



AESCULUS HIPPOCASTANUM L.

colture in vitro per la produzione di escina

* **Stefania Dello Sisto**

* **Alessandra Bertoli**

* **Luisa Pistelli**

INQUADRAMENTO BOTANICO

Famiglia: *Sapindaceae*

Genere: *Aesculus*

Specie: *hippocastanum L.*

Sinonimi: *Castagno d'India, Horse chestnut, Marronnier d'Indie, Castano de Indias, Falso castano, Castano caballuno.*

L'ippocastano è un grande albero originario dell'Asia occidentale e delle foreste dei Balcani, ora coltivato in tutta l'Europa centro-meridionale e nelle zone temperate, come pianta ornamentale lungo i viali, nei parchi e nei giardini. In Italia si incontra fino a 800 m di altitudine.

La denominazione del genere, attribuita impropriamente da Linneo all'Ippocastano, corrisponde al nome latino di una quercia (*Aesculus*) che produce ghiande commestibili. I frutti erano ritenuti medicamentosi per la tosse dei cavalli, il nome della specie, infatti, deriva dalle parole greche *hippos*, cioè cavallo, e *kastanon*, cioè castagna.

DESCRIZIONE BOTANICA

Albero di grandi dimensioni con chioma rotondeggiante, corteccia bruna e ruvida, cresce spontaneo o coltivato ovunque. Fiorisce in giugno.

Le foglie digitate composte hanno 7 foglioline grandi acutamente dentate di forma cuneato-oblunga. I fiori, odorosi, sono raccolti in pannocchie terminali. Il frutto è una cassuola globosa, spinosa e coriacea che si apre in due o tre valve contenenti da due a quattro semi lisci, lucidi, simili alla castagna. Il loro colore è marrone con ilo cenerognolo.

LA DROGA, LE PROPRIETÀ TERAPEUTICHE E I PRINCIPI ATTIVI

La droga è costituita prevalentemente dai semi, anche se sono noti usi popolari di differenti parti dell'albero: i fiori, le foglie e la corteccia.

Fu il Mattioli, medico e botanico senese del cinquecento, ad importarlo da Costantinopoli dove aveva visto usare il frutto nella medicina veterinaria somministrato ai cavalli sotto forma d'infuso contro le coliche intestinali e la tosse. Più tardi, nei suoi celebri *Commentari in Dioscoridem* (1565), egli riconoscerà l'azione astringente di questa droga e i suoi benefici effetti sulla circolazione.

In Francia si usava la farina dei semi per applicazioni esterne, per recare sollievo nelle tumefazioni reumatiche e gottose, mentre i semi, crudi o cotti, servivano per preparare bagni curativi anche per le emorroidi. La medicina erboristica inglese li impiegava per questo disturbo oltre che per i reumatismi. In Italia ed in Germania si utilizzavano per le varici e per le flebiti, sia per uso interno, sotto forma di estratto fluido, sia per uso esterno come cataplasmi astringenti. Per questo scopo erano impiegate soprattutto le foglie. In America l'Ippocastano venne usato anche come anti-trombotico, probabilmente attivo nella diminuzione del tempo di coagulazione del sangue.

Tra il 1896 e il 1907 fu pubblicato il primo lavoro scientifico sui semi dell'Ippocastano. Artault De Vevey ispirandosi alla medicina popolare francese dimostrò clinicamente le proprietà curative dell'alcoolaturo nei disturbi varicosi.

Attualmente questa droga è molto utilizzata in terapia per l'insufficienza venosa periferica, varici, flebiti, emorroidi, cellulite, fragilità capillare. Un'ampia letteratura, infatti, riporta le varie attività farmacologiche, tra cui quelle antiedematose, antiflogistiche, e capillaro-protettive. Rientra in numerosi preparati erboristici e farmaceutici, in forme farmaceutiche diverse quali compresse, capsule, supposte e pomate, nonché estratti idroalcolici.

Viene spesso associato ad estratti di altre piante come l'amamelide, la vite rossa, il ginkgo e il mirtillo.

I semi dell'Ippocastano contengono numerose sostanze, concentrate nei cotiledoni: triterpeni dell'oleano (escina, criptoescina, agriescina), tannini catechici, triterpeni turicallanici (turicalla-8,23-dien-3b-olo), glucosidi cumarinici (esculoside), flavonoidi (glicosidi della quercetina e del kaenferolo), vitamine C, B, e D. I benefici effetti dell'Ippocastano, tuttavia sono dovuti all'escina, C₅₄H₂₈O₂₃ che per idrolisi spinta è riducibile alla escigenina, chimicamente definibile come un triterpene pentaciclico appartenente al gruppo della beta-amirina/acido oleanoico. L'escina è una miscela complessa di saponine triterpenoidiche difficili da separare i cui due agliconi principali (sapogenine) sono la protoescigenina e il barrintogenolo C, presenti nella miscela in rapporto di 2:8 ed aventi lo scheletro dell'oleano-12-ene. Essi si legano a zuccheri come il glucosio, lo xilosio, il galattosio che formano una catena tricarbossilica, disponendosi secondo un ordine diverso, in posizione 3.

