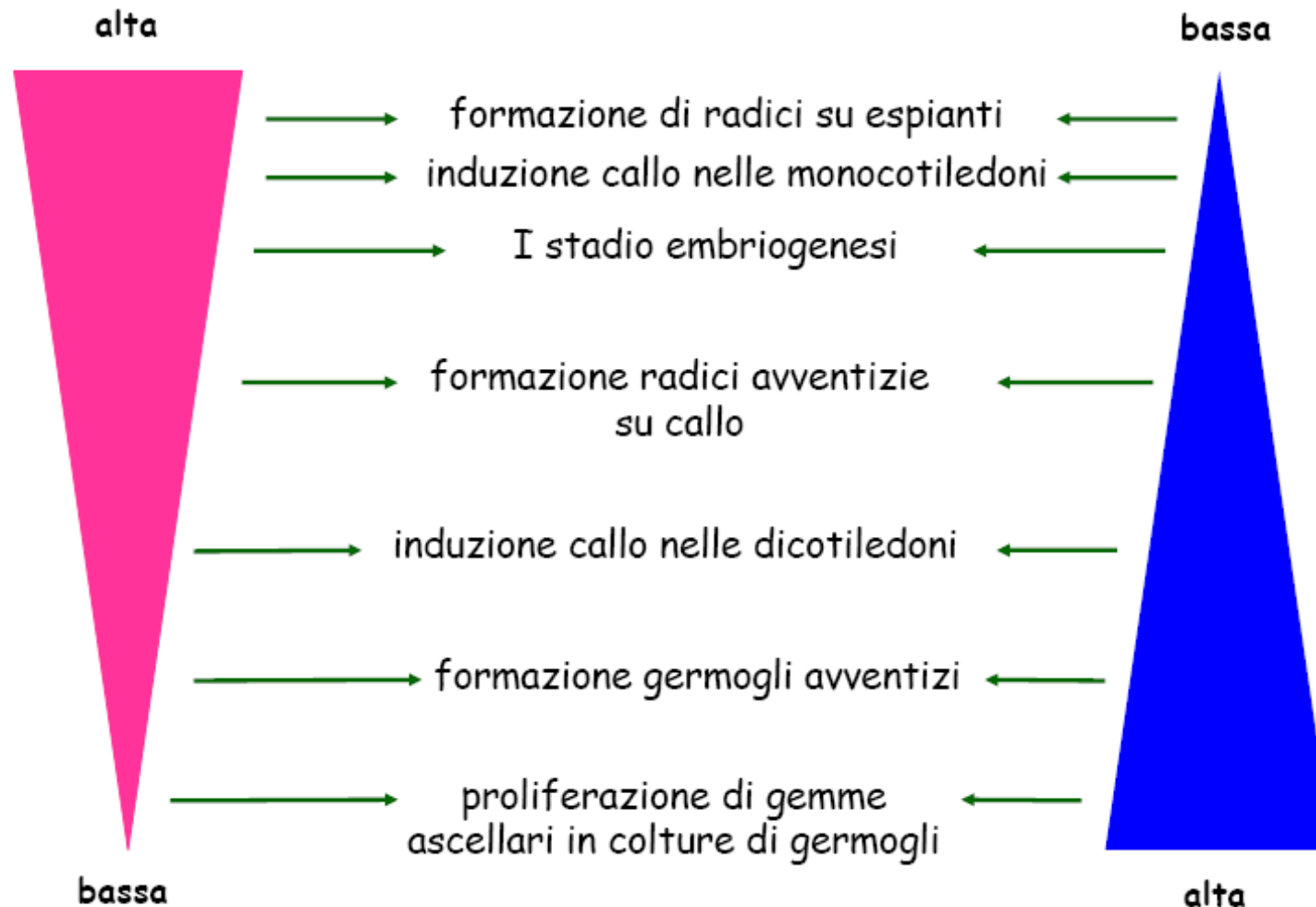


1Aux

**Rapporto: Auxine (mg/l): Citochinine (mg/l)**

# AUXINA

# CITOCHININA



# Caulogenesi sperimentale

**Per caulogenesi si intende la produzione di germogli avventizi da espianti di diverso tipo o da cellule entro masse callose. Queste masse cellulari possono organizzare meristemoidi che si svilupperanno in organi (foglie e gemme ascellari) in particolari condizioni colturali.**

La micropropagazione degli apici caulinari fa parte della caulogenesi sperimentale e rappresenta un sistema di **rigenerazione**

*Coltura di meristemi apicali.*

Zona meristemica dell'apice caulinare, si aggiungono solitamente citochinine a basse concentrazioni.

*Coltura di apici caulinari.*

Simile alla propagazione per talea, si usa una talea caulina in miniatura. La buona riuscita dipende dall'espianto e dagli ormoni adatti. La produzione di germogli ascellari può essere accompagnata dalla proliferazione di gemme avventizie dal callo alla base del propagulo.

# SISTEMI DI RIGENERAZIONE

L'**accrescimento dell'apice meristemato** interviene quando il meristema apicale di un' estremità del germoglio viene fatto radicare (radici avventizie) per la produzione di una plantula. Tale procedura viene impiegata principalmente per ottenere piante esenti da virus, nelle quali solo il meristema apicale (0,5mm) è rimosso assieme a poche foglie sottostanti.

# COLTURA DI MERISTEMI APICALI

## RISANAMENTO DA VIRUS

I virus si possono trasmettere da pianta a pianta, per contatto, per seme, per polline, per propagazione vegetativa, per mezzo di funghi e per vettori animali.

Non essendo le malattie virali curabili con trattamenti in campo, l'unico modo per controllarle rimane la prevenzione.

Il risanamento di piante infette prevede la coltura di meristemi apicali, che si basa sul fatto che le particelle virali sono assai rare, o disturbate nel loro metabolismo nei meristemi apicali. Essa consiste nel prelevare un apice vegetativo ed allevarlo "*in vitro*", in questo modo si otterrà l'intera pianta risanata ovviamente la sua condizione deve essere confermata da saggi virologici.





# Sistemi di caulogenesi sperimentale propriamente detti

## *Sviluppo di germogli avventizi da vari organi*

Sia direttamente dall'espianto che indirettamente dal callo che si forma sulla superficie di taglio. I fattori che favoriscono lo sviluppo sono la scelta dell'espianto e il regime ormonale.

Esempi di espianto: pezzi di foglia; espianti di apici di germogli; cotiledoni, ipocotili; giovani foglie; infiorescenze immature o scapi fiorali; scaglie di bulbi.

## *Sistemi di coltura di tessuti e di cellule.*

La coltura di cellule vegetali sia come cellule isolate (es. protoplasti), che tessuto calloso, che come sospensione liquida è un importante tecnica preliminare alla rigenerazione dell'intera pianta.

