

Scarpa, Grazia Maria; Dedola, Rita; Lai, Daniela; Mereu, Anna Rita (2009)
Moltiplicazione in vitro di Salvia desoleana Atzei e Picci. Italian Journal of
Agronomy, Vol. 4 (4 Suppl.), p. 771-776. ISSN 1125-4718.

<http://eprints.uniss.it/3713/>



Italian Journal of Agronomy **Rivista di Agronomia**

An International Journal of Agroecosystem Management

III Convegno nazionale “Piante Mediterranee”
27 settembre – 1 ottobre 2006
Fiera del Levante, Bari, Italia



Università degli Studi di Bari
Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali

Le piante mediterranee nelle scelte strategiche per l'agricoltura e l'ambiente

a cura di
Giuseppe De Mastro

Moltiplicazione in vitro di *Salvia desoleana* Atzei e Picci

Micropropagation of Salvia desoleana Atzei e Picci

G.M. Scarpa, R. Dedola, D. Lai, A.R. Mereu

Dipartimento di Scienze Agronomiche e Genetica Vegetale Agraria*

Riassunto

La *Salvia desoleana* Atzei e Picci è una pianta endemica della Sardegna, perenne, suffrutice sempreverde, rizomatosa, con ceppo epigeo lignificato. È una camefito e, dopo un breve periodo di riposo estivo, emette, dalle gemme presenti nei primi 20-30 cm del fusto, rami svernanti che poi fioriranno in primavera-estate. Più raramente è un'emicriptofita, svernante attraverso gemme presenti a livello del suolo. Le piante coltivate persistono per numerosi anni, comportandosi come suffrutici sempreverdi. Le parti della pianta utilizzate per l'estrazione degli oli sono le foglie e le sommità fiorite, con epoca di raccolta a luglio.

Alla pianta attualmente vengono attribuite le seguenti proprietà: antipiretica, antispasmodica, astringente, emmenagoga, ipertensiva, stimolante e tonica; proprietà coleretiche; attività analgesica periferica, attività antinfiammatoria, proprietà antimicrobiche ed alcuni effetti deprimenti sul sistema nervoso centrale. È stato dimostrato che induce apoptosi.

Nell'ambito di un più ampio lavoro di ricerca sulle possibilità di sfruttamento della *Salvia desoleana* in coltivazione, si è intrapreso uno studio di approccio all'adattabilità alla coltura *in vitro* della specie, per effettuare la propagazione di un elevato numero di piantine mediante il prelievo di una ridotta quantità di materiale.

I substrati utilizzati nella sperimentazione erano basati su sali e vitamine Murashige e Skoog.

Si è verificato allungamento dei germogli in coltura su tutti i substrati. Formazione di callo alla base degli espianti in presenza di NAA e 6BA moltiplicazione sui substrati contenenti NAA e 6BA oppure IBA. Il fattore di moltiplicazione osservato è di 2-3 nuovi germogli per espianto in coltura nel primo mese, incrementato a 20 nel secondo mese di prova.

È stata indotta formazione di radici nei germogli in coltura sul substrato contenente IAA.

È ipotizzabile, una volta stabilizzata la coltura, la produzione *in vitro* dei principi attivi, con ulteriore salvaguardia delle piante spontanee.

Abstract

The *Salvia desoleana* Atzei and Picci is an endemic species of the Sardinia, perennial, evergreen, with lignified epigeo stock. It is one camefito and, after a short period of rest, it emits, from gems in first 20-30 cm of the stalk, coppers that shall flowering in spring-summer. The cultivated plants persist for numerous years. The parts of the plant used for the extraction of essential oils are the inflorescences and leaves, time of collection on July. To the plant, the following propriety have been ascripted: antipiretyc, antispasmodic, astringent, hypertensive, stimulating and tonic; coleretic property; peripheral analgesic activity, anti-inflammatory activity, antimicrobic property and some depressing effects on the central nervous system. It has been demonstrated that it induces apoptosys.

It has been performed a study of approach to the adaptability to the cultivation *in vitro* of the species, in order to carry out the propagation of a high number of plants. The substrates use you in the experimentation were base on basal salts and vitamins of Murashige and Skoog. Lengthening of the buds in cultivation has been taken place on all substrates. Formation of callus to the base of the explants has been observed in NAA and 6BA; multiplication on substrates containing NAA and 6BA or IBA. The observed factor of multiplication is of 2-3 new buds for bud in cultivation in the first month, increased to 20 in the second month. It has been induced formation of roots in the buds in cultivation on containing substrate IAA.

Parole chiave: coltura in vitro, micropropagazione, officinali.