Con legami esterei, invece, sono legati a molti acidi fra cui l'acido acetico, isobutirrico, alfa-metilbutirrico, angelico, tiglico e glicuronico disposti in differenti posizioni della molecola. L'escina si trova in due forme isomere: alfa-escina e beta-escina.

Si distingue così una escina cristallizzata, scarsamente attiva per somministrazione orale, perché scarsamente solubile in acqua, cioè l'isomero alfa, e una forma amorfa di circa duecento volte più solubile di questa, che può essere impiegata come acido libero sotto forma dei suoi sali di sodio e di potassio, ovvero l'isomero beta. Comunemente il termine escina è riferito a tale molecola, cioè alla miscela naturale di saponine dell'Ippocastano, sia sotto forma di sale sodico sia sotto forma di acido libero.

Le Farmacopee e i testi di Farmacognosia oltre ai semi, fonte industriale di escina, descrivono la corteccia dell'ippocastano, come fonte industriale di esculina, principio attivo appartenente alla classe delle cumarine (6,7-diidrossucumarina-6-glucoside), il cui aglicone è noto come esculetina. Le proprietà farmaceutiche di questo ulteriore principio attivo sono, in parte, simili a quelle della saponina. L'esculina, infatti, oltre ad essere utilizzata per uso esterno come efficace astringente e vasocostrittore, possiede attività antiossidante, dovuta all'inibizione della fenilalaninidrossidasi, e attività batteriostatica e antifungina, comunque esplicate attraverso il trattamento cutaneo.

INTRODUZIONE

I primi lavori svolti per verificare se fosse stato possibile ottenere l'escina da colture in vitro risalgono a circa trenta anni fa. L'unica fonte per l'industria farmaceutica, infatti, era rappresentata dai semi di *Aesculus hippocastanum L.*, e l'escina, era già larga-



mente utilizzata per i preparati farmaceutici orali e topici. Gli esperimenti iniziarono nel 1976 in Italia, presso l'Istituto e Orto Botanico dell'Università di Genova, dove alcune ricercatrici intrapresero il lungo percorso di studi e di lavoro, utilizzando campioni prelevati dall'albero di ippocastano presente nel giardino dell'università.

Dal punto di vista biotecnologico la tecnica applicata fu quella dell'embriogenesi somatica, cioè si indagò sulle possibilità di rigenerare tessuti a partire da cellule somatiche prelevate da espianti selezionati. Secondo questa tecnica, le cellule somatiche vengono coltivate in laboratorio al fine di ottenere embrioni, i quali possono essere conservati in cella o sviluppati fino ad avere pianticelle con possibilità di trapianto. L'embriogenesi somatica, nel caso dell'ippocastano, è stata ottenuta da tessuti diversi (utilizzando medium e nutrienti diversi) quali antere (Radojevic 1978), foglie primarie (Dameri et al. 1986), filamenti staminali (Jørgensen 1989), cotiledoni (Profumo et al. 1990), rami (Gastaldo et al. 1994). Tuttavia gli embrioni somatici ottenuti da espianti di foglie risultarono i più produttivi rispetto al quantitativo di escina contenuta, o meglio, il contenuto di escina presente in essi risultò il maggiore ritrovato nei tessuti generati da colture in vitro, addirittura superiore al quantitativo presente nel seme in vivo.

Le stesse ricercatrici indagarono anche sulla possibile presenza dell'esculina, altro principio attivo prodotto dall'ippocastano, e del suo aglicone, l'esculetina, nella proliferazione cellulare di espianti prelevati dalla corteccia, tipica fonte delle sostanze in vivo. Tuttavia, in questo caso i risultati dell'esperimento si fermarono alla constatazione dell'effettivo ritrovamento dei metaboliti secondari, poiché il valore del loro quantitativo nella coltura in vitro, non fu entusiasmante. I principi attivi, infatti, erano presenti in quantità inferiore al contenuto rinvenuto in vivo. Inoltre, dagli embrioni somatici nati da espianti di tipo diverso (cotiledoni, foglie), anche prelevati dalla pianta adulta, fu possibile ottenere la rigenerazione della pianta di ippocastano. La stessa tecnica dell'embriogenesi somatica, quindi, oltre che per la produzione di escina, può essere utilizzata per diversi tipi di micropropagazione. (Profumo et al. 1990)