# ESPIANTO



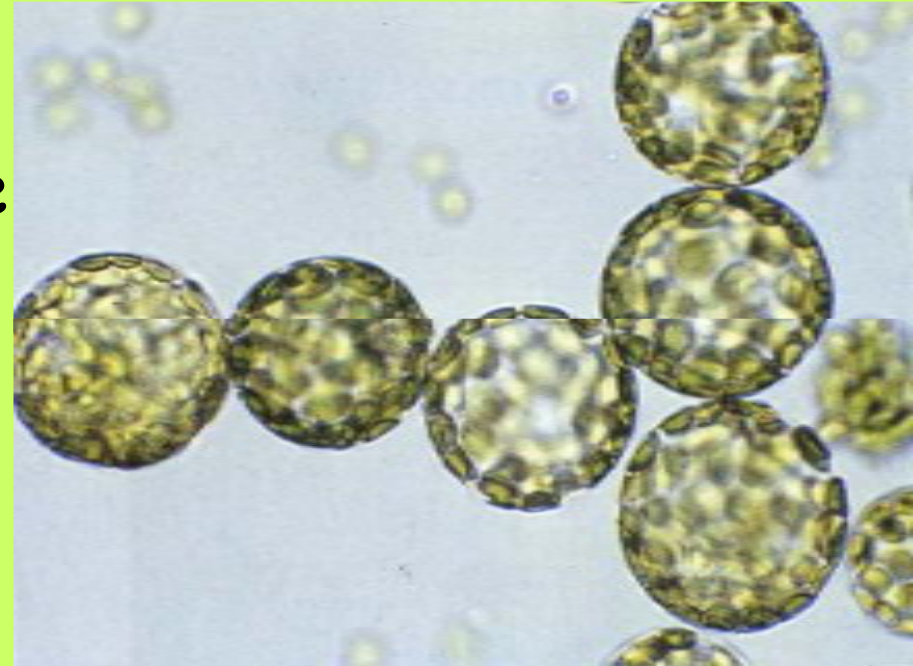
Si pone in coltura un espianto sterile.

Fattori importanti: scelta dell'espianto, eliminazione inquinanti, nutrienti, luce, temperatura e substrato. In generale, tessuti giovani, come apici dei germogli terminali o laterali o avventizi hanno capacità rigenerative migliori. Ottime anche le gemme a fiore immature.

Cellule private della parete

## **PROTOPLASTI**

in coltura possono  
propagarsi indefinitamente



Protoplasti di cellule del mesofillo  
mantenute in coltura in presenza di  
mannitolo per evitare la lisi.

# MOLTIPLICAZIONE

Il materiale viene messo a crescere in presenza di elevati livelli di citochinina.

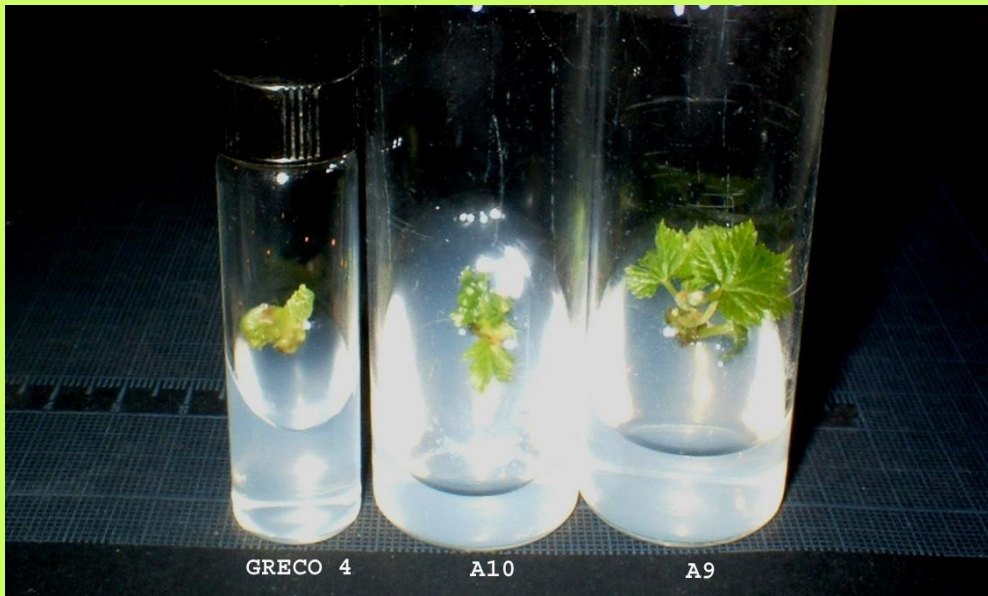


La moltiplicazione dei germogli dipende o dalla continua formazione di germogli ascellari o dalla formazione di germogli avventizi dalle masse calliformi di tessuto alla base dei germogli.

# *Vitis vinifera*...

## Inizio coltura

## Moltiplicazione



*...Vitis vinifera...*

## Radicazione



... *Vitis vinifera*

## Ambientamento



# Rizogenesi



Espianti

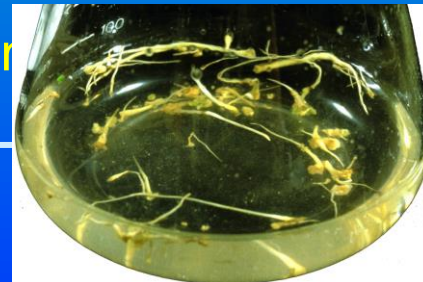
Rizogenesi



Radici neoformate

Inoculo in  
mezzo  
liquido

Trasferimento in  
bioreattore



Radici in mezzo liquido



Bioreattore



# Rizogenesi diretta e indiretta



Esp. caulinare



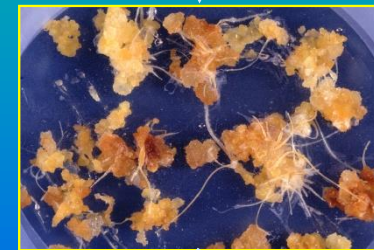
Esp. fogliari

Callogenesi

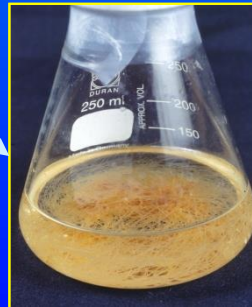


Rizogenesi diretta

Rizogenesi indiretta



Inoculo in mezzo liquido



# Rizogenesi diretta e indiretta

**Rizogenesi diretta**: le radici avventizie si formano direttamente dai tessuti dell'espianto (soprattutto cellule parenchimatiche)



Sezione trasversale di un espianto caulinare di *Angelica arcangelica*: radici avventizie, formatesi a carico del cambio cribro-vascolare

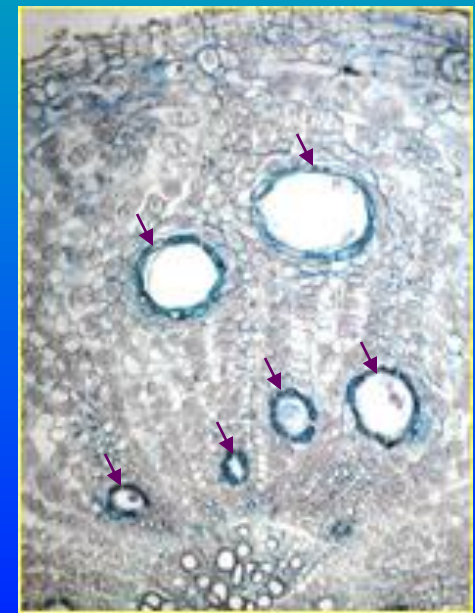
**Rizogenesi indiretta**: le radici si formano da cellule indifferenziate (callo)

# Rizogenesi

Le radici ottenute, sebbene in grado di **allungarsi** e **ramificare**, mantengono una **struttura di tipo primario**, quindi non sono adatte per la produzione di metaboliti sintetizzati specificamente nel corpo secondario della radice



In *Angelica arcangelica* gli oli essenziali sono prodotti prevalentemente in dotti secretori localizzati nel corpo secondario della radice





