

Studio *in vitro* del rilascio graduale del complesso nanospugna/fitoregolatore sulla comparsa dei primi apici radicali in *Passiflora amalocarpa*

Paola Chiavazza, Andrea Faggio, Valentina Polin e Marco Devecchi

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università di Torino

In vitro study of nanospunge/ growth regulator complex gradual release on the onset of the first root tips in *Passiflora amalocarpa*

Abstract. With the aim to increase multiplication rate, aseptic culture protocol using explants of various origin are known. In more recent times, studies were undertaken on the complex nanospunge/plant growth regulator activity to stimulate *in vitro* rhizogenesis of passiflora microshoots with different attitude to the adventitious roots. Nanospunges are obtained through a newly established hyper-cross-linking of beta-cyclodextrin, with respect to which, depending on the crosslinker used, enhance the ability to include stable inorganic and organic molecules. They are experienced in the chemical-pharmaceutical like solubilizing agents and as nanovectors of poorly soluble active molecules, whom they are able to promote the gradual release and the effectiveness. Recently in the medical, numerous studies try to evaluate toxicity decrease of chemotherapeutic principles (hemolysis experiments conducted on human erythrocytes) and their efficiency increase even at lower doses, effects mainly due to the gradual release that occurs when active ingredient is complexed with nanospunge. In this paper we reported the first results, within the plant, of a study that aims to demonstrate that included growth regulator release (IBA, IAA) occurs in a gradual way, by simply delaying but not in any way inhibiting the onset of the first *Passiflora amalocarpa* root tips, which presents no difficulty to adventitious roots.

Key words: solubilizing agents, nanovectors, IBA, IAA.

Introduzione

Le interazioni fra molecole in grado di determinare complessi aventi caratteristiche chimico-fisiche innovative e brevettabili, sono oggetto di studio da parecchi anni. Sono numerosi i composti che hanno la

capacità di includere altre molecole nella loro struttura mutandone, in questo modo, le proprietà. Ad esempio le ciclodestrine (CD), oligomeri del D-glucopiranosio ottenute mediante degradazione enzimatica degli amidi, sono utilizzate da tempo per il lento rilascio e la veicolazione di molecole utili. In campo agrario le prime applicazioni, in tempi recenti, riguardano l'inclusione di regolatori di crescita come acido indolbutirrico (IBA) e acido naftalenacetico (NAA) allo scopo di stimolare la radicazione sia di talee legnose che di microgermogli *in vitro* (Mura *et al.*, 1995; Brutti *et al.*, 2000). A loro volta, le CD sono state utilizzate per la sintesi di composti costituiti da macromolecole ramificate a struttura tridimensionale, insolubili in acqua, dove danno origine a sospensioni di tipo colloidale (Cavalli *et al.*, 2006). In questo tipo di struttura sono incluse cavità di varia grandezza, che si vanno ad aggiungere a quelle presenti nella CD di base e che danno origine a un composto chiamato nanospugna (NS). Questa ha la caratteristica di poter includere simultaneamente sia molecole lipofile (nelle cavità idrofobiche delle CD), che molecole idrofile (nelle cavità che si vengono a creare fra gruppi base di CD) (Mhanga *et al.*, 2007).

Lo studio del rilascio graduale di composti tossici a livello cellulare, possibile attraverso l'uso di queste strutture di recente costituzione, da tempo si avvale di sperimentazione a livello clinico. Pazienti oncologici, dopo l'assunzione di farmaci veicolati con NS, vengono periodicamente monitorati con esami di laboratorio allo scopo di valutare il rilascio rallentato dall'inclusione del chemioterapico (Swaminathan *et al.*, 2010).

Materiali e metodi

Dovendo evidenziare il fenomeno già abbastanza complesso di gradualità del rilascio di sostanze, la scelta della specie vegetale da utilizzare è caduta su una pianta con buona competenza, in assenza di stimolazione esogena, sia alla produzione di nuovi germogli che all'emissione di apici radicali.

A partire da gemme ascellari di *Passiflora amalocarpa* Barb. Rodr., si è ottenuta una produzione di

* paolamaria.chiavazza@unito.it

microgermogli, ottenuti mediante subcolture di nodi nel substrato MS (Murashige e Skoog, 1962) in assenza di fitoregolatori. Per gli studi di rizogenesi sono stati utilizzati germogli costituiti da due nodi, di circa 2 cm di lunghezza. Il mezzo di radicazione era costituito da MS con aggiunta di IBA e acido indolacetico (IAA), entrambi a dosi di 0,5 e 5 mg/l. I due principi sono stati complessati a concentrazione equimolare con nanospugna derivata da beta-ciclodestrina, con modalità di formazione del complesso già oggetto di pubblicazione (Chiavazza *et al.*, 2009). Debite quantità della soluzione contenente il complesso NS/regolatore di crescita sono state aggiunte al mezzo di coltura prima della solidificazione.