GLI ESPERIMENTI E LA PRODUZIONE DI ESCINA

I primi esperimenti di colture in vitro per la produzione del principio attivo, furono svolti nel 1976 prendendo in considerazione tessuti prelevati dal seme dall'ippocastano, dal quale si estrae notoriamente l'escina. I semi utilizzati vennero raccolti in momenti diversi, sia rispetto al loro sviluppo che alla stagione. Tuttavia, quelli che dettero i risultati migliori vennero selezionati prima della deiscenza del frutto, cioè nel mese di agosto e in quello di settembre ed anche raccolti direttamente sul terreno (in questo caso prelevati ad ottobre). In considerazione dell'importanza del materiale di partenza, per il buon esito dell'esperimento, si rivelò determinante anche un altro fattore. Poiché si trattava del primo studio, i frammenti di tessuto da coltivare furono prelevati in più regioni cotiledonari, in modo da verificare eventuali variazioni di comportamento rispetto alla crescita in vitro. Effettivamente questa strategia si rivelò fondamentale e permise, dopo ripetute semine, di individuare nel seme zone di prelievo particolari per ottenere sia calli sia nuove radici. Gli espianti tratti dai cotiledoni furono coltivati in vitro ad una temperatura oscillante intorno ai 23 °C e con periodi di luce e buio della durata di 12 ore, su vari substrati sia acquosi che agarizzati. Dopo diversi tentativi di somministrazione dei nutrienti e dei fitoregolatori, si notò che la proliferazione cellulare diveniva ottimale su medium nutritivo liquido, costituito dalla soluzione salina, vitamine, cisteina e acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D). La sola aggiunta di zuccheri e minerali, infatti, non fu sufficiente per uno sviluppo cellulare abbondante, che, invece, si rivelò ottimale in seguito alla scelta del 2,4-D, in quanto gli altri fitoregolatori testati incidevano negativamente sulla

proliferazione dei tessuti. (Profumo et al. 1976; Dameri et al. 1978)

Negli esperimenti effettuati con concentrazioni variabili e combinazioni diverse di sostanze nel medium, le diverse regioni cotiledonari, dimostrarono di avere un differente tasso di crescita direttamente collegato alla presenza di fasci conduttori, indispensabili per la formazione di nuovi tessuti. L'alta attività di moltiplicazione cellulare, perciò, era limitata agli espianti prelevati in vicinanza dell'asse embrionale, intorno ad esso e nelle zone della guaina del fascio. Si originarono così calli friabili con formazioni più resistenti da cui si estendevano numerose radici. I calli più esuberanti, quasi sempre verdi, misero in evidenza, che non vi era incompatibilità tra la formazione di clorofilla e la crescita, cioè la concentrazione ottimale delle auxine non era legata alla soppressione della clorofilla, contrariamente a quanto osservato in altri studi. Nelle neoformazioni, inoltre, in particolare nella zona dei fasci conduttori, erano presenti notevoli quantità di amido sottoforma di granuli, la cui fisionomia era differente da quella osservata nei frammenti cotiledonari e quindi nel seme appena raccolto. In questo caso, infatti, i granuli semplici avevano forma subsferica o più o meno ovoidale, mentre nei nuovi tessuti l'amido si presentava sottoforma di agglomerati, come fu trovato nel fusto e nei rami dell'albero, denotando la presenza di due tipologie di granuli nello stesso individuo. (Profumo et al. 1976).

L'indagine circa la presenza di escina, venne eseguita dopo cinque mesi dalla semina di 1 g di espianto cotiledonare. L'estratto che fu confrontato in cromatografia su strato sottile (TLC) con la soluzione standard di escina. La quantità di escina individuata risultò equivalente a quella presente nei tessuti cotiledonari in vivo, ma nessuna traccia venne rinvenuta a livello delle cellule neoformate o nel liquido di coltura, a prescindere dal tipo di terreno utilizzato. Il principio attivo restava presente nei tessuti cotiledonari anche dopo una lunga permanenza in vitro (Profumo et al. 1976). I calli risultarono privi di escina rispetto al tessuto da cui derivavano probabilmente, perché le cellule formavano un parenchima scarsamente organizzato, benché i cotiledoni fossero il tessuto selettivo per l'accumulo del principio attivo. Le ricercatrici, quindi, svilupparono i test seguenti partendo da altri tessuti dell'ippocastano, al fine di trovare migliori potenzialità biochimiche e morfogenetiche per le colture biosintetiche. Gli esperimenti successivi, infatti, si svolsero nell'intento di sviluppare l'embriogenesi somatica prelevando gli espianti per la coltura dalle foglie primarie di piantine cresciute in vitro da embrioni zigotici. Nella letteratura farmaceutica, le foglie dell'ippocastano non sono considerate come



parte selettiva per l'accumulo di escina, tuttavia se ne conoscono usi popolari (Dameri et al. 1986)

I frammenti prelevati furono coltivati in vitro su mezzo MS con il 3% di saccarosio, solidificato con agar, e integrato con kinetina, 2,4-D, e azoto (KDN), indispensabili per la formazione del callo ed anche per lo sviluppo delle grandi potenzialità morfogenetiche. Dopo un periodo di 25 giorni, i calli formati furono isolati e trasferiti in subcoltura, con lo stesso medium e poi senza gli ormoni. Alcuni calli furono subcolturali ad intervalli di 25 giorni, comunque con le medesime condizioni di coltura di partenza e dettero calli bianchi e compatti - detti precursori - da cui occasionalmente, ma spontaneamente si ebbero calli gialli con regioni friabili (gruppo A), dai quali si svilupparono embrioni. L'altra porzione di calli fu isolata in medium liquido e posta a crescere in agitazione per 25 giorni e poi trasferita su medium solido, generando calli bianchi friabili, incapaci di embriogenesi (gruppo B). Tutte le colture erano state poste in camera di crescita alla temperatura di 25±1 °C alle condizioni di luce e buio di 12 ore (Dameri et al. 1986).