# Rizogenesi

alcuni prodotti ottenuti da colture di radice

<b>Specie</b>	<b>Prodotto</b>	<b>Referenze</b>
<i>Artemisia absinthium</i>	Olii volatili	Kennedy et al. (1993)
<i>Beta vulgaris</i>	Betalaine	Hamill et al. (1986)
<i>Bidens alba</i>	Poliacetileni	Norton and Towers (1986)
<i>Calystegia sepium</i>	Alcaloidi tropanici	Jung and Tepfer (1987)
<i>Coreopsis tintoria</i>	Fenilpropanoidi	Thron et al. (1989)
<i>Datura stramonium</i>	Scopolamina, iosciamina	Baiza et al. (1998)
<i>Hemidesmus indicus</i>	2-idrossi- metossibenzaldeide	Sreekumar et al. (1998)
<i>Hyoscamus albus</i>	Iosciamina	Hashimoto and Yamada (1986)
<i>Hyoscamus muticus</i>	Iosciamina	Flores et al. (1987)
<i>Polygonum tinctorium</i>	Indigo, Indirubina	Shim et al. (1998)
<i>Silybum marianum</i>	Flavonolignani	Alikaridis et al. (2000)

# Produzione di xantoni da colture di radici di iperico con attività antifungina

Appl Microbiol Biotechnol (2011) 91:977–987

DOI 10.1007/s00253-011-3303-6

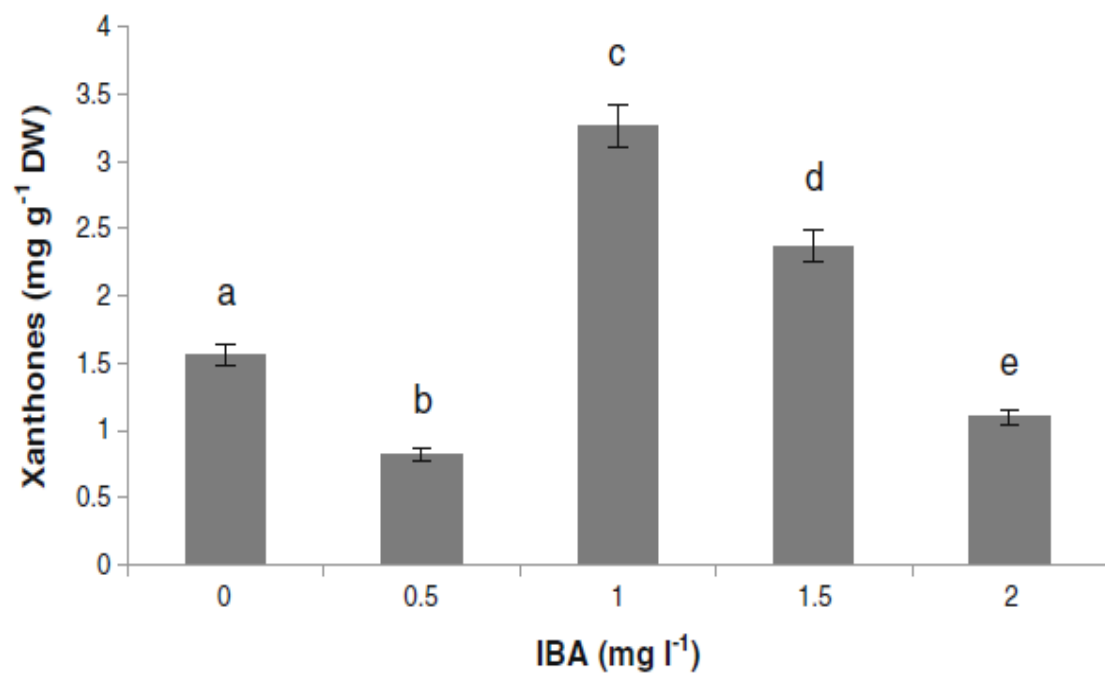
---

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

## Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity

Noemi Tocci • Giovanna Simonetti • Felicia Diodata D'Auria • Simona Panella •  
Anna Teresa Palamara • Alessio Valletta • Gabriella Pasqua

**Fig. 2** Total xanthone accumulation (milligrams per gram dry weight) in roots cultivated in MS medium supplemented with different concentrations of IBA (0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg l<sup>-1</sup>). Results are means ( $\pm$ SD) of three independent replicates. Different letters refer to significant differences ( $P < 0.05$ )



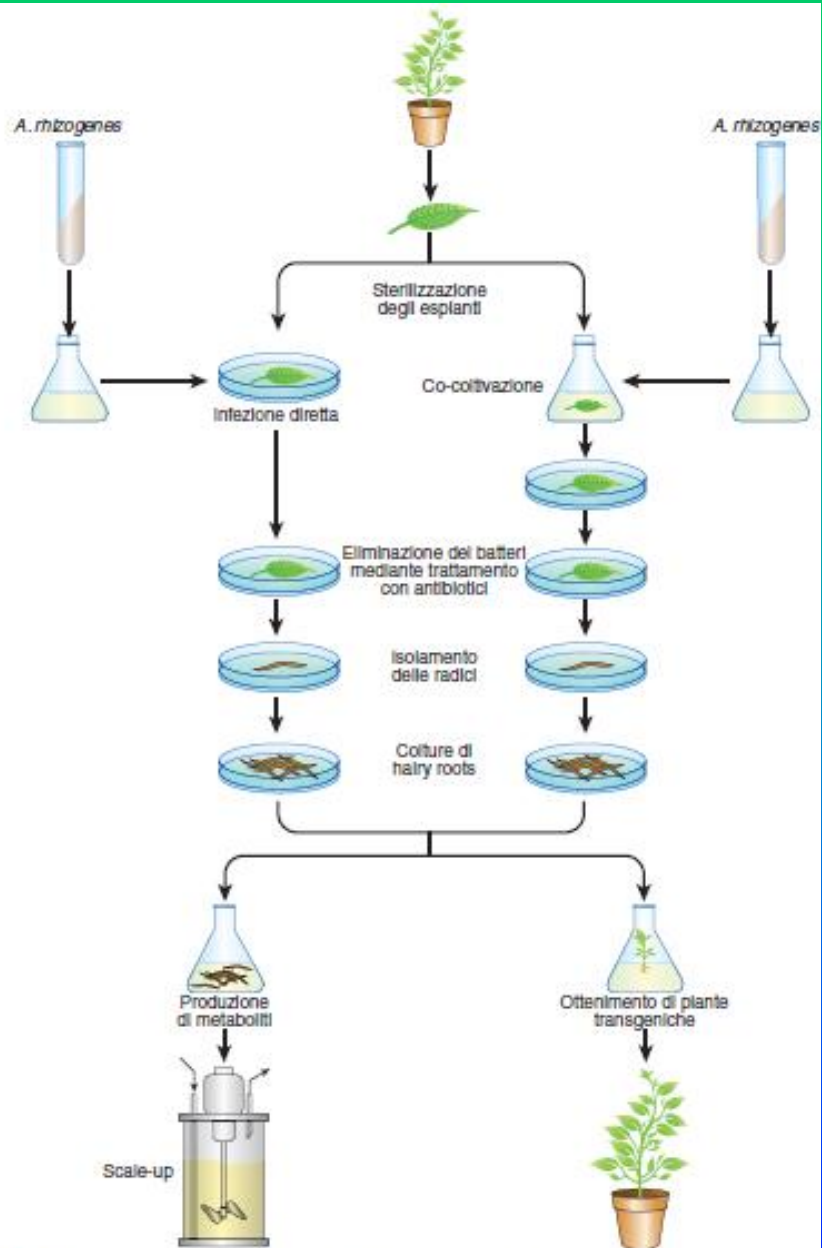
**Table 4** Antifungal activity of total extracts from untreated and chitosan-treated roots of *H. perforatum* subsp. *angustifolium* obtained on the 15th day of culture and isolated and of purified xanthenes against 12 strains of *C. neoformans*

