



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI - DAFNE

Corso di Dottorato di Ricerca in

BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XXVIII Ciclo.

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Colture *in vitro* di carciofo (*Cynara scolymus* L.): un
sistema biotecnologico alternativo per la produzione di composti bioattivi**

Settore scientifico-disciplinare
AGR/07

Tesi di dottorato di:

Dott. Massimiliano Meneghini

Coordinatore del corso

Prof.ssa Stefania Masci

Tutore

Dott.ssa Raffaella Tavazza

Data della discussione

29 giugno 2016

...fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza

INDICE

INTRODUZIONE	PAG.
1. CARCIOFO	5
1.1 Cenni tassonomici, storici, botanici	5
1.2 Risorse genetiche	8
1.3 Diffusione e importanza economica	9
1.4 Cenni agronomici	10
1.5 Propagazione	11
1.6 Aspetti nutrizionali e farmacologici	14
2. COMPOSTI BIOATTIVI	16
2.1 Composti fenolici	17
2.2 Composti fenolici del Carciofo	19
2.2.1 Acidi fenolici	19
2.2.2 Flavonoidi	21
2.3 Inulina	26
3. TECNICHE <i>IN VITRO</i> PER LA PRODUZIONE DI METABOLITI SECONDARI	30
3.1 Coltura di calli e sospensioni cellulari	31
3.2 Hairy roots	34
4. OBIETTIVO DELLA TESI	35

5. PHYTOCHEMICALS ACCUMULATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN CALLUS AND SUSPENSION CULTURES DERIVED FROM LEAF EXPLANTS OF GLOBE ARTICHOKE

5.1	Introduction	37
5.2	Material and methods	38
5.2.1	Chemicals	38
5.2.2	Culture Initiation, Medium Composition and Tissue Culture Conditions	39
5.2.3	Quantification of Total Polyphenols and Anthocyanins	40
5.2.4	Extraction procedure and HPLC analysis	40
5.2.5	Determination of Antioxidant Activity	42
5.2.6	Statistical Analysis	42
5.3	Results and discussion	43
5.4	Conclusions	49

6. ANALISI DEL CONTENUTO DI INULINA IN COLTURE *IN VITRO* DI CALLI E RADICI DI CARCIOFO

6.1	Introduzione	51
6.2	Materiali e metodi	53
6.2.1	Materiale <i>in vitro</i>	53
6.2.1.1	Coltura <i>in vitro</i> di piantine micropropagate di carciofo	53
6.2.1.2	Coltura di calli: induzione e condizioni di crescita	59
6.2.1.3	Coltura di radici in sospensione: induzione e condizioni di crescita	62
6.2.2	Materiali <i>in vivo</i>	63
6.2.3	Estrazione dell'inulina	66
6.2.4	Analisi mediante HPLC del contenuto di inulina	66
6.2.5	Analisi statistica	66

6.3 Risultati e discussione	67
6.3.1 Coltura <i>in vitro</i> di piantine micropropagate di carciofo	67
6.3.2 Coltura di calli: induzione e condizioni di crescita	74
6.3.3 Analisi del contenuto di inulina	76
6.4 Conclusioni	78

7. TRASFORMAZIONE GENETICA DI *CYNARA SCOLYMUS* L. TRAMITE *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*: TECNOLOGIA INNOVATIVA PER LA PRODUZIONE DI INULINA.

7.1 Introduzione	79
7.2 Materiali e metodi	80
7.2.1 Materiale <i>in vivo</i>	80
7.2.2 Materiale <i>in vitro</i>	81
7.2.3 Ceppi batterici	81
7.2.4 Protocollo di trasformazione	82
7.2.4.1 Preparazione di <i>A. rhizogenes</i>	82
7.2.4.2 Infezione degli espianti con <i>A. rhizogenes</i>	82
7.2.5 Coltura di “hairy roots”	84
7.2.6 Estrazione del DNA genomico e analisi molecolare mediante PCR	85
7.2.7 Estrazione dell’inulina	87
7.2.8 Analisi mediante HPLC del contenuto di inulina	87
7.2.9 Analisi statistica	88
7.3 Risultati e discussione	88
7.3.1 Trasformazione di espianti fogliari, radicali e piantine di carciofo mediante <i>A. rhizogenes</i>	88
7.3.2 Valutazione della trasformazione dei cloni “hairy roots” tramite PCR	92

7.3.3 Coltura di “hairy roots” per la produzione di biomassa	94
7.3.4. Analisi del contenuto di inulina	96
7.4 Conclusioni	98
8. BIBLIOGRAFIA	99
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	

INTRODUZIONE

1. CARCIOFO

1.1 Cenni tassonomici, storici, botanici

Il carciofo (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) è un'angiosperma dicotiledone appartenente all'ordine delle *Asterales*, famiglia delle *Asteraceae* (*Compositae*), sottofamiglia *Asteroideae* (*Tubuliflorae*), tribù *Cynareae* (Bianco e Pimpini., 1990). La famiglia conta più di 20.000 specie ed è pertanto una delle più rappresentate tra le angiosperme. Il nome gli deriva dal tipo d'infiorescenza (capolino) che, pur raggruppando un cospicuo numero di fiori assai minuti, simula nell'aspetto un singolo fiore. Specie erbacea poliennale, coltivata per la produzione di capolini (infiorescenze immature) e semi. E' originaria dell'areale mediterraneo e dell'Africa settentrionale, dove sono ancora presenti specie selvatiche spontanee di *Cynara*.

Noto fin dai tempi dei Greci e dei Romani, che ne apprezzavano le caratteristiche gastronomiche e curative, il carciofo si diffuse in Italia nel '400 dalla zona di Napoli verso la Toscana, per poi arrivare al resto d'Europa e, nel 1700 negli Stati Uniti (Oliaro, 1967). Le prime descrizioni di varietà di carciofo risalgono al XVIII secolo ma già da prima erano noti diversi tipi. Secondo Columella, il nome del genere *Cynara* potrebbe derivare da "cinis", poichè il terreno, destinato a ospitare le piante di carciofo era solitamente cosperso di cenere. Alcuni autori suggeriscono un'analogia con il colore grigio-verde della pianta stessa. Il nome *scòlymus*, invece, deriva dal greco e significa appuntito, alludendo probabilmente alla forma appuntita di alcuni tipi di carciofo.

L'etimologia del nome comune è diversa per le varie lingue. In particolare il termine italiano carciofo deriverebbe dal latino "articactus", da cui la parola italiana, ora in disuso di "articiocco", quella francese di "artichaut" e quella inglese di "artichoke" (Oliaro, 1967).

Secondo la classificazione del Fiore, al genere *Cynara* si attribuisce un'unica specie il *Cynara cardunculus* L., che comprende tre varietà botaniche:

- *Cynara cardunculus* var *sylvestris* (Lamk).: cardo selvatico, noto sotto il nome di caglio o carduccio, spontaneo nel bacino del Mediterraneo, che trova impiego nella preparazione del cosiddetto caglio fiore;
- *Cynara cardunculus* var *scolymus*: carciofo coltivato;
- *Cynara cardunculus* var *altilis* DC: cardo domestico.

Si ritiene che il carciofo ed il cardo domestico derivino entrambi da quello selvatico, in seguito ad un processo di selezione che ha favorito lo sviluppo dell'inflorescenza nel primo e della nervatura mediana delle foglie nel secondo.

Dal punto di vista botanico il carciofo (Figura 1) è una pianta con corredo cromosomico diploide ($2n=2x=34$) caratterizzata da spiccata proterandria, quindi con una struttura genetica altamente eterozigote.



Figura 1. Pianta e capolino di carciofo

E' caratterizzato da un fusto rizomatoso sotterraneo, carnoso, comunemente detto "ceppaia", sul quale sono inserite numerose gemme da cui hanno origine ovuli e carducci.

L'apparato radicale del carciofo è di tipo rizomatoso, e si sviluppa diversamente in funzione del tipo di riproduzione; è fittonante, con numerose radici secondarie, nel caso di piante derivanti da seme (achenio) mentre è costituito da radici avventizie fibrose che man mano si ingrossano, perdono la funzione assorbente e assumono la funzione di organi di riserva, se proviene da propagazione agamica (carducci, ovuli).

Nel carciofo la struttura caulinare e quella radicale non sono ben distinte; quando la gemma apicale si evolve, si origina lo stelo che si allunga e all'apice porta il capolino. Lo stelo fiorifero è cilindrico, leggermente scanalato nel senso longitudinale, raggiunge un'altezza variabile di 40-80 cm.

Le foglie, a rosetta alla base, alterne lungo il fusto, sono di colore verde intenso sulla pagina superiore e grigiastro su quella inferiore, ricche di peli e stomi, con nervatura centrale particolarmente evidente che costituisce gran parte del peso della pianta. La forma delle foglie varia secondo la cultivar, l'età della pianta e la posizione sulla pianta. Generalmente le foglie in prossimità del capolino sono lanceolate con margine intero o seghettato, mentre le foglie basali hanno il margine profondamente intaccato. L'angolazione d'inserzione delle foglie determina l'aspetto della pianta, da espanso ad assurgente.

Il capolino (Figura 2) è costituito dal ricettacolo su cui sono inseriti internamente i fiori ermafroditi, violacei, con ovario infero e monoculare (Figura 3), da cui si sviluppa, per ciascun fiore, un frutto secco fornito di pappo, un achenio di forma oblunga (1 g. = 25 semi), con germinabilità di 3-4 anni. Esternamente sono inserite le brattee, avvolgenti, lunghe da 5 a 10 cm e larghe da 3 a 6 cm, la cui disposizione conferisce la forma al capolino, da cilindrico a ovoidale, conico, sferico e subsferico, di colore dal verde più o meno intenso con striature violette esternamente, a bianco-giallo internamente, dotate o no di spine.

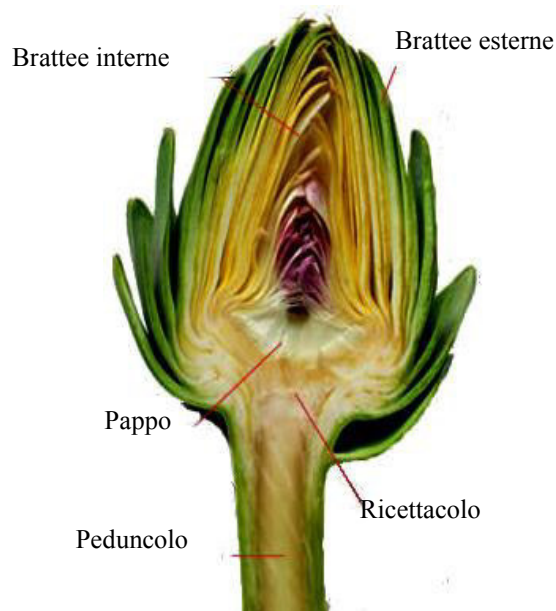


Figura 2. Sezione del capolino di carciofo



Figura 3. Singolo fiore

1.2 Risorse genetiche

In Italia sono coltivati numerosi tipi varietali che si differenziano per caratteristiche morfologiche quali forma, dimensione, spinescenza e colore dei capolini, alle quali i consumatori sono fortemente legati (Mauromicale, 1987).

Una classificazione universalmente riconosciuta (Dellacecca *et al.*, 1976; Porceddu *et al.*, 1976) divide i diversi ecotipi di carciofo, in base alle caratteristiche del capolino, in quattro tipologie (Figura 4):

- "Spinosi", caratterizzati da lunghe spine sulle brattee e sulle foglie;
- "Romaneschi", con capolini più o meno globosi;
- "Violetti", con capolini viola di medie dimensioni;
- "Catanesi", con capolini relativamente piccoli e allungati.

Le diverse tipologie di carciofo possono anche essere classificate in funzione della comparsa del capolino in: varietà autunnali dette anche rifioranti o precoci, con produzione tra l'autunno e la primavera, e varietà primaverili o tardive, con produzione tra febbraio-maggio (Mauromicale e Ierna, 2000).

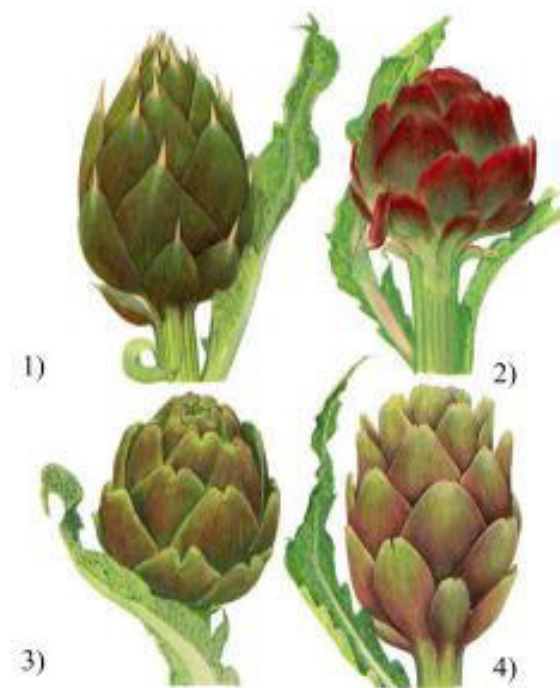


Figura 4. 4 gruppi di carciofo classificati in funzione della morfologia del capolino:

1) Spinoso; 2) Violetto; 3) Romanesco; 4) Catanese

1.3 Diffusione e importanza economica

Il 90% della superficie adibita alla coltura del carciofo mondiale è concentrato nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (Italia, Spagna, Francia, Grecia, Tunisia, Algeria, Marocco e Israele). Tuttavia si è osservata di recente un'estensione della coltivazione anche in California, Argentina, Perù Cina, Cile e Nuova Zelanda.

Attualmente l'Italia è il maggior produttore mondiale, con un contributo del 24% delle tonnellate prodotte a livello mondiale, seguito da Egitto, Spagna e Perù (Figura 5).

Con una superficie totale coltivata a carciofi di circa 36.000 ettari, la produzione italiana ammonta a circa 400.000 tonnellate, con il 35% in Puglia, il 32% in Sicilia, il 21% in Sardegna, il 7% in Campania e il 4% nel Lazio.

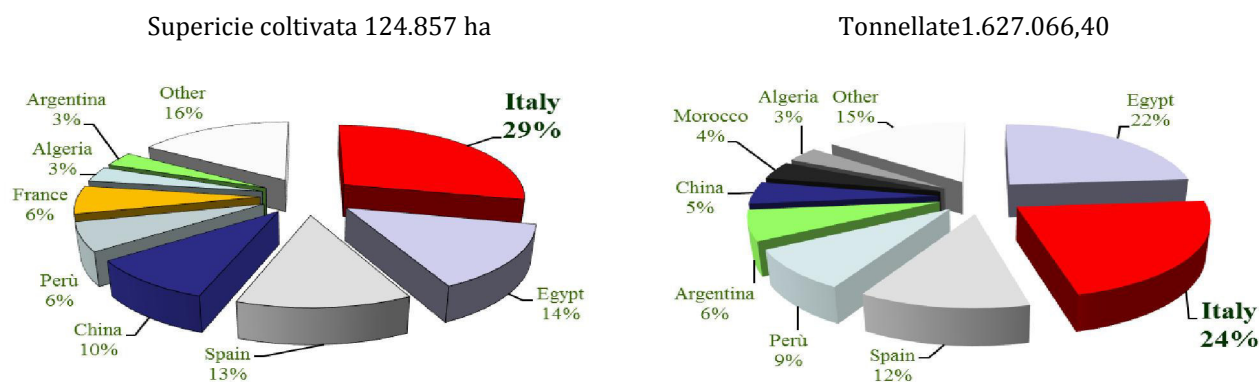


Figura 5. Superficie coltivata a carciofo e tonnellate prodotte nel mondo (dati FAO 2012)

In Italia, la coltivazione è principalmente concentrata nelle isole, al Centro-Sud e nelle regioni costiere della penisola. La distribuzione regionale vede la Sicilia al primo posto con 14.540 ettari e 1.527.960 t di produzione, seguita dalla Puglia (14.980 ha e 1.385.850 t) e dalla Sardegna (13.630 ha e 1.198.300 t). Altre regioni come Lazio (936 ha e 182.100 t), Campania (958 ha e 132.189 t), Abruzzo (412 ha e 53.130 t) rappresentano circa il 4 e il 3% rispettivamente della superficie investita e della produzione totale in Italia.

L'offerta italiana è destinata prevalentemente al consumo fresco e in secondo luogo all'industria conserviera, soprattutto per la produzione di prodotti sott'olio, e dei surgelati. L'Italia è il primo produttore mondiale di carciofo e il secondo paese esportatore dopo la Spagna, ma è anche il secondo paese importatore.

1.4 Cenni agronomici

Il carciofo predilige i terreni profondi, di medio impasto e con un buon drenaggio che vada a evitare i ristagni idrici, soleggiati e poco esposti al vento, con pH compreso tra 6.4 e 7.

Dal punto di vista climatico la coltura mal tollera gli abbassamenti bruschi di temperatura; predilige un clima mite, sufficientemente umido. Per quanto riguarda le esigenze termiche, sono necessari 15-20 °C per la germinazione, 20-22 °C diurni e 12-14°C notturni per la crescita della pianta, 7-9 °C come temperatura minima biologica e inferiore a -10 °C come temperatura letale.

In funzione della notevole produzione di massa verde, il carciofo ha elevate esigenze idriche, con volumi di adacquamento stagionale che si aggirano intorno ai 7-10 mila m³/ha, a seconda il tipo di coltura e dei diversi ambienti di coltivazione. I metodi d'irrigazione più utilizzati sono quelli per aspersione e a goccia.

Sempre in relazione al notevole sviluppo della vegetazione, la coltura ha elevate esigenze nutrizionali. In particolare l'azoto e il fosforo sono indispensabili per favorire lo sviluppo vegetativo della pianta, mentre il potassio è necessario sia per migliorare la resistenza della pianta alle avversità climatiche, sia per favorire una produzione qualitativamente più buona di prodotto. In linea di massima, il ritmo di asportazione degli elementi segue lo stesso andamento di produzione di sostanza secca, differenziandosi tra i singoli elementi in funzione dell'entità del bisogno degli stessi da parte della pianta.

Il carciofo entra in produzione l'anno successivo a quello d'impianto, tranne che per le piantine ottenute da seme, con rese medie di 100 quintali di capolini per ettaro. La raccolta manuale procede scalarmente ogni 3-4 giorni. I capolini che si sviluppano sul fusto principale sono detti cimaroli, generalmente con un diametro superiore agli 11 cm. I “figli” si differenziano sulle ramificazioni secondarie, con diametro tra 9 e 11 cm.

1.5 Propagazione

Il carciofo si può propagare sia per via sessuata, con la riproduzione da seme, sia per via vegetativa sfruttando la sua naturale predisposizione a emettere nuove piante dalle gemme del rizoma. La riproduzione da seme, è utilizzata per studi genetici, poichè le piante non mantengono le caratteristiche specifiche della varietà, sono tardive e molto spesso non qualitativamente valide.

La propagazione vegetativa tradizionale si può attuare tramite: carducci, ovuli, zampe, colture *in vitro* di meristemi apicali. La scelta del metodo dipende dal tipo di ciclo colturale, dalla tradizione che si è venuta a creare nelle regioni di coltivazione e dalla disponibilità di nuove tecnologie.

I carducci sono germogli che crescono alla base della pianta e sono distaccati con una porzione di radice. I carducci per i nuovi impianti si staccano dalle migliori piante di 2-3 anni, devono essere ben sviluppati, con una lunghezza di 20-40 cm e provvisti di 4-5 foglie, la cui parte distale è tagliata al momento dell'impianto. La moltiplicazione per carducci è tipica delle regioni centro-settentrionali ed è eseguita nel periodo autunno-primaverile con materiale proveniente dalla scarducciatura di altre carciofaie.

Nelle zone irrigue meridionali, dove si pratica il risveglio anticipato, è frequente l'impianto per "ovuli" in estate. Gli ovuli sono le gemme di grossezza diversa che si formano alla base del fusto interrato, da cui alla ripresa vegetativa hanno origine i carducci. Gli ovuli si distaccano dalla pianta madre in estate durante la fase di riposo. Spesso, l'impianto estivo è fatto con ovoli, provenienti da carducci messi a vivaio nell'annata precedente, quindi già ben radicati e formati.

La moltiplicazione per parti di ceppo o zampa è un metodo poco usato, che utilizza una porzione ipogea del fusto munita di gemma. Questo sistema si pratica nei paesi freddi ed è utilizzato nei piccoli appezzamenti.

La propagazione vegetativa ha il pregio di trasmettere il genotipo delle piante madri alle piante propagate, permettendo il mantenimento dello standard varietale. Ha però lo svantaggio di trasmettere le virosi accumulate, che sono una delle principali cause che riducono la longevità di una carciofaia. Per migliorare lo stato fitosanitario delle colture si può ricorrere a piante ottenute da micropropagazione. Questa tecnica consente la produzione rapida di un gran numero d'individui (cloni) genotipicamente e fenotipicamente identici alla pianta selezionata, con un processo di propagazione simile a quello della talea.

La coltura *in vitro* è condotta in condizioni asettiche e con l'impiego di celle climatiche con parametri ambientali controllati: fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, illuminazione di 4000 lux

e temperatura di 22 ± 1 °C. Il materiale di partenza è costituito da apici vegetativi di carducci dai quali viene prelevato l'apice meristematico, delle dimensioni di circa 0.5 mm. Le dimensioni dell'espianto sono di notevole rilevanza ai fini del risanamento poiché il successo della tecnica è basato sull'utilizzo di porzioni di pianta dove la probabilità di presenza dei virus è minima. Gli apici meristematici vengono posti *in vitro* e, attraverso una serie di passaggi su substrati differenti per il tipo di ormoni, si arriva alla rigenerazione di piantine complete (Figura 6).



Figura 6. Piantine di carciofo micropropagate

Una fase molto importante nella micropropagazione è l'ambientamento delle piantine di carciofo ottenute *in vitro*; la pianta deve riacquisire le proprie funzioni fisiologiche di traspirazione e fotosintesi.

La micropropagazione o propagazione meristematica, è oggi la tecnica più all'avanguardia nel campo della moltiplicazione del carciofo. Favorisce la disponibilità di carciofaie uniformi e risanate da malattie, soprattutto virali e la conservazione a medio e lungo termine delle risorse genetiche.

La moltiplicazione *in vitro* del carciofo può considerarsi soddisfacente o meno a seconda che ci si riferisca alle varietà primaverili o alle varietà autunnali. Per quanto riguarda le varietà primaverili (Romanesco, Terom ecc.), l'uso di piantine micropropagate ha consentito, non solo di avere

carciofaie più sane e uniformi, ma anche di modificare le pratiche agronomiche tradizionalmente utilizzate. Piantine micropropagate di queste cultivar, trapiantate in campo in settembre, sono in grado di entrare in produzione già nella primavera successiva, diversamente da quanto avviene, quando si utilizzano i carducci come materiale di partenza (Saccardo e Ancora, 1983; Ancora, 1986). Per quanto riguarda invece le varietà precoci o autunnali, le tecniche di moltiplicazione *in vitro* si sono dimostrate inefficaci soprattutto a causa di una disformità del materiale micropropagato che acquisisce caratteristiche di tardività (Pecaut e Martin, 1993).

1.6 Aspetti nutrizionali e farmacologici

Il carciofo, ortaggio dal caratteristico sapore dolce-amaro, molto apprezzato per il profumo intenso, il gusto corposo, la consistenza allo stesso tempo tenera e croccante, è una vera e propria riserva di principi attivi e particolari virtù terapeutiche. Gustoso e versatile contiene una buona quantità di calcio, fosforo, magnesio, ferro e potassio, ha pochissime calorie ed è dotato di proprietà regolatrici dell'appetito, diuretiche e disintossicanti, viene perciò consigliato per combattere ipertensione, sovrappeso e cellulite.

Costituisce inoltre un valido apporto di sali minerali, vitamine (A, B1, B2, C, PP), acido malico, acido citrico, tannini, fosforo, sostanze polifenoliche, e zuccheri consentiti anche ai diabetici. L'alto contenuto di ferro lo rende indicatissimo per gli anemici e i diabetici.

Il carciofo è ricco di fibra alimentare (65% di cellulosa, 21% da emicellulose e 1,4% da lignina) utile a mantenere la funzionalità intestinale e probabilmente anche a controllare i livelli ematici di glucosio e colesterolo. La fibra contribuisce inoltre al raggiungimento del senso di sazietà, quindi aiuta a limitare il consumo di alimenti a elevata densità energetica. Il consumo del carciofo nella dieta degli italiani (circa 8 kg/pro capite/anno) è di gran lunga il più elevato nel mondo.

La coltura del carciofo si presta a essere valorizzata oltre che per l'aspetto nutrizionale (Pandino *et al.*, 2010) anche dal punto di vista farmacologico (Figura 7).

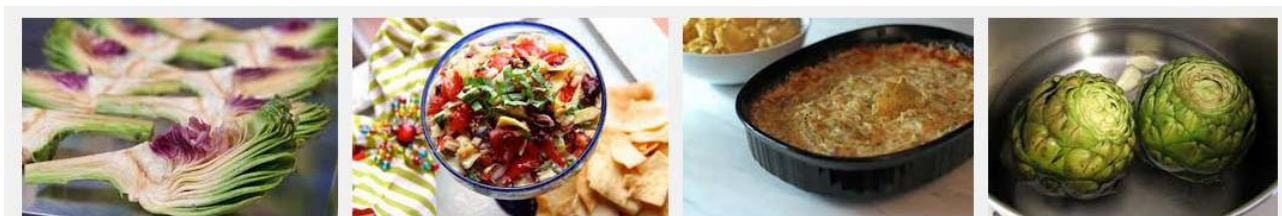


Figura 7. Ricette e farmaci a base di carciofo

La concentrazione endogena elevata di sostanze bioattive sia nella parte edule, che nelle foglie e nelle radici, conferiscono al carciofo numerose proprietà benefiche per la salute: abbassamento del tasso di colesterolo ematico, effetto coleretico (aumento del flusso biliare), ipocolesterolemia, epatoprotezione, azione antitumorale, antiossidante e antibatterico, riduzione della glicemia (Gebhardt, 1997; Kraft, 1997; Clifford, 2000; Saénz Rodriguez *et al.*, 2002; Coinu *et al.*, 2007; Rondanelli *et al.*, 2011; Fantini *et al.*, 2011).

Le proprietà terapeutiche del carciofo sono legate all'elevato contenuto di diversi tipi di composti bioattivi, in particolare polifenoli e inulina (Wang *et al.*, 2003; Fratianni *et al.*, 2007; Lattanzio *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2010; Menin *et al.*, 2013; Pandino *et al.*, 2010, 2011a, 2011b, 2011c, 2012a, 2012b).

I composti polifenolici del carciofo appartengono al gruppo degli acidi clorogenici (acido clorogenico e acidi dicaffeilchinici) e dei flavonoidi (glicosidi di luteolina e apigenina). Numerosi lavori hanno evidenziato che queste sostanze possiedono forte attività antiossidante, cioè sono

capaci di svolgere un'azione protettiva nei confronti dei radicali liberi e, quindi, potenzialmente efficaci nella prevenzione di gravi patologie (Kono *et al.*, 1997).

L'inulina, carboidrato appartenente al gruppo dei frutto-oligosaccaridi (FOS), è un composto endogeno di notevole interesse alimentare e farmacologico, poichè funziona fisiologicamente come fibra dietetica prebiotica, ossia è resistente agli attacchi enzimatici nello stomaco e passa come tale nell'intestino, dove svolge un'azione equilibratrice sulla microflora intestinale. Il consumo d'inulina non comporta l'incremento del tasso di glicemia e ciò rende il carciofo, una specie ortiva che può essere consumata senza rischio dai diabetici (Causey *et al.*, 2000).