I calli del gruppo A mostrarono alta frequenza di embriogenesi somatica, continuando a formare embrioni anche dopo ripetute subcolture. Da questi embrioni, nella maggioranza dei casi, si ottennero embrioni secondari, confermando che la presenza di embrioni stimola la formazione di nuovi (Staritsky, 1970; Sondal and Sharp, 1977; Sondahl et al. 1980). Gli embrioni somatici che furono posti in medium senza ormoni, proseguirono la crescita con la formazione di due o più cotiledoni verdi, mentre l'organogenesi si manifestò prima con la produzione dell'apparato epigeo e poi con l'emissione delle radici. La differenziazione di più foglie, la possibilità di ottenere embrioni somatici e tessuti diversi dai calli rigenerati,

potevano costituire materiale utile per lo sviluppo selettivo di cellule ricche in escina. Tuttavia, nell'intento di ottenere la produzione del principio attivo, fu fondamentale osservare anche le differenze istologiche e morfologiche sorte proprio nello sviluppo eterogeneo dei calli, determinato sia dalla presenza di nutrienti diversi, che dalle condizioni ambientali di crescita. Tale disomogeneità tra i calli era connessa con le differenze biochimiche specialmente riguardo all'escina contenuta (Dameri et al. 1986; Profumo et al. 1986).

In particolare le ricercatrici giunsero alla verifica che il bilancio ormonale e nutrizionale era responsabile dell'embriogenesi somatica. **Gli studi ultrastrutturali** fornirono in questo senso una importante chiarificazione, delucidando le fattezze subcellulari corrispondenti a caratteristiche morfologiche e fisiologiche diverse tra i due gruppi di calli A e B, discendenti entrambi dal callo precursore mantenendo lo stesso medium e gli stessi nutrienti, ma con condizioni di coltura differenti. Il callo precursore, mostrava cellule piccole, senza spazi intercellulari, con vacuoli piccoli sparsi nel citoplasma e un grosso vacuolo centrale, mentre i mitocondri erano scarsamente dotati di creste e i plastidi privi di amido. Il gruppo di calli (A), che fu posto in camera di crescita su medium solido e statico, ebbe notevole sviluppo grazie all'alta attività metabolica, di cui erano prova sia l'alta sintesi proteica, dovuta alla presenza frequente dei polisomi, che le numerose creste mitocondriali, testimonianza dell'accelerata attività respiratoria. Nelle cellule, ricche di organelli, era anche presente amido per le cresciute necessità nutrizionali, ma la sintesi di questo polisaccaride era legata anche alle capacità embriogenetiche che, infatti, non erano presenti nel callo precursore, come pure l'amido stesso. **L'esame istologico**, inoltre, evidenziò sviluppo tissutale, con cellule meristematiche ed elementi vascolari e la presenza di un precipitato nero nei vacuoli, che rappresentava il contenuto di escina. Questa linea di calli, in fine, aveva la capacità di generare embrioni somatici, che conservarono l'attività di produzione del principio attivo. L'altro gruppo di coltura (B) si sviluppò prima con agitazione meccanica del medium liquido, poi su medium statico e il cambiamento dello stato fisico di esso, forse, poteva produrre diverse situazioni ormonali e/o nutrizionali da cui, probabilmente, dipendeva la differenziazione di cellule con alta crescita e allargamento, ma senza potenziale abilità embriogenetica. In queste cellule, infatti, si osservava una fattura ultrastrutturale che suggeriva un buon livello metabolico, ma non erano presenti elementi vascolari e non vi era amido, confermando che la presenza di esso fosse legata all'acquisizione delle capacità embriogenetiche (Profumo et al. 1986). L'investigazione sul quantitativo di escina

prodotta, perciò, prese in considerazione il callo precursore, il callo embriogenetico A e gli embrioni, in relazione alla saponina presente nel cotiledone in vivo. **L'analisi in HPLC** mostrò che nel callo embriogenetico (A), in cui era presente la fase di maggiore attività proliferativa e di differenziazione (20 giorni), era presente anche il maggiore quantitativo di escina. Esso era superiore di addirittura sette volte, sia rispetto al controllo, cioè alla quantità contenuta nei cotiledoni in vivo, sia rispetto ai valori ritrovati nelle colture ottenute da espianti cotiledonari che, anche con l'aggiunta di fitoregolatori, ne contenevano un quantitativo simile a quello presente nei semi in vivo. Inoltre, dopo 70 giorni senza la subcoltura nel medium fresco, l'ammontare di escina diminuiva, ma rimaneva pur sempre alta rispetto al controllo. La concentrazione del principio attivo presente nel callo precursore, invece, non aveva valori significativamente differenti dal cotiledone standard. In più, quando il callo embriogenetico (A) veniva trasferito in medium fresco ogni 25 giorni per un periodo di 2 anni, il livello di escina si manteneva sempre di circa tre volte superiore allo standard (Tabella 1). (Profumo et al. 1990).