	MIC $\pm$ SD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	MIC range ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	MIC <sub>100</sub> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Control roots	99 $\pm$ 55.5	64–250	333 $\pm$ 119
Treated roots	39.1 $\pm$ 19*	16–125	146 $\pm$ 46
3	>64	>64	>64
4	44 $\pm$ 15.6	32–64	>64
6	>64	>64	>64
7	42 $\pm$ 15	32–64	>64
Amphotericin B	nd	0.016–4	1.63 $\pm$ 1.55
Fluconazole	2.23 $\pm$ 1.57	0.5–8	15.1 $\pm$ 17.7

Data represent the mean of three separate experiments in triplicate

3 1,7-dihydroxyxanthone, 4 cadensin G, 6 paxanthone, 7 5-*O*-methyl-2-deprenylrheediaxanthone B, MIC arithmetic mean of minimum inhibitory concentration, SD standard deviation, MIC<sub>100</sub> lowest drug concentration that prevented any discernible growth with respect to the untreated control, nd not determined

\* $P < 0.001$  (versus control roots, by Student's *t* test)



**Figura 18.10**

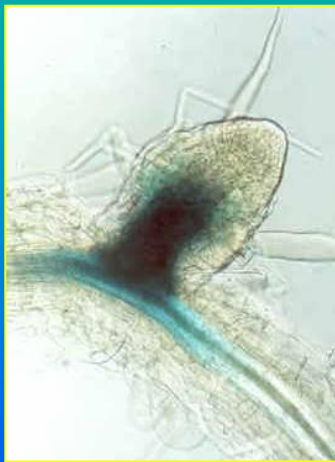
Schema della procedura per l'induzione in vitro di hairy roots e delle possibili loro applicazioni.



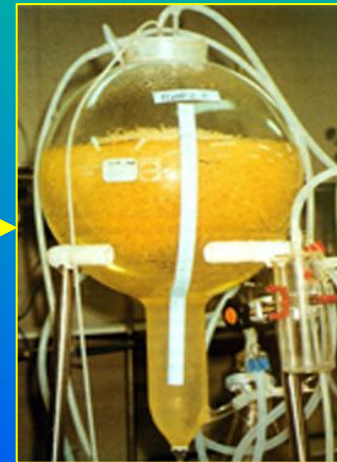
# Rizogenesi

*hairy roots*

Le ***hairy roots*** (radici pelose) sono ottenute mediante infezione con un batterio del suolo, ***Agrobacterium rhizogenes***



Coltura in  
bioreattore

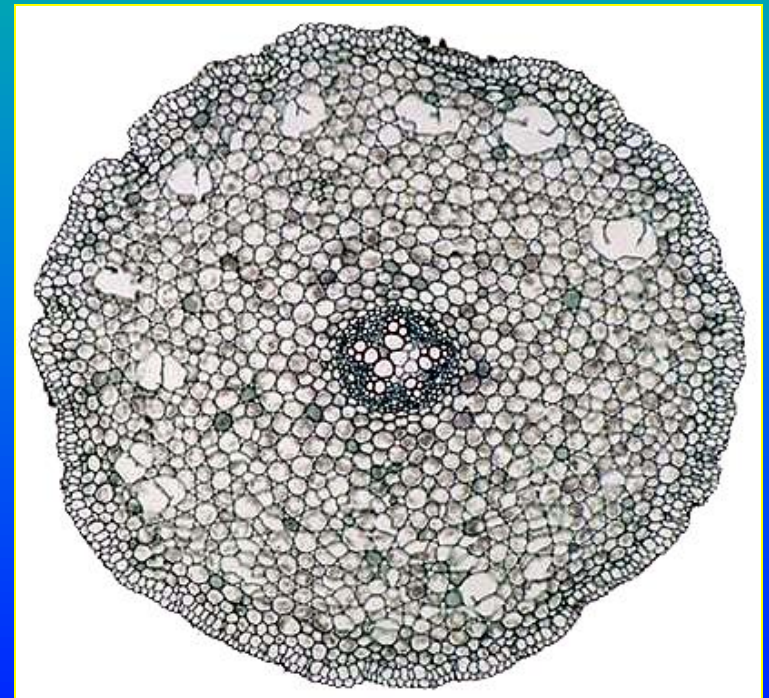


Il batterio trasferisce alla cellula vegetale un frammento di DNA (T-DNA) localizzato nel plasmide batterico. Il T-DNA si integra nel DNA della cellula ed i geni vengono trascritti e tradotti. Il T-DNA contiene geni che inducono over-espressione della via biosintetica delle auxine, stimolando la genesi e l'accrescimento delle radici. Altri geni determinano la sintesi di opine utilizzate dal batterio per nutrizione.

# Rizogenesi

*hairy roots*

Le ***hairy roots*** mantengono indefinitamente una struttura di tipo primario





# Rizogenesi

alcuni prodotti ottenuti da *hairy roots*

Specie	Prodotto	Referenze
<i>Artemisia absinthium</i>	Olii volatili	Kennedy et al. (1993)
<i>Atropa belladonna</i>	Atropina	Kamada et al. (1986)
<i>Azadirachta indica</i>	Azadiractina, Ninbina, Salanina	Allan et al. (2002)
<i>Bidens</i> spp.	Poliacetileni	Mckinely et al. (1993)
<i>Cassia</i> spp.	Antrochinoni	Ko et al. (1988)
<i>Catharanthus roseus</i>	Catarantina, taberosina	Geerlings et al. (1999)
<i>Cichorium intybus</i>	Esculetina	Bais et al. (1999)
<i>Cinchona ledgeriana</i>	Alcaloidi chinolinici	Hamill et al. (1987)
<i>Datura</i> spp.	Alcaloidi tropanici	Rhodes et al. (1989)
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Alcaloidi tropanici	Mano et al. (1989)
<i>Echinacea purpurea</i>	Alcaloidi	Trypsteen et al. (1991)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Flavonoidi isoprenilati	Asada et al. (1998)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Glicirrizina	Ko et al. (1989)
<i>Hyoscamus albus</i>	Alcaloidi	Shimomura et al. (1991)
<i>Hyoscamus muticus</i>	Iosciamina	Sevon et al. (1998)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Sciconina	Shimomura et al. (1986)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina	Parr and Hamill (1987)

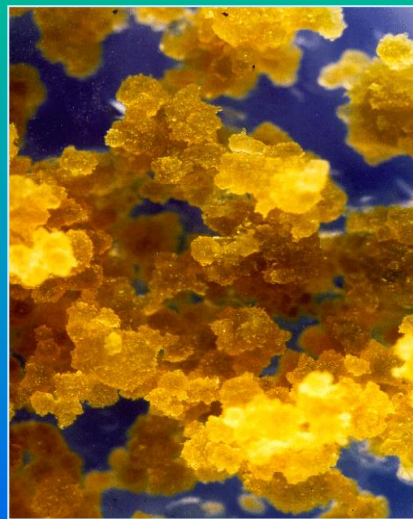


# Caulogenesi

## *Hypericum perforatum*



Nella **pianta** ipericina è sintetizzata nei **globuli neri**, mentre iperforina è sintetizzata nelle tasche secretorie