L'estrazione dei principi avviene dai diversi organi della pianta con acqua e miscele idroalcoliche. Il contenuto dei principi attivi varia in relazione all'organo, all'età della pianta, alla cultivar, all'epoca di raccolta, alla tecnica adoperata nell'essiccamento del materiale fresco (Lattanzio e Morone, 1979; Fratianni *et al.*, 2007; Lattanzio *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2010; Negro *et al.*, 2011; Pandino *et al.*, 2011a, 2011b, 2011c, 2012a). Negli ultimi anni, sta sempre più aumentando l'interesse verso gli alimenti con elevato contenuto di antiossidanti naturali, soprattutto rispetto all'uso di antiossidanti sintetici (cioè BHA e BHT), il cui utilizzo è sospetto di cancerogenicità (Llorach *et al.*, 2002; Peschel *et al.*, 2006). Oggi, estratti secchi di carciofo sono già commercializzati come farmaci per il fegato e ad azione coleretica (Lattanzio *et al.*, 2009).

2. COMPOSTI BIOATTIVI

Per composti bioattivi s'intende un gruppo di molecole prodotto dal metabolismo secondario delle piante in grado di indurre effetti farmacologici o tossicologici in uomo e animali (Bernhofs 2010). I metaboliti secondari sono prodotti da vie biosintetiche al di fuori del metabolismo primario e quindi non strettamente correlati con i bisogni giornalieri della pianta (assimilazione, respirazione, trasporto e differenziamento), ma fondamentali per altri tipi di funzioni come la protezione (difesa contro gli erbivori mediante sostanze tossiche o irritanti), l'attrazione o la segnalazione (colore e profumo dei fiori). I metaboliti secondari sono raggruppati in varie classi, suddivise in genere su

base chimico-organica e biosintetica. Attualmente si conoscono circa 50.000 metaboliti secondari, variamente distribuiti nel Regno Vegetale (Wink, 1997) e appartenenti alle classi dei polifenoli, steroidi, terpeni e alcaloidi. In questo capitolo saranno trattati nello specifico solo i polifenoli di cui il carciofo è ricco.

2.1 Composti fenolici

I composti fenolici sono un gruppo eterogeneo di circa 10.000 molecole frutto del metabolismo secondario della pianta, caratterizzate dalla presenza di almeno un gruppo fenolico cioè un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici (Figura 8).

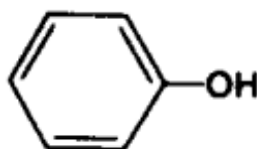


Figura 8. Struttura chimica del gruppo fenolico

La grande varietà di strutture fenoliche (Tabella 1) riflette un altrettanto grande diversificazione delle loro funzioni: possono fungere da pigmenti florali a basso peso molecolare, da antibiotici, da schermo nei confronti delle radiazioni UV, da repellenti per gli insetti e segnali nella interazione pianta-microorganismi; possono avere proprietà antibatteriche, antiossidanti, antinfiammatorie e antitumorali. I composti fenolici si accumulano preferenzialmente negli organi aerei della pianta (steli, foglie, fiori e frutti) piuttosto che nelle radici. Questa localizzazione preferenziale è messa in relazione con l'effetto induttore della luce sul metabolismo fenolico e con il ruolo protettivo esercitato dai composti fenolici nei confronti delle radiazioni ultraviolette (Moglia *et al.*, 2010). In generale la principale funzione di questi metaboliti secondari sembra essere la difesa delle piante contro stress abiotici e biotici (attacchi patogeni) (Moglia *et al.*, 2010). E' stato evidenziato che i

passaggi enzimatici coinvolti nella via metabolica di sintesi dei polifenoli sono sotto il controllo di geni innescati da molecole segnale prodotte dai meccanismi di difesa della pianta (Dixon *et al.*, 2002).

Tabella 1. Principali composti fenolici delle piante

N.° atomi di carbonio	Scheletro base	Classe
6	C6	Fenoli semplici - Benzochinoni
7	C6-C1	Acidi fenolici
8	C6-C2	Acetofenoni - Acidi fenilacetici
9	C6-C3	Acidi idrossicinnamici - Fenilpropeni - Cumarine
10	C6-C4	Naftochinoni
13	C6-C1-C6	Xantoni
14	C6-C2-C6	Stilbeni - Antrachinoni
15	C6-C3-C6	Flavonoidi - Isoflavonoidi
18	(C6-C3) ₂	Lignani
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoidi
N	(C6-C3-C6) _n	Lignine – Melanine - Tannini condensati

La sintesi dei composti fenolici parte dalla fenilalanina (Figura 9) con eliminazione di ammoniaca e formazione di acido cinnamico. La reazione è catalizzata dalla PAL (fenilalanina ammoniacaliasi). L'aggiunta di gruppi ossidrilici porta alla formazione di altri importanti composti: i fenilpropanoidi (Dixon e Paiva, 1995; Dixon *et al.*, 2002; Moglia *et al.*, 2008).

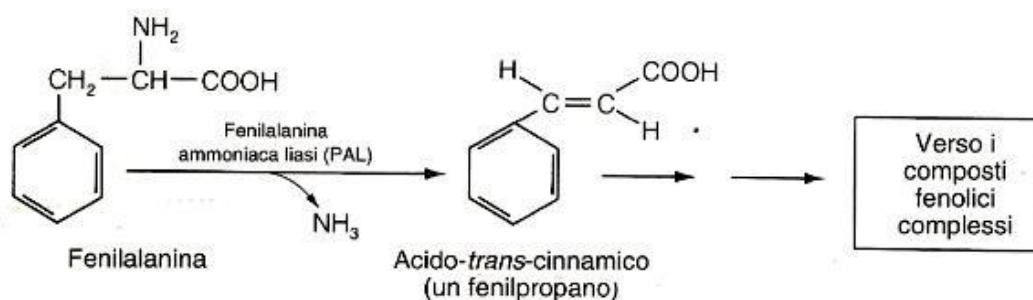


Figura 9. Deaminazione della fenilalanina ad acido trans-cinnamico catalizzata dalla PAL

I polifenoli, sono stati divisi in dieci classi generali in funzione del numero di anelli fenolici che essi contengono e degli elementi strutturali che legano questi anelli gli uni agli altri.

2.2 Composti fenolici del Carciofo

Per la ricchezza in polifenoli il carciofo si rivela una pianta molto interessante sia per la qualità sia per la quantità dei composti in essa contenuti. I composti fenolici del carciofo appartengono a due gruppi principali: acidi fenolici e flavonoidi.

2.2.1 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono caratterizzati da un anello aromatico con una catena alifatica laterale con tre atomi di carbonio. Sono derivati dell'acido cinnamico (Figura 10) e i più diffusi sono: l'acido caffeico (Figura 11), l'acido p-cumarico, l'acido ferulico, l'acido gallico e l'acido sinapico. Spesso questi ultimi si trovano esterificati con alcoli alifatici (acido cicorico) o con acido chinico (Figura 12) (acido clorogenico) o con glucosio ed altri zuccheri (echinacoside). Sono considerati sostanze farmacologicamente attive come agenti antiossidanti, antimutageni e anticancerogeni (Maffei M.,1999).

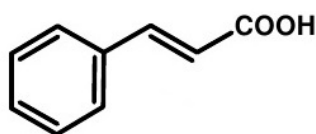


Figura 10. Acido cinnamico

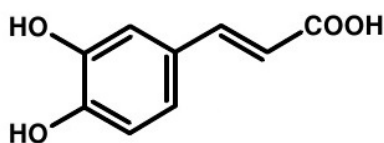


Figura 11. Acido caffeico (acido 3,4-idrossicinnamico)

Nel carciofo i più abbondanti acidi fenolici appartengono agli acidi mono- e difeoilchinici (Lattanzio, *et al.*, 2009), ma sono abbondanti anche l'acido caffeico (acido 3,4-idrossicinnamico) ed in generale i depsidi, isomeri di posizione dell'acido caffeico, esteri dell'acido chinico (Figura 12) (Lattanzio *et al.*, 2009).

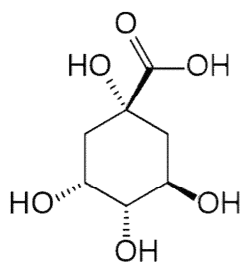


Figura 12. Acido chinico

Il più conosciuto derivato dell'acido caffeoilchinico, anche se non il più abbondante in estratti di carciofo, è la cinarina (acido 1,3-O-dicaffeoilchinico, secondo la vigente nomenclatura IUPAC) (Figura 13); questo composto fu isolato e caratterizzato in estratti di foglie di carciofo da Panizzi e Scarpati ne 1954.

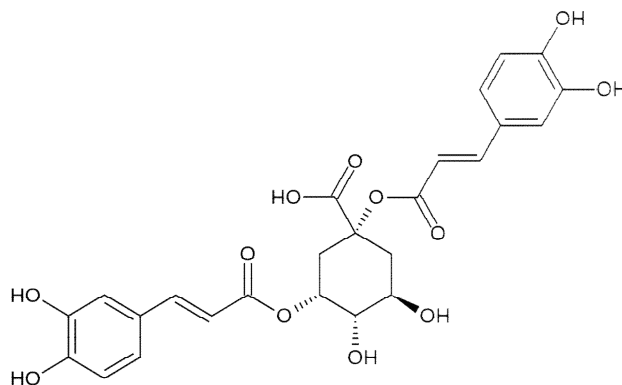


Figura 13. Cinarina o acido 1,3-O-dicaffeoilchinico (IUPAC 1976)

Da allora sono stati isolati e caratterizzati numerosi altri derivati dell'acido chinico, in forma di esteri con l'acido caffeico: l'acido clorogenico (acido 3-O-caffeoilchinico, IUPAC) (Figura 14) è il componente più abbondante e rappresenta circa il 39% del contenuto di acidi caffeilchinici totali

(Lattanzio *et al.*, 2009). Altri importanti acidi fenolici sono alcuni acidi caffeilchinici presenti nelle foglie e nei capolini: acido 1,5-O-dicaffeoilchinico (Figura 15), acido 3,4-O-dicaffeoilchinico, (Lattanzio *et al.*, 1994, 2009)

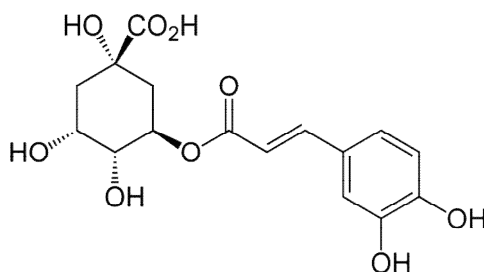


Figura 14. Acido clorogenico (acido 3-O-Caffeoilchinico)

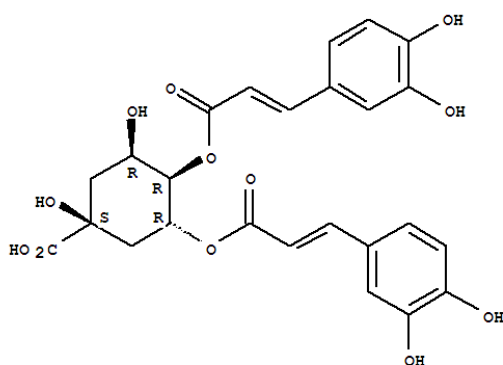


Figura 15. Acido 1,5-O-dicaffeoilchinico

2.2.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono polifenoli in gran parte idrosolubili, soprattutto perché di solito sono presenti nella pianta in forma glicosidica (Pietta, 2000). La loro struttura chimica di base possiede uno scheletro C6-C3-C6, ossia due anelli aromatici contenenti uno o più gruppi fenolici, uniti da un ponte di tre atomi di carbonio di solito presenti in forma ciclica ossigenata. La via biosintetica dei flavonoidi deriva dal p-cumaril-CoA, che si condensa con tre molecole di malonil-CoA a formare un intermedio, chiamato calcone, da cui si diparte la via biosintetica che porta ai flavonoidi e isoflavonoidi. Il p-cumaril-CoA è un intermedio della via dell'acido shikimico (biosintesi dei

fenilpropanoidi), mentre il malonil-CoA è un intermedio chiave nell'allungamento della catena carboniosa degli acidi grassi.

Sono presenti nelle felci e in tutte le piante superiori, dove si trovano sia come agliconi sia, in maggior misura, come glicosidi. Essi si differenziano per i loro sostituenti, rappresentati principalmente da gruppi ossidrilici e metossilici, e per la natura e la posizione della parte zuccherina. Sono stati isolati più di 2.000 composti flavonoidi, i quali costituiscono la più ampia classe di prodotti naturali di tipo fenolico. Nell'ambito della famiglia dei flavonoidi è possibile distinguere sei classi principali: flavanoli (catechina, epicatechina), flavonoli (quercetina), flavanoni, flavoni, isoflavoni, antocianine (Figura 16).

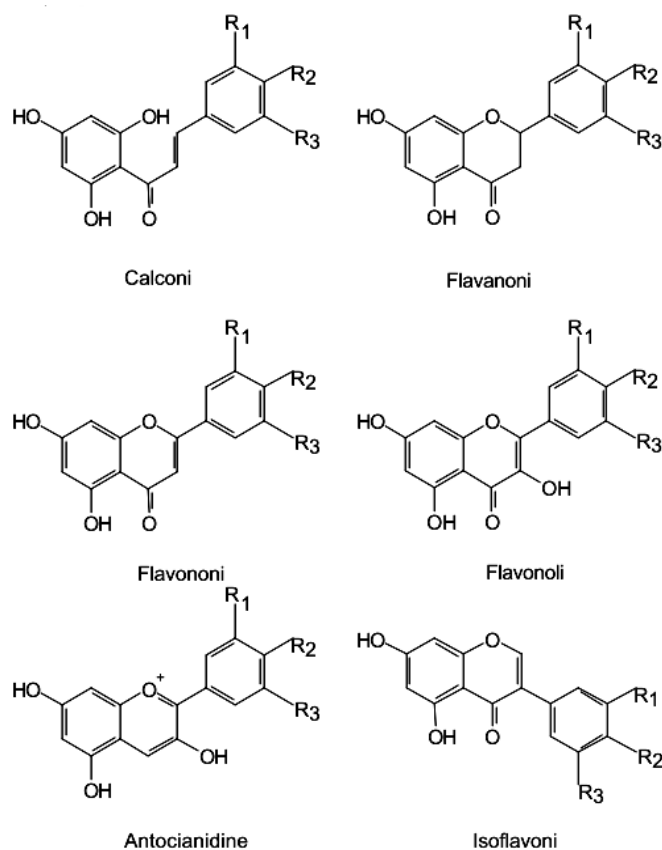


Figura 16. Le sei classi di Flavonoidi

Sono composti variamente colorati, in genere in giallo, e contribuiscono al colore dei fiori e frutti,

dove sono presenti come glicosidi sciolti nel succo cellulare. Una particolare eccezione è rappresentata dalle antocianidine (o antociani) e dai loro glucosidi (conosciuti come antocianine), che sono rossi, violetti o blu a seconda del pH del succo della cellula.

Nel carciofo i flavonoidi costituiscono circa il 10% dei polifenoli totali. Sono stati descritti i flavonoidi luteolina (Figura 17), apigenina (Figura 18) e i loro glicosidi (luteolina-7-O-glucoside o cinaroside (Figura 19), luteolina-7-O-rutinoside o scolimoside, e apigenina-7-O-glucoside) che costituiscono costituenti minori del contenuto fenolico totale (<10%) (Lattanzio *et al.*, 2009).

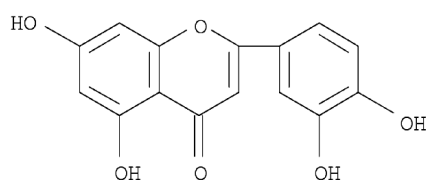


Figura 17. Luteolina

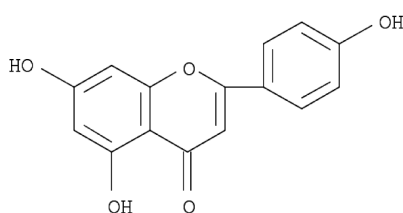


Figura 18. Apigenina

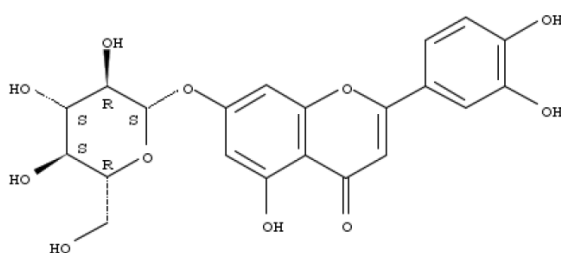


Figura 19. Cinaroside

Alcuni lavori (Aubert e Foury, 1981; Schütz *et al.*, 2004) hanno in oltre rilevato la presenza di diversi tipi di antociani (o antocianine), una classe di flavonoidi che costituiscono uno dei più

importanti gruppi di pigmenti vegetali, presenti in petali, fiori e frutti, la cui struttura molecolare di base è costituita dal catione flavilio (Figura 20)

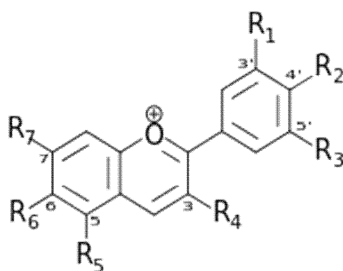


Figura 20. Il catione flavilio

Tra gli antociani identificati nel carciofo troviamo: cianidina 3-O- β -glucoside (Figura 21a) cianidina 3-O- β -sophoroside (Figura 21b), cianidina 3,5-diglucoside (Figura 21c), cianidina 3-(3"-malonil)glucoside (Figura 21d), cianidina 3-(6"-malonil)glucoside (Figura 21e), peonidina 3-O- β -glucoside (Figura 21f), peonidina 3-(6"-malonil)glicoside (Figura 21g).

Numerosi autori hanno rivelato un elevato grado di variabilità nel contenuto di polifenoli, in relazione alla fase fisiologica, al genotipo, alla parte anatomica, alle condizioni ambientali, alle pratiche colturali e di post-raccolta (Lattanzio e Morone, 1979; Fratianni *et al.*, 2007; Lattanzio *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2010; Negro *et al.*, 2011; Pandino *et al.*, 2011a, 2011b, 2011c, 2012a).

I flavonoidi e gli acidi fenolici sono i più importanti antiossidanti polifenolici presenti nella dieta (Maffei M., 1999; Negro *et al.*, 2012 ; Azzini *et.al.*, 2007).

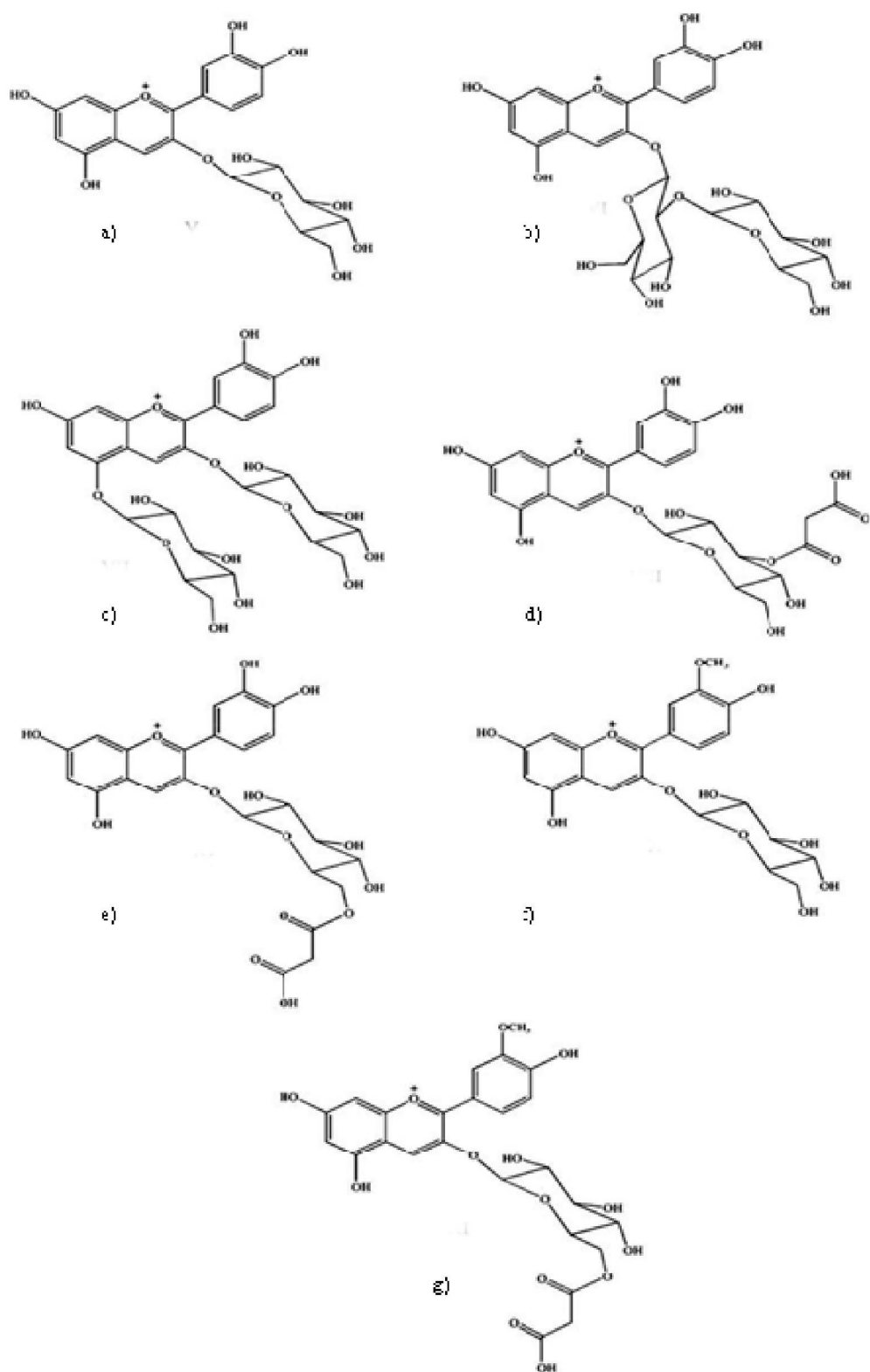


Figura 21. Antociani identificati in carciofo

2.3 Inulina

L'inulina è un carboidrato idrosolubile costituito da una miscela di fibre lineari di lunghezza variabile, costituite da un numero variabile di molecole di fruttosio (Figura 22) unite da legami glicosidici β -(2 $\rightarrow$ 1) con un α -D-glucosio in posizione terminale (Hellwege *et al.*, 2000). Appartiene al gruppo dei fruttani, i più abbondanti carboidrati non strutturali contenuti nel vacuolo di circa il 15% di tutte le specie di piante da fiore (Hellwege, *et al.* 2000; Liischer, *et al.*, 1996) con funzione di riserva a lungo termine, crioprotezione e regolazione osmotica. (Roberfroid, 2004).

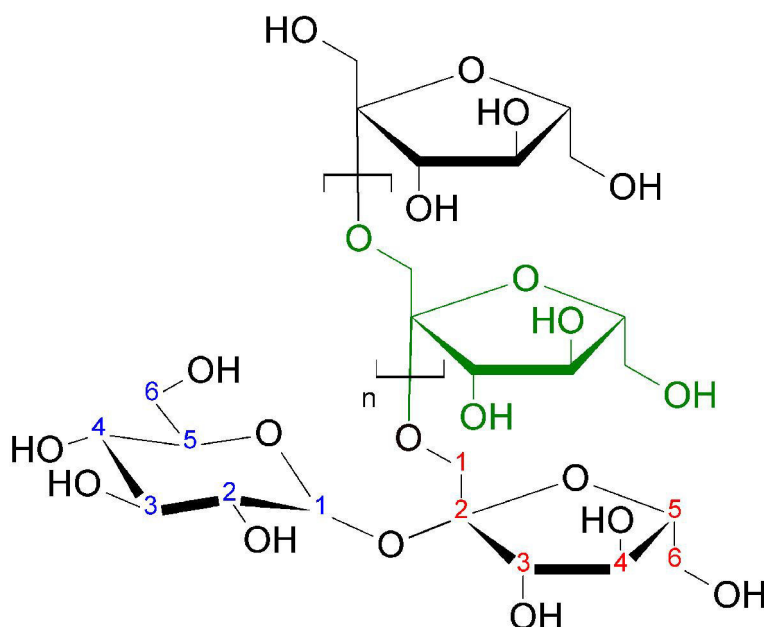
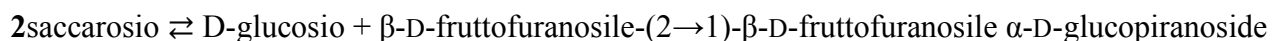


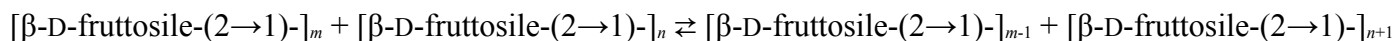
Figura 22. Molecola di inulina

L'inulina è sintetizzata mediante l'azione combinata di almeno due diverse fruttosiltrasferasi. (Hellwege, *et al.*, 1998; Hellwege, *et al.*, 2000) In un primo passo la saccarosio:saccarosio 1-fruttosiltrasferasi (1-SST) catalizza la formazione del trisaccaride 1-kestoso da due molecole di saccarosio con rilascio di glucosio.



Successivamente, la 2,1-fruttano:2,1-fruttano 1-fruttosiltransferasi (1-FFT) media il trasferimento

reversibile dei residui di fruttosio tra molecole di inulina di lunghezza differente.



Il numero di unità di fruttosio presenti in una catena determina il grado di polimerizzazione (DP) della molecola. Esso dipende dalla specie vegetale, dall'età della pianta e dalle condizioni ambientali (Roberfroid, 2004) ed influenza fortemente le caratteristiche funzionali della molecola come la solubilità e la capacità di formare microcristalli se disciolta in acqua. (Lopez-Molina *et al.*, 2005).

Il grado di polimerizzazione ed il contenuto di inulina in alcune specie vegetali edibili è stato analizzato in numerosi lavori ed è riportato in tabella 2 (Roberfroid, 2004; Praznik e Beck, 1985).

Tabella 2. Contenuto e grado di polimerizzazione (DP) dell'inulina in alcune specie vegetali

PIANTA	Inulina (g/l)	Grado di polimerizzazione (DP)
Carciofo (<i>Cynara scolymus</i>)	2-7	DP _{≥5} =95%; DP _{≥40} =87%
Cicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	15-20	DP 2 – 65; DP ≤ 40 = 92%
Topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i>)	17 – 20,5	DP 2 – 50; DP ≤ 40 = 94%

Cicoria (*Chicorium intybus*) e topinambur (*Helianthus tuberosus*), sebbene sintetizzino molecole a basso peso molecolare, rappresentano le principali specie dalle quali viene commercialmente estratta l'inulina. (Lopez-Molina, *et. al.*, 2005). Il carciofo (*Cynara scolymus*) sintetizza le molecole a catena più lunga arrivando a formare polimeri fino a 200 unità, (Hellwege, *et al.*, 2000; Praznik e Beck, 1985) e con un grado di polimerizzazione maggiore di 40 nell'87% delle molecole che costituiscono la miscela di catene lineari (Roberfroid, 2004, Ronkart *et al.*, 2007). L'alto valore

medio (Tabella 3) del grado di polimerizzazione dell'inulina estratta dal carciofo avvicina le sue proprietà a quelle dell'inulina di più elevata qualità estraibile dalla cicoria e permetterebbe un suo impiego in applicazioni industriali simili (Lopez-Molina, *et al.*, 2005, Lattanzio 2009).