Le condizioni sperimentali prevedevano:

- MS + nanospugna (5mg/l)
- MS + IBA (0,5 e 5 mg/l)
- MS + NS/IBA (0,5 e 5 mg/l)
- MS + IAA (0,5 e 5 mg/l)
- MS + NS/IAA (0,5 e 5 mg/l)

Ogni trattamento è stato replicato in 5 vasi di coltura e in ognuno sono stati trapiantati 5 microgermogli. L'emissione di radici avventizie/microtalea è stata osservata nei due schemi sperimentali (IBA, IAA) con una frequenza settimanale. I dati sono stati sottoposti ad ANOVA seguita dal test di Tukey per la verifica della significatività delle differenze fra le medie, utilizzando il software Graph Pad Prism.

Risultati e discussione

A conferma di quanto osservato in prove precedenti (dati non riportati), la presenza di NS non ha alterato significativamente la capacità di regolazione induttiva a livello radicale (fig. 1). Per quanto riguarda il

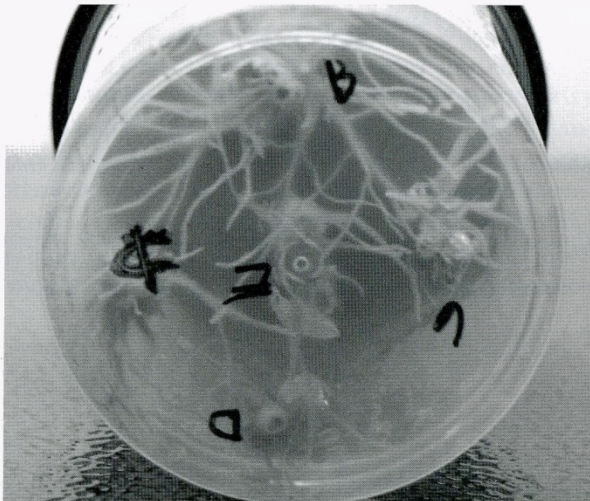


Fig. 1 - Allungamento di apici radicali in NS a fine ciclo di coltura.
Fig. 1 - Root tips elongation in NS at the end of culture

fenomeno del rilascio graduale, oggetto del nostro studio, non è stata osservata differenza significativa fra i trattamenti con e senza NS in presenza di entrambi i regolatori di crescita alle dosi minori (0,5 mg/l).

Prendendo invece in considerazione i trattamenti con IAA e IBA a concentrazione maggiore, l'entità del numero di radici emesse da ogni germoglio non differiva a fine trattamento, ma era diversa la velocità con la quale esse comparivano durante il ciclo di subcoltura in esame. Il risultato ottenuto verso il 30° giorno, testimonia che il fitoregolatore complessato nella NS non è ancora disponibile per la pianta, se non in minima parte (figg. 2 e 3). La disponibilità è, invece, pressoché totale verso il 60° giorno, quando non si riscontrano differenze significative tra i trattamenti con i regolatori di crescita allo stato libero e complessati alla fine del periodo di osservazione (fig. 4). In generale, la capacità della nanospugna di incorporare all'interno

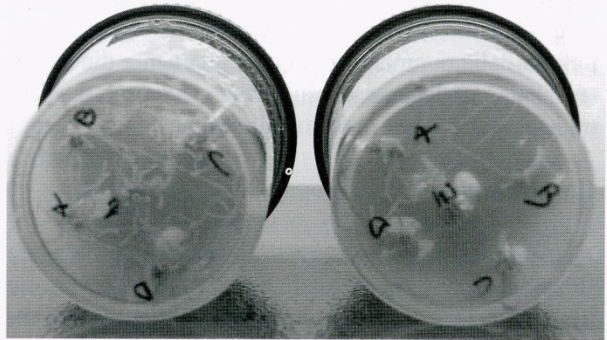


Fig. 2 - Numero di radici/microtalea nei trattamenti con IBA 5 mg/l allo stato libero (sinistra) e complessato (destra) al 30° giorno di coltura.

Fig. 2 - Number of roots/microshoot with free (left) and complexed (right) IBA 5 mg/l at 30th day of culture.

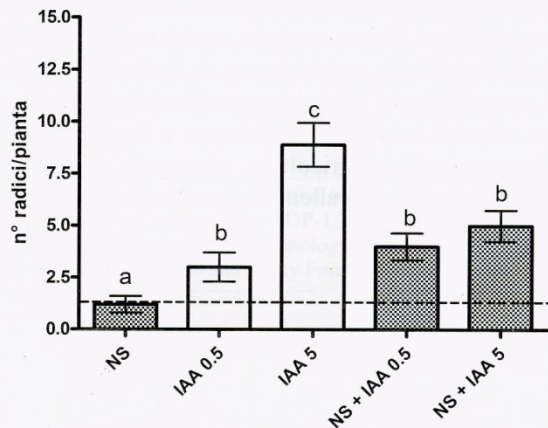


Fig. 3 - Risposta ai trattamenti con IAA allo stato libero e complessato con NS in *Passiflora amalocarpa*
Fig. 3 - Rooting response to free and complexed IAA treatments in *Passiflora amalocarpa*