Le **cellule indifferenziate** non producono ipericina e iperforina



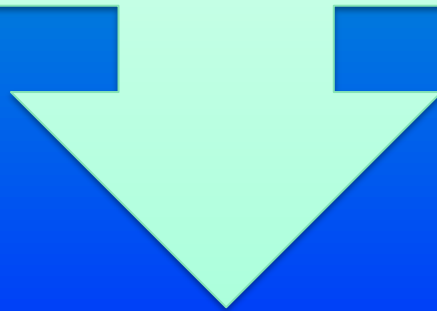
I **germogli rigenerati in vitro** possiedono globuli neri e **producono** ipericine ma per produrre iperforine devo ottenere foglie adulte

# Estrazione

## Solubilizzazione dei metaboliti

La gran parte delle metodiche per l'analisi dei metaboliti vegetali richiedono che essi siano:

- in fase liquida (es. HPLC, LC/MS e NMR)
- in fase gassosa (es. GC)



Il materiale vegetale non può essere analizzato tal quale

# Estrazione in fase liquida

Matrice fresca e secca

L'estrazione dei metaboliti può essere effettuata su:

- Biomassa vegetale fresca (idratata)
- Biomassa vegetale secca (disidratata)



Essiccazione →



# Estrazione

## Essiccazione

L'essiccazione viene generalmente effettuata in stufa ad alte temperature e per tempi lunghi (per es. foglie 70°C per 72 h)



Inadatta per metaboliti termolabili, che devono essere estratti da biomassa fresca o essiccata in liofilizzatore



Stufa da laboratorio



Liofilizzatore da bancone

# Estrazione

## Triturazione

L'efficienza dell'estrazione è tanto maggiore quanto più è ampia la superficie di contatto tra matrice vegetale e solvente



Triturazione del materiale vegetale



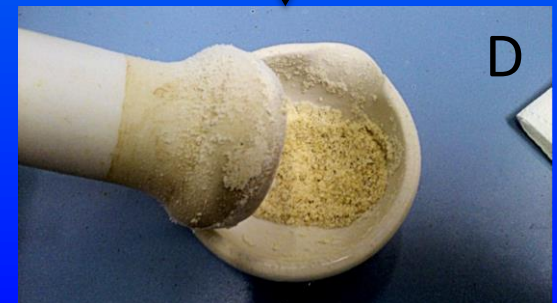
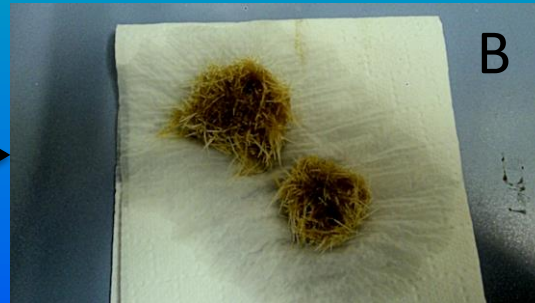
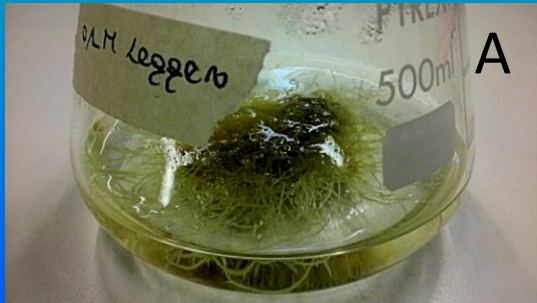
Triturazione di foglie secche con pestello e mortaio



# Estrazione Polverizzazione

Esistono metodiche che permettono di ottenere **polveri finissime**, con enormi incrementi della superficie di contatto matrice/solvente

Polverizzazione in N<sub>2</sub> liquido (-196 °C)



Polverizzazione in N<sub>2</sub> liquido di radici coltivate *in vitro*

# Estrazione

## Omogeneizzazione

Esistono strumenti che permettono di ridurre la matrice vegetale in piccolissimi frammenti **direttamente nel solvente di estrazione**

Omogeneizzatori a immersione



Ultraturrax

# Estrazione

## Sonicazione

È possibile incrementare la permeabilità delle membrane biologiche, aumentando di molto l'efficienza dell'estrazione



Sonicazione



Bagno a ultrasuoni

# Estrazione

## Estratti totali

Spesso gli estratti totali vengono ottenuti con solventi a polarità media



Estratti etanolic e metanolic

Matrice vegetale

Estrazione con  
MeOH o EtOH

Estratto totale

L'estratto così ottenuto è molto complesso, cioè composto da un numero elevatissimo di metaboliti

# Estrazione

## Estratti totali

È possibile ottenere estratti totali più semplici (minor numero di metaboliti) e quindi più facili da analizzare

Estrazioni seriali con solventi a polarità crescente

**Matrice vegetale**

Estrazione con  
**cloroformio**  
(CHCl<sub>3</sub>)

**Estratto 1**

Estrazione con  
**acetato di etile**  
(EtOAc)

**Estratto 3**

Estrazione con  
**metanolo**  
(MeOH)

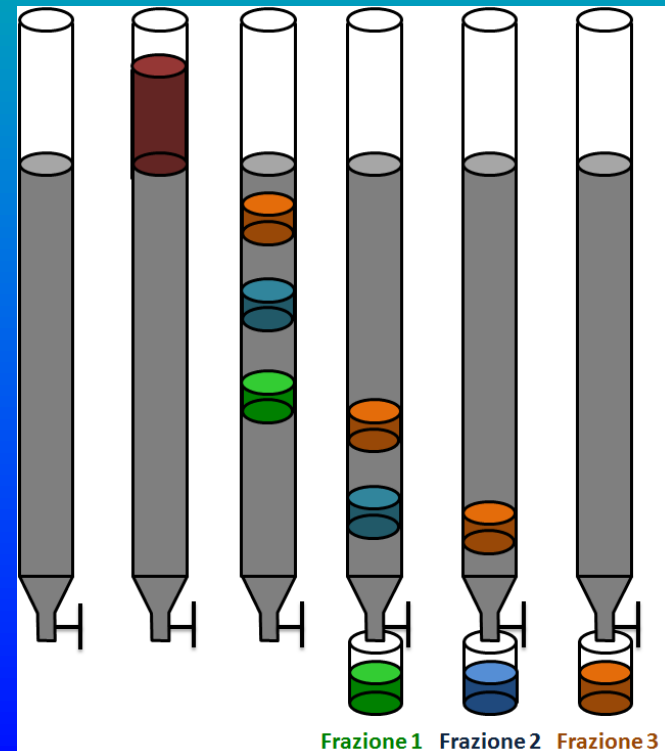
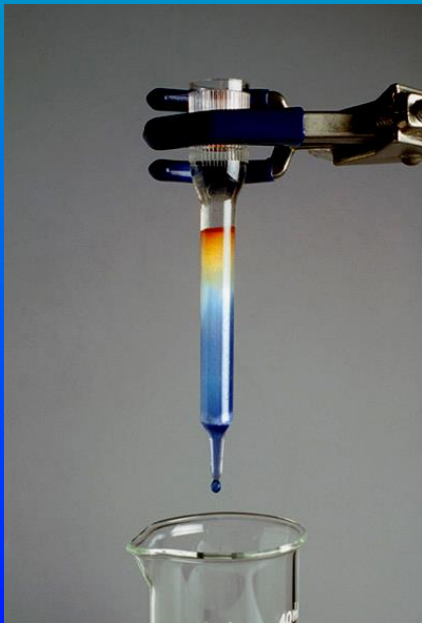
**Estratto 2**