Tabella 3. Caratteristiche chimico-fisiche dell'inulina estratta da carciofo

Grado medio di polimerizzazione	46
Inulina/oligofruttosio (% di D.M.)	99.5
pH (10% w/w)	5-7
Taste	Neutro
Sweetness (saccarosio = 100%)	Nessuno
Solubilità in acqua a 25°C (g/l)	5

In anni recenti è stata ampiamente investigata e scientificamente documentata la capacità dell'inulina di influenzare positivamente la composizione della microflora intestinale. I fruttani in generale, non possono essere digeriti nell'intestino umano in quanto è sprovvisto degli enzimi necessari, per cui molecole come l'inulina possono raggiungere la parte terminale del colon e divenire un substrato di crescita per i batteri, facendoli divenire predominanti nell'ambiente microbiologico intestinale (Roberfroid e Delzenne, 1998). È stato osservato che questo determina una diminuzione del contenuto di acidi grassi a catena corta nelle feci e della concentrazione di sostanze tumorali come l'ammoniaca (Gallagher *et al.*, 1996; Heyer *et al.*, 1998). Questa caratteristica di non essere assorbibile dal primo tratto gastrointestinale, colloca l'inulina nei così detti 'oligosaccaridi non digeribili' (non-digestible oligosaccharides: NDO), una categoria di 'alimenti funzionali' che hanno le seguenti proprietà: attività prebiotica (un termine con cui si intende la capacità, da parte di una sostanza assunta con l'alimentazione, di incrementare il numero e l'attività dei batteri lattici e bifidobatteri nell'intestino umano); capacità di modificare positivamente le abitudini intestinali, di incrementare l'assunzione di calcio e di interagire con il metabolismo

lipidico. Inoltre, l'inulina risulta essere una fibra a basso contenuto calorico che potrebbe essere utilizzata nella produzione di cibi con contenuto di grassi ridotto (Van Loo *et al.*, 1999). Queste proprietà danno sempre maggior risalto al ruolo che potrebbe assumere questo polisaccaride come sostanza prebiotica, naturalmente presente in alcuni alimenti od aggiunta come ingrediente nella formulazione di alimenti funzionali.

3. TECNICHE *IN VITRO* PER LA PRODUZIONE DI METABOLITI SECONDARI

La maggior parte dei metaboliti secondari utilizzati dall'uomo è stata ottenuta, fino a pochi decenni addietro, esclusivamente mediante estrazione diretta dalla pianta di interesse. Tuttavia tale pratica può presentare alcuni inconvenienti: le piante possono essere difficilmente reperibili; la loro coltivazione può essere difficile o impossibile in climi diversi da quello di origine; la sintesi dei prodotti d'interesse è circoscritta ad un particolare stadio del ciclo vitale.

Un'altra via per la produzione di metaboliti secondari è rappresentata dalle colture cellulari. La produzione di metaboliti secondari mediante la coltura di tessuti vegetali *in vitro* si basa sulla premessa che gli stessi prodotti rinvenuti in natura all'interno di un organo, di un frutto o di altri tessuti, possono essere indotti ad accumularsi in cellule indifferenziate.

I fattori che influiscono sulla sintesi di metaboliti secondari *in vitro* sono molteplici: tipo di materiale di partenza, mezzo di coltura (ad esempio la quantità di carboidrati presenti influisce sulla biomassa, perchè la crescita è eterotrofa), tipo e quantità di ormoni presenti, luce (il passaggio della luce a intensità e in quantità ottimali rappresenta un prerequisito per la massima espressione dei metaboliti), temperatura. Nonostante il numero di variabili insite nel processo la coltura *in vitro* rappresenta una alternativa economicamente vantaggiosa rispetto al materiale *in vivo*.

I principali vantaggi delle colture cellulari sono:

- Sintesi dei metaboliti secondari bioattivi in ambiente controllato e, quindi, indipendenza dalle condizioni climatiche e del terreno;
- Eliminazione delle influenze biologiche negative che colpiscono la produzione dei metaboliti secondari in natura, quali microrganismi e insetti;
- Selezione delle cultivar che possiedono una più elevata produzione di metaboliti secondari;
- Presenza di definiti sistemi di produzione che portano a una migliore qualità e resa del prodotto;
- Assenza, negli estratti, di residui di erbicidi o d'inquinanti ambientali, poichè la coltura è condotta in condizioni asettiche;

- Possibilità di estrarre immediatamente il materiale biologico non appena la coltura ha raggiunto le dimensioni adeguate; eliminando così il problema della raccolta, trasporto e stoccaggio del prodotto;
- Salvaguardia dell'ambiente in quanto non si esegue una raccolta intensiva;
- Conservazione del materiale riprodotto per lunghi periodi.

Le colture *in vitro* per la loro versatilità nella produzione di composti bioattivi sono state definite da Ramachandra Rao e Ravishankara (2002) come “fabbriche chimiche di metaboliti secondari”.

3.1 Colture di calli e sospensioni cellulari

La produzione di colture di cellule e di tessuti in mezzo solido o liquido rappresenta un settore delle biotecnologie vegetali di relativa recente introduzione. Queste tecnologie si sono rivelate uno strumento estremamente utile nei settori produttivi che prevedono la produzione su larga scala di metaboliti secondari delle piante di interesse per l'industria alimentare e medico-farmaceutica.

Una volta identificato il principio attivo e selezionato il genotipo che produce il composto in quantità più elevate, per generare una linea cellulare viene utilizzata una porzione di tessuto della pianta. Le cellule vegetali già differenziate, conservano la capacità di sdifferenziarsi ritornando alla condizione di pluripotenza e dando origine ad ammassi amorfi di cellule chiamati calli. La coltura di callo si ottiene generalmente a partire da frammenti di organo o di tessuto contenenti meristemi o cellule metabolicamente attive come i parenchimi. Questi espianti di partenza devono essere sterilizzati superficialmente per eliminare i microrganismi che nel mezzo di coltura, ricco di zuccheri e nutrienti vari, prenderebbero il sopravvento sulle cellule vegetali. Dal tessuto si ottiene quindi un aggregato cellulare chiamato callo che può essere mantenuto in coltura in modo pressochè indefinito. I metaboliti secondari sono prodotti nella fase di plateau della curva di crescita cellulare: inizialmente le cellule accumulano sostanze, cioè fonti di C, ma non le ossidano; successivamente, nella fase esponenziale e in quella logaritmica, le impiegano per trarre energia per l'accrescimento cellulare (metabolismo primario); solo nella fase stazionaria producono i metaboliti secondari. Sono

indispensabili più cicli di subcoltura del callo per raggiungere una produzione costante di metaboliti secondari. La coltura di cellule in sospensione rappresenta un sistema in fase liquida dove le cellule derivate dalla disgregazione di un callo friabile, vengono coltivate singolarmente o in piccoli aggregati (Figura 23). In tale sistema, le cellule sono tutte nelle stesse condizioni ambientali e possono essere coltivate in poco spazio grandi quantità di biomassa.

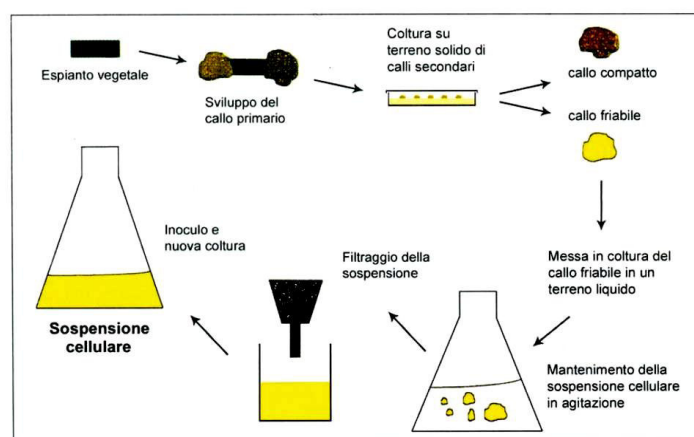


Figura 23. Rappresentazione schematica per la preparazione di colture cellulari in sospensione

Lo sviluppo cellulare avviene secondo una tipica curva di crescita di Figura 24. All'inizio si ha una fase di latenza in cui il numero di cellule rimane costante, ma si intensificano tutte le attività metaboliche; la lunghezza di questa fase varia secondo lo stato fisiologico delle cellule.

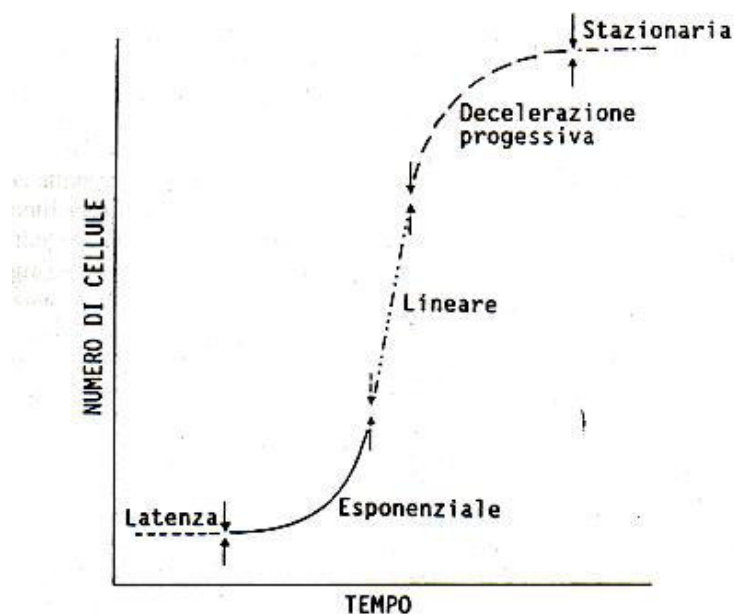


Figura 24. Curva di crescita di una sospensione cellulare suddivisa nelle varie fasi (da Wilson *et al.*, 1971)

A livello biochimico coincide con un aumento di ATP per effetto della ossidazione dei carboidrati, aumento di proteine e acidi nucleici. Seguono una fase di crescita esponenziale che diminuisce in velocità quando uno o più fattori nutritivi divengono fattori limitanti (zucchero, vitamine, aminoacidi). In questo stadio le cellule sono in prevalenza morfologicamente indifferenziate (cellule meristematiche), mentre nella successiva fase lineare, in cui la moltiplicazione cellulare rallenta fino ad arrestarsi, aumenta la dimensione cellulare. Al termine di questa fase si ha uno stadio stazionario (plateau), probabilmente raggiunto per esaurimento di qualche elemento nutritivo; mentre continuano ancora le attività metaboliche ed aumenta la quantità di cellule con grandi vacuoli. Le cellule vegetali hanno una crescita molto più lenta di batteri, lieviti e cellule animali, ma in coltura hanno il metabolismo accelerato rispetto ai tessuti differenziati nelle piante intere, col risultato di una veloce proliferazione di biomassa e un ciclo biosintetico condensato, le vie biosintetiche diventano attive in 2-4 settimane mentre nella pianta da settimane ad anni (Dörnenburg e Knorr, 1995).

3.2 Hairy roots

Le radici coltivate *in vitro* sono state utilizzate in molti lavori come fonte di metaboliti secondari. Ci sono due ragioni per questa scelta:

- La maggior parte dei metaboliti secondari sono prodotti o sono maggiormente accumulati in tessuti differenziati.
- Gli organi in coltura sono geneticamente più stabili delle colture cellulari.

Tuttavia, le radici sono caratterizzate da una crescita lenta. Come alternativa si utilizzano colture di “hairy roots” (HR). Queste sono ottenute da piante infettate con *Agrobacterium rhizogenes* che stimola l’emissione di radici avventizie. Questo fenomeno è dovuto 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: l’attivazione di questi geni causa, fra l’altro, la neoplasia organogenetica che si manifesta sotto forma di radici. I geni del T-DNA posseggono e riconoscono segnali di tipo eucariotico e una volta entrati nella cellula superiore, si esprimono. Alcuni di essi producono enzimi i quali portano alla modificazione di certi aminoacidi in molecole chiamate opine che il solo batterio infettante è in grado di metabolizzare come fonte di carbonio e di azoto.

Mediante la trasformazione, con il plasmide Ri di *A. rhizogenes*, di espianti vegetali *in vitro*, è possibile ottenere e coltivare HR conseguendo tutti i vantaggi della coltura *in vitro*: facile manipolazione e controllo, crescita indipendente da cambiamenti climatici, sterilità, lavorazione e purificazione relativamente semplici ed economici (Weathers *et al.*, 2010).

Le HR prodotte in seguito al trasferimento del T-DNA del plasmide Ri, hanno la capacità di accrescersi molto rapidamente senza l’aggiunta di auxine di sintesi e, grazie alla loro stabilità genetica, hanno un livello di produzione di metaboliti secondari piuttosto stabile (Ramachandra Rao, 2002). Le HR rappresentano una valida alternativa alle colture cellulari per la produzione di metaboliti secondari. Nell’ultimo decennio le HR sono state utilizzate per la produzione di numerosi tipi di biomolecole come anticorpi, citochinine, vaccini ed enzimi (Obembe *et al.*, 2011).

4. OBIETTIVI DELLA TESI

Il crescente interesse verso alimenti ricchi di composti nutraceutici ha orientato l'attenzione dell'industria verso il carciofo (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.), in virtù del suo alto contenuto in polifenoli (acidi caffeilchinici, flavoni) e inulina, composti ad elevata capacità antiossidante e prebiotica. Grazie al contenuto di tali composti, il carciofo rientra tra i prodotti funzionali secondo quanto definito dalla Commissione Europea (FuFoSE). Tuttavia, il loro contenuto varia in funzione della varietà, dell'organo considerato, dello stato fisiologico, delle condizioni pedo-climatiche e agronomiche. L'interazione di tali fattori rende quindi difficile l'approvvigionamento di materiale vegetale con caratteristiche standardizzate.

La coltura di cellule e/o tessuti *in vitro* ha la potenzialità di superare questi inconvenienti rappresentando una strategia alternativa per l'estrazione di metaboliti secondari bioattivi per l'industria farmaceutica.

A tal fine, la messa a punto di un sistema di coltura cellulare *in vitro* di carciofo e del suo scale-up rappresenta il primo passo per la validazione di questa strategia per la produzione di molecole d'interesse industriale su larga scala.

Obiettivo della tesi di dottorato è stato quello di mettere a punto strategie innovative per la produzione di molecole bioattive (acidi caffeilchinici, flavoni ed antociani) e probiotiche (inulina) da colture cellulari e da organi (radici, hairy roots) di carciofo.

A tale scopo, per la produzione ed analisi dei polifenoli sono state definite le condizioni sperimentali per l'allestimento di colture cellulari da tessuti fogliari di piantine *in vitro* e gli estratti analizzati, con metodi spettrofotometrici e cromatografici (HPLC) per il contenuto in polifenoli totali, in acidi caffeilchinici totali e per l'attività antiossidante.

Per quanto riguarda l'inulina sono stati ottenuti e analizzati diversi tipi di materiale vegetale al fine di individuare il sistema più idoneo alla sua produzione *in vitro*. In particolare, sono state allestite le seguenti tipologie di colture: a) radici; b) callo da espianti radicali; c) HR indotte mediante infezione con *Agrobacterium rhizogenens*.

Il contenuto di inulina dei materiali prodotti *in vitro* è stato confrontato sia con quello di radici di piante di carciofo allevate in un sistema idroponico, realizzato durante il dottorato, sia con radici di piante allevate in campo. Gli estratti sono stati analizzati mediante HPLC.

5. EVALUATION OF CAFFEYOYLQUINIC ACIDS, ANTHOCYANINS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN CALLUS AND SUSPENSION CULTURE OF *CYNARA SCOLYMUS* L.

5.1 Introduction

There is increasing interest in the secondary metabolites produced in plants. In fact, polyphenols are one of the largest group of phytochemicals implicated in plant growth, and reproduction. They have potent antioxidant properties and beneficial effects on human health: there is a strong relationship between their intake and the decrease in the incidence of cardiovascular disease and certain forms of cancer (Holst e Williamson, 2008). Additionally, polyphenols are important determinants of food flavour, texture, colour and sensory perception (Shahidi, 1997). Because of their health-promoting effects and growing public interest in replacing the synthetic antioxidants in foods with natural ones, the exploitation of crop residues to extract bioactive compounds has recently reviewed (Sundram e Samman, 2006). However, the production of polyphenols and their accumulation in plants is recognized as being modulated by both abiotic (i.e. growing environment, crop management, post-harvest handling) and biotic factors (genotype, weeds, pathogens) (Beckman, 2000). Overall, these factors do not produce standardized features in the raw material. This has prompted industries, as well as scientists, to consider cell culture technology as an alternative source of pharmaceutical plant compounds (Mulabagal e Tsay, 2004). In vitro cultures may provide a continuous and reliable source of bioactive compounds, and could be used for the large-scale culture of plant cells, thus making the process standardized and economically sustainable. In addition, in vitro cultures enhance these compounds by modifying culture conditions or by the application of stress factors (Knorr *et al.*, 1994).

Cynara cardunculus L. is a complex species, native to the Mediterranean Basin, which consists of the globe artichoke [var. *scolymus* (L.) Fiori], the cultivated cardoon (var. *altilis* DC.) and the wild cardoon [var. *sylvestris* (Lamk) Fiori], and plays an important economic role in the Mediterranean

area. The main product of the globe artichoke consists of immature inflorescences (heads or capitula), which can be utilized for both fresh consumption and food industry, and as a component of many recipes, because it combines good sensory properties with healthy properties. Those properties have been related to its high level of polyphenols (Pandino *et al.*, 2012a). In particular, besides common use the crop residues, above all leaves of globe artichoke, have been exhaustively studied in terms of their caffeoylquinic acids and flavones content (Kukić *et al.*, 2008, Pandino *et al.*, 2012b), which both exhibit a wide range of biological activities (Dong *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2010). Despite the known advantages of the cell culture technology in some crops (Grzegorzczuk, *et al.*, 2007; Ravindra e Narayan, 2003; Tadhani *et al.*, 2007), in *C. cardunculus* very little attention has been paid to the polyphenol content of in vitro cell cultures (Menin *et al.*, 2013; Trajtemberg *et al.*, 2006), and no systematic attempt has as yet been made to detail how cell growth can influence the polyphenol content and profile. Based on previous results on polyphenol accumulation in calluses of globe artichoke (Menin *et al.*, 2013), the aim of our study was to develop an alternative ‘in vitro’ system for the production of biomolecules of a nutraceutical interest, which have already been studied from a qualitative and quantitative viewpoint ‘in vivo’. Therefore, callus and cell suspension culture of globe artichoke were established to investigate their total polyphenol and anthocyanin content and antioxidant potential. In addition, the fluctuation in polyphenol profile and antioxidant activity as influenced by cell growth was also analysed.

5.2 Material and methods

5.2.1 Chemicals

Reagents and solvents were purchased from VWR (Leighton Buzzard, UK) and were of analytical or HPLC grade. Apigenin-7-*O*-glucoside, apigenin, luteolin-7-*O*-glucoside, luteolin, 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), cyanidin chloride, cyanidin-3-glucoside and hesperetin were obtained from Extrasynthese (Lyon, France), cynarin (1,3-di-*O*-caffeoylquinic acid) was from Roth (Karlsruhe, Germany). Reagents for cell culture: Murashige e Skoog medium (MS) including

vitamins (Murashige e Skoog, 1962), α -naphthalene acetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (6-BAP) and Plant agar were analytical grade and purchased from Dukefa (Haarlem, The Netherlands). Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA) ultrapure water was used throughout this research.

5.2.2 Culture Initiation, Medium Composition and Tissue Culture Conditions

Callus cultures were established from in vitro leaves of globe artichoke “Grato 1”, which is an interesting clone isolated from the varietal group of ‘Romaneschi’. For callus induction, explants were inoculated on MS medium supplemented with 2 mg L⁻¹ NAA, 5 mg L⁻¹ BAP, 3% (w/v) sucrose and 7 g L⁻¹ Plant agar, adjusted to pH 5.8. The cultures were incubated at 24±2°C in the dark for the first four weeks, then moved into the light (37.5 μ E m⁻² s⁻¹) under a 16-h photoperiod provided by cool-white fluorescent lamps (Philips TL-D 36 W/865). Two types of “Grato 1” calli were observed after the third subculturing: a light green callus and green/red-pigmented callus. Cell-line selection was carried out by visual screening; subcultures were performed at 4-week intervals for one year.

Suspension cultures were established as described previously (Ordas *et al.*, 1991). Briefly, 5g fresh weight (FW) of the callus was transferred to a 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of MS liquid medium, described above. The suspension cultures were incubated at 24±2 °C on a rotary shaker (130 rpm) in the light. Cells were filtered after ten days through 500, 250 and 125 μ m mesh filters, respectively to remove cell aggregates. Cells settling on the last filter were resuspended in 50 mL of fresh medium and incubated further. Cells were subcultured every 20 days by inoculating cell suspensions into fresh medium (1:5 v/v). The inoculum size was approximately 3 g fresh weight in 50 mL of liquid medium. Cell growth was determined by measuring the cell volume after sedimentation (CVS), as described in Natali *et al.*, (2011). All measures were performed in triplicate.

5.2.3 Quantification of Total Polyphenols and Anthocyanins

Total polyphenols were quantified using a modified Folin-Ciocalteu method (Cicco *et al.*, 2009). The lyophilised samples (100 mg) were diluted in 1mL of 70% methanol and stirred at room temperature for 1h, with shaking. The mixture was centrifuged at 5000g for 5 min at 25°C and an aliquot, properly diluted, was mixed with Folin-Ciocalteu reagent and allowed to react at room temperature for 2 min. Sodium carbonate (5%, w/v) was added and put in a temperature bath at 40°C for 20 min. The tubes were then rapidly cooled and the absorbance was read at 760 nm using a Shimadzu 1601 UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). Total polyphenol values were reported as chlorogenic acid equivalents.

Total monomeric anthocyanin content was determined using the pH-differential method (Lo Scalzo *et al.*, 2008). A total of 100 mg of powdered freeze-dried material was dissolved in two solutions [potassium chloride (0.025M) at pH 1.0 and sodium acetate (0.4M) at pH 4.5], and stirred at room temperature for 1h. The solution was then filtered through a Whatman No. 4 filter paper, and the absorbance was recorded at 515 nm using a spectrometer. The difference in absorbance between the two pH values and wavelengths was used to calculate anthocyanin content as cyanidin-3-glucoside equivalent. All data presented are mean values of three independent experiments (n=3) and expressed as g kg⁻¹ of dry matter (DM).

5.2.4 Extraction procedure and HPLC analysis

The extraction procedure for caffeoylquinic acid and flavone profile was carried out as described by Pandino *et al.* (2012a). The anthocyanin extracts were prepared as follows: 100 mg of the lyophilised sample were treated with 5 ml of 70% ethanol, acidified with 37% HCl (pH 2.2±0.1), for 1 h at room temperature, with shaking. The mixture was centrifuged at 5000g for 5 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant was transferred to a microfuge tube and the sample was centrifuged once more with 1 mL of solvent. The supernatants were combined and kept at -20°C for

further analysis by HPLC.

Each extract was analysed using a series 1200 HPLC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with ChemStation software (B.03.01) and a diode array detection system. Separations were achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm; 5.0 μ m particle size), operated at 30 °C, with a 0.2 μ m stainless steel inline filter.

The HPLC conditions for the caffeoylquinic acid and flavone profile were adapted from Pandino *et al.* (2012a): the mobile phase was 1% formic acid in water (solvent A) and in acetonitrile (solvent B) at a flow rate of 0.5 mL/min. The gradient started with 5% B to reach 10% B at 10 min, 40% B at 30 min, 90% B at 50 min, 90% B at 58 min. Chromatograms were recorded at 280, 310, and 350 nm from the diode array and data were collected between 200 and 600 nm. Each compound was identified based on its retention time, UV spectrum and already published identification of compounds from globe artichoke (Wang *et al.*, 2003). Quantification was performed by a calibration curve using the available standards. Mono- and dicaffeoylquinic acids were calculated using 5-*O*-caffeoylquinic acid and 1,3-*O*-dicaffeoylquinic acid as references, respectively. Apigenin and luteolin conjugates were quantified as apigenin-7-*O*-glucoside and luteolin-7-*O*-glucoside, respectively.

The operating conditions for anthocyanin profile were performed according to Truong *et al.*, (2010), with a few modifications. The injection volume was set at 20 μ L with an eluent flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The elution solvents were A (1% v/v formic acid in water) and B (acetonitrile containing 1% formic acid) with the following gradient: 5% to 35% B from 0 to 15 min, 35% to 55% B from 15 to 35 min, 55% to 5% B from 35 to 55 min, and isocratic at 5%B from 55 to 60 min to equilibrate the column for the next injection. Spectral data from 200 to 600 nm were recorded, and the anthocyanin chromatograms were monitored at 515 nm. Identification of the anthocyanin compounds was ascertained based on chromatographic retention times, and spectral analysis, taking into account published data on globe artichoke (Schütz *et al.*, 2006a). Quantification was performed by calibration curves using the available standards. In particular, cyanidin-3-malonylglucoside was

calculated as cyanidin-3-glucoside equivalent. All data presented are mean values $\pm$ standard deviation of three independent experiments (n=3) and expressed as g kg⁻¹ of DM.

5.2.5. Determination of Antioxidant Activity

Antioxidant capacity of sample extracts was determined by FRAP (ferric reducing-antioxidant power) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assays.

FRAP assay. Briefly, an aliquot of sample extracts (10 μ L) was added to 30 μ L of water and 300 μ L freshly prepared of FRAP reagent. After 4 and 60 minutes, this reduction was measured at 595 nm using a microplate reader (Labsystems Multiskan Ascent) (Firuza *et al.*, 2005). Known concentrations of ferrous sulphate, in the range of 100-1750 μ mol L⁻¹, were used for the calibration. These were dissolved in the same solvent used for the extraction, to prevent different solvents from influencing the examined samples. Results were expressed as mmol Fe²⁺ kg⁻¹ of DM.

DPPH assay. An aliquot (0.1 mL) of each extract, used for the total polyphenol assay, was added to 3.9 mL of freshly prepared methanolic solution containing 0.24 g L⁻¹ DPPH, and held in the dark for 30 min at room temperature. The absorbance was then measured at 515 nm, using a UV–Visible spectrophotometer (Brand-Williams *et al.*, 1995). The working solution was prepared by dilution of methanolic DPPH to absorbance at $\approx$ 1.1 AU to gain the sufficient reaction capacity for higher contents of the antioxidant in extracts. The percentage inhibition of DPPH was obtained by the following equation: $[(AC(0)-AS(t))/AC(0)] \times 100$, where AC(0) is the absorbance of the blank control at the beginning of the assay, and AS(t) the sample absorbance after 30 min.

5.2.6. Statistical Analysis

All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were separated by LSD (least significant difference) tests, when the F-test was significant. Percent values were transformed to arcsin $\sqrt{x}$ (Bliss transformation) prior to analysis and then subjected to ANOVA.

5.3 Results and discussion

It is well known that the phenolics in globe artichoke leaves are potent antioxidants and that the genotype is mainly preserved from a donor plant to its tissue cultured plantlets. We thus induced callus and cell suspension cultures from *in vitro* leaf explants of globe artichoke, to investigate the feasibility of using plant tissue culture to increase homogeneous plant material with superior metabolite profiles. Thus, the focus was on sampling only a genotype “Grato 1”, selected on the basis of its known *in vivo* profile (Ciancolini *et al.*, 2013) and *in vitro* performance (data not shown).