Key words: in vitro culture, officinal plants.

* E-mail: grazia@uniss.it

Introduzione

La *Salvia desoleana* Atzei e Picci è una specie endemica della Sardegna appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae* o *Labiatae*. È una pianta perenne, un suffrutice sempreverde, rizomatosa, con ceppo epigeo lignificato. È una camefita, e dopo un breve periodo di riposo estivo, emette, dalle gemme presenti nei primi 20-30 cm del fusto, rami svernanti che fioriranno in primavera-estate. Più raramente è un'emicriptofita, svernante attraverso gemme presenti a livello del suolo.

La pianta si presenta alta per lo più oltre il metro, è tomentosa e ghiandolosa, ed emette in ogni sua parte un profumo intenso e persistente in ogni stadio.

Il suo habitat ideale è rappresentato da pendii aridi, boscaglie, luoghi soleggiati, in preferenza terreni piuttosto sciolti, su substrati vari: calcarei, granitici, granitico-porfiroidi. Vive sia a basse che ad elevate altitudini, sino a massimo 900 m s.l.m.

Fiorisce da maggio a luglio e può presentare delle fioriture supplementari nel periodo autunnale in concomitanza con le prime piogge di Settembre (Camarda e Valsecchi, 1990). È una pianta assai rustica, che non richiede particolari cure, ma solo il rispetto delle sue esigenze pedo-climatiche: terreno sciolto, permeabile, in zona calda e soleggiata. Può essere coltivata per seme, ma il potere germinativo è piuttosto basso, attecchendo meglio su terreno preparato, o per via vegetativa, talee, divisione dei rizomi basali. Per brevi periodi, può resistere a temperature di -4° (Clebsch, 2003). Le piante coltivate persistono per numerosi anni, comportandosi come suffrutici sempreverdi (Atzei, 2003).

Agli oli essenziali della *S. desoleana* sono stati riconosciuti alcuni effetti terapeutici molto importanti grazie alla presenza di abbondanti quantità di: β -pinene, β -pinene, β -cimene, linaiole e acetato di linaile. Importante è porre l'accento sull'assenza, tra i componenti dell'olio essenziale, del tujone, costituente tossico, presente negli estratti di oli essenziali di altre Salvia. La presenza del tujone comporta, in caso di sovradosaggio nell'uso della droga, effetti collaterali come tachicardia, vampate di calore, crampi e sensi di vertigini; effetti non presenti nell'utilizzo della *Salvia desoleana* e della *Salvia sclarea* che ne sono sprovviste (Pignatti, 1982).

Le parti della pianta utilizzate per l'estrazione degli oli sono le foglie e le sommità fiorite, con epoca di raccolta a luglio.

Alla pianta attualmente vengono attribuite le seguenti proprietà: antipiretica, antispasmodica, astringente, emmenagoga, ipertensiva, stimolante e tonica (Marchioni e Di Stefano, 1989); studi più recenti ne hanno evidenziato le proprietà coleretiche (Peana et al., 1994); possiede inoltre una discreta attività analgesica periferica, una buona attività antinfiammatoria, proprietà antimicrobiche ed alcuni effetti deprimenti sul sistema nervoso centrale (Peana et al., 1999).

La *Salvia desoleana*, grazie alle sue caratteristiche, trova importanti utilizzi anche in altri settori oltre a quello farmaceutico, infatti per il profumo intenso e persistente posseduto, tanto allo stadio vegetativo quanto conservato nel materiale secco, si suppone che l'essenza possieda proprietà fissatrici perciò utili nel settore della profumeria e come pianta officinale (Atzei, 1982); per le proprietà di controllo degli insetti, è risultata utile contro l'entomofauna dannosa (Nurra, 2003). È stato osservato, infine (Peana et al., 1994), che alcune frazioni dell'olio essenziale di *Salvia desoleana*, agiscono anche contro diversi patogeni responsabili di gravi fitopatie sia dell'apparato aereo che dell'apparato radicale e del colletto delle piante. In particolare è stata valutata l'efficacia sui seguenti patogeni: *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Dastur) Waterh., *Rhizoctonia solani* Kuh, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *Sclerotium rolfsii* Sacc (Peana et al., 1999).

Materiali e metodi

Nell'ambito di un più ampio lavoro di ricerca sulle possibilità di sfruttamento della *Salvia desoleana* Atzei e Picci, si è intrapreso uno studio di approccio all'adattabilità alla coltura *in vitro* della specie, per effettuare la propagazione di un elevato numero di piantine mediante il prelievo di una ridotta quantità di materiale.