# Frazionamento

## Colonne cromatografiche

Diversi metodi permettono di ottenere dagli estratti totali delle frazioni, ciascuna contenente un numero limitato di metaboliti

Separazione cromatografica



# Evaporazione

## Evaporazione del solvente

Spesso i metaboliti contenuti negli estratti e nelle frazioni sono troppo diluiti per essere analizzati

L'estratto deve essere portato a secco e poi risolubilizzato in un piccolo volume di solvente



Evaporatore rotante (rotavapor)

# Analisi HPLC

Separazione, identificazione e quantificazione

L'**HPLC** è una delle metodiche più usate per l'**analisi dei metaboliti** contenuti in **estratti e frazioni**



***Cromatografia liquida ad alta Performance***



## Tabella 17.1

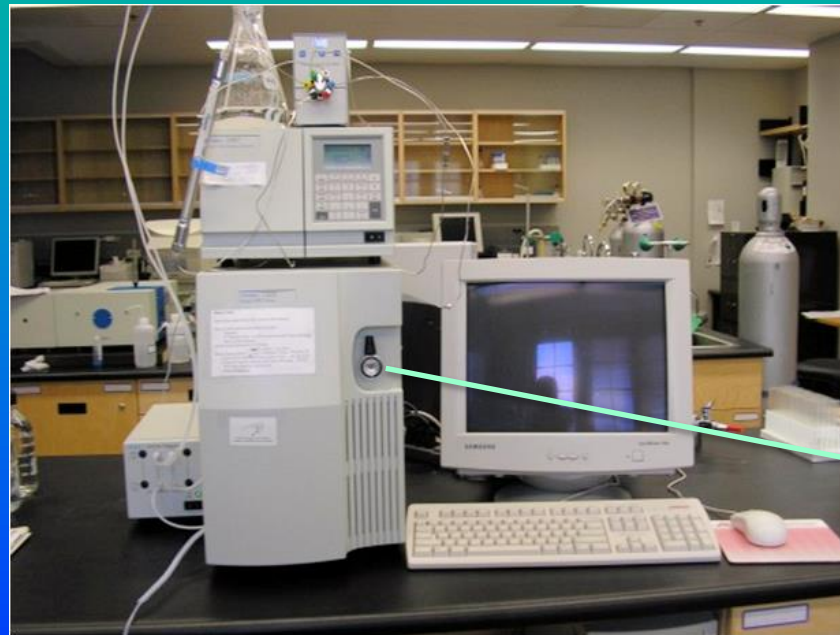
### Differenti strategie impiegate negli esperimenti di metabolomica

<b>Metabolomics</b>	L'identificazione e la quantificazione di tutti i metaboliti presenti in un sistema biologico. Le tecniche analitiche devono essere altamente selettive e sensibili. A tutt'oggi nessuna tecnica analitica da sola o combinata con altre è in grado di determinare tutti i metaboliti costituenti il metaboloma di microorganismi, piante e organismi animali.
<b>Metabonomics</b>	La misura quantitativa della risposta metabolica dinamica e multiparametrica di un sistema vivente a stimoli fisio-patologici o modificazioni geniche.
<b>Metabolite target analysis</b>	Determinazione quantitativa di uno o pochi metaboliti correlati ad uno specifico pathway metabolico.
<b>Metabolite profiling/ metabolic profiling</b>	Analisi per identificare e quantificare metaboliti coinvolti in alcuni pathway metabolici.
<b>Metabolic fingerprinting</b>	Analisi globale e rapida per classificazione o "screening" dei campioni. L'identificazione e la quantificazione non è richiesta.
<b>Metabolic footprinting</b>	Misura globale dei metaboliti secreti dallo spazio intra-cellulare nel terreno di crescita cellulare in colture di microorganismi, cellule vegetali ed animali.

# Analisi HPLC

## Principi generali

Un piccolissimo volume di estratto viene **iniettato** nel sistema HPLC attraverso l'**iniettore**



Hamilton

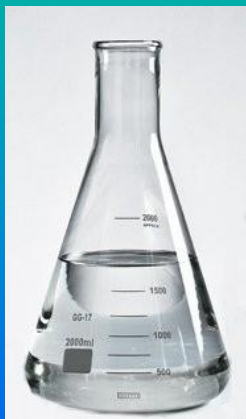


Iniettore

# Analisi HPLC

## Principi generali

L'estratto raggiunge la colonna cromatografica attraverso un piccolo tubo, sospinto da una soluzione sotto pressione (**eluente**)



Eluente



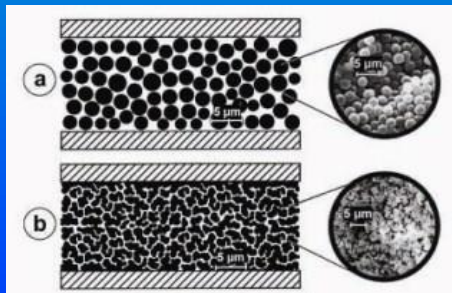
L'eluente costituisce la FASE MOBILE del sistema

# Analisi HPLC

## Principi generali

All'interno della colonna si trova un materiale granulare nei cui interstizi (**pori**) la fase mobile può fluire

colonne



Il materiale interno alla colonna costituisce la FASE STAZIONARIA

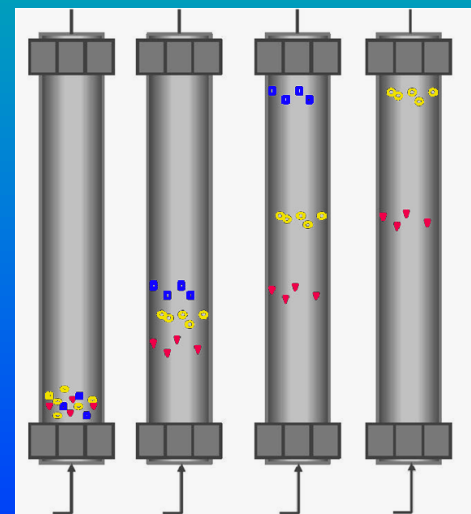
# Analisi HPLC

## Principi generali

Le diverse molecole presenti nell'estratto procederanno a diversa velocità nella colonna ...