In our tests, most “Grato 1” explants (83%) formed a callus at one of the cut ends within ten days of culture on MS medium containing 2 mg L⁻¹ NAA, 5 mg L⁻¹ BAP. On transferring cultures to the light, red-pigmented calli were observed after the third subculturing. These calli retained their red pigmentation during the next subcultures. The pigments were identified as anthocyanins (see below). Anthocyanins were not detected in dark grown callus cultures. By visually selecting the red-pigmented parts of the calli, an anthocyanin-producing and not-producing “Grato 1” suspension culture were established. Maximum anthocyanin formation was observed after one year of culture. Among the *in vitro*-derived materials, on average the cell suspension cultures accumulated higher total polyphenols (TP) and total anthocyanin (TA) contents, and showed enhanced antioxidant activities (DPPH and FRAP) compared to calli (Table 4). In agreement with our results, Ali *et al.*, (2013) also observed that cell suspension of *Artemisia absinthium* had a higher amount of TP and total flavonoids, as well as a better antioxidant activity than callus. These results suggest that the degree of cell culture differentiation affects the biosynthesis of TP, as reported in *Schisandra chinensis* where a different accumulation of phenolic acid was found between undifferentiated and organogenic calli (Szopa e Ekiert, 2012). Additionally, our findings indicate that there were significantly greater levels of all studied parameters in anthocyanin-producing than in not-producing cell suspension cultures (Table 4).

Table 4. Total polyphenols (TP) and total anthocyanins (TA) contents and antioxidant activity (DPPH and FRAP) in cell cultures of globe artichoke “Grato 1”. Different letters within each row indicate significance at Fisher’s protected LSD (least significant difference) test ($P \leq 0.05$).

Parameter	Callus	CSC	
		Green	Red
TP (g kg ⁻¹ of DM).	8.2 ^b	8.8 ^b	25.7 ^a
TA (g kg ⁻¹ of DM).	0.15 ^b	Nd	2.61 ^a
DPPH (%)	51.6 ^c	69.2 ^b	89.8 ^a
FRAP (mmol Fe ²⁺ of DM)	2.1 ^c	3.5 ^b	24.3 ^a

Abbreviation: CSC: cell suspension cultures; Red: anthocyanin-producing and Green: not-producing cultures; DM: dry matter; Nd: not detected; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP: ferric reducing-antioxidant power.

For example, there was an approximate 3-fold increase in TP in the anthocyanin-producing cell suspension cultures compared to the other cultures under study. In the light of these results, the “Grato 1” anthocyanin-producing suspension cultures were used for further investigations. To better investigate the correlation between cell growth and the biosynthesis of polyphenols, in suspension cultures, we followed the cell growth kinetics. This was monitored by measuring the cell volume after sedimentation (CVS) at intervals of 5 days, for 25 days (Fig. 25).

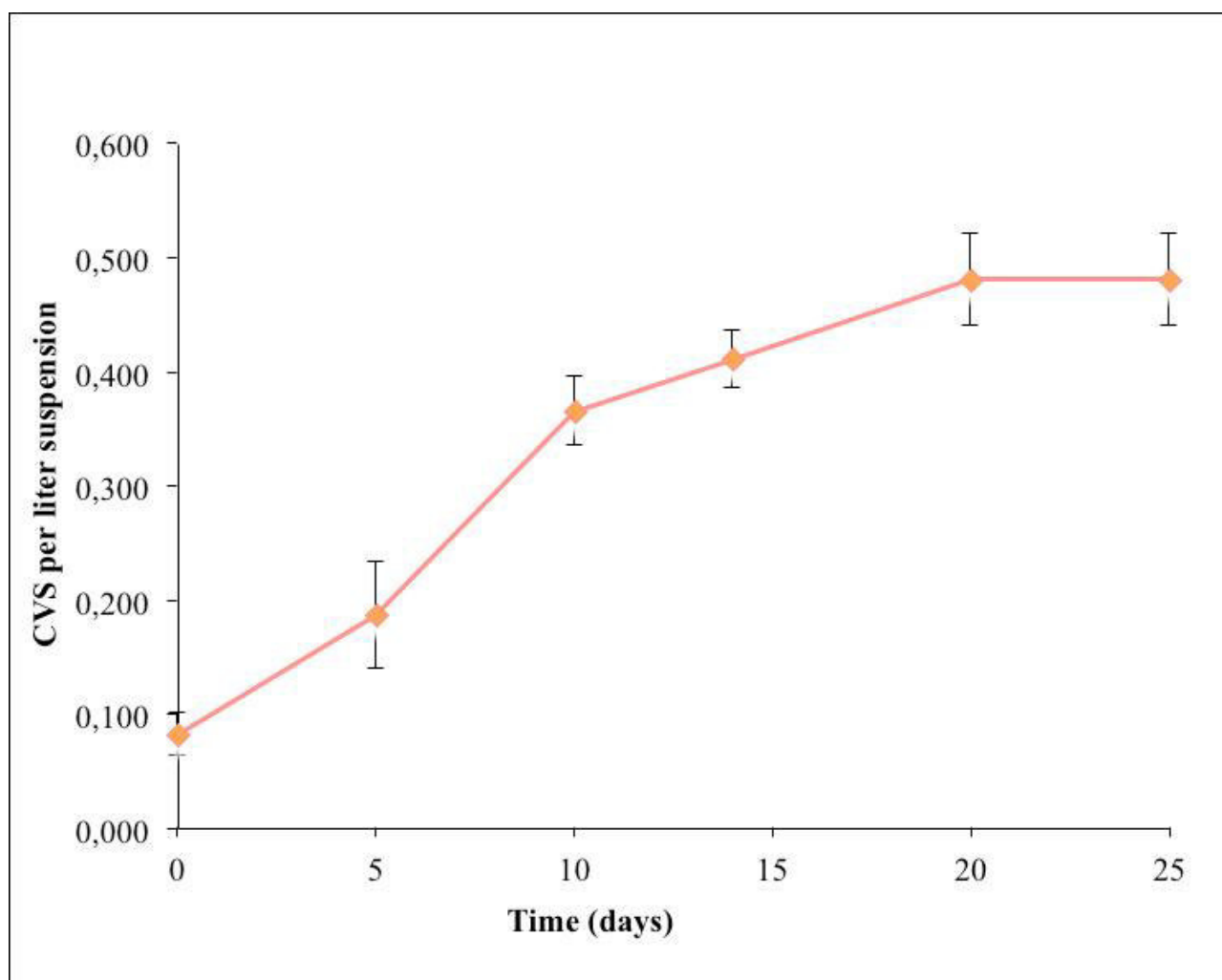


Figure 25. Time course of anthocyanin-producing cell suspension cultures of globe artichoke “Grato 1”, expressed as cell volume after sedimentation (CVS) per litre. Each point indicates the means $\pm$ SE of three replicates.

TP, total caffeoylquinic acids (TCA), TA and antioxidant potential were also estimated. Maximum cell growth (six-fold increase in CVS) was achieved on day 20 of culture, in the early stationary phase.

Peak TP and TCA values, 28.9 and 26.6 g kg⁻¹ of DM respectively, were observed on day 25 (Table 5), while no significant differences were found in the first 15 days. Similarly, 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid did not exhibit significant differences in the first 15 days. This compound was the most abundant, representing about 82% and 71% of TCA and TP.

Table 5. Phenolic content (g kg⁻¹ of DM) in anthocyanin-producing cell suspension cultures of globe artichoke “Grato 1” during one growth period of 25 days. Different letters within each row indicate significance at Fisher’s protected LSD (least significant difference) test ($P \leq 0.05$).

Compound	Time (days)				
	5	10	15	20	25
3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	0.31 ^d	0.50 ^c	0.49 ^c	0.55 ^b	0.62 ^a
5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	1.98 ^d	2.24±0.1 ^c	2.17±0.1 ^{cd}	2.77±0.1 ^a	2.51±0.1 ^b
3,5- <i>O</i> -dicaffeoylquinic acid	0.39 ^a	0.44±0.1 ^a	0.23 ^b	0.51 ^a	0.40 ^a
1,5- <i>O</i> -dicaffeoylquinic acid	15.29±0.3 ^b	14.23 ^b	14.74±0.2 ^b	20.71±0.3 ^a	21.18±1.1 ^a
4,5- <i>O</i> -dicaffeoylquinic acid	0.65 ^c	0.36 ^d	0.31 ^d	0.87 ^b	1.86±0.1 ^a
TCA	18.6^c	17.8^c	17.9^c	25.4^b	26.6^a
TP	21.8^b	22.6^b	21.1^b	27.6^a	28.9^a

Abbreviation: TCA: total caffeoylquinic acids; TP: total polyphenols.

In addition, 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid together with 5-*O*-caffeoylquinic acid were the predominant caffeic acid derivatives, in agreement with previous studies on leaves of *C. cardunculus* field-grown plants (Pandino *et al.*, 2013a; Pandino *et al.*, 2015). At the same time no flavonoids were detected in the present study. This discrepancy with the literature data (Wang *et al.*, 2003) could be linked to several factors, such as the genetic background and the growth conditions (Pandino *et al.*, 2012c). However, to the best of our knowledge, no data on the phytochemicals of globe artichoke cell suspension are available in the literature to enable us to make a comparison. However, when compared to *in vivo* data obtained in biomass of “Grato 1” by Ciancolini *et al.*, (2013), our results showed a higher TCA content than globe artichoke plants grown under field conditions. In addition, the level of TCA observed here was higher than in leaves reported by Pandino *et al.* (2013b) in other cultivated globe artichoke genotypes. This is in agreement with a previous report, where the TCA of *C. cardunculus* cardoon callus was more abundant than *in vivo* young leaves (Trajtemberg *et al.*, 2006). In medicinal plants, earlier studies have also recorded higher levels of phenolic compounds *in vitro* than in *in vivo* samples (Diwan *et al.*, 2012; Giri *et al.*,

2012). It should also be noted here that some anthocyanins were found. During cell growth, the TA content ranged from 1.43 to 2.41 g kg⁻¹ of DM, while the total measured anthocyanins (calculated as the sum of identified anthocyanin content) varied from 0.94 to 1.50 g kg⁻¹ of DM (Table 6).

Table 6. Anthocyanin content (g kg⁻¹ of DM) in cell suspension cultures of globe artichoke “Grato 1” during one growth period of 25 days. Different letters within each row indicate significance at Fisher’s protected LSD (least significant difference) test ($P \leq 0.05$).

Compound	Time (days)				
	5	10	15	20	25
cyanidin-3-glucoside	0.17 ^c	0.10 ^e	0.12 ^d	0.18 ^b	0.21±0.01 ^a
cyanidin malonylglucoside	1.24±0.04 ^a	0.80 ^d	0.85 ^c	0.98 ^b	0.87±0.01 ^c
cyanidin	0.09 ^b	0.04 ^c	0.03 ^d	0.05 ^c	0.13 ^a
TMA	1.50^a	0.94^d	1.00^c	1.21^b	1.21^b
TA	2.41^a	1.43^c	1.54^c	2.11^b	2.04^b

Abbreviation: TMA: total measured anthocyanin; TA: total anthocyanin.

Cyanidin malonylglucoside was the main anthocyanin compound, followed by cyanidin-3-glucoside and cyanidin, in line with a previous work regarding heads grown cultivated globe artichoke (Schütz *et al.*, 2006a). Its maximum accumulation was recorded in five days, thereafter decreasing by about 26% on day 10. The same trend was observed for the other compounds. Considering that this phenomenon coincided with the phase of rapid cell growth (Fig. 25), our results suggested that rapid cell growth affects the biosynthesis of anthocyanin compounds. This is confirmed by previous findings in grape and strawberry, where the accumulation of anthocyanin compounds changed in a similar manner (Saw *et al.*, 2012; Zhang e Furusaki, 1997). In the present experiment, these anthocyanins and TCA together represented 92% of TP and, thus, may have a direct contribution to the antioxidant activity. Here, we reported two different antioxidant activity assays (DPPH and FRAP), because the measurements are affected by specific conditions applied in that assay (Huang

et al., 2005). The DPPH assay uses organic radical producers, while the FRAP assay works with metal ions for oxidation. Our results highlighted a strong positive and statistically significant correlation between TP and both DPPH ($r= 0.84$, $p \leq 0.05$) and FRAP ($r= 0.85$, $p \leq 0.05$). A similar trend was recorded for TCA, while the relationship between antioxidant activities and TA was not statistically significant (Table 7).

Table 7. The correlation coefficients (r) of linear regression among total polyphenols (TP), total caffeoylquinic acids (TCA), total anthocyanins (TA) and the antioxidant activity tested by different methods in anthocyanin-producing cell suspension cultures of globe artichoke “Grato 1”.

Antioxidant activity test	Phytochemicals		
	TP	TCA	TA
DPPH	0.84 [*]	0.71 ^{ns}	0.10 ^{ns}
FRAP	0.85 [*]	0.72 ^{ns}	0.07 ^{ns}

Abbreviation: DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP: ferric ion reducing antioxidant power; ns: not significant. ^{*} significant at $P \leq 0.05$.

The highest values (91.4% and 31.4 mmol Fe²⁺ of DM) were achieved on days 20 and 25 in the early stationary phase, for the DPPH and FRAP assays, respectively (Table 8), in correspondence with the greater content of TCA. Therefore TCA may be considered as the main compounds involved in the antioxidant activity of globe artichoke cell suspensions. According to Holst e Williamson (2008), the antioxidant potential in polyphenols is closely dependent on their chemical structure and is primarily attributed to the high reactivity of hydroxyl substituents.

The higher antioxidant activity of TCA is partially ascribed to its free OH substituent, which is thought to increase the stability of the radical compound. The different antioxidant assays also play an important role in the antioxidant potential of a compound (Pekkarinen *et al.*, 1999). Although the anthocyanins detected here appear not to affect the antioxidant potential, their presence is highly

relevant given the importance of anthocyanins in cancer prevention (Wang e Stoner, 2008).

Table 8 DPPH radical scavenging and ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assays in anthocyanin-producing cell suspension cultures of globe artichoke “Grato 1” during one growth period of 25 days. Different letters within each row indicate significance at Fisher’s protected LSD (least significant difference) test ($P \leq 0.05$).

Antioxidant activity test	Time (days)				
	5	10	15	20	25
DPPH (%)	87.3 ^{cd}	88.6 ^{bc}	85.7 ^d	91.4 ^a	90.5 ^{ab}
FRAP (mmol Fe ²⁺ of DM)	26.1 ^{ab}	28.4 ^{ab}	23.7 ^b	30.6 ^{ab}	31.4 ^a

Abbreviation: DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP: ferric ion reducing antioxidant power; DM: dry matter.

5.4 Conclusions

Our findings highlighted the similarity in polyphenols profiles between globe artichoke “Grato 1” suspension cultures and the leaves from field-grown plants. In addition, cell suspension cultures of “Grato 1” accumulated significantly higher levels of total phenolics content than the leaves. Anthocyanin-producing suspension cultures exhibited very strong DPPH free radical scavenging activity and reducing power compared to the non-producing suspension culture, likely to due to the presence of anthocyanins in the cultures. In the former suspension cultures, we also found a positive correlation between the antioxidant potential and the total phenolics content. Anthocyanins have not previously been reported to be an artichoke’s leaf constituent.

In this study we established for the first time, an anthocyanin-producing cell culture and determined the optimal time to harvest cell suspension cultures in order to maximize their biochemical potential and antioxidant activity, and hence the industrial value. Since the *Cynara cardunculus* L. species is known to be an important constituent of healthy food, our results clearly showed that globe artichoke suspension cultures could be a promising source of antioxidant phenolic compounds.

However, further studies are needed to standardize the method and assess other growing conditions and genotypes to improve and/or keep under control the profile of these biomolecules.

6. ANALISI DEL CONTENUTO DI INULINA IN COLTURE *IN VITRO* DI CALLI E RADICI DI CARCIOFO

6.1 Introduzione

Il crescente interesse verso alimenti ricchi di nutraceutici ha orientato l'attenzione dei ricercatori verso il carciofo, per il suo alto contenuto di polifenoli e inulina, cioè di composti con elevata capacità antiossidante e prebiotica.

Il carciofo ha un basso contenuto energetico e lipidico, è ricco di polifenoli, proteine, sali minerali e fibra, insolubile e solubile. In particolare di quest'ultima categoria fa parte l'inulina, le cui proprietà chimico-fisiche (grado di polimerizzazione, peso molecolare medio, ecc.) nel carciofo dipendono da molteplici fattori, tra i quali genotipo, stadio fisiologico, epoca di raccolta (Di Venere *et al.*, 2005).

L'inulina è un polimero del fruttosio costituito da catene lineari, composte da un numero variabile di unità di fruttosio, legate con legami β -(2→1), ciascuna delle quali terminante con una molecola di glucosio (Hellwege, *et al.*, 2000). Più precisamente in questa forma si trova soprattutto nelle piante appartenenti all'ordine delle *Asterales*. Appartiene al gruppo dei fruttani, i più abbondanti carboidrati non strutturali contenuti nel vacuolo cellulare di circa il 15% delle piante da fiore (Hellwege *et al.*, 2000; Liischer *et al.*, 1996) con funzione di riserva. Si accumula nelle radici del carciofo nei periodi freddi, quando l'accrescimento è ridotto, per poi fornire in primavera l'energia necessaria alla crescita; ha un ruolo protettivo per la pianta nei confronti delle basse temperature e della siccità; per la sua presenza nel capolino è stata ipotizzata una funzione osmoregolatrice.

L'inulina viene solo parzialmente digerita nell'intestino tenue dell'uomo a causa della mancanza degli enzimi necessari all'idrolisi della molecola; promuove la crescita dei bifidobatteri della microflora intestinale (funzione prebiotica), contribuendo a inibire la presenza di batteri dannosi. Ha inoltre effetti benefici per la salute, poiché contribuisce a migliorare l'assorbimento di sali minerali come il calcio, regolare la concentrazione dei lipidi nel sangue e contribuisce alla prevenzione del cancro al colon.

L'inulina è presente in diverse piante, la maggior parte appartenenti alla grande famiglia delle *Asteraceae*, di cui ricordiamo: la cicoria (*Cichorium intybus* L.), il topinambur (*Helianthus tuberosus* L.), il carciofo (*C. scolymus*), il tarassaco comune (*Taraxacum officinale*), la dalia (*Dahlia variabilis*) e lo yacón (*Polymnia sonchifolia*) (Hellwege *et al.*, 1998, 2000).

Il grado di polimerizzazione e il contenuto di inulina in alcune specie vegetali edibili sono stati oggetto di numerosi lavori (Roberfroid, 2004; Praznik e Beck, 1985); il grado di polimerizzazione influenza fortemente le caratteristiche funzionali della molecola.

La cicoria e il topinambur, sebbene sintetizzino fibre di inulina a basso peso molecolare, rappresentano in questo momento le principali specie dalle quali è commercialmente estratta l'inulina (Lopez-Molina, *et al.*, 2005, Hellwege, *et al.*, 2000; Praznik e Beck, 1985).

L'inulina estratta dal carciofo presenta proprietà chimico-fisiche analoghe a quella della cicoria ma con un più elevato grado di polimerizzazione. Queste sue caratteristiche, unitamente alle sue molteplici proprietà funzionali, la rendono idonea per applicazioni nell'industria alimentare.

Ricerche effettuate su numerose cultivar di carciofo hanno messo in evidenza una notevole variabilità nel contenuto di inulina che, come è stato già riportato, è influenzato da fattori genetici, fisiologici e ambientali. I prodotti naturali a base di carciofo presenti in commercio hanno proprietà diverse in dipendenza del processo di produzione utilizzato e del materiale vegetale. Pertanto lo sviluppo di biotecnologie per la produzione di inulina in laboratorio è di notevole interesse. L'utilizzo di colture *in vitro* potrebbe rappresentare una fonte di produzione alternativa alla pianta coltivata in campo essendo svincolata dai fattori abiotici che inducono variabilità nelle rese, rendendo così il processo standardizzabile ed economicamente sostenibile.

Scopo del presente lavoro è stato quello di allestire diversi tipi di colture cellulari di carciofo (radici e calli da radice) al fine di individuare il sistema più idoneo per produzione *in vitro* di inulina.

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 Materiale *in vitro*

6.2.1.1. Coltura *in vitro* di piantine micropropagate di carciofo

Per la sperimentazione sono state utilizzate piantine micropropagate di carciofo appartenenti a 5 cloni presenti nella collezione di germoplasma presso i laboratori dell'ENEA-Casaccia.

I 5 cloni di carciofo sono stati scelti in base alle loro testate caratteristiche agronomiche e biochimiche:

- “Grato 1”
- “C3”
- “Castellammare”
- “Campagnano”
- “Americano”

Il processo di micropropagazione del carciofo prevede tre fasi: moltiplicazione, allungamento, radicazione. Per la fase di moltiplicazione è stato impiegato il terreno base di coltura Gik (Tavazza *et al.*, 2004), (Tabella 9) addizionato con 2 mg/L di Kinetina, 0,1 mg/L di IBA, 3% di saccarosio, pH 5,8, 7 g/L di Plantagar (Duchefa). Le subcolture sono state effettuate ad intervalli di 21 giorni separando i germogli di neoformazione. Prima della radicazione le piantine sono state mantenute per un mese su di un terreno di allungamento, denominato Gira, composto dal terreno base GIK, addizionato con 0,5 mg/L di Kinetina, 0,1 mg/L IBA, 0,01 mg/L di 2iP (GIRA), 3% saccarosio, pH 5,8. Il passaggio delle piantine dalla fase di allungamento a quella di radicazione è stato fatto quando queste presentavano un'altezza di almeno 3-4 cm. Per l'induzione della radicazione sono stati aggiunti al terreno di coltura 2 mg/L di NAA, 3% saccarosio (Tabella 10).

Tabella 9. Composizione del terreno di base GIK**MACRO ELELEMENTI**

NH ₄ NO ₃	400	mg/L
KNO ₃	800	mg/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	mg/L
KH ₂ PO ₄	170	mg/L

MICRO ELELEMENTI

ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	mg/L
H ₃ BO ₃	6,2	mg/L
MnSO ₄ x 4H ₂ O	20	mg/L
CUSO ₄ x 5H ₂ O	0,25	mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	mg/L
CoCL ₂ x 6H ₂ O	0,025	mg/L
KI	0,83	mg/L
FeEDTA	36,7	mg/L

VITAMINE

Acido nicotinico	0,5	mg/L
Piridossina	0,5	mg/L
Glicina	2,0	mg/L
Tiamina HCL	1,0	mg/L
Mioinositolo	200	mg/L

Saccarosio	30	g/L
Plantagar	7	g/L

Tabella 10. Composizione e concentrazione ormonale (espressa in mg/L) utilizzata nelle varie fasi del processo di micropropagazione. (GIK) moltiplicazione, (GIRA) allungamento, (RAD) radicazione

ORMONI	GIK	GIRA	RAD
Kinetina	2,0	0,5	-
IBA	0,1	0,1	-
2Ip	-	0,01	-
BAP	-	-	-
NAA	-	-	2,0

Al fine di migliorare il protocollo di micropropagazione e quindi la qualità del materiale micropropagato, sono stati condotti esperimenti che hanno preso in considerazione i seguenti aspetti:

Qualità della luce. Il confronto tra due tipi di illuminazione è stato condotto utilizzando tre cloni già stabilizzati in vitro: “Campagnano”, “Castellamare” e “C3”. Gli espianti, in fase di moltiplicazione sono stati posti in due celle climatiche con due diversi tipi di sorgenti luminose: lampade a fluorescenza (Neon) Philips TLD da 75 W (Figura 26) e lampade tipo LumiBar LED Strip Light (LumiGrow) (Figura 27), a tre tipi di diodi emittenti luce monocromatica di lunghezza d’onda differente ed intensità variabile. Lo spettro di emissione erogato dalle due sorgenti di luce è stato rilevato con uno spettroradiometro Jaz System (Ocean Optics). Per un corretto confronto tra i due sistemi di illuminazione, i LED sono stati regolati in modo che il PAR (radiazione fotosinteticamente attiva), misurato tramite ‘Quantum sensor’ (Silimet), risultasse equivalente a quello delle lampade a fluorescenza (circa $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Entrambe le camere di crescita avevano una temperatura di circa $20 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo di 16 h di luce e 8 di buio.



Figura 26. Camera di crescita con illuminazione costituita da lampade fluorescenti (Neon)



Figura 27. Camera di crescita con illuminazione costituita da lampade LED LumiBar (LumiGrow)

Per ogni cultivar/trattamento sono stati utilizzate tre repliche da 5 espianti ciascuna e sono state effettuate 3 subcolture a distanza di 21 giorni, al termine delle quali è stato calcolato il tasso di crescita relativa su peso fresco (Relative grown rate - fresh weight: RGR_{fw}), secondo Hoffmann e Poorter (2002):

$$RGR_{fw} = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{t_2 - t_1} \times 100$$

in cui W_1 e W_2 sono i pesi freschi misurati all'inizio ed alla fine della subcoltura.

In oltre al termine di ogni subcoltura è stato misurato il numero di nuovi germogli emersi e calcolato il tasso di moltiplicazione (TM), secondo la seguente formula:

$$TM = \frac{\text{N.° germogli ottenuti}}{\text{N.° germogli iniziali}}$$

Nuove metodiche di propagazione. La tecnica della coltura liquida in immersione temporanea (TIS, Temporary Immersion System), che è stata utilizzata in questo lavoro, si basa su cicli alternanti di immersione dei germogli con periodi più o meno lunghi di coltura in asciutto.

Gli esperimenti di immersione temporanea, in confronto con la coltura su terreno solido, sono stati condotti utilizzando il sistema RITA® Vitropic (Fr) (Figura 28) e i germogli micropropagati di due cloni di carciofo: “Grato 1” ed “Americano”. Sono stati impiegati tre vasi per ciascun genotipo con 5 germogli per vaso. I tempi di immersione impostati sono stati di 15 minuti ogni 8 ore (Figura 29). Sono state condotte tre subcolture della durata di 21 gg. al termine delle quali sono stati calcolati il tasso di crescita relativa su peso fresco (RGR_{fw}) ed il tasso di moltiplicazione (TM). Gli esperimenti sono stati ripetuti 2 volte.



Figura 28. Vasi per immersione temporanea, sistema RITA®

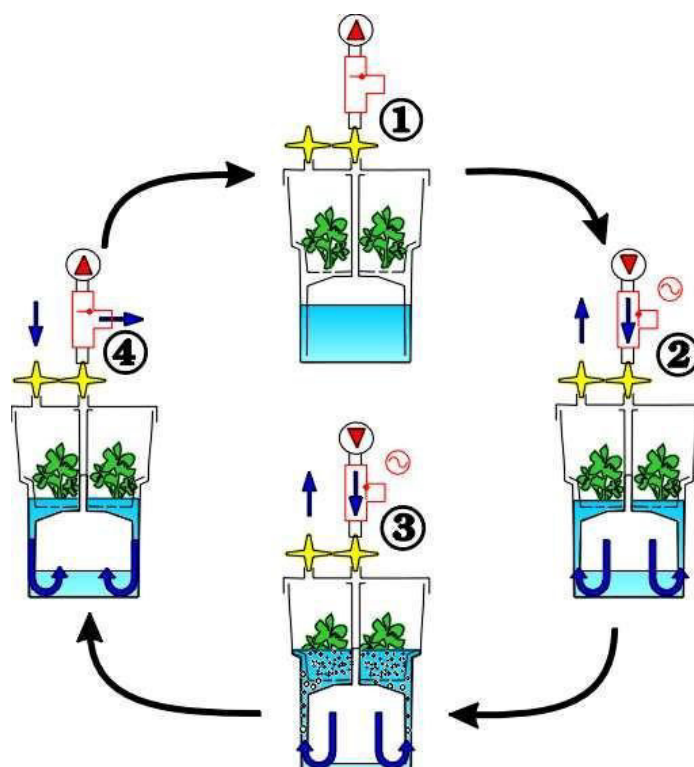


Figura 29. Schema di funzionamento del sistema ad immersione temporanea RITA. (1) Fase di quiete. (2) La pompa insuffla aria sterile all'interno del vaso. (3) L'aumento di pressione fa salire il terreno liquido fino ad immergere le piantine. (4) Scarico: la pompa si spegne, l'aria fuoriesce dal vaso, la pressione diminuisce e il terreno liquido ridiscende nel serbatoio lasciando scoperte le piante.