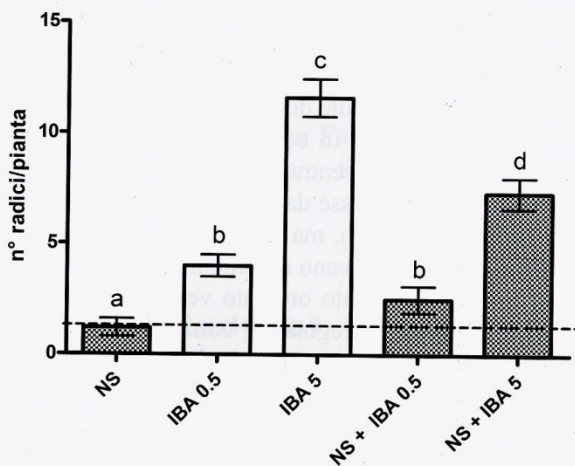


Fig. 4 - Risposta ai trattamenti con IBA allo stato libero e complessato con NS in *Passiflora amalocarpa*.

Fig. 4 - Rooting response to free and complexed IBA treatments in *Passiflora amalocarpa*.

della sua struttura molecole utili, è ancora da ottimizzare in quanto studi recenti sembrano testimoniare che l'entità della complessazione è strettamente dipendente dal tipo di legame chimico che si viene a formare tra le ciclodestrine che la costituiscono.

Conclusioni

Con questo studio si è voluto iniziare ad indagare se anche in sistemi vegetali è possibile osservare un rilascio di tipo graduale mediante l'utilizzo di complessi con NS; mentre la capacità delle nanopugne di incorporare molecole all'interno della loro struttura e di veicolarle lentamente è stata valutata ampiamente in campo chimico-farmaceutico, in ambito vegetale sono noti solamente lavori che riguardano esclusivamente la migliorata solubilità di composti a difficile dissoluzione. Ulteriori accertamenti dovranno riguardare affinate caratteristiche specifiche quali l'effettiva migliorata solubilità delle molecole complessate, la loro stabilità chimica nonché la permanenza a livello radicale di composti utili in agricoltura, ad elevata biodisponibilità, determinate da rallentata distribuzione.

Riassunto

In tempi più recenti, sono stati intrapresi studi riguardanti l'attività del complesso nanopugna/fitorregolatore per stimolare la rizogenesi *in vitro* di microgermogli di passiflora a diversa attitudine alla radicazione avventizia. Le nanopugne sono materiali di recente costituzione ottenuti tramite iper-reticolazione della beta-ciclodestrina, rispetto alla quale, a seconda del reticolante utilizzato, incrementano la capacità di includere stabilmente molecole organiche ed inorganiche. In questo lavoro sono riportati i primi risultati in campo vegetale di uno studio che ha come obiettivo la dimostrazione che il rilascio del regolatore di crescita complessato (IBA, IAA) avviene in modo graduale, semplicemente ritardando ma non inibendo in alcun modo la comparsa dei primi apici radicali in *Passiflora amalocarpa*, la quale non presenta difficoltà alla radicazione avventizia *in vitro*.

Parole chiave: agenti solubilizzanti, nanotrasportatori, IBA, IAA.

Bibliografia

- MURA P., CECCARELLI L., FAUCCI M.T., RINALDELLI E., MANCUSO S., 1995. *Improvement of solubility of indolbutyric acid by complexation with alfa-cyclodextrin and rhizogenic activity in Olea europea L. cv. Leccio del Corno*. Sci. Hort., 9: 119-121.
- BRUTTI C., APOSTOLO N.M., FERRAROTTI S.A., LLORENTE B.E., KRYMKIEWICZ L., 2000. *Micropropagation of Cynara scolymus employing cyclodextrins to promote rhizogenesis*. Sci. Hort., 83: 1-10.
- CAVALLI R., TROTTA F., TUMIATTI W., 2006. *Cyclodextrin-based Nanosponges for Drug Delivery*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 56: 209-213.
- MHLANGA S.D., MAMBA B.B., KRAUSE R., MALAFETSE T.J., 2007. *Removal of organic contaminants from water using nanosponge cyclodextrins polyurethanes*. J. Chem. Tech. Biotech. 82: 328-388.
- SWAMINATHAN S., PASTERO L., SERPE L., TROTTA F., VAVIA P., AQUILIANO, TROTTA M., ZARA G., CAVALLI R., 2010. *Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity*. Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics 74: 193-201.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant 15: 473-497.
- CHIAVAZZA P., LAVA C., TROTTA F., DEVECCHI M., 2009. *Attività di complessi nanopugna-regolatori nella radicazione di microgermogli di Passiflora spp*. Italus Hortus, 16(2): 258-262.