### Separazione



... sulla base della loro affinità con la fase fissa e con la fase mobile:  
**SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA**

# Analisi HPLC

## Principi generali

Ciascuna sostanza raggiungerà il detector dopo un certo tempo dall'iniezione (tempo di ritenzione)

Detector

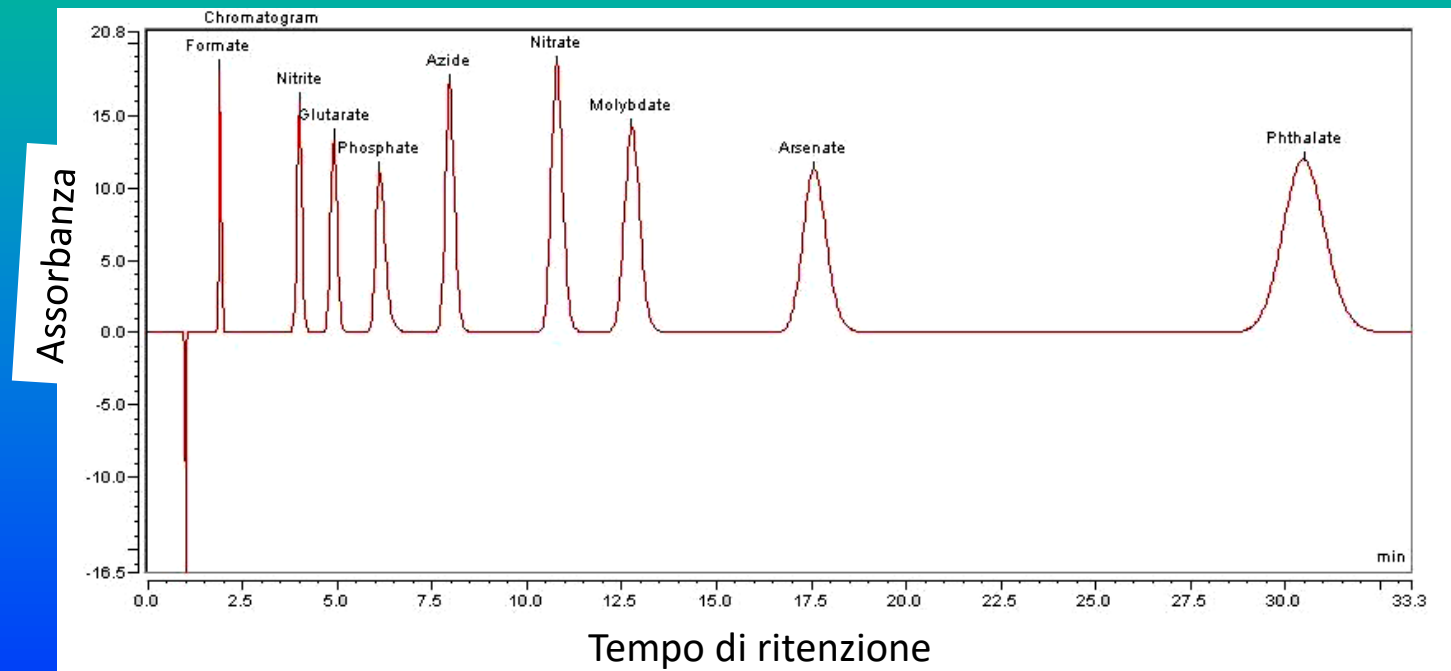


Nel detector viene misurata l'assorbanza della sostanza ad una o più lunghezze d'onda

# Analisi HPLC

## Principi generali

Il detector restituisce un profilo cromatografico in cui a ciascun picco corrisponde una determinata sostanza



L'area sottesa al picco è proporzionale alla concentrazione della sostanza

# Analisi HPLC

## Analisi di metaboliti noti

Per l'identificazione e per la quantificazione degli analiti sono necessari gli standard, ossia campioni puri dell'analita



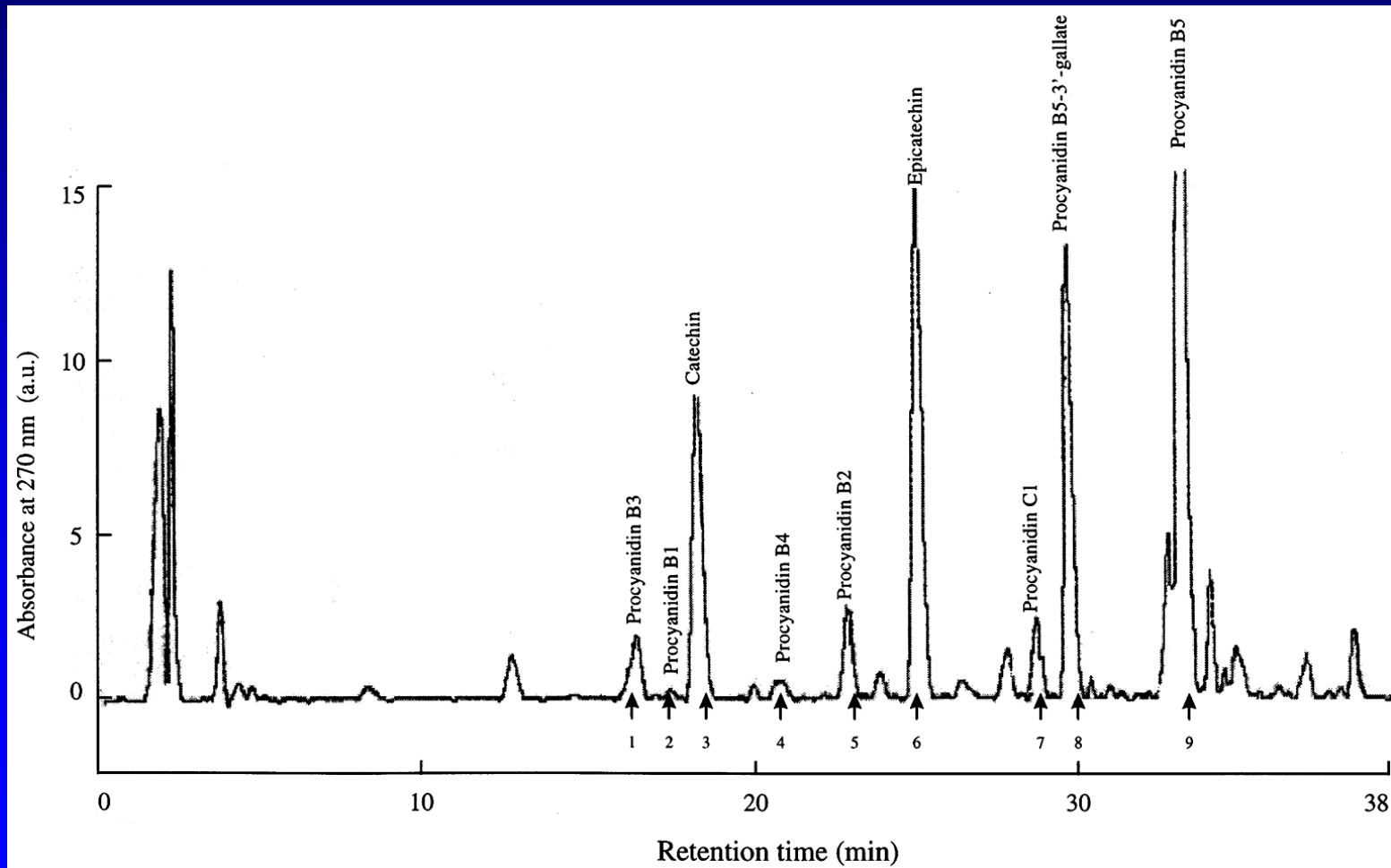
L'**HPLC** non è adatta alla caratterizzazione strutturale di composti ignoti, poiché richiede la disponibilità di standard

Per la gran parte dei metaboliti noti sono disponibili in commercio gli standard, cioè campioni puri degli analiti