Uso delle ciclodestrine nella fase di radicazione. Per individuare il terreno più idoneo per la radicazione è stato effettuato uno studio comparativo tra un terreno di radicazione addizionato con ciclodestrine e uno senza. Il confronto tra i due terreni è stato condotto utilizzando cinque cloni, ben sviluppati, provenienti dalla fase di allungamento: “Castellamare”, “C3”, “Campagnano”, “Americano”, “Grato 1”.

Per la prova, 20 mg/l di β -Ciclodestrine (ALFA AESAR) sono stati addizionati al terreno di radicazione (Tabella 10). Per ogni clone sono state valutate 15 piantine suddivise in tre repliche di 5 piantine ciascuna. Dopo tre settimane di permanenza sul terreno di radicazione è stato rilevato il tasso di radicazione calcolato come percentuale di piantine radicate rispetto a quelle iniziali.

6.2.1.2 Coltura di calli: induzione e condizioni di crescita

L'induzione di callo è stata effettuata su espianti radicali di ~5 mm, prelevati da piantine di “Grato 1” micropropagate *in vitro* (Figura 30).

Per indurre la formazione di callo, sono stati testati tre terreni di coltura (A, B e C indicati in Tabella 11), composti da sali e vitamine MS (Murashighe e Skoog 1962) (Tab. 12), a cui sono stati aggiunti 30 g/L di saccarosio e composizioni e concentrazioni diverse di ormoni, 7 g/L agar, Plant-agar (Duchefa). Il pH è stato poi aggiustato a 5,8 con KOH 1M prima del ciclo di sterilizzazione e tutti sono stati sterilizzati in autoclave a 121° C per 20 min. Per ogni terreno di coltura sono stati messi in coltura 30 espianti. Le colture con gli espianti radicali sono state trasferite in cella climatica al buio per le prime quattro settimane e, successivamente, spostate alla luce regolando il fotoperiodo a 16 h, con irradianza di $37,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornita da lampade fluorescenti cool-white (Philips TL-D 36 W / 865), a una temperatura di $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

Dopo un mese di coltura è stata calcolata, per ogni terreno, la percentuale di espianti con callo. I calli sono stati subcolturati, nelle stesse condizioni di crescita, ogni 30 gg.

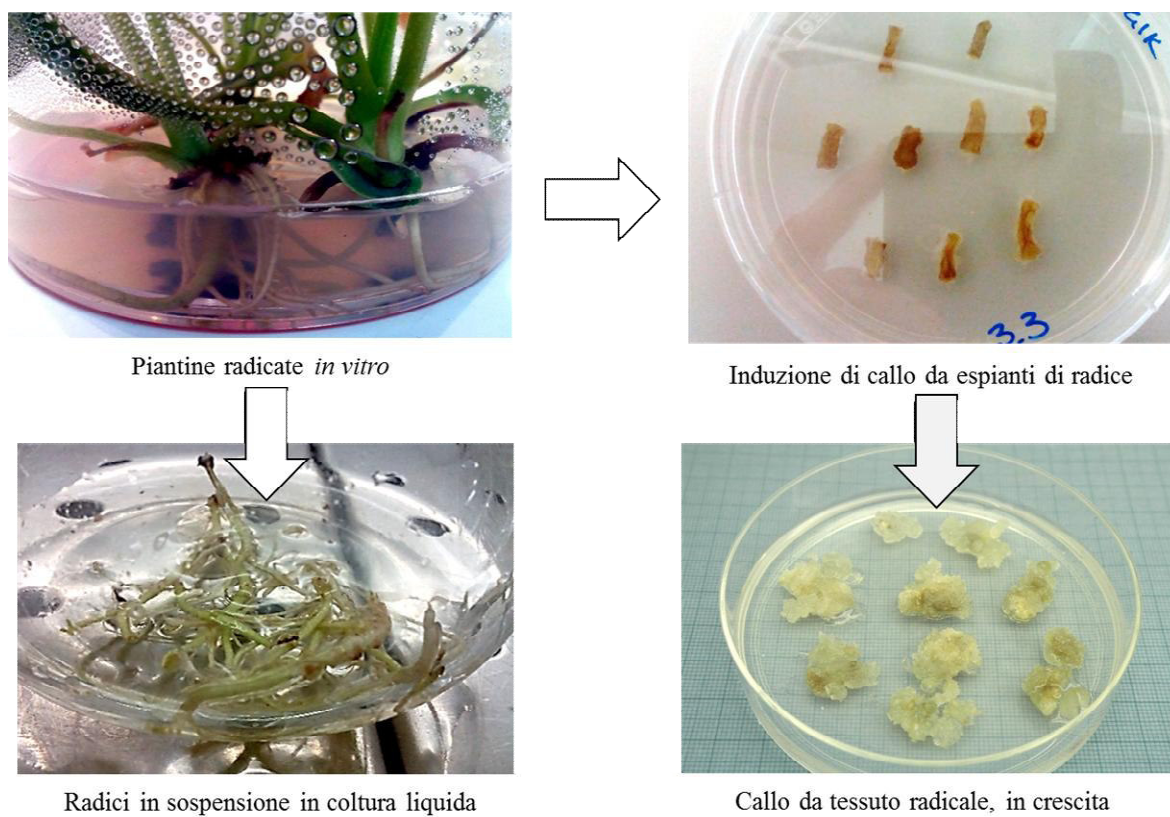


Figura 30. Allestimento per la colture di calli e di radici in sospensione

Tabella 11. Composizione dei terreni usati per l'induzione di callo

TERRENI	ORMONI mg/L			
	NAA	BAP	GA3	2,4D
A	2	5	-	-
B	5	0,2	1	-
C	-	-	-	0,2

Tabella 12. Composizione del terreno di base MS**MACRO ELEMENTI**

NH ₄ NO ₃	1650,00	mg/L
KNO ₃	1900,00	mg/L
MgSO ₄	180,54	mg/L
KH ₂ PO ₄	170,00	mg/L
CaCl ₂	332,02	mg/L

MICRO ELEMENTI

ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,60	mg/L
H ₃ BO ₃	6,20	mg/L
MnSO ₄ x H ₂ O	16,90	mg/L
CUSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	mg/L
CoCl x 6H ₂ O	0,025	mg/L
FeNaEDTA	36,70	mg/L
KI	0.83	mg/L

VITAMINE

Acido nicotinico	0,5	mg/L
Piridossina	0,5	mg/L
Tiamina HCL	1,0	mg/L
Glicina	2,0	
Mioinositolo	100,0	mg/L

6.2.1.3 Coltura di radici in sospensione: composizione del terreno e condizioni di crescita

Per allestire la coltura sono state utilizzate radici del clone “Grato 1” provenienti da piantine *in vitro* allevate per un mese sul terreno di radicazione.

Le radici, dopo essere state ripulite dall’agar, tramite ripetuti lavaggi in acqua sterile, sono state asciugate e pesate; 50 gr di radici sono state trasferite in beute ‘Erlenmayer’ da 250 ml preventivamente sterilizzate. Successivamente sono stati aggiunti 50 ml di terreno liquido composto da sali MS (Tabella 12), vitamine Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (Tabella 13), 30 g/L di saccarosio a pH 5,7. Le beute sono state sistemate su un agitatore orbitale (Fig. 30) alla velocità di 100 rpm in camera di crescita al buio e alla temperatura di 25 ± 1 °C. Sono state allestite tre ripetizioni.

Tabella 13. Composizione delle vitamine Gamborg B5

Acido nicotinico	1,0	mg/L
Piridossina	1,0	mg/L
Tiamina HCL	10,0	mg/L
Mioinositolo	100,0	mg/L

6.2.2 Materiale *in vivo*

Coltura in campo – L'apparato radicale di piante di carciofo adulte, del genotipo “Grato 1” (Figura 31), allevate in un campo catalogo presso Cerveteri, è stato prelevato nel mese di febbraio 2015, per le analisi del contenuto di inulina. Le radici una volta estirpate sono state lavate, tagliate e catalogate in base al loro calibro: minore di 5 mm (Figura 31a), compreso tra 5 e 10 mm (Figura 31b), maggiore di 10 mm (Figura 31c). Successivamente sono state congelate in azoto liquido, liofilizzate (tramite liofilizzatore Freeze Dryer Modulyo – Thermo electron Corporation) e conservate a - 80° C fino al momento delle analisi.



Figura 31. Radici di piante di “Grato 1” cresciute in campo: a < 5 mm; b 5 – 10 mm; c > 10 mm

Coltura in idroponica - Piantine micropropagate di “Grato 1” con apparato radicale ben sviluppato sono state ambientate in serra in condizioni di fuori suolo mediante un sistema idroponico ‘Nutriculture’ a 36 posti, studiato per la germinazione di semi e lo sviluppo di piccole talee. Dopo un mese le piante ambientate sono state trasferite in un sistema idroponico più grande ‘Aero Flo System ‘GHE’ (Hydroponics) a 40 posti, studiato per la crescita fuori suolo di piante adulte (Figura 32). Come soluzioni nutritive sono state impiegate soluzioni commerciali: FloraMicro, FloraBloom e FloraGrow della General Hydroponics alla concentrazione di 1ml/L. Fasci di radici, con un peso fresco variabile tra 5-10 g, sono stati prelevati da piante con un apparato fogliare di circa 50 cm (Figura 33) per le analisi del contenuto di inulina. Le radici prelevate sono catalogate in base al loro calibro: minore di 5 mm (Figura 32a), compreso tra 5 e 10 mm (Figura 32b). Successivamente sono state congelate in azoto liquido, liofilizzate (tramite liofilizzatore Freeze Dryer Modulyo – Thermo electron Corporation) e conservate a - 80° C fino al momento delle analisi.

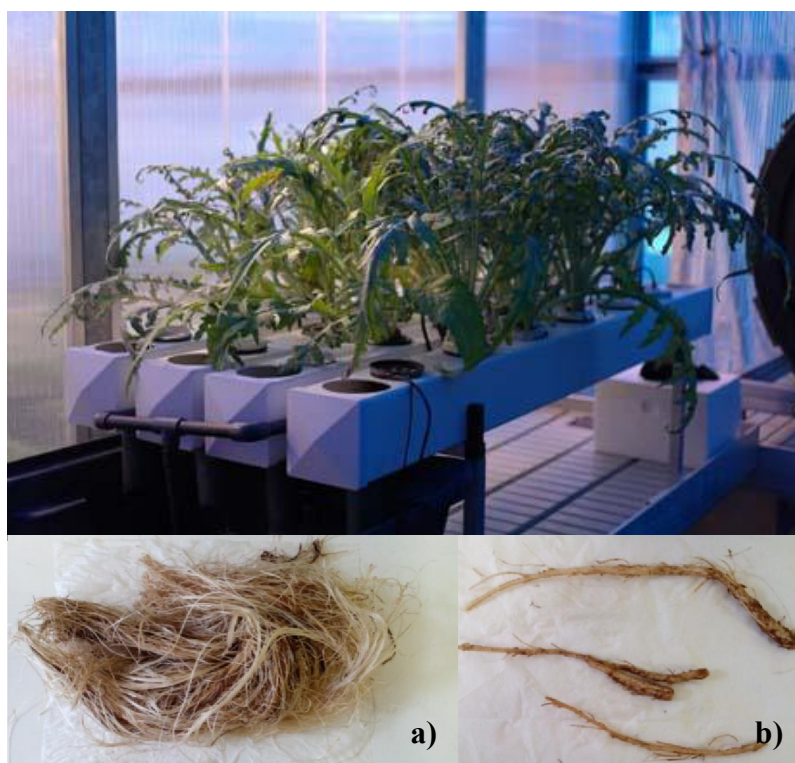


Figura 32. Radici di piante di “Grato 1” cresciute in un sistema idroponico Aero Flo System ‘GHE’: a < 5 mm; b 5 – 10 mm.



Figura 33. Allestimento di una cultura idroponica di carciofo "Grato 1"

6.2.3 Estrazione dell'inulina

L'estrazione dell'inulina è stata effettuata secondo la metodica riportata da Schütz *et al.*, (2006b), opportunamente dimensionata per le quantità processate in questo lavoro: ciascuna aliquota da 100 mg di campione liofilizzato è stata posta all'interno di una beutina aggiungendo 8 mL di acqua bollente. Dopo aver controllato, ed eventualmente corretto il pH a 7 con HCl 50 mM o NaOH 50 mM, il campione è stato trasferito quantitativamente in una beuta volumetrica da 20 mL portando la temperatura a $85 \pm 2^\circ\text{C}$, mantenendo tale temperatura per 10 min e mescolando il contenuto di tanto in tanto. Le sospensioni così ottenute sono state poi filtrate con filtri in Teflon (porosità $0,22\ \mu\text{m}$) e congelate a -20°C prima dell'analisi del contenuto dell'inulina, nistoso, kestoso, saccarosio, glucosio e fruttosio.

6.2.4 Analisi mediante HPLC del contenuto di inulina

Gli estratti sono stati analizzati mediante HPLC (AGILENT) gestito dal software OpenLab (AGILENT), costituito da una pompa quaternaria, un forno termostato, un autocampionatore, un rilevatore ELSD 1260 Infinity (Agilent Technologies). Per la separazione è stata utilizzata una colonna Rezex rcm-monosaccharide Ca^{2+} ($30 \times 0,78\ \text{cm}$; $9\ \mu\text{m}$) (Phenomenex), fornita di precolonna con filtro Carbo-Ca ($4 \times 3,0\ \text{mm}$) (Phenomenex) termostatata a $85 \pm 1^\circ\text{C}$. Come eluente è stata impiegata acqua deionizzata a $0,6\ \text{mL/min}$ in isocratica (tempo di acquisizione: 30 min). Il volume di iniezione è stato impostato a $25\ \mu\text{l}$. Gli standard di Inulina, Kestoso, Nistoso, Glucosio, Saccarosio, Fruttosio e Sorbitolo, tutti SIGMA HPLC standard, sono stati diluiti in acqua deionizzata. La retta di taratura è stata generata con concentrazioni comprese tra $0,05$ e $0,4\ \text{mg/ml}$ + $0,25\ \text{mg/ml}$ di sorbitolo (standard interno).

6.2.5 Analisi statistica

I dati sono stati elaborati statisticamente con il software opensource 'R', effettuando analisi della varianza tramite test ANOVA, seguita dal test di Tukey HSD per la verifica della significatività

delle differenze fra le medie per $p \leq 0,01$

6.3 Risultati e discussione

6.3.1 Coltura *in vitro* di piantine micropropagate di carciofo

Due fasi fondamentali influenzano l'efficienza della propagazione durante la coltura *in vitro*: la prima riguarda la produzione di nuovi germogli ascellari (fase di moltiplicazione), la seconda l'induzione di radici avventizie alla base del germoglio. Al fine di ottimizzare queste due fasi di coltura nel carciofo, e disporre per la sperimentazione di materiale vegetale di qualità, in questo lavoro di tesi è stata inizialmente valutata: l'influenza della qualità della luce sull'accrescimento e la moltiplicazione *in vitro*, la possibile applicazione del TIS nella fase di moltiplicazione e l'impegno delle β -ciclodestrine nella fase di radicazione.

L'analisi statistica del tasso di crescita relativa su peso fresco, RGRfw (Tabella 14) effettuata per i tre cloni considerati nelle prove di confronto delle sorgenti luminose, ha evidenziato differenze significative tra i tipi di luce: in particolare sono stati riscontrati valori maggiori del RGRfw in condizioni di illuminazione LED per i tre cloni considerati (Figura 34); l'emissione spettrale più intensa nelle lunghezze d'onda del rosso (600-700 nm) e del blu (400-500 nm), caratteristica del LED (Figura 35), sembrerebbe indurre uno sviluppo più rapido delle piantine rispetto a quello osservato sotto luce a fluorescenza, a parità di PAR.

Tabella 14. Valori medi e deviazione standard del tasso di crescita relativo su peso fresco (RGRfw) e tasso di moltiplicazione (TM) dei tre genotipi nelle diverse condizioni di luce. Lettere differenti all'interno della riga indicano differenze significative per $p \leq 0,01$.

GENOTIPO	RGRfw		TM	
	LED	NEON	LED	NEON
Campagnano	9.6±1.0 ^(a)	7.5±0.7 ^(b)	3.5±0.5 ^(ab)	3.0±0.5 ^(b)
Castellamare	9.1±1.0 ^(a)	7.6±1.2 ^(b)	3.4±0.5 ^(ab)	2.2±0.3 ^(b)
C3	9.3±1.4 ^(a)	7.5±0.9 ^(b)	4.3±0.9 ^(a)	3.6±0.5 ^(ab)

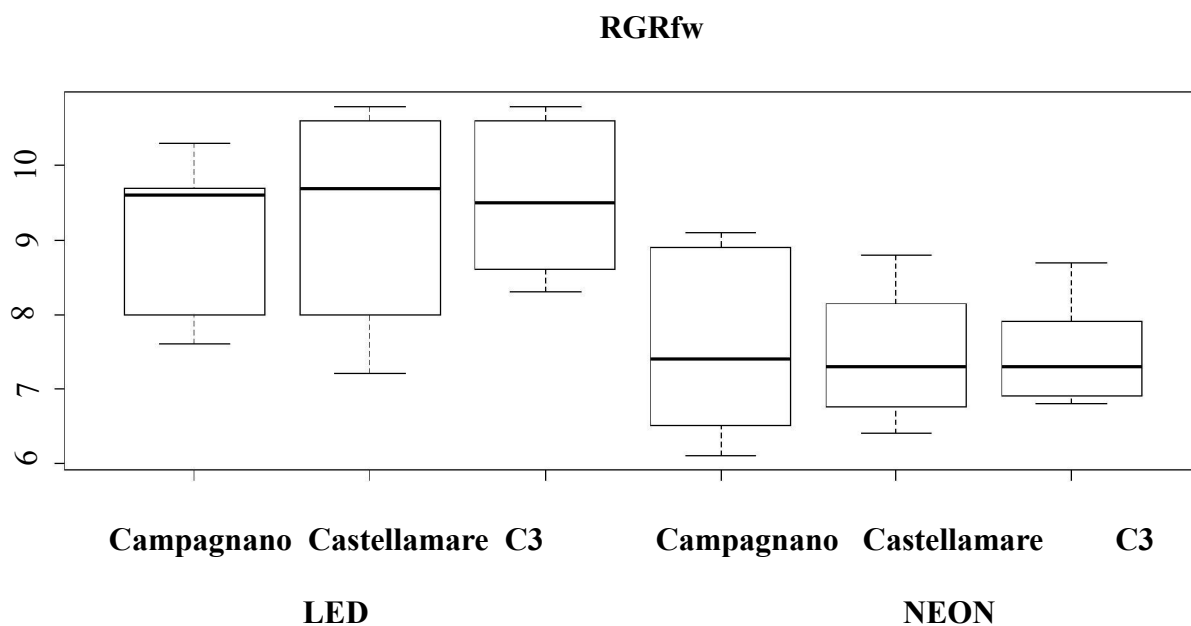


Figura 34. BoxPlot del tasso di crescita relativa su peso fresco (RGRfw) dei tre cloni in condizioni LED e NEON.

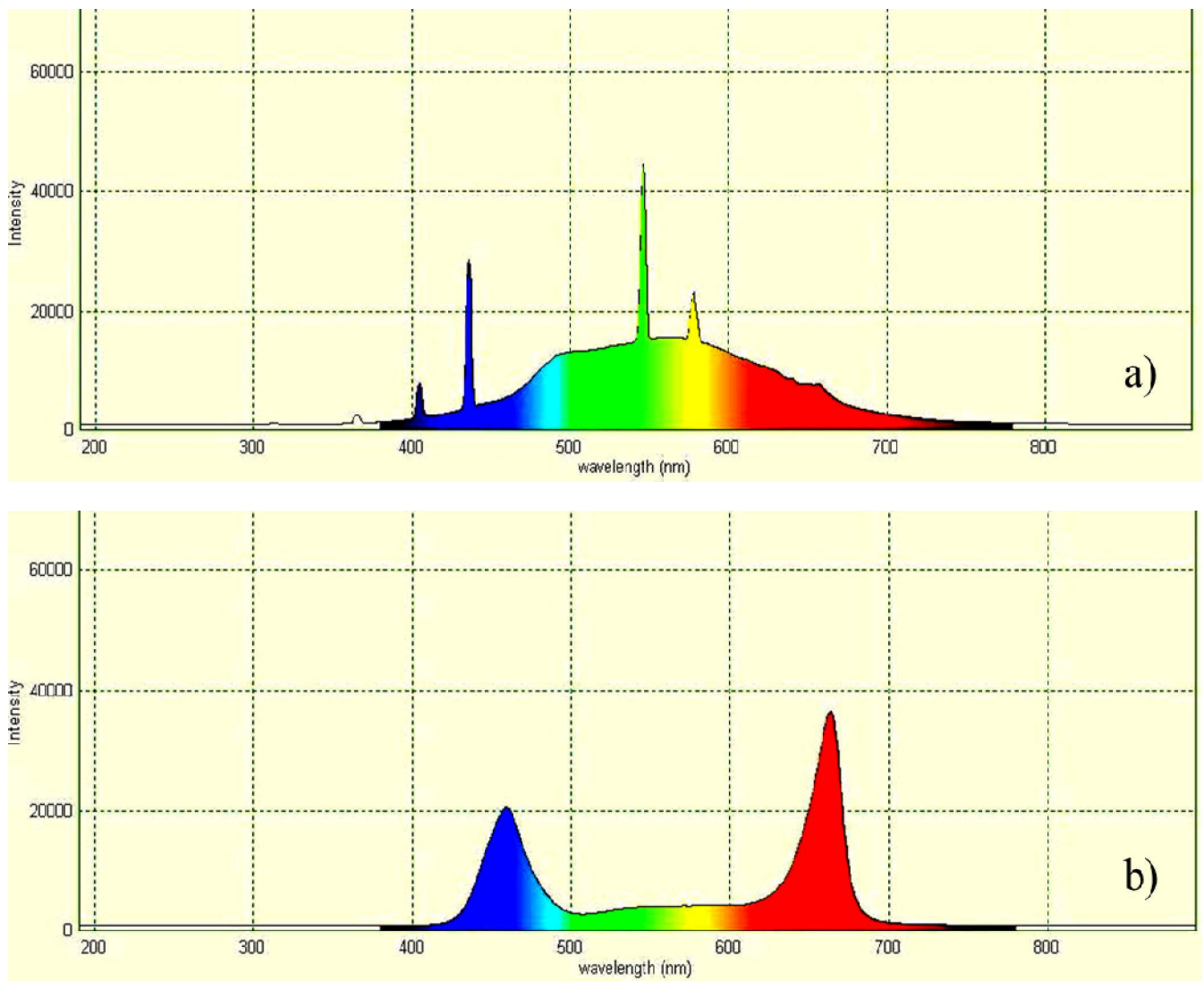


Figura 35. Spettri di emissione delle due sorgenti di luce considerate: a) luce a fluorescenza (Neon), b) luce LED.

Relativamente allo sviluppo di nuovi germogli, quantificato mediante TM (Figura 36), l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative (Tabella 9). Questi dati, anche se preliminari, mostrano che le lampade tipo LumiBar LED potrebbero rappresentare una valida fonte luminosa anche per la micropropagazione del carciofo, confermando quanto già presente in letteratura: i LED, comparati ad altre fonti luminose utilizzate per la coltura *in vitro*, presentano alcune caratteristiche interessanti come la possibilità di modificare la qualità della luce integrando lo spettro di emissione con lunghezze d'onda in grado di influenzare i processi morfo-fisiologici della pianta (Savona *et al.*, 2012).

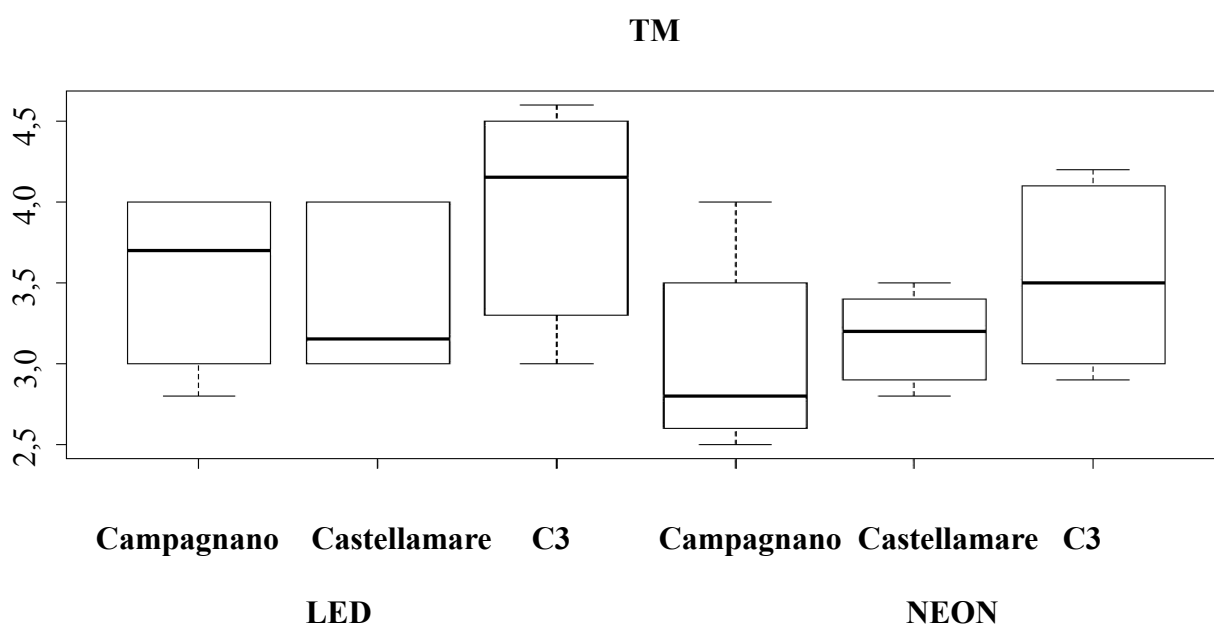


Figura 36. BoxPlot del tasso di moltiplicazione (TM) dei tre genotipi in condizioni LED e NEON.

Per quanto riguarda la valutazione della possibilità di utilizzare la coltura in TIS per migliorare il protocollo di micropropagazione del carciofo, l'analisi statistica del tasso di crescita relativa su peso fresco (RGRfw) dei due genotipi cresciuti su terreno solido e liquido con sistema ad immersione temporanea non ha evidenziato differenze significative (Tabella 15) (Figura 37). Per quanto riguarda il tasso di moltiplicazione (TM) la risposta è stata cultivar-dipendente. In “Grato 1” è stato osservato un tasso di formazione di nuovi germogli significativamente più alto nel terreno solido rispetto a quello liquido, mentre nell’ “Americano” non sono state riscontrate differenze

statisticamente significative tra le piantine cresciute nei due sistemi (Figura 38).

Tabella 15. Valori medi e deviazione standard del tasso di crescita relativo su peso fresco (RGRfw) e tasso di moltiplicazione (TM) dei due genotipi su terreno solido ed immersione temporanea (liquido). Lettere differenti indicano differenze significative per $p \leq 0,01$.