CAMPIONI	Peso secco (% peso fresco)	% Escina /peso secco
Cotiledoni in vivo	56.7	10.7±0.5
Callo precursore	5.9	12.2±1.9
Callo A dopo 20 giorni	4.3	63.2±7.3
Callo A dopo 70 giorni	3.4	50.0±2.9
Callo A dopo 2 anni	3.4	31.7±1.8
Embrioidi	5.2	69.5±4.6

TABELLA 1. Escina contenuta nei calli e negli embrioidi degli espianti cotiledonari coltivati in vitro. I cotiledoni in vivo sono utilizzati come controllo.

Il massimo contenuto di saponine era negli embrioidi, in particolare nelle prime fasi embrionali, dopo il trasferimento nel medium senza ormoni e, quindi, l'incremento della sostanza poteva essere connesso al repentino passaggio dal medium ricco di fitoregolatori al medium privo di essi. Probabilmente, gli stessi fattori che davano l'impulso alla moltiplicazione cellulare e all'embriogenesi, potevano anche dare l'incremento alla produzione di escina; tuttavia era

MEDIUM DI COLTURA	% Escina /peso secco
MS	23.3±5.1
MS+2,4-D	47.8±4.0
MS+GA3	52.9±5.4
MS+NAA	53.7±5.7

TABELLA 2. Influenza dei fitoregolatori sulla produzione di escina da espianti cotiledonari in vitro. Per ogni campione sono osservate 10 frazioni.

necessario chiarire meglio quali fossero le influenze dei diversi tipi di medium e di fitoregolatori (Profumo et al. 1991).

Gli studi che seguirono furono effettuati nuovamente sui tessuti cotiledonari, testando diverse condizioni di crescita. Le ricercatrici constatarono che, aggiungendo allo stesso medium nutritivo MS agarizzato, basse concentrazioni di regolatori di crescita 2,4-D, l'acido naftalenacetico (NAA) e acido giberellico (GA3), separatamente nel quantitativo di 0,5 mg/l, l'escina che si formava in vitro acquisiva valori tra loro diversi, ma più apprezzabili rispetto a quelli ottenuti nei lavori svolti precedentemente sullo stesso tessuto. Dopo 17 settimane di coltura in incubazione a 25±1°C sotto luce fluorescente e 12 ore di fotoperiodo, le nuove formazioni dei calli che si svilupparono vennero analizzate per rilevare il contenuto della saponina in HPLC. Il risultato mostrò che l'addizione singola dei fitoregolatori aveva un effetto determinante sulla produzione del principio attivo in confronto al solo medium MS, mentre solo in presenza del 2,4-D si produceva un callo giallo friabile ed embriogenetico, con caratteristiche simili a quelle descritte per i calli ottenuti dagli espianti fogliari. Il principio attivo, in alcuni casi, raggiungeva i quantitativi ritrovati nei calli embriogenetici ottenuti da espianti fogliari o, comunque, era presente in maniera evidente (Tabella 2) (Profumo et al. 1992). L'indagine fu estesa ottenendo l'embriogenesi somatica da espianti prelevati da segmenti terminali dei rami, tessuti in natura veramente scarsi in contenuto di escina. Questi espianti furono divisi in due grup-

pi: quelli prelevati dai giovani rami di circa 0,5 cm di diametro e quelli ricavati dai rami di circa un anno di età, in questo caso con diametro di circa 0,8 cm.

Il medium basale di coltura MS, contenente saccarosio e solidificato con agar, venne arricchito con sostanze simili a quelle indispensabili alle colture degli altri tessuti, l'acido 2,4-D, l'acido naftalenacetico e chinetina. Le colture furono poste in camera di crescita a temperatura di 25±1 °C con 12 ore di fotoperiodo.

Dopo 25-30 giorni, gli espianti dei rami più giovani produssero un'alta quantità di calli bianchi e compatti, mentre quelli dei rami più adulti generarono pochi calli di minime dimensioni. Più tardi sui calli bianchi o direttamente sull'espianto dei rami giovani, si formarono calli gialli e compatti con caratteristiche embriogenetiche. Essi, dopo 20 giorni, furono trasferiti in medium nuovo, privo di regolatori di crescita, sviluppando, in circa tre settimane, numerosi embrioni somatici in circa tre settimane, i quali, trasferiti su medium fresco, produssero piccole pianticelle. (Gastaldo et al. 1994)

Per controllare la formazione di escina, nel test successivo fu confrontato il quantitativo di principio attivo ottenuto dalle formazioni generate dagli espianti dei rami giovani con quelle derivate dagli espianti cotiledonari, coltivati nelle condizioni già descritte sopra, in relazione al contenuto dei semi in vivo.