Materiale vegetale. Il prelievo è stato effettuato su piante di 3 anni di *Salvia desoleana* allevate nel campo dell'Azienda Sperimentale della Facoltà di Agraria, situata a Sassari (40° 43' N; 08° 34' E) in località Ottava, 80 m s.l.m.

I prelievi in campo sono stati effettuati in un periodo compreso tra novembre 2005 e marzo 2006. Per ciascun prelievo si sono scelte le parti più giovani della pianta, quali gemme e apici vegetativi.

Substrati utilizzati nella prova. I substrati utilizzati nella sperimentazione erano basati su sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) associati ai regolatori di crescita così da ottenere i mezzi di coltura riportati in tabella 1. I mezzi di coltura sono stati preparati a partire dai sali di coltura MS Sigma. I regolatori di crescita da utilizzare sono stati scelti sulla base dei risultati di prove preliminari effettuate nel laboratorio del Dipartimento in prove precedenti (Lai, 2005).

Dopo l'aggiunta dei regolatori di crescita il pH di ciascun substrato è stato portato a 5,8. È stato usato agar come gelificante. La sterilizzazione è stata effettuata in autoclave ad un'atmosfera di pressione (120 °C) per 20'; quindi i mezzi di coltura sono stati conservati in bottiglia sterile sino al momento dell'uso, sciolti in microonde, piastrati e lasciati solidificare in tubi di coltura sterili da 30 ml. Per la fase di allungamento e di radicazione gli espianti sono stati subcolturali in tubi da 90 ml.

Sterilizzazione del materiale vegetale. Tutti gli espianti sono stati preventivamente ripuliti dalle parti legnose e dalle parti verdi che presentavano evidenti alterazioni dovute presumibilmente a stress ambientali, si è quindi proceduto alla loro sterilizzazione superficiale.

La sterilizzazione si è effettuata, per il primo periodo, mediante immersione dei prelievi in una soluzione con ipoclorito di sodio al 10% per 20'; in seguito si è ritenuto opportuno concentrare l'ipoclorito di sodio sino al 20% e protrarre il periodo di immersione fino a 40' e aggiungere un passaggio in alcool al 70%.

Sono state prelevate le gemme laterali e apicali. Gli espianti sono stati allevati in cella climatica ad una temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$, luminosità di 4.000 lux e fotoperiodo di 16 ore di luce 8 di buio. La verifica dello sviluppo dell'espianto veniva fatta giornalmente, nello stesso momento venivano eliminati i germogli che presentavano alterazioni evidenti o contaminazione.

Risultati e discussione

Uno dei maggiori problemi da affrontare nel prelievo di materiale da pieno campo è la contaminazione da batteri e funghi. Nel prelievo di espianti della *Salvia desoleana*, con l'utilizzo di protocolli con dosaggi e tempi standard, la percentuale di contaminazione era spesso prossima al 100% e, solo occasionalmente, si riusciva a ottenere materiale non contaminato (Lai, 2005).

Sulla base delle diverse prove di sterilizzazione è stato messo a punto il seguente protocollo:

- lavaggio in acqua corrente per circa 15 minuti
- immersione in etanolo al 70% per 30 minuti
- lavaggio in acqua sterile, 3 risciacqui
- immersione in sodio ipoclorito 20% per 40 minuti e successivi risciacqui.

Anche se i dosaggi di sodio ipoclorito e i tempi di sterilizzazione in alcool superano di molto quelli indicati in bibliografia per parti vegetative di specie erbacee, l'utilizzo di valori così elevati ha consentito di ottenere una percentuale di espianti "sani" del 47,4%.

Influenza del substrato sulla moltiplicazione

Si è verificato allungamento dei germogli in coltura su tutti i substrati. Formazione di callo alla base degli espianti in coltura sui substrati E e B, moltiplicazione sui substrati E, B e IBA.

Il fattore di moltiplicazione osservato è stato, dopo un mese di coltura, di 2-3 nuovi germogli per espianto, considerando nel calcolo tutti gli espianti vitali, anche se non avevano dato luogo a nuovi germogli. Nel substrato B il valore osservato è stato di 4 nuovi germogli per espianto. Dopo due mesi di adattamento alla coltura in vitro, è stato osservato, sui germogli subcolturali sul substrato B, un incremento della induzione alla moltiplicazione che ha portato ad ottenere una media di 20 nuovi germogli per espianto. Non si è avuto incremento di moltiplicazione nei germogli in subcoltura sui substrati E e IBA.

La formazione di callo indifferenziato è stata osservata su tutti i germogli allevati sul substrato e occasionalmente si è osservata formazione di callo alla base dei germogli allevati su B all'inizio dell'induzione; non si è avuta formazione di callo nelle subcolture.