Genotipo	RGRfw		TM	
	solido	liquido	solido	liquido
Grato 1	$8.9 \pm 1.4^{(ns)}$	$8.6 \pm 1.7^{(ns)}$	$3.5 \pm 0.6^{(a)}$	$1.6 \pm 0.1^{(b)}$
Americano	$7.9 \pm 1.3^{(ns)}$	$8.4 \pm 1.0^{(ns)}$	$2.8 \pm 0.5^{(ns)}$	$3.4 \pm 1.3^{(ns)}$

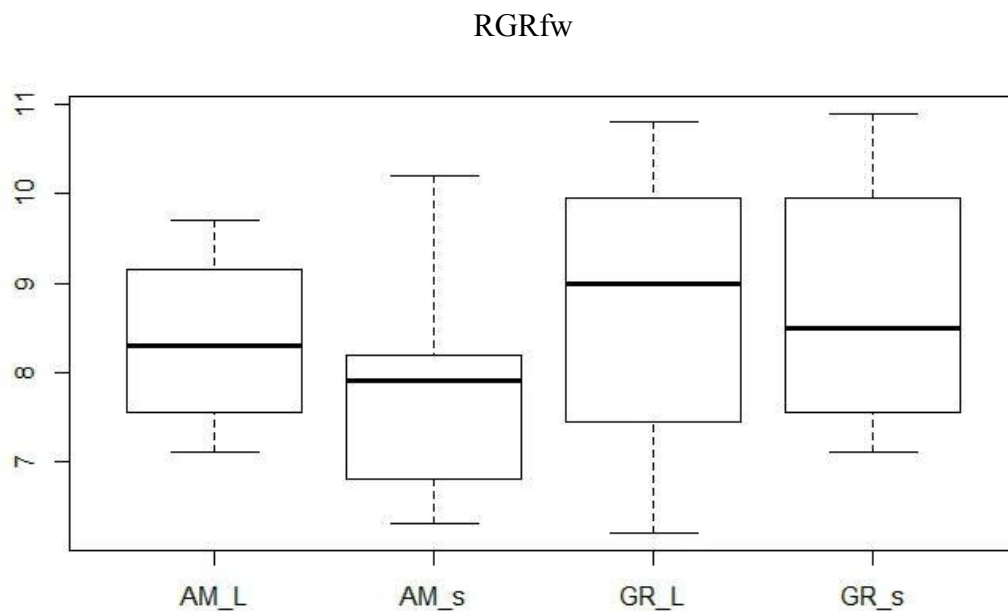


Figura 37. Boxplot del RGRfw dei genotipi in coltura solida ed in immersione temporanea (AM: “Americano”; GR: “Grato 1”; L: terreno liquido; s: terreno solido)

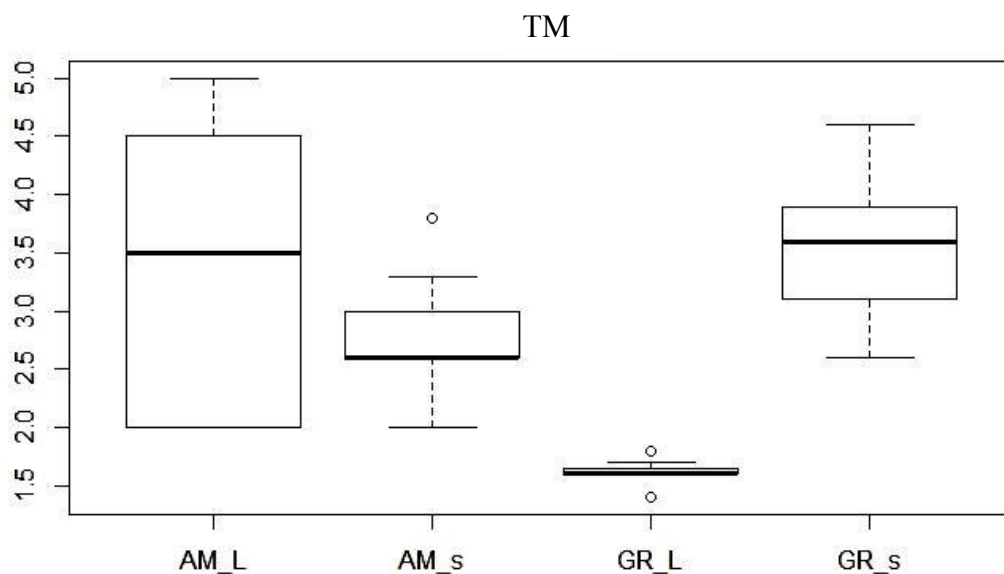


Figura 38. Boxplot del TM dei genotipi in coltura solida ed in immersione temporanea (AM: “Americano”; GR: “Grato 1”; L: terreno liquido; s: terreno solido)

Dai risultati emerge che il sistema di immersione temporanea con le condizioni da noi testate non risulta essere migliorativo né nelle rese produttive né nella qualità delle piantine prodotte; inoltre sono stati osservati, durante la fase di micropropagazione, fenomeni di vitrescenza (iperidricità) nel 33% degli espianti (Figura 39). Questo fenomeno, ben noto nel carciofo, consiste in una alterazione fisiologica che induce ispessimento, succulenza e elevata fragilità della pianta, che appare per lo più traslucida (De Paoli *et al.*, 1994). E' stato riportato in letteratura che l'iperidricità è spesso correlata con alte concentrazioni di citochinina nel terreno di coltura (Ancora, 1986). Nel caso specifico del sistema a immersione temporanea, l'alterazione potrebbe essere stata causata dai tempi di immersione delle plantule, troppo lunghi o troppo frequenti, e/o dalla composizione dell'atmosfera nei vasi.



Figura 39. Piantine di carciofo in immersione temporanea (vaso RITA®). Piantina con evidenti segni di vitrescenza (iperidricità).

La fase di radicazione è la fase conclusiva della micropropagazione con l'ottenimento di una piantina morfologicamente completa. Nel carciofo, questa fase presenta ancora delle criticità soprattutto per le tipologie precoci. Uno dei problemi è determinato dalla constatazione che solo un ridotto numero di germogli proliferati *in vitro* radica.

Da quanto riportato in bibliografia, le β -ciclodestrine hanno la capacità di aumentare la permeabilità della membrana cellulare e di alterare l'interazione tra le auxine e i loro recettori favorendone l'assorbimento (Uekama *et al.*, 1998). In alcune specie come olivo (Mura *et al.*, 1995) e jojoba (Apostolo *et al.*, 2001) il loro impiego ha determinato un aumento della percentuale di germogli radicati e un maggior numero di radici per germoglio. In questo lavoro, l'analisi dei dati, nell'indagine sull'uso di β -ciclodestrine nella fase di radicazione, ha evidenziato che il tipo di risposta è clone-dipendente (Figura 40). Infatti, mentre nel clone C3 è stata ottenuta una percentuale maggiore di piante radicate in assenza di β -ciclodestrine nel terreno di radicazione (100% rispetto al 42%), nel clone "Americano" è stata riscontrata in presenza di β -ciclodestrine (100% rispetto al 75%); nei cloni "Campagnano", "Castellammare" e "Grato 1" non sono state osservate differenze significative tra le due tesi. La variabilità riscontrata nella risposta dei cloni, rende molto difficile pensare a una condizione di coltura *in vitro* unica per tutti. Il trattamento con β -ciclodestrine anche

se ha dato risultati controversi in termini di percentuale di plantule radicate, ha dato risultati soddisfacenti come qualità dell'apparato radicale formato permettendo alla pianta di adattarsi prontamente alle nuove condizioni *in vivo*.

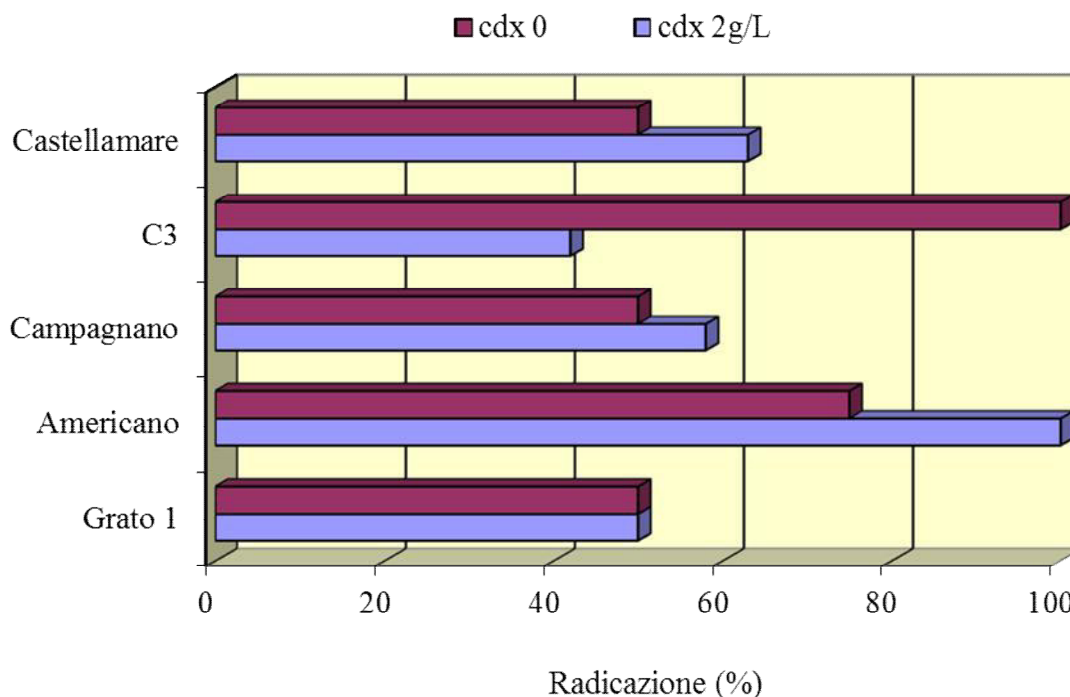


Figura 40. Percentuali di radicazione di 5 cloni di carciofo su terreno di radicazione, in assenza e in presenza di β -ciclodestrine

6.3.2. Coltura di calli: induzione e condizioni di crescita

Gli espianti radicali del clone “Grato 1”, hanno prodotto callo dopo 10 giorni di coltura ad entrambe le estremità. Dei tre terreni testati, il terreno B ha indotto la formazione di callo nel 100% degli espianti (Tabella 16). Inoltre si è dimostrato, insieme al terreno A, il migliore per l'incremento di biomassa. Al contrario, sul terreno C gli espianti, dopo un'iniziale produzione di callo, sono andati incontro a imbrunimento e successiva morte del tessuto (Figura 41). I calli indotti in condizione di buio apparivano chiari e friabili (Figura 42). Dopo 30 giorni di coltura i calli sono stati separati dagli espianti, e subcolturati, al fine di incrementarne la massa.

Tabella 16. Percentuale di espianti radicali che hanno prodotto callo dopo 30 giorni di coltura

TERRENO	ORMONI mg/L				% espianti con callo
	NAA	BAP	GA3	2,4D	
A	2	5	-	-	85
B	5	0,2	1	-	100
C	-	-	-	0,2	82

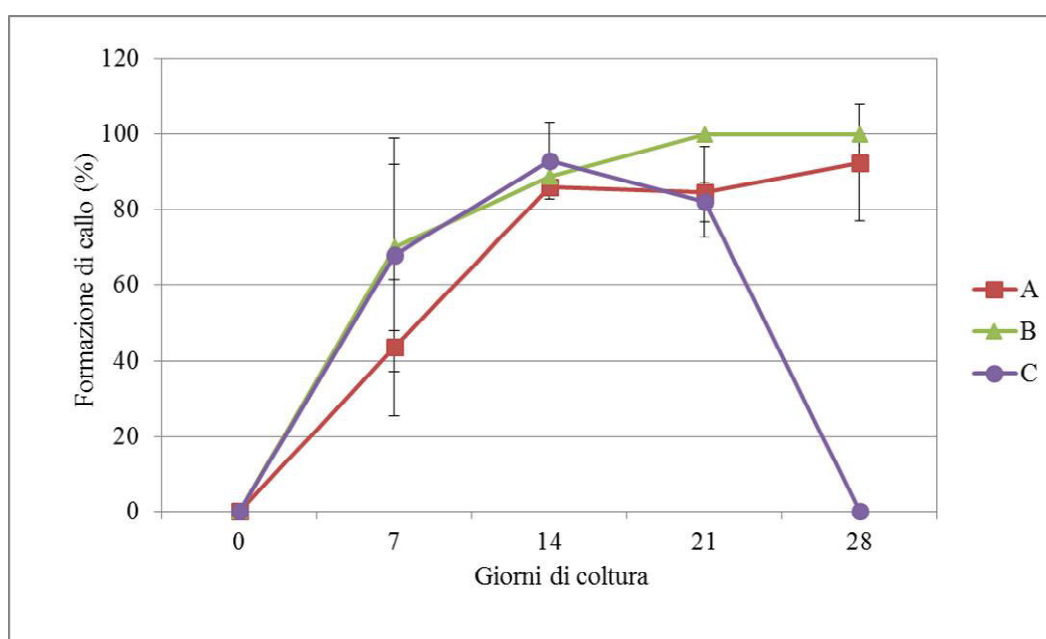


Figura 41. Andamento nel tempo della percentuale di espianti radicali che hanno prodotto callo



Figura 42. Formazione di callo in espianti radicali di “Grato 1” dopo 30 giorni di coltura.

6.3.3 Analisi del contenuto di inulina

L'analisi mediante HPLC degli estratti provenienti dai diversi materiali vegetali di carciofo cultivar “Grato 1”, ha permesso di ottenere un profilo qualitativo e quantitativo di inulina, fruttosio, saccarosio e glucosio (Figura 43).

L'analisi statistica dei risultati delle analisi (Tabella 17) non mostra differenze significative, tranne che per due tipi di tessuto: nel callo cresciuto sul terreno B, che risulta avere il valore più basso di inulina in rapporto al peso secco (32,9 g/Kg di materia secca) e nella radice più lignificata, proveniente da pianta in campo, che invece mostra il contenuto più elevato di inulina (534 g/Kg di materia secca). Gli altri tipi di materiale vegetale analizzato mostrano un contenuto di inulina variabile, con valori paragonabili a quelli già presenti in bibliografia relativi ad estrazioni da foglie e capolini di piante *in vivo* (Robertfroid 2004).

L'analisi del contenuto degli zuccheri semplici, che si liberano come monomeri, dimeri, trimeri e tetrameri in seguito all'idrolisi del polisaccaride inulina mostrano valori altrettanto variabili. In particolare vediamo che nel caso del callo cresciuto sul terreno B è molto elevata la quantità di nistoso e kestoso, precursori dell'inulina, a differenza delle altre matrici vegetali in cui il contenuto di Inulina è più elevato e i due oligosaccaridi non sono stati rilevati.

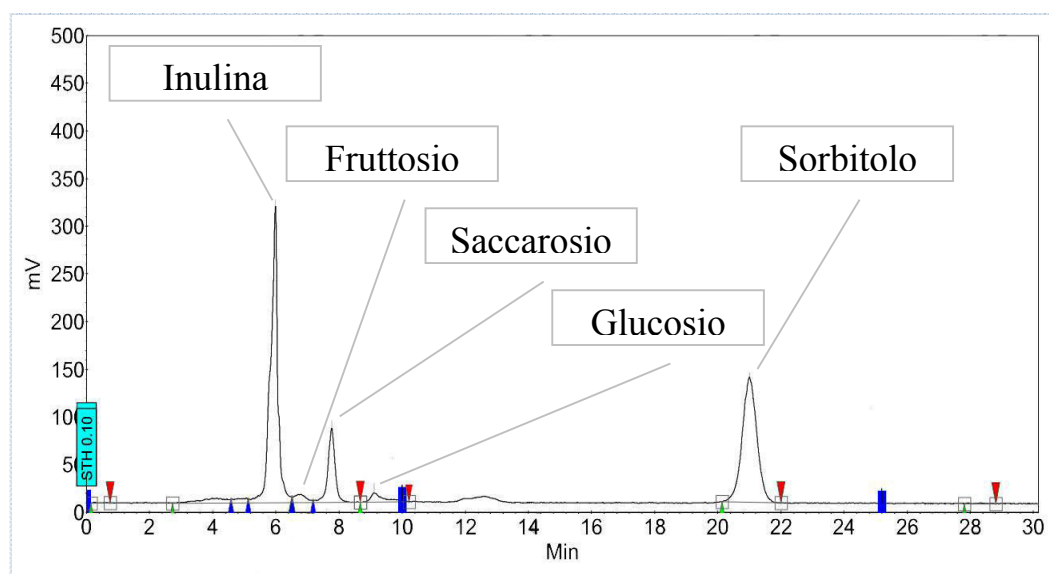


Figura 43. Analisi cromatografica del contenuto di zuccheri in estratti di radice di “Grato 1”

Tabella 17. Contenuto in zuccheri (g/Kg di materia secca) in estratti di diversi materiali vegetali di “Grato 1”. Lettere differenti indicano differenze significative per $p \leq 0,01$.

MATERIALE VEGETALE	Nistosio				
	Inulina	+ Kestosio	Saccarosio	Glucosio	Fruttosio
Callo (terreno A)	67,6±26 ^(a)	n.r.	n.r.	4,1±2,3	n.r.
Callo (terreno B)	32,9±2,3 ^(b)	197,7±17,2	108,5±6,0	81,9±11,4	79,1±11,1
Radice idroponica ($\varnothing \leq 5\text{mm}$)	77,6±1,8 ^(a)	n.r.	22,8±6,2	0,5±0,9	n.r.
Radice idroponica ($\varnothing 5 - 10 \text{ mm}$)	118,4±21,7 ^(c)	n.r.	47,8±33,9	1,4±2,1	0,0
Radice di pianta in campo ($\varnothing \leq 5\text{mm}$)	78,9±2,4 ^(a)	n.r.	17,9±1,6	6,1±2,6	n.r.
Radice di pianta in campo ($\varnothing 5 - 10 \text{ mm}$)	175,3±1,4 ^(d)	n.r.	0,0	17,5±10,0	n.r.
Radice di pianta in campo ($\varnothing > 10 \text{ mm}$)	534,0±18,5 ^(e)	n.r.	n.r.	89,5±111,7	n.r.
Radice <i>in vitro</i> in coltura liquida	81,7±14,3 ^(a)	0,0	63,6±10,8	82,4±0,0	133,1±46,9

6.4 Conclusioni

In questo lavoro è stato messo a punto, per la prima volta, un metodo per la produzione di inulina a partire da colture *in vitro* di calli e radici di carciofo. Il protocollo sviluppato ha consentito di ottenere una buona resa in inulina. Le radici coltivate *in vitro*, hanno mostrato un contenuto di inulina confrontabile, a parità di diametro della sezione radicale ($\varnothing \leq 5\text{mm}$), con quello misurato per lo stesso genotipo *in vivo*.

Il maggiore controllo sulle variabili che caratterizzano il processo di crescita del materiale *in vitro* permette di ipotizzare l'utilizzo di queste metodologie per una estrazione standardizzata dell'inulina, poiché permette di svincolarsi dai fattori limitanti che condizionano la produzione della materia prima in campo, dalla produzione circoscritta ad alcuni organi e limitata a determinati periodi dell'anno.

Ulteriori studi dovranno essere finalizzati alla ottimizzazione delle condizioni di coltura al fine di ottenere una maggiore quantità di biomassa sia del callo che delle radici e alla selezione di nuovi cloni, per incrementare la resa di inulina.

7. TRASFORMAZIONE GENETICA DI *CYNARA SCOLYMUS* L. TRAMITE *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*: TECNOLOGIA INNOVATIVA PER LA PRODUZIONE DI INULINA.

7.1 Introduzione

Il carciofo (*Cynara scolymus* L.) è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle *Asteraceae*, nota fin dai tempi dei Romani per le sue caratteristiche gastronomiche e curative. L'attuale crescente interesse nei confronti dei cibi funzionali, alimenti che, oltre a fornire nutrienti, apportano anche altri benefici per la salute, ha condotto a una rinnovata attenzione scientifica nei confronti di questa ortiva.

Tra i costituenti del carciofo, le sostanze fenoliche (acidi mono- e di- caffeilchinici e flavonoidi), gli zuccheri e l'inulina rivestono particolare interesse sia dal punto di vista nutrizionale che tecnologico. In particolare, l'inulina ha acquisito una certa importanza non solo per le sue caratteristiche nutrizionali ma anche per quelle legate al suo utilizzo come additivo alimentare.

L'inulina, sintetizzata da alcune piante come carboidrato di riserva al posto dell'amido, è un oligosaccaride formato da catene di fruttosio con una molecola di glucosio terminale; fa parte di una famiglia di fibre alimentari chiamate fruttani o frutto-oligosaccaridi. Essa viene solo parzialmente digerita nel tratto superiore dell'intestino umano e quindi classificata tra i carboidrati indisponibili. L'inulina subisce processi di fermentazione da parte dei bifidobatteri della microflora intestinale, dei quali essa promuove la crescita (funzione prebiotica), contribuendo a inibire la presenza dei batteri dannosi. Numerosi studi ne hanno inoltre evidenziato il ruolo positivo nella regolazione della concentrazione dei lipidi nel sangue, nell'assorbimento di minerali come il calcio e nella prevenzione ai tumori del retto. L'inulina, attualmente in commercio, è estratta principalmente dalle radici di cicoria e di topinambur. Anche se l'inulina contenuta nel carciofo è dotata di un elevato grado di polimerizzazione che ne determina proprietà superiori rispetto a quella in uso, l'impiego del carciofo l'impiego del carciofo come fonte per l'estrazione è commercialmente svantaggioso,

principalmente per motivi tecnici agronomici e le rese variabili, dipendenti da numerosi fattori biotici e abiotici.

Un approccio biotecnologico, basato su tecniche di colture *in vitro*, può costituire un sistema per la produzione di biomassa vegetale, in condizioni controllate, da cui estrarre inulina con caratteristiche superiori e con rese costanti. In particolare, le colture *in vitro* di radici rappresentano un sistema ideale per la produzione di metaboliti secondari di interesse farmaceutico e industriale in quanto la maggior parte di questi composti è prodotta e maggiormente accumulata in tessuti differenziati e perché gli organi in coltura sono geneticamente più stabili delle colture cellulari.

Tuttavia, le radici *in vitro* sono spesso caratterizzate da una crescita lenta. Un modo per aggirare questo problema è quello di far ricorso alle ‘hairy roots’ (HR). Le HR sono radici neoplastiche derivanti dall’infezione con *Agrobacterium rhizogenes* e successivo trasferimento di due segmenti del plasmide Ri, il TL-DNA ed il TR-DNA, nel genoma della cellula ospite. Le HR, caratterizzate da una rapida crescita in terreno liquido e da un alto livello di produzione di metaboliti secondari, offrono il vantaggio di poter essere propagate in coltura axenica indefinitamente, mantenendo la loro integrità morfologica e stabilità genetica, senza l’aggiunta di ormoni esogeni (Ramachandra Rao e Ravishankara, 2002). Nell’ultimo decennio le HR sono state utilizzate per la produzione di numerosi tipi di biomolecole come anticorpi, citochinine, vaccini ed enzimi (Obembe *et al.*, 2011). Scopo di questo lavoro è stato quello di allestire una coltura di HR, via infezione con *A. rhizogenes* di espianti di carciofo, allo scopo di ottenere colture clonali di radici ad elevato tasso di crescita e contenuto di inulina.

7.2. Materiali e metodi

7.2.1 Materiale *in vivo*

Per le analisi biochimiche, è stata allestita una coltura di piante di carciofo in una serra a contenimento di tipo P2, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, ad una temperatura costante di 22 °C. Le piante sono state coltivate in sistema idroponico con acqua

microbiologicamente controllata e l'aggiunta di tre nutrienti composti (Flora Series™: FloraMicro, FloraGro and FloraBloom; General Hydroponics).

7.2.2 Materiale *in vitro*

Negli esperimenti di trasformazione mediante *A. rhizogenes*, sono state impiegate piantine *in vitro* di carciofo “Grato 1”(in fase di allungamento), allevate in camere di crescita alla temperatura di 19 ± 1 °C e un fotoperiodo di 16 h di luce, 8 ore di buio. Espianti fogliari e radicali sono stati prelevati durante le due fasi di micropropagazione: moltiplicazione e radicazione (Figura 44).

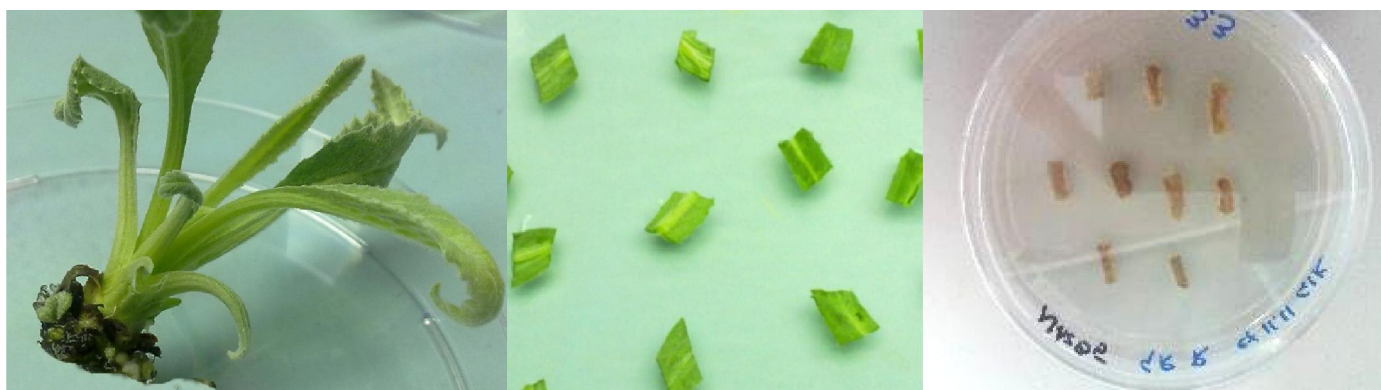


Figura 44. Piantine in fase di allungamento ed espianti fogliari e radicali di carciofo “Grato 1” utilizzati per l’infezione con *A. rhizogenes*

7.2.3 Ceppi batterici

Per le infezioni del materiale vegetale per l’ottenimento di colture di HR è stato impiegato il ceppo agropinico di *A. rhizogenes* A4RSII, fornito dalla banca microbica ATCC (ATCC number: 43057. Young *et al.*, 2001).

7.2.4 Protocollo di trasformazione

7.2.4.1 Preparazione di *A. rhizogenes*

La coltura liofilizzata di Agrobatterio è stata ricostituita in terreno YEB liquido secondo le istruzioni della ditta fornitrice e propagata a 28 °C su terreno solido YEB agarizzato (Tabella 18) per 72h. Il ceppo è stato mantenuto in selezione con rifampicina (50 µg/ml) (marcatore cromosomale). Successivamente, una singola colonia è stata inoculata in 10 ml di terreno YEB liquido/Sm in agitazione a 250 rpm, a 28 °C. Dopo 24h la coltura è stata diluita in rapporto 1:100(v/v) in YEB/Sm e lasciata crescere per un altro over-night. Raggiunta la densità ottica desiderata ($OD_{600nm}=1.4$) la sospensione è stata centrifugata a 3500g per 15 minuti a temperatura ambiente, ed il pellet ottenuto è stato risospeso e diluito in MS (MS medium, SIGMA, 4,4 g/L) fino ad $OD_{600nm}=0.1$ ed addizionato con 1mM di acetosiringone.