Il quantitativo di escina prodotto nei calli iniziali, in quelli embriogenetici e negli embrioni somatici, di entrambi i tessuti considerati, venne determinato con l'analisi in HPLC e le concentrazioni ottenute furono confrontate con il controllo in vivo (Tabella 3).

Si evidenziò che il principio attivo nei calli iniziali era presente in concentrazioni considerevoli, ma le quantità di escina risultarono maggiori nelle fasi di crescita intensa, cioè negli embrioni somatici, per decrescere, poi, negli embrioidi, confermando l'idea della diretta correlazione tra la differenziazione dei tessuti e la produzione dell'escina. Le ricercatrici evidenziarono in modo particolare che i valori della saponina ritrovati nelle colture in vitro dei cotiledoni e in quelle dei rami risultavano simili, nonostante questi ultimi in natura possedevano un quantitativo di escina veramente basso. Comunque in entrambi i casi, la concentrazione del principio attivo, era inferiore a quella ritrovata negli embrioidi ottenuti dagli espianti delle foglie (Profumo et al 1991 e 1994).

In un successivo esperimento furono nuovamente impiegati di frammenti rameali, prelevati dai rami giovani. Questa volta le ricercatrici erano interessate a provare se, in vitro, era possibile ottenere anche

l'esculina, l'altro metabolita secondario di interesse farmaceutico prodotto dall'ippocastano, naturalmente presente nella corteccia dei rami.

Gli espianti, di circa 0,5 cm di diametro, furono posti nella loro posizione naturale su medium MS, con kinetina, acido naftalenacetico e acido 2,4-diclorofenossiacetico e introdotti in camera di crescita a 25±1 °C sotto luce fluorescente, in 12 ore di fotoperiodo. Come descritto precedentemente, entro circa un mese gli espianti produssero un callo bianco e compatto in quantità crescente, da cui originò il successivo callo giallo e friabile, da cui si ebbero timidi embrioidi. Il callo embriogenetico venne trasferito in subcoltura con lo stesso medium, ma senza regolatori di crescita producendo, questa volta con alta frequenza, notevoli embrioidi. Per ogni tipo di tessuto furono esaminati 5 campioni in HPLC, esprimendo il quantitativo in esculina ed esculetina in mg/g di peso secco in rapporto al controllo, cioè un ramo di circa tre anni di età. I principi attivi erano presenti in tutti i campioni analizzati, ma nel callo iniziale l'esculina era un quarto del quantitativo contenuto nei rami in natura, mentre nel callo embriogenetico il valore raddoppiava. L'esculetina, invece, aveva la stessa concentrazione negli embrioidi e nei rami in vivo, dimezzandosi in entrambi i calli (Tabella 4). L'analisi in 1H-NMR confermò la presenza dei principi attivi negli embrioni somatici, tuttavia, rispetto alla produzione di escina, i valori dell'esculetina e dell'esculina erano piuttosto bassi, simili a quelli presenti nella pianta, pertanto, le ricercatrici si proposero di proseguire gli studi su altri tessuti di ippocastano (Gastaldo et al. 1996).

CONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI SOMATICI DI A. HIPPOCASTANUM

Gli embrioni somatici dell'ippocastano, una volta prodotti in vitro, possono essere mantenuti nelle condizioni di salute ottimali con la crioconservazione. Un primo esperimento condotto in questo senso evidenziava che, il raffreddamento in azoto liquido, se preceduto dal trattamento degli embrioni con i crioconservanti, costituiva un buon metodo per lo stoccaggio (Joergensen, 1990).

Successivamente furono paragonati tre diversi metodi di raffreddamento, al fine di confrontare la variazione nel comportamento degli embrioni somatici di ippocastano e di valutarne la migliore percentuale di recupero dopo il periodo di conservazione, sia attraverso l'uso di crioconservanti e con lento o rapido raffreddamento, sia senza di essi impiegando la tecnica dell'essiccazione veloce.

Gli embrioni somatici utilizzati per l'esperimento,

ATERIALI	CAMPIONI	% PESO SECCO	ESCINA/% PESO SECCO
spianti dai rami	Callo iniziale	7.0	7.0
	Callo embriogenetico	4.0	4.0
	Embrioidi	7.8	7.8
spianti dai cotiledoni	Callo iniziale	5.8	5.8
	Callo embriogenetico	5.9	5.9
	Embrioidi	5.2	5.2
emi	Cotiledone	56.7	56.7

BELLA 3. Escina presente nei calli e negli embrioni somatici ottenuti da espianti rami e dei cotiledoni in vitro. Confronto con il contenuto in vivo.