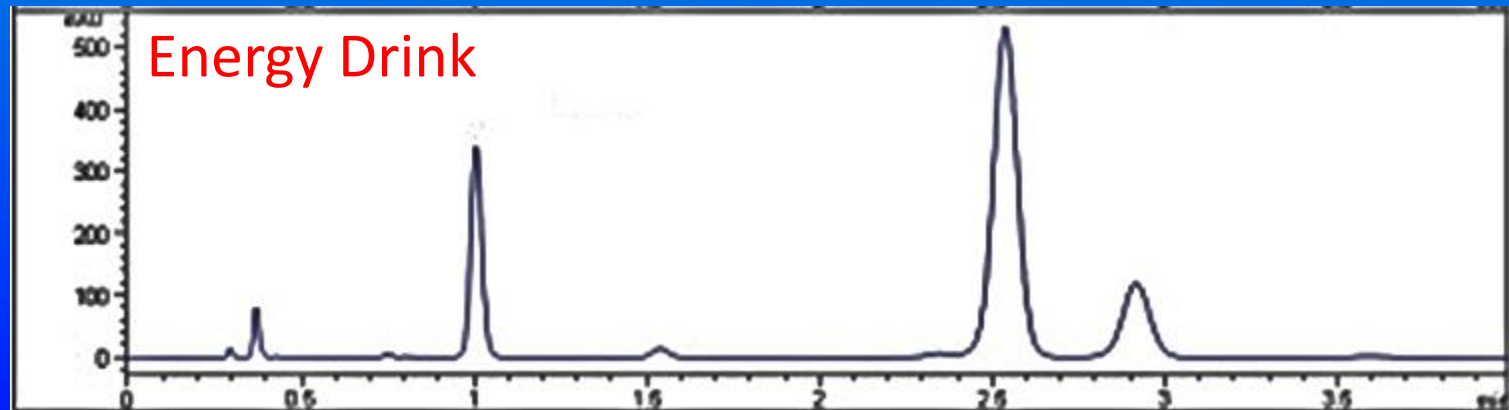
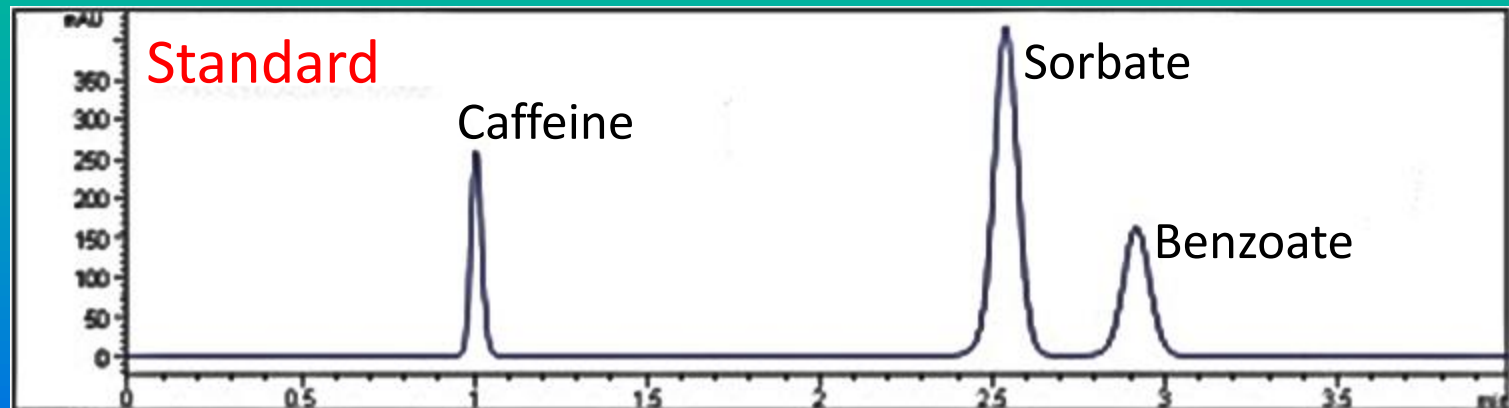
# Estrazione di metaboliti vegetali e loro identificazione/quantificazione mediante HPLC



# Uso degli standard

## Determinazione del tempo di ritenzione

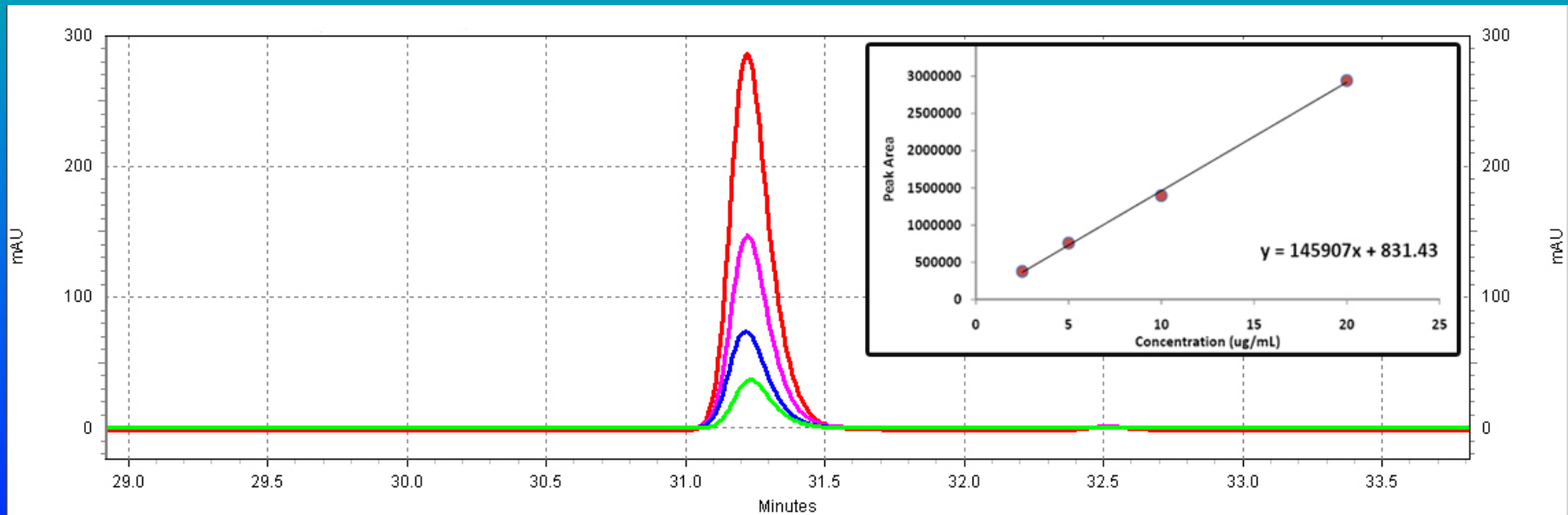
L'attribuzione di un nome alle molecole è effettuata sulla base dell'identità con il tempo di ritenzione dello standard



# Uso degli standard

## Determinazione del tempo di ritenzione

Con soluzioni a diversa concentrazione di standard viene costruita una **retta di taratura** e viene determinata l'area ed è quindi possibile misurare la concentrazione dell'analita nell'estratto.



LC-MS) è probabilmente il miglior metodo, ma una assoluta quantificazione dei composti individuali è possibile solo con l'aiuto di curve di calibrazione di tutti i composti individuali, procedimento poco realizzabile quando in uno spettro MS sono presenti centinaia se non migliaia di segnali di masse, molti dei quali non ancora univocamente assegnati a composti. Di conseguenza si procede ad una quantificazione percentuale in termini di diminuzione o aumento relativo.