Tabella 18. Terreno di coltura YEB (pH: 7,2)

Estratto di lievito	1	g/L
Estratto di carne	5	g/L
Peptone	5	g/L
Saccarosio	5	g/L
MgSO ₄	493	mg/L
Agar	15	g/L

7.2.4.2 Infezione degli espianti con *A. rhizogenes*

Sono stati sviluppati due approcci per la trasformazione:

- immersione degli espianti nella sospensione batterica e co-coltura con agro per due giorni
- iniezione diretta della pianta

Infezione degli espianti fogliari e radicali.

Le infezioni con *A. rhizogenes* sono state effettuate su espianti fogliari e radicali, provenienti rispettivamente da piantine micropropagate e in fase di radicazione, di 3-4 settimane.

Per entrambi gli espianti è stato seguito lo stesso protocollo di infezione: 30 espianti sono stati trasferiti in piastre Petri (9 cm) contenenti 15 ml di sospensioni batteriche e incubate per 15 minuti a temperatura ambiente, in lenta agitazione. Successivamente, gli espianti sono stati asciugati su carta Whatman 3MM sterile, per eliminare l'eccesso di coltura batterica e poste su substrato MSB5 (sali MS, Tabella 6), vitamine B5 (Tabella 13) 30 g/L di saccarosio. Acetosiringone 0.1 mM, pH 5,7.

Le piastre sono state incubate a 25 ± 1 °C al buio. Dopo 48 ore di co-coltura, gli espianti sono stati trasferiti sullo stesso terreno addizionato con Cefotaxime (300 µg/ml), per contenere la crescita batterica, e incubate nuovamente a 25 ± 1 °C al buio fino alla comparsa degli abbozzi radicali. Come controllo sono stati utilizzati espianti fogliari e radicali, non infettati, posti nelle stesse condizioni di coltura. Gli espianti sono stati trasferiti su terreno di coltura fresco ogni 15 giorni e l'antibiotico nel mezzo è stato dimezzato ad ogni passaggio. Una volta azzerata la concentrazione di antibiotico, ed in assenza di visibile crescita batterica, gli espianti sono stati posti su piastre contenenti MSB5 (Tabella 13) al 3% di saccarosio. Dopo un mese, le radici rigenerate dagli espianti sono state isolate singolarmente (clone) e trasferite sullo stesso mezzo di coltura.

La frequenza di trasformazione, espressa in percentuale, è stata calcolata con la seguente formula: (numero di espianti formanti hairy roots/numero iniziale di espianti) x100.

Infezione delle piantine.

Le infezioni con *A. rhizogenes* sono state effettuate su piantine di carciofo, in fase di allungamento, raggruppate in tre classi a seconda della loro dimensioni (Figura 45):

- P = piccole di 7 – 15 mm
- M = medie di 15 – 25 mm
- G = grandi > di 25 mm



Figura 45. Piantine in fase di allungamento. a): 7 – 15 mm; b) 15 – 25 mm; c): > 25 mm.

Una singola colonia di *A. rhizogenes* è stata risospesa in 100 µl di MS addizionato con Acetosiringone 0.1 mM. L'infezione è avvenuta mediante iniezione diretta della sospensione batterica nella base della pianta. Al termine dell'infezione tutte le piante (appartenenti alle tre classi) sono state trasferite su GIRA (Tabella 10) e poste a 19 ± 1 °C con un fotoperiodo di 16h di luce. Dopo 4 giorni di co-cultura le piante sono state trasferite sullo stesso terreno addizionato con Cefotaxime (300 µg/ml). Le piantine sono state trasferite su terreno di coltura fresco ogni 15 giorni. Dopo quarantacinque giorni, le radici rigenerate alla base della pianta sono state isolate singolarmente (clone) e trasferite su MSB5 30 g/l saccarosio addizionato con 200 µg/ml di Cefotaxime.

7.2.5 Coltura di “hairy roots”(HR)

Per cercare di aumentare la biomassa radicale, ciascun clone di HR è stato cresciuto con due modalità: una parte è stato mantenuto su terreno solido MSB5 in piastra ed una parte, dopo essere stato ripulito dall'agar, è stato trasferito su lo stesso terreno liquido, in beute 'Erlenmayer' da 250 ml, preventivamente sterilizzate. Le beute sono state sistemate su un agitatore orbitale (Figura 46) alla velocità di 100 rpm. Beute e piastre sono state poste in camera di crescita al buio alla temperatura di 25 ± 1 °C.

Per misurare l'accrescimento dei singoli cloni hairy roots, nelle due condizioni di crescita, sono stati registrati, ad intervalli di una settimana: il numero totale di nuove ramificazioni emergenti (TBP, total branching point) e la lunghezza (TRL total root length), in accordo con quanto riportato Lenk *et al.*, 2012. I rilievi sono stati effettuati mediante l'impiego di una fotocamera Samsung NX200, e l'elaborazione delle foto per le misurazioni, mediante utilizzo del software opensource ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).



Figura 46. Beute su agitatore orbitante impiegato per la crescita di HR in coltura liquida

7.2.6 Estrazione del DNA genomico ed analisi molecolare mediante PCR

La verifica molecolare dell'effettiva natura transgenica stabile dei cloni di hairy roots selezionati è stata effettuata mediante la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Il DNA genomico utilizzato in PCR è stato estratto da cloni radicali singoli a partire dalla biomassa fresca, utilizzando il protocollo ed il kit di estrazione GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). Per ogni singola estrazione è stata utilizzata una quantità di tessuto radicale compresa tra 0.1 e 0.15 g; le radici sono state macerate utilizzando un pestello in un tubo da 1.5 ml dove è stato eseguito il passaggio di lisi cellulare. Il DNA genomico estratto è stato quantificato spettrofotometricamente attraverso la misurazione dell'assorbanza ($\lambda=260$ nm) ed è stata calcolata

la resa totale per ogni campione (fattore conversione $OD_{260\text{ nm}} = 50\mu\text{g/ml}$).

Nella miscela di reazione della PCR del volume di 25 μl , erano presenti

- 0.2 mM di ciascun desossiribonucleotide (dNTPs),
- 10 pmoli di primer “forward”;
- 10 pmoli di primer “reverse”;
- 25 ng circa di DNA genomico come template;
- 0.5 U di Taq polimerasi
- 2.5 mM di MgCl_2
- H_2O dd sterile a volume.

La miscela è stata incubata in termociclatore, iniziando il processo con una fase di denaturazione di 2' a 95°C , seguita da 3 fasi successive di denaturazione, appaiamento ed allungamento, ripetute ciclicamente 30 volte. Le tre fasi erano caratterizzate dalle seguenti temperature e tempi:

- Denaturazione 1' a 95°C
- Appaiamento (“annealing”) 40'' a 54°C
- Allungamento 50'' a 72°C

Al termine dei 30 cicli un ultima fase di allungamento di 7' a 72°C , chiudeva l'intero processo di amplificazione.

I primer utilizzati in PCR (Tabella 19), sono stati scelti per l'amplificazione dei geni *rolB*, *rolC* (presenti nel T-DNA) e del gene *virC1* (presente nel plasmide Ri). La scelta dei primers è stata determinata dal fatto che i DNA genomici dei cloni hairy roots effettivamente trasformati, dovevano aver integrato il T-DNA di *A. rhizogenes* e perciò risultare amplificabili per i geni *rolB* e *rolC*, mentre dovevano risultare non amplificabili per il gene *virC1* che si trova sul plasmide Ri di *A. rhizogenes* (al di fuori del T-DNA e perciò non integrato nel genoma dell'ospite).

Tabella 19. Sequenze nucleotidiche degli oligonucleotidi utilizzati in PCR.

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA NUCLEOTIDICA
RolBfor	5' - GAATTAGCCGGACTAAACGT - 3'
RolBrev	5' - TTGTTTGGATGCCCTAATT - 3'
RolCfor	5' - ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA - 3'
RolCrev	5' - TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC - 3'
VirC1for	5' - AATGCGTCTCTCTCGTGCAT - 3'
VirC1rev	5' - AAACCGACCACTAACGCGAT - 3'

7.2.7 Estrazione dell'inulina

L'estrazione dell'inulina è stata effettuata secondo la metodica riportata da Schütz *et al.*, (2006b), opportunamente dimensionata per le quantità processate in questo lavoro: ciascuna aliquota da 100 mg di campione liofilizzato è stata posta all'interno di una beutina aggiungendo 8 mL di acqua bollente. Dopo aver controllato, ed eventualmente corretto il pH a 7 con HCl 50 mM o NaOH 50 mM, il campione è stato trasferito quantitativamente in una beuta volumetrica da 20 mL portando la temperatura a $85 \pm 2^\circ\text{C}$, mantenendo tale temperatura per 10 min e mescolando il contenuto di tanto in tanto. Le sospensioni così ottenute sono state poi filtrate con filtri in Teflon (porosità $0,22\ \mu\text{m}$) e congelate a -20°C prima dell'analisi del contenuto dell'inulina, nistoso, kestoso, saccarosio, glucosio e fruttosio.

7.2.8 Analisi mediante HPLC del contenuto di inulina

Gli estratti sono stati analizzati mediante HPLC (AGILENT) gestito dal software OpenLab (AGILENT), costituito da una pompa quaternaria, un forno termostato, un autocampionatore, un

rilevatore ELSD 1260 Infinity (Agilent Technologies). Per la separazione è stata utilizzata una colonna Rezex rcm-monosaccharide Ca²⁺ (30 x 0,78 cm; 9 µm) (Phenomenex), fornita di precolonna con filtro Carbo-Ca (4 x 3,0 mm) (Phenomenex) termostata a 85 ± 1°C. Come eluente è stata impiegata acqua deionizzata a 0,6 mL/min in isocratica (tempo di acquisizione: 30 min). Il volume di iniezione è stato impostato a 25 µl. Gli standard di Inulina, Kestoso, Nistoso, Glucosio, Saccarosio, Fruttosio e Sorbitolo, tutti SIGMA HPLC standard, sono stati diluiti in acqua deionizzata. La retta di taratura è stata generata con concentrazioni comprese tra 0,05 e 0,4 mg/ml + 0,25 mg/ml di sorbitolo (standard interno).

7.2.9 Analisi statistica

I dati sono stati elaborati statisticamente con il software opensource 'R', effettuando analisi della varianza tramite test ANOVA, seguita dal test di Tukey HSD per la verifica della significatività delle differenze fra le medie per $p \leq 0,01$

7.3 Risultati e discussione

7.3.1 Trasformazione di espianti fogliari, radicali e piantine di carciofo mediante

A. rhizogenes

La trasformazione di tessuti di carciofo con il ceppo virulento A4RSII di *A. rhizogenes* è stata effettuata al fine di ottenere massa radicale, da adibire per l'estrazione di inulina, sfruttando la capacità di questo batterio di indurre la formazione di radici avventizie (hairy roots) in corrispondenza del sito di inoculo. E' noto che l'efficienza di trasformazione attraverso *A. rhizogenes* può dipendere da diversi fattori quali il genotipo delle piante, il tipo di espianto, il ceppo batterico, la concentrazione e modalità di inoculo.

Sono stati confrontati due sistemi di trasformazione: a) immersione degli espianti (foglie e radici) nella sospensione batterica; b) iniezione diretta della pianta.

Come mostrato in Tabella 20 l'induzione di hairy roots (HR) è influenzata dal tipo di espianto.

Infatti, dopo sette giorni dall'infezione, solo gli espianti radicali hanno prodotto HR (Figura 47a) con una frequenza di induzione del 54% mentre quelli fogliari, probabilmente poco suscettibili all'attacco batterico, non hanno mostrato l'emersione di radici di neoformazione e sono morti dopo due settimane. I cloni radicali ipoteticamente trasformati, isolati dagli espianti radicali, hanno mostrato una scarsa crescita, assenza di ramificazioni laterali, senescenza precoce e morte dopo la quarta subcoltura (MSB5 30 g/L saccarosio 200 µg/ml di Cefotaxime) in assenza di fitormoni (3 subcolture).

Tabella 20. Effetto del tipo di espianto sulla frequenza e il tempo di induzione di hairy roots

Ceppo <i>A. rizhogenes</i>	Espianto	% induzione	N° radici per espianto	Tempo di risposta in giorni
Controllo	Foglia	0,0	0	-
	Radice	19,0	1	7
	Pianta	6,3	1	20
A4	Foglia ^α	0,0	0	
	Radice ^α	54,0	2,2	7
	Pianta ^β	75,0	2,4	20

^α) immersione degli espianti nella sospensione batterica

^β) iniezione della pianta con la sospensione batterica



Figura 47. Produzione di hairy roots in espianti radicali (a) e piantine (b) dopo infezione con *A. rhizogenes*.

Relativamente alla prova di trasformazione di piantine di carciofo, i risultati mostrano differenze significative nella risposta a secondo della grandezza delle piante presa in esame (Figura 48). In particolare, al crescere delle dimensioni delle piante si passa da un'assenza di induzione di radici avventizie all'ottantanove per cento.

Le radici putativamente transgeniche hanno mostrato inizialmente una crescita lenta e ridotta per poi svilupparsi, successivamente in modo normale. Dopo quarantacinque giorni, le HR ottenute dalla trasformazione di piante di taglia > di 25 mm sono state isolate singolarmente e subcolturate su MSB5 30 g/L saccarosio, 200 µg/ml di Cefotaxime (Figura 49a, 49b e 49c). I cloni HR hanno mostrato un accrescimento indefinito nel tempo (Figura 49d).

Questo ultimo protocollo di trasformazione si è dimostrato l'unico veramente efficace per l'ottenimento di colture HR in attiva proliferazione.

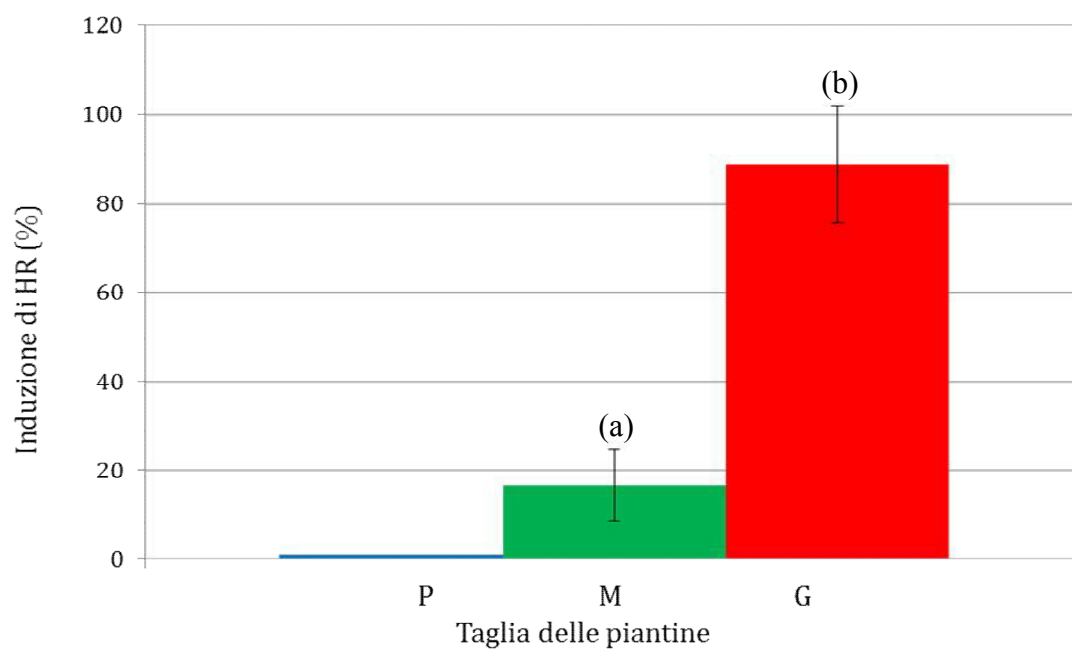


Figura 48. Effetto della dimensione delle piantine di carciofo “Grato 1” sulla frequenza di induzione di HR. Lettere differenti indicano differenze significative con $p < 0,01$

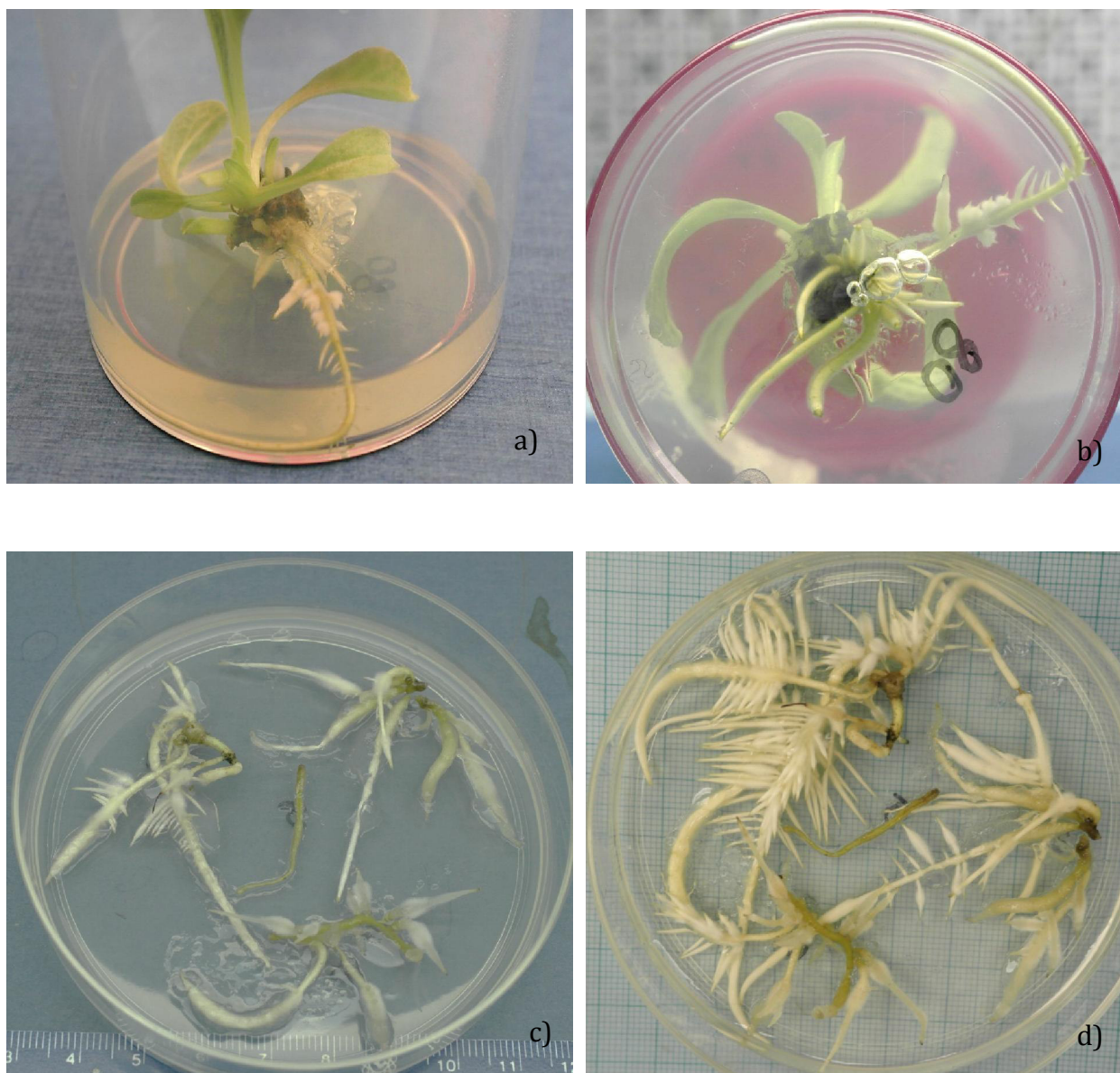


Figura 49. Fasi dello sviluppo delle HR indotte in piantine di carciofo “Grato 1”: a) e b) emersione dal sito di infezione; c) trasferimento su terreno solido; d) sviluppo radicale dopo un mese di coltura.

Valutazione della trasformazione dei cloni HR tramite analisi PCR

Per alcuni dei cloni ottenuti è stata verificata l'effettiva integrazione del T-DNA di *A. rhizogenes* nel genoma nucleare delle radici. A questo scopo il DNA genomico è stato estratto ed è stata effettuata una analisi tramite PCR utilizzando delle coppie di oligonucleotidi specifiche per l'amplificazione dei geni *rolB*, *rolC*, presenti nel T-DNA, (Nemoto *et al.*, 2009), e del gene *virC1*, presente nel plasmide Ri di *A. rhizogenes*. Infatti, se la trasformazione è avvenuta correttamente, i DNA

genomici dei cloni HR devono aver integrato il T-DNA di *A. rhizogenes* e risultare amplificabili per i geni *rolB* e *rolC*, mentre devono risultare non amplificabili per il gene *virC1* che si trova sul plasmide *Ri* ma, essendo esterno al T-DNA, non viene integrato nel genoma dell'ospite. Come controllo positivo per la reazione di amplificazione è stata utilizzata una colonia di *A. rhizogenes* (contenente quindi il plasmide *Ri* e amplificabile con le coppie di oligonucleotidi specifiche per geni *rolB*, *rolC* e *virC1*); come controllo negativo, il DNA genomico di una radice di carciofo “Grato 1” non trasformata.

I risultati ottenuti tramite PCR dei DNA genomici dei 4 cloni analizzati (Figura 50), mostrano come i cloni selezionati risultino amplificabili per i geni *rolB*, *rolC* e, quindi, che si è verificata l'integrazione del T-DNA nel genoma dell'ospite. Sono infatti visibili le bande di lunghezza di 776 paia di basi (bp) specifica del gene *rolB* e di 487 bp del gene *rolC*. Non risulta, invece, visibile la banda relativa al gene *virC1*(425 pb), come atteso nel caso di effettiva origine trasformante dei cloni. Inoltre l'assenza di quest'ultima banda testimonia l'efficacia degli antibiotici aggiunti al terreno di coltura nell'eliminazione della presenza di colonie di *A.rhizogenes*, nelle condizioni colturali delle HR.

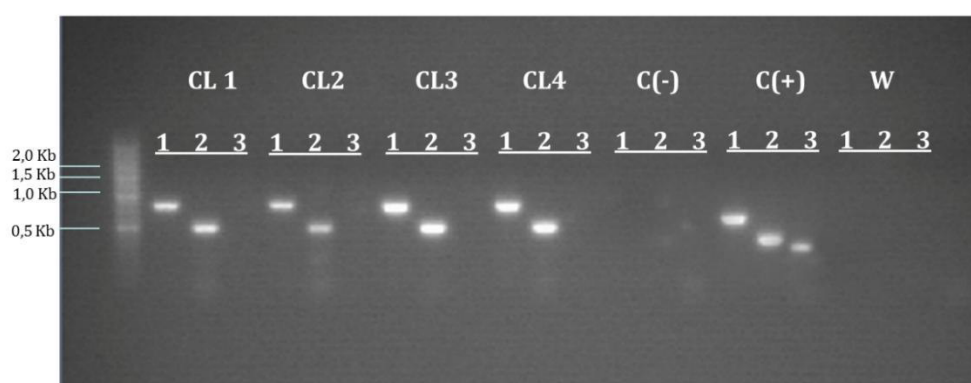


Figura 50. Analisi elettroforetica dei prodotti di PCR effettuata sui DNA genomici di 4 cloni di HR di carciofo “Grato 1”, utilizzando oligonucleotidi specifici per i geni *rolB* e *rolC* (bande contrassegnate con 1 e 2) e *virC1* (bande contrassegnate con 3). CL1, CL2, CL3, CL4 cloni di hairy roots; C (-) radice non trasformata; C(+)colonia di *A. rhizogenes*; W mix di reazione della PCR senza DNA. Marker (1kb DNA Ladder, NEB).

7. Coltura di hairy roots per la produzione di biomassa

Al fine di incrementare la produzione di biomassa radicale su cui eseguire le analisi del contenuto di inulina, tre cloni transgenici (CL1; CL2; CL3) sono stati cresciuti su terreno solido (Figura 51a) e liquido (Figura 51b).

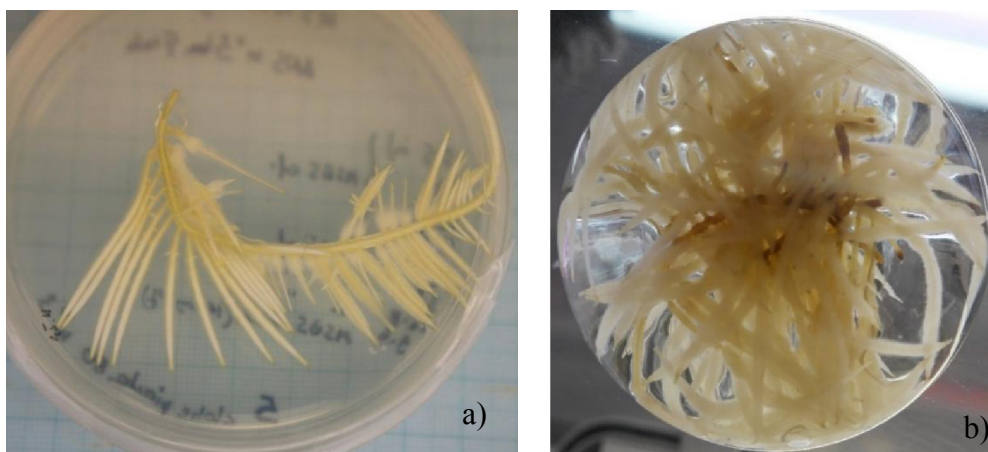


Figura 51. HR in fase di accrescimento su terreno solido (a) e liquido (b).

Lo studio dell'accrescimento delle HR è stato effettuato misurando la lunghezza totale delle radici (Total root length TRL, espressa in mm) e il numero di nuove ramificazioni (Total branching point) nell'arco di 21 giorni. Per la rilevazione di questi parametri è stato impiegato il metodo di analisi delle immagini (Lenk *et al.* 2012). In breve, ogni cinque giorni, sono state scattate delle foto mediante fotocamera digitale e i dati analizzati (Figura 52) mediante il software opensource ImageJ.

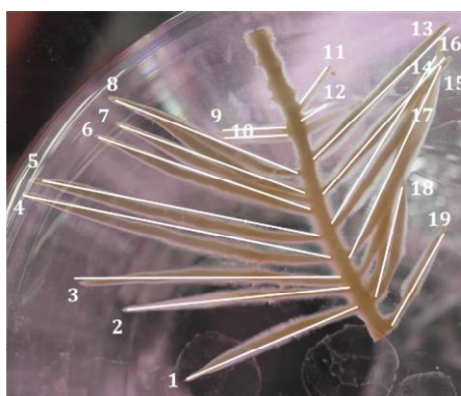


Figura 52. Analisi della crescita di HR mediante ImageJ. (1-19) ramificazioni di neoformazione;

La lunghezza totale delle HR dei tre cloni transgenici, di “Grato 1” è riportata in Figura 53. In tutti i cloni si ha un maggior accrescimento radicale, e quindi una maggior produzione di biomassa, in coltura liquida rispetto a quella solida.