AMPIONE	% peso secco /peso secco	Esculina	Esculetina
allo bianco iniziale	5.49	0.387 ±/0.011	0.201 ±/0.014
allo giallo friabile	3.90	0.960 ±/0.035	0.283 ±/ 0.094
mbrioidi	4.98	0.818 ±/ 0.088	0.579 ±/0.059
ami in vivo	37.67	1.350 ±/ 0.094	0.583 ±/ 0.109

BELLA 4. Contenuto di esculina ed esculetina nei calli e negli embrioni somatici esciuti da espianti della corteccia dei rami in vitro e confronto con il contenuto rami in vivo

furono fatti nascere in vitro su medium iniziale liquido E1B5 e subcolturali in medium solido contenente acido abscissico (ABA) in tre volumi diversi e cioè, 0,75, 7.5 e 75.0 µM, oppure in medium privo di esso. Nella procedura del trattamento con i criocconservanti, parte degli embrioni somatici ottenuti furono trattati con una miscela di questi (10 M di saccarosio, 0.5 M di glicerolo, 0.5 M di DMSO) e incubati per un ora in un bagno di ghiaccio per poi essere raffreddati secondo i due procedimenti. Il raffreddamento lento fu condotto tenendo un gruppo di embrioni per 10 minuti a 0°C, raffreddando da -35°C a 1°C / min, mantenendo per 30 minuti a questa temperatura e poi immergendo in azoto liquido. Per il metodo di raffreddamento veloce, invece, altri embrioni, furono immersi direttamente nel gas liquido e rapidamente raffreddati a 0°C.

Gli embrioni non trattati con i criocconservanti furono essiccati all'aria in armadio, per periodi diversi di 2, 3 e 4 ore e, successivamente, posti in fiale da 2 ml per essere immersi in azoto liquido. Dopo le diverse procedure di raffreddamento, per effettuare il recupero degli embrioni, le colture furono poste nuovamente in azoto liquido per 3-5 giorni e riscaldate a 40°C in bagno d'acqua, affinché potessero essere trasferite sul medium solido iniziale. La vitalità e la variabilità di questi embrioni furono osservate attraverso il recupero stimato in base alla percentuale di embrioni che, entro sei settimane, mostrava lo sviluppo o dei cotiledoni (ricrescita diretta) o degli embrioni avventizi (embrioni secondari) (Kiss et al. 1992).

Gli embrioni trattati con i criocconservanti ritornarono prima marroni e, dopo 2-3 settimane dal riscaldamento, cominciarono a recuperare in alta percentuale, sviluppando direttamente pianticelle (ricrescita secondaria), oppure alta percentuale di embriogenesi secondaria. Gli embrioni precolturali in medium senza ABA morirono dopo la criocconservazione raffreddati sia velocemente che lentamente. Il tasso di recupero fu alto (43%) con 0.75 µM di ABA, purché gli embrioni fossero raffreddati lentamente. L'incremento del quantitativo del fitoregolatore da 7.5 a 75.0 µM, invece, ne ridusse la sopravvivenza in modo concentrazione dipendente (Tabella 5).

	ABA µM 0 lento rapido		ABA µM 0.75 lento rapido		ABA µM 7.5 lento rapido		ABA M 75.0 lento rapido	
cuperoTotale	0	0	43±3.2	15±3.6	29±4.2	10±1.1	5±1.0	7±2.3
crescita diretta	0	0	40±2.0	9±1.5	20±2.4	2±0.3	5±1.0	6±1.8
embrioni secondari	0	0	3±1.2	6±2.1	9±1.8	8±0	0	1±0.5

LLA 5. Effetto dell'ABA, aggiunto nel medium di pretrattamento, sul recupero embrioni somatici di ippocastano sottoposti a criocconservazione con raffreddamento lento e rapido.

In fine, con il sistema di essiccazione all'aria, il recupero maggiore (46%) si ottenne quando gli embrioni, nutriti con 0.75 µM di ABA, vennero posti ad essiccare per 4 ore in modo da ridurre l'umidità contenuta fino al 13% (Zs.Jekkel et al.1998).

CONCLUSIONI

La coltura in vitro di alcuni tessuti di Ippocastano potrebbe essere un'eccellente risorsa di escina, utile per fornire tutto l'anno lo stesso principio attivo presente nel seme. I risultati, ottenuti negli esperimenti partendo dai tessuti delle foglie, dei cotiledoni e dei rami, confermano la possibile applicazione industriale. Le ricercatrici ne hanno ipotizzato la realizzazione secondo la tecnica della coltura in sospensione in bioreattori. Il materiale strutturalmente omogeneo è facile da reperire e assicura, dallo stesso peso netto in vivo, una produzione in vitro di principio attivo più alta di quella ottenuta dalla droga. Inoltre, i processi di estrazione hanno costi inferiori, in confronto a quelli necessari quando sono usati direttamente i semi. (Profumo et al. 1991 e 1992).