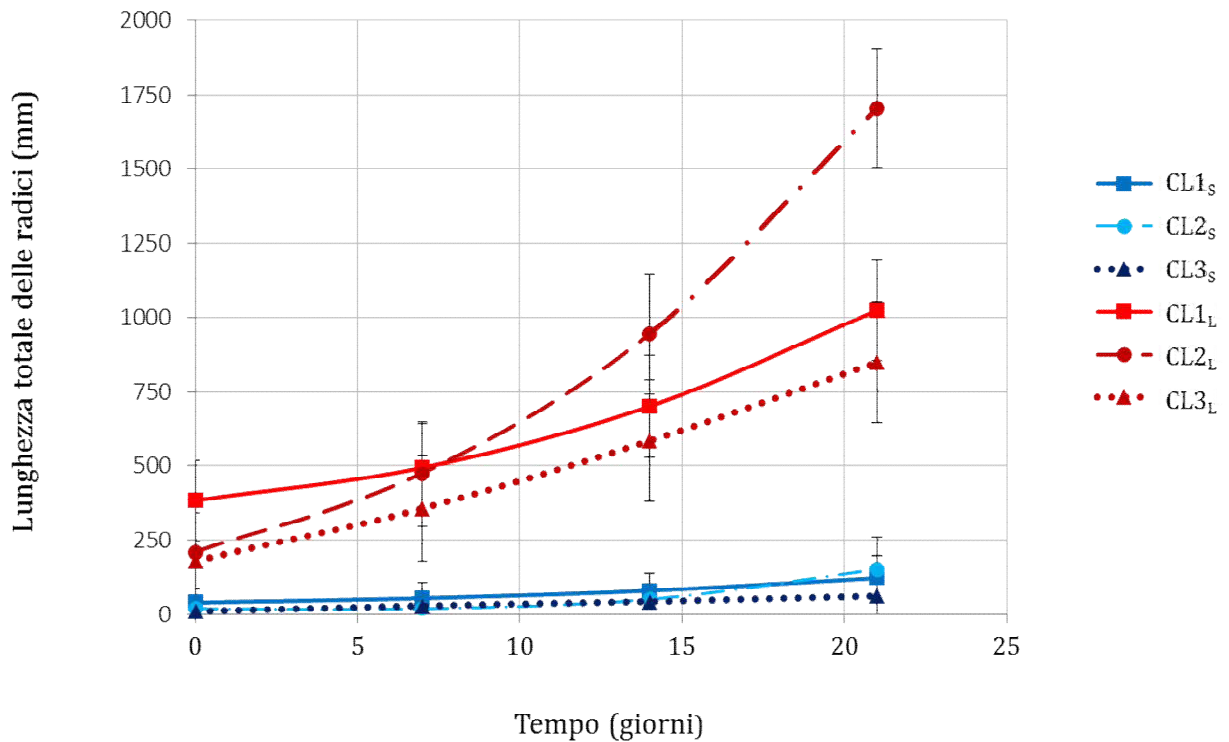


Figura 53 . Crescita radicale di tre cloni transgenici, in un arco temporale di 20 giorni, in coltura solida (CL1_s; CL2_s; CL3_s) e liquida (CL1_L; CL2_L; CL3_L).

Per quanto riguarda la formazione di nuove ramificazioni, questo parametro sembra dipendere più dal clone preso in esame che dalle condizioni di crescita. Infatti, come si può osservare dalla Figura 54 i cloni CL1 e CL3 mostrano nel tempo, un aumento del numero di ramificazioni simile nelle due condizioni di crescita, mentre nel clone CL2 si evidenziano differenze tra la coltura in solido e liquido. In particolare, in quest'ultimo il numero di nuove ramificazioni è significativamente maggiore nelle radici cresciute in liquido rispetto a quelle cresciute in solido.

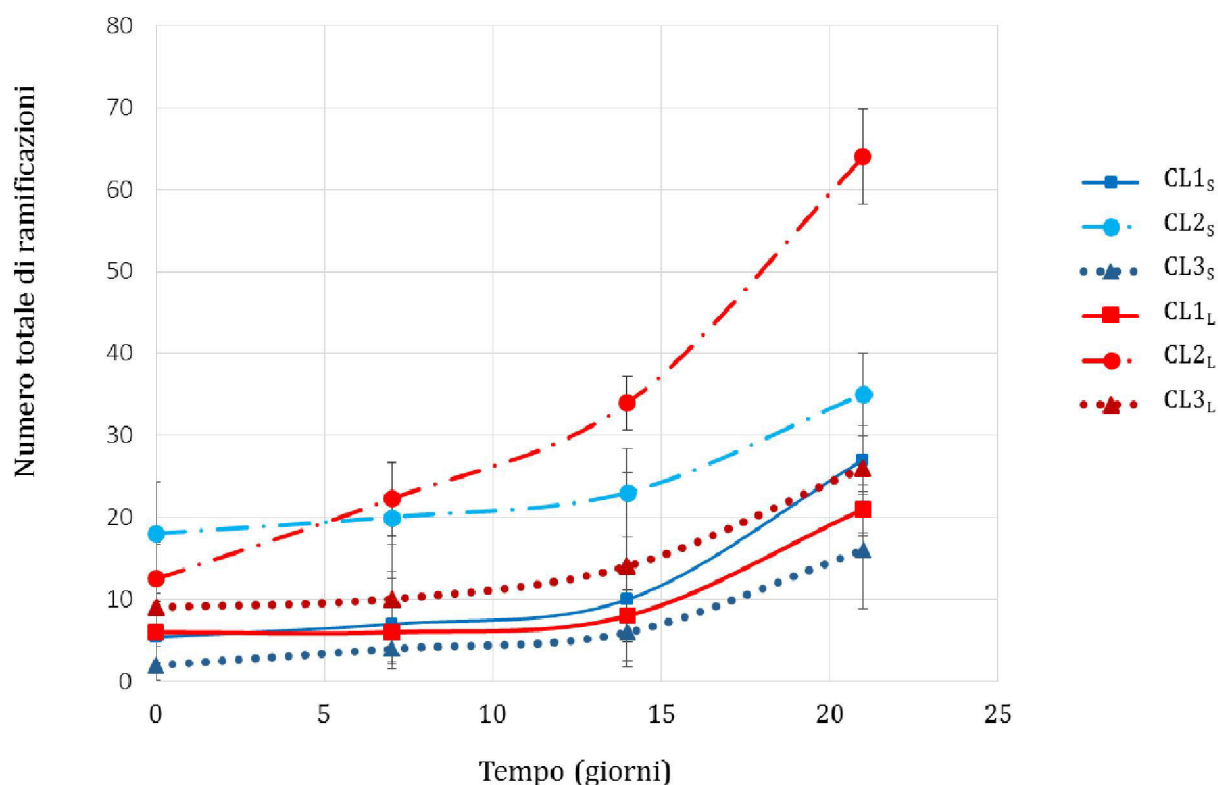


Figura 54. Numero totale di ramificazioni radicali nei tre cloni transgenici, in un arco temporale di 20 giorni, in coltura solida (CL1_S; CL2_S; CL3_S) e liquida (CL1_L; CL2_L; CL3_L).

In generale, dai risultati ottenuti si può concludere che la coltura liquida rappresenta il substrato più idoneo per l'accrescimento radicale e che tra i cloni transgenici presi in esame, il clone CL2 è quello che, a parità di condizioni di crescita, mostra una maggiore resa in biomassa. Per questo motivo, le analisi del contenuto di inulina sono state inizialmente eseguite solo su questo clone.

7. Analisi del contenuto di inulina

Il contenuto di inulina delle HR è stato confrontato sia con quello delle radici non trasformate cresciute *in vitro* che con le radici di piante di carciofo allevate in un sistema idroponico (dati precedentemente presentati nel Cap. 6). L'analisi mediante HPLC ha permesso di ottenere i valori di inulina, fruttosio, saccarosio e glucosio riportati in Tabella 21

Tabella 21. Contenuto di zuccheri (g/Kg MS) in estratti di HR del clone CL2, cresciute rispettivamente in terreno solido e liquido, radici *in vitro* e radici di piante cresciute in idroponica.

MATERIALE VEGETALE	Inulina	Nistoso Kestoso	Saccarosio	Glucosio	Fruttosio
HR in coltura solida	73,9±6,6 ^(c)	0,0	97,1±7,9	124,9±11,9	0,0
HR in coltura liquida	99,3±2,0 ^(a)	0,0	97,7±4,8	111,6±3,2	0,0
Radice <i>in vitro</i> in coltura liquida	81,7±14,3 ^(b)	0,0	63,6±10,8	82,4±0,0	133,1±46,9
Radice idroponica (ø ≤ 5mm)	77,6±1,8 ^(c)	n.r.	22,8±6,2	0,5±0,9	n.r.
Radice idroponica (ø 5 – 10 mm)	118,4±21,7 ^(a)	n.r.	47,8±33,9	1,4±2,1	0,0

Lettere differenti nella stessa colonna indicano differenze significative per $p \leq 0,01$.

□ Dati precedentemente presentati nel Cap. 6.

Dall'analisi statistica emerge che il contenuto di inulina nelle HR cresciute in coltura liquida è significativamente più elevato rispetto a quello in coltura solida (99,3±2,0 rispetto a 73,9±6,6 g/Kg MS). Inoltre, le rese di inulina del clone CL2 (99,3±2,0 g/Kg MS) sono anche significativamente superiori a quelle del non trasformato *in vitro* (81,7±14,3 g/Kg MS) e alle radici idroponiche, con diametro inferiore a 5 mm (77,6±1,8 g/Kg MS). Inoltre, è da sottolineare che i valori di inulina nelle HR sono superiori anche a quelli fin ora pubblicati (99 g/Kg DM vs 70 g/Kg DM) relativi a estrazioni da foglie e capolini di piante *in vivo* (Roberfroid 2004).

CONCLUSIONI

Il protocollo d'infezione con *A. rhizogenes*, messo a punto durante la tesi di dottorato, ha permesso di ottenere colture HR di carciofo in attiva proliferazione.

Tra le diverse tipologie di espianti utilizzati, le piantine di dimensioni superiori ai 25 mm, si sono dimostrate le migliori per l'ottenimento di radici di neoformazione. L'analisi mediante PCR ha dimostrato la corretta integrazione del T-DNA nel genoma dei cloni HR isolati. Lo studio della crescita dei cloni su terreno solido e liquido ha permesso di identificare in quest'ultimo la migliore metodica colturale per incrementare la produzione di biomassa.

Il contenuto in inulina del clone HR CL2, è risultato più elevato sia rispetto a quello delle radici non trasformate, *in vitro* ed *in vivo*, che ai valori riportati in letteratura da foglie e capolini di piante in campo.

Ulteriori prove, già in fase di svolgimento mirano a valutare l'influenza di alcuni fattori (composizione del terreno di coltura, fonte di carbonio, pH, luce/buio, aerazione) per ottimizzare la metodologia di trasformazione e la resa di inulina.

Questo è il primo studio rivolto ad una valutazione delle HR di carciofo per la produzione di inulina.

BIBLIOGRAFIA

- Ali, M., Abbasi, B.H., Ihsan-ul-haq., 2013. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. Ind. Crop Prod. 49, 400-406.
- Ancora G., 1986. Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 2: Crops, YPS Bajaj ed., Springer Verlag Berlin- Heidelberg, 471-484
- Apostolo, N.M., Brutti, C., Ferrarotti, S.A., Llorente, B.E., Krymkiewicz, N., 2001. Stimulation of root development with cyclodextrins on jojoba shoots *in vitro*. In Vitro-Pl, 37(3), 2001, pp. 414-418
- Aubert, S., and Foury, C., 1981. Couleur et pigmentation antohicyanique de l'artichaut (*Cynara scolymus* L). In V. Marzi e V. Lattanzio (Eds.), Studi sul Carciofo (pp. 57–76). Bari: Industrie Grafiche Laterza.
- Azzini, E., Bugianesi, R., Romano F., Di Venere D., Miccadei S., Durazzo A., Foddai MS., Catasta G., Linsalata V., Maiani G, 2007. Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: a pilot study. Br J Nutr., 97(5), 963-9.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99, 191-203.
- Beckman, C.H., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiol. Mol. Plant P. 57, 101-110.

- Bernhoft, A., 2010. A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.
- Bianco V.V., Pimpini F., 1990. Carciofo (*Cynara scolymus* L.). Orticoltura. Patron Editore, Bologna, 209-251.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. . Lebensm. Wiss. Technol. 22, 25–30.
- Causey, J. L., Feirtag, J. M., Gallaher, D. D., Tungland, B. C., Salvin, J. L., 2000. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men, Nutr. Res., 20, 191–201,.
- Ciancolini, A., Alignan, M., Pagnotta, M.A., Miquel, J., Vilarem, G., Crinò, P., 2013. Morphological characterization, biomass and pharmaceutical compounds in Italian globe artichoke genotypes. Ind. Crop Prod. 49, 326-333.
- Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V., 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchem. J. 91, 107–110.
- Clifford, M., 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. Journal of Science of Food and Agriculture, 80, 1033-1043
- Coinu, R., Cart, S., Urgeghe P., Mulinacci N., Pinelli P., Franconi F., Romani A., 2007. Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. Food Chemistry, 101, 524-531
- De Paoli, G., Rossi, V., Scorzoli, A., 1994. Micropropagazione delle piante ortoflorofrutticole. Edagricole.

- Dellacecca V., Magnifico V., Marzi V., Porceddu E., Scarascia G.T., 1976. Contributo alla conoscenza delle varietà di carciofo coltivate nel mondo. Atti II Congresso Internazionale Studi sul Carciofo, Bari, Ed. Minerva Medica, Torino, 199-316
- Di Venere, D., Linsalata, V., Calabrese, N., Pieralice, M., Bianco, V.V., 2005. Morphological and biochemical changes during growth and development of artichoke buds. *Acta Horti* 681.
- Diwan, R., Shinde, A., Malpathak, N., 2012. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. in vitro culture lines. *J. Bot.* doi:10.1155/2012/685427.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085–1097.
- Dixon R.A, Achnine L, Kota P, Liu C.J, Reddy M.S.S, Wang L., 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence: A genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3: 371–390
- Dong, X., Wang, Y., Liu, T., Wu, P., Gao, J., Xu, J., Yang, B., Hu, Y., 2011. Flavonoids as vasorelaxant agents: synthesis, biological evaluation and quantitative structure activities relationship (QSAR) studies. *Molecules* 16, 8257-8272.
- Dörnenburg H. and Knorr D., 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enz Microb Technol* 17: 674-684)
- Fantini, N., Colombo G., Giori A., Riva A., Morazzoni P., Bombardelli E., Carai M.A.M., 2011. Evidence of Glycemia-lowering Effect by a *Cynara scolymus* L. Extract in Normal and Obese Rat. *Phytotherapy Research*, 25, 463-466
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L., 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1721, 174-184.

- Fratianni, F., Tucci M., De Palma M., Pepe R., Nazzaro F., 2007. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*, 104, 1282-1286.
- Gallaher, D. D., Schneeman, B. O., Ziegler, E.E., Filler, L.J., Jr., 1996. Present Knowledge in Nutrition. Eds., 7th ed., ILSI Press Washington, D.C., pp. 87–97.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirement o suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151.
- Gebhardt R., 1997. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke *Cynara scolymus* L. against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 279-286
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I.D., Nandi, S.K., Rawal, R.S., Pande, V., 2012. In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: a rare Himalayan medicinal orchid. *Ind. Crop Prod.* 39, 1-6.
- Grzegorzczuk, I., Matkowski, A., Wysokińska, H., 2007. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chem.* 104, 536–541.
- Hellwege E. M., Raap M, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG. 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Lett.* 427(1), 25-8.
- Hellwege, E. M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L., Arnd G. Heyer 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(15), 8699-704.
- Heyer, A.G, Schroeer, B., Radosta, S., Wolff, D., Czapla, S., Springer, J.,1998. Structure of the

enzymatically synthesized fructan inulin. Carbohydr Res 313, 165-174.

Hoffmann, W. A., Poorter, H., 2002. Avoiding Bias in calculations of Relative Growth Rate. Annals of Botany, 80: 37-42.

Holst, B., Williamson, G., 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. Curr. Opin. Biotech. 19, 73-82.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agr. Food Chem. 53, 1841-1856.

Knorr, D., Geulen, M., Grahl, H., Sitzmann, W., 1994. Food application of high electric field pulses. Trends Food Sci Tech. 5, 71-75.

Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H., 1997. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. BBA-Gen Subjects. 1335, 335–342

Kraft K., 1997. Artichoke leaf extract recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. Phytomedicine, 4, 369-378

Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., Soković, M., 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. Food Chem. 107, 861-868.

Lattanzio V. and Morone I., 1979. Variations of the orthodiphenol content of *Cynara scolymus* L. during the plant growing seasons. Experientia 35, Birkhauser Verlag, Basel, 993

Lattanzio, V., Cardinali A., Di Venere D., Linsalata V., Palmieri S., 1994. Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads: Enzymic or chemical

reactions? Food Chemistry, 50, 1-7

Lattanzio, V., Kroon P.A., Linsalata V., Cardinali A., 2009. Globe artichoke: A functional food and a source of nutraceutical ingredients. Journal of Functional Foods, 1, 131-144

Lenk, F., Vogel, M., Bley T., Steingroewer, J., 2012. Automatic image recognition to determine morphological development and secondary metabolite accumulation in hairy root networks. Engineering in Life Sciences, 12, 588-594.

Liischer, M., Erdin, C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Boller, T., Wiemken, A., 1996. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. FEBS Letters 385, 39-42.

Llorach, R., Espin J.C., Tomás Barberán F.A., Ferreres F., 2002. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a Potential Source of Health-Promoting Antioxidant Phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3458-3464

Lopez-Molina, D., Navarro-Martinez, M.D., Melgarejo, F.R., Hiner, A.N.P., Chazarra, S., Rodriguez-Lopez, J.N., 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). Phytochemistry 66, 1476–1484.

Lo Scalzo, R., Genna, A., Branca, F., Chedin, M., Chassaigne, H., 2008. Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and cabbage (*B. oleracea* L. var. capitata) and its stability in relation to thermal treatments. Food Chem. 107, 136-144.

Lombardo, S., Pandino G., Mauromicale G., Knödler M., Carle R., Schieber A., 2010. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. Food Chemistry, 119, 1175-1181

Maffei, M., 1999. Metabolismo e prodotti secondari delle piante. UTET-Università

- Mauromicale, G. 1987. Panorama varietale del carciofo e sua prevedibile evoluzione. *Informatore Agrario* 5:69-75
- Mauromicale G. and Ierna A., 2000. Panorama varietale e miglioramento genetico del carciofo. *L'Informatore Agrario*, 56, 39-45
- Menin, B., Moglia, A., Comino, C., Hakkert, J.C., Lanteri, S., Beekwilder, J., 2013. *In vitro* callus-induction in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) J. Hort. Sci. Biotech. Horticulturae Science Biotech, 88, 537-542
- Moglia, A., Lanteri S., Comino C., Acquadro A., de Vos R., Beekwilder J., 2008. Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. *J Agric Food Chem* 56: 8641–8649
- Moglia, A., Comino C., Lanteri S., 2010. Production of novel antioxidative phenolic amides through heterologous expression of the plant's chlorogenic acid biosynthesis genes in yeast. *Metab Eng* 12 : 223 – 232.
- Mulabagal, V., Tsay, H., 2004. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 1, 29-48.
- Mura, P., Ceccarelli, L., Faucci, M.T., Rinaldelli, E., Mancuso, S., 1995. Improvement of solubility of indolbutyric acid by complexation with alpha-cyclodextrin and rhizogenic activity in *Olea europea* L cv Leccio del Corno. *Advance Horticultural Science* 9, 119–121.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Natali, R.M., de Winter, W., van Iren, F., Verpoorte, R., 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat. Prot.* 6, 715-742.

- Negro D., Grieco S., De Lisi A., Sarli G., Sonnante G., 2011. Chlorogenic acid content variation in artichoke plant parts and physiological stages. Proc. VII IS on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives Ed. C. Bazinet, Acta Horticulturae, 942 469-472
- Negro D., Montesano V., Grieco S., Crupi P., Sarli G., De Lisi A., Sonnante G., 2012. Polyphenol compounds in artichoke plant tissue and varieties. Journal of Food Science, 77, 2, 244-252
- Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oks, A., Muranaka, T., Mano Y., 2009. Function of the *aux* and *rol* genes of the Ri plasmid in plant cell division *in vitro*. Plant Signal Behav. 4, 1145-1147.
- Obembe, O.O., Popoola J.O., Leelavathi S., Reddy S.V., 2011. Advances in plant molecular farming. Biotechnol Adv., 29:210–222.
- Oliaro T., 1967. Lineamenti di una storia del carciofo. In: Atti I Congr. Int. Carciofo. Bari. Ed, Minerva Medica, Torino
- Ordas, R.J., Tavazza, R., Ancora, G., 1991. Callus formation from isolated globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) suspension protoplast. Plant Sci. 77, 253-259.
- Pandino G., Courts F. L., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G., 2010. Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in the Immature Inflorescence of Globe Artichoke, Wild Cardoon, and Cultivated Cardoon. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 1026-1031
- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G., 2011a. Chemical and Morphological Characteristics of New Clones and Commercial Varieties of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). Plant Foods for Human Nutrition, 66, 291- 297
- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G., 2011b. Profile of polyphenols and

phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 148-153

Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G., 2011c. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, 126, 417-422

Pandino, G., Lombardo, S., Mauro, R.P., Mauromicale, G., 2012a. Variation in polyphenol profile and head morphology among clones of globe artichoke selected from a landrace. *Sci Hort.* 138, 259-265.

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G., 2012b. Characterization of phenolic acids and flavonoids in leaves, stems, bracts and edible parts of globe artichokes. *Acta Hort.* 942, 413-417.

Pandino, G., Lombardo, S., Williamson, G., Mauromicale, G., 2012c. Polyphenol profile and content in wild and cultivated *Cynara cardunculus* L. *Ital. J. Agr.* 7, 254-261.

Pandino, G., Lombardo, S., Lo Monaco, A., Mauromicale, G., 2013a. Choice of time of harvest influences the polyphenol profile of globe artichoke. *J. Funct. Foods* 5, 1822-1828.

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., 2013b. Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Ind. Crop Prod.* s, 44, 44-49.

Pandino, G., Lombardo, S., Moglia, A., Portis, E., Lanteri, S., Mauromicale, G., 2015. Leaf polyphenol profile and SSR-based finger printing of new segregant *Cynara cardunculus* genotypes. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2014.00800.

Pecaut P., Martin F., 1993. Variation occurring after natural and *in vitro* multiplication of early mediterranean cultivars of globe artichoke. *Agronomie* 13, 909-919.

- Pekkarinen, S.S., Stöckmann, H., Schwarz, K., Heinonen, M., Hopia, A.I., 1999. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agr. Food Chem.* 47, 3036-3043.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* 97, 137-150.
[doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.033](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.033)
- Pietta, P., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035 - 1042
- Porceddu E., Dellacecca V., Bianco V.V., 1976. Classificazione numerica di cultivar di carciofo. *Atti II Congresso Internazionale Carciofo, Bari.*, Ed. Minerva Media, Torino, 1105-1119
- Praznik, W., and Beck, H.R.F., 1985. Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. *Journal of Chromatography*, 348 (1985) 187-197
- Ramachandra Rao S. and Ravishankara G. A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 20: 101-115.
- Ravindra, P.V., Narayan, M.S., 2003. Antioxidant activity of the anthocyanin from carrot (*Daucus carota*) callus culture. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54, 349–355.
- Roberfroid, M. B., Delzenne, N. M., 1998. Dietary fructans, *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 117–143.
- Roberfroid, M., 2004. Inulin-Type Fructans. *Functional Food Ingredients*. CRC Press LLC.
- Rondanelli, M., Giacosa A., Orsini F., Opizzi A., Villani S., 2011. Appetite Control and Glycaemia Reduction in Overweight Subjects treated with a Combination of Two Highly

Standardized Extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus*. *Phytotherapy Research*, 25, 1275-1282.

Ronkart, S. N., Blecker, C. S., Fourmanoir, H., Fougnes, C., Deroanne, C., Van Herck, J.-C., Paquot, M., 2007. Isolation and identification of inulooligosaccharides from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604, 81–87.

Saccardo F, Ancora G (1983) Il contributo della micropropagazione al miglioramento della coltura del carciofo. In: Giornata su Recenti acquisizioni del miglioramento genetico italiano in orticoltura e floricoltura, Ferrara, 9 December, pp 24 – 26

Saénz Rodríguez T., García Giménez D., De la Puerta Vázquez R., 2002. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*, 9, 8, 687-693

Savona, M., Mascarello, C., Sacco, E., Ruffoni, B., 2012. Osservazioni dell'effetto della qualità della luce LED sulla crescita di piante micropropagate di *Myrtus communis* subsp. Trentina. *Acta Italus Hortus*, 6: 136-139.

Saw, N.M.M.T., Riedel, H., Cai, Z., Kütük, O., Smetanska, I., 2012. Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric fields and ethephon. *Plant Cell Tiss. Org.* 108, 47-54.

Schütz K., Kammerer D., Carle R., Schieber A. 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4090-4096.

Schütz, K., Persike, M., Carle, R., Schieber, A., 2006a. Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ.

Anal. Bioanal. Chem., 384, 1511-1517.

Schütz, K., Muks, E., Carle, R., Schieber, A., 2006b. Separation and quantification of inulin in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) roots by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Biomed. Chromatogr. 20: 1295–1303.

Shahidi, F., 1997. Natural antioxidants: an overview. In *Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications*, Shahidi F, Champaign, IL: AOCS Press, pp.1-7.

Szopa, A., Ekiert, H., 2012. *In vitro* cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese Mangolia vine) – a potential biotechnological rich source of therapeutically important phenolic acids. Appl. Biochem. Biotech. 166, 1941–1948.

Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R., 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. J. Food Comp. Anal. 20, 323–329.

Tavazza, R., Papacchioli, V., Ancora, G., 2004. An improved medium for *in vitro* propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. “Spinoso sardo”. Acta Hort. 660, 91–97.

Trajtemberg, S.P., Apostolo, N.M., Fernandez, G., 2006. Calluses of *Cynara cardunculus* var. *cardunculus* cardoon (Asteraceae): determination of cynarine and chlorogenic acid by automated high-performance capillary electrophoresis. In Vitro Cell. Dev. Biol. 42, 534–537.

Truong, V., Deighton, N., Thompson, R.T., Mcfeeters, R.F., Dean, L., Pecota, K.V., Yencho, G.C., 2010. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. J. Agr. Food Chem. 58, 404-410.

Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. Chemical Review 98,2045–2076.

- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, N., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., van Vliet, E., 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, 81, 121–132.
- Wang, M., Simon, J.E., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q.Y., Tadmor, Y., 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agr. Food Chem.* 51, 601-608.
- Wang, L., Stoner, G.D., 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 269, 281-290.
- Weathers, P.J., Towler, M.J., Xu, J., 2010. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbial Biotechnol.*: 85(5), 1339–1351
- Wink, M., 1997. Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Adv Bot Res.* 25: 141-169.
- Wong, C.C., Meinl, W., Glatt, H., Barron, D., Stalmach, A., Steiling, H., Crozier, A., Williamson, G., 2010. *In vitro* and *in vivo* conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans. *J. Nutr Biochem.* 11, 1060-1068.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.*, 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 89-103.

Zhang, W., Furusaki, S., 1997. Regulation of anthocyanin synthesis in suspension cultures of strawberry cell by pH. *Biotechnol. Lett.* 19, 1057-1061.

Ringraziamenti

Ringrazio la Dott.ssa Raffaella Tavazza per avermi seguito con grande disponibilità, collaborazione ed entusiasmo durante lo svolgimento del lavoro sperimentale svolto presso i laboratori dell'Agenzia ENEA della Casaccia e per la disponibilità e l'aiuto offertomi per la stesura di questo lavoro di tesi. A lei va la mia più sincera gratitudine, poiché è soprattutto grazie a lei che ho potuto raggiungere questo risultato.

Ringrazio il Dott. Oliviero Maccioni per il supporto fondamentale che mi ha offerto nello svolgimento del lavoro sperimentale.

Infine desidero ringraziare con affetto la mia famiglia ed in particolare la mia compagna di vita, che con grande generosità mi ha supportato sempre in questo percorso.