In tutte le neoformazioni ottenute in vitro, l'escina è presente in concentrazioni simili o più alte rispetto a quelle trovate nei semi in natura, con il massimo contenuto di saponine negli embrioidi ottenuti dagli espianti fogliari. La somministrazione simultanea dei regolatori di crescita esogeni necessari all'embriogenesi si è rivelata essenziale. Talvolta, le alte concentrazioni di ormoni possono, oltre ad accelerare la formazione del callo, abolire la produzione di metaboliti secondari determinando antagonismo tra la crescita stimolata e la possibilità di immagazzinare sostanze secondarie. Nel caso dell'Ippocastano, invece, c'è parallelismo tra l'intensità di sviluppo e la concentrazione del principio attivo e, tale rapporto, si concretizza comunque a prescindere dalla tipologia dell'espianto. (Profumo et al. 1991)

Nei esperimenti, inoltre, si evidenziarono differenti comportamenti tra gli espianti delle foglie e gli espianti dei cotiledoni, in relazione proprio ai fitoregolatori. E' possibile, infatti, che, la composizione chimica dei cotiledoni, connessa alla loro funzione di stoccaggio, giochi un ruolo decisivo nell'ottenere l'embriogenesi, diminuendo il fabbisogno di regolatori di sviluppo esogeni. Nelle colture cotiledonari, inoltre, la combinazione di auxine e citochinine non è essenziale per l'embriogenesi somatica. Al contrario, la loro azione combinata, è necessaria per gli espianti fogliari che, se crescono in MS solo con 2,4-D, non sviluppano embriogenesi e dopo 10-20 giorni in coltura, danno necrosi. (Profumo et al.1990 e 1995).

La relazione diretta tra le potenzialità embriogenetiche e la produzione di escina è provata dal fatto che

gli espianti hanno differente contenuto di principio attivo, in dipendenza dalle qualità embriogenetiche possedute e queste sono tali da permetterne la produzione ottimale. Riguardo al contenuto della saponina, in fine, gli studi mostrano che le differenze morfologiche nelle caratteristiche istologiche e ultrastrutturali sono correlate con le differenze biochimiche. (Gastaldo et al. 1994 e 1995)

* UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia

BIBLIOGRAFIA

- Capuana M; Debergh P.C. (1997) Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos Plant-Cell-Tissue-and-Organ-Culture; 48(1):23-29
- Dameri R.M., Caffaro L., Gastaldo P., Profumo P. (1986) Callus formation and embryogenesis with leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. J. Plant Physiol. 12: 93-96
- Gastaldo P., Carli S., Profumo P. (1994) Somatic embryogenesis from stem explants of *Aesculus hippocastanum* Plant Cell. Tissue and Organ Culture 39: 97-99
- Gastaldo P., Caviglia A.M., Carli S., Profumo P. (1996) Somatic embryogenesis and esculin formation in calli and embryo from bark explants of *Aesculus hippocastanum* L. Plant Science: (Limerik),119: 1-2: 157-162
- Gastaldo P., Caviglia A.M., Profumo P. (1994) *Aesculus hippocastanum* L. (Horse Chestnut) in vitro culture and production of aescin Biotechnology in Agriculture and Forestry, 28

- Jekkel Z.; Gyulai G; Kiss E; Heszky L E (1998) Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods Plant-Cell-Tissue-and-Organ-Culture 52(3): 193-197
- Profumo P., Caviglia A.M., Gastaldo P. (1992) Formation of aescin glucosides by callus tissue from cotyledonary explant of *Aesculus hippocastanum* L. Plant Science: (Limerik) 1992 47: 9-10 -661-662
- Profumo P., Caviglia A.M., Gastaldo P. (1994) Aescin formation of calli and embryoids from cotyledon and stem explant of *Aesculus hippocastanum* L. Journal of Pharmacy and Pharmacology 46: 11:924-925
- Profumo P., Dameri R. M., Cremona Orsino I. (1976) Frammenti cotiledonari di *Aesculus hippocastanum* L. coltivati in vitro. Primi dati sul comportamento dell'amido e dell'escina Estratto da Giornale Botanico Italiano 110: 1-2: 155-171
- Profumo P., Gastaldo P. and Rascio N. (1987) Ultrastructural Study of Different Types of Callus from Leaf Explants of *Aesculus hippocastanum* Protoplasma 138: 89-97
- Profumo P., Gastaldo P. (1995) Somatic embryogenesis in Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30
- Profumo P., Gastaldo P., Caviglia A.M. and Dameri R.M. (1980) 1990 Somatic embryogenesis from cotyledonary explant of *Aesculus hippocastanum* L. Acta Embryologiae et morphologiae experimentalis 11:2:101-106
- Profumo P., Gastaldo P., Dameri R.M. and Dameri R.M. (1990) Aescin content in embryogenic callus and in embryoids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* Planta Medica 1990, Vol: 57:1:50-52
- Profumo P., Gastaldo P., Dameri R.M., and Caffaro L. (1986) Histological study of calli and embryoids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. J.Plant Physiol. 126: 97-103.