Radicazione

È stata ottenuta radicazione quando i germogli sono stati allevati sul substrato C. Le prime radici si sono formate dopo 15 giorni dall'induzione. La percentuale di radicazione ottenuta è stata elevata, su 20 germogli utilizzati per la prova, 19 hanno formato radici, per una percentuale del 95%. Occasionalmente è stata osservata formazione di radici sui germogli in coltura sul substrato IBA.

Le piantine radicate sono state trapiantate in vaso, utilizzando una miscela di terriccio commerciale e perlite, non sterili. La percentuale di attecchimento è stata del 90% circa.

Conclusioni

La *Salvia desoleana* è una specie endemica con un patrimonio genetico unico, non ripetibile e caratteristiche fitochimiche uniche che è necessario tutelare. Ha, inoltre, un areale di distribuzione assai ristretto.

Con la coltura *in vitro* è possibile sia conservare questa diversità sia moltiplicare la specie producendo materiale da mettere in campo in caso di impianti per la coltivazione.

È proponibile inoltre, una volta stabilizzata la coltura, la produzione *in vitro* dei principi attivi, con ulteriore salvaguardia delle piante spontanee.

Particolarmente incoraggianti sono i dati qui riportati, che hanno consentito di individuare in modo puntuale, le esigenze della specie in coltura *in vitro* ai fini della moltiplicazione.

Bibliografia

- ATZEI A.D. 1982. Le piante medicinali della Sardegna, *Salvia desoleana* Atzei & Picci.
- ATZEI A.D. 2003. Le piante nella Tradizione popolare della Sardegna, *Salvia desoleana* Atzei & Picci.
- CAMARDA I., VALSECCHI F. 1990. Piccoli arbusti, liane e suffrutici spontanei della Sardegna. Carlo Delfino editore.
- CLEBSCH B. 2003. The new book of *Salvias*.
- LAI D. 2005. Approccio alla coltura *in vitro* di *Salvia desoleana* Atzei e Picci. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Sassari.
- MARCHIONI A., CALIÒ DI STEFANO F. 1989. Le piante medicinali della Sardegna, guida pratica per il riconoscimento di 102 specie. Edizioni La Torre, Cagliari.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- NURRA G. 2003. Valutazione delle potenzialità della *Salvia desoleana* nel controllo degli insetti patogeni. Tesi di Master (FIABAMED), Università degli Studi di Sassari, Facoltà d'Agraria.
- PEANA A., MORETTI D., JULIANO C. 1999. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oil of *Salvia desoleana* and *Salvia sclarea*. *Planta Med.*, 65: 752-754.
- PEANA A., SATTA M., MORETTI M.D.L., ORECCHIONI M. 1994. Attività coleretica dell'olio essenziale di *Salvia desoleana* Atzei & Picci e *Salvia sclarea* L. VII Congr. Naz. Soc. Ital. Farmacognosia, Bologna, 30 giugno - 2 luglio.
- PIGNATTI S. 1982. Flora d'Italia, vol. II. 488-493. Edagricole, Bologna.

Tabella 1. Composizione dei substrati utilizzati nella prova.
Table 1. Media used in the experiment.

| Denominazione substrato | Sali e vitamine | Regolatori di crescita | | | |
|-------------------------|-----------------|------------------------|------------------------|-----|----------------------|
| A | MS | 2,4D | 0,1 mg l ⁻¹ | KIN | 1 mg l ⁻¹ |
| B | MS | NAA | 0,2 mg l ⁻¹ | 6BA | 2 mg l ⁻¹ |
| C | MS | IAA | 1 mg l ⁻¹ | | |
| E | MS | NAA | 0,1 mg l ⁻¹ | 6BA | 1 mg l ⁻¹ |
| IBA | MS | IBA | 1 mg l ⁻¹ | | |

Figura 1. Espianti al momento del prelievo.
Figure 1. Explants at taking step.

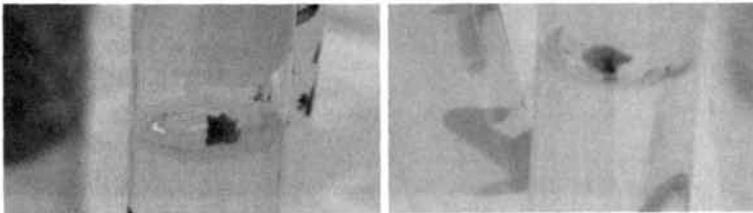


Figura 2. Formazione dei nuovi germogli nel tubo di coltura.
Figure 2. New shoots in the culture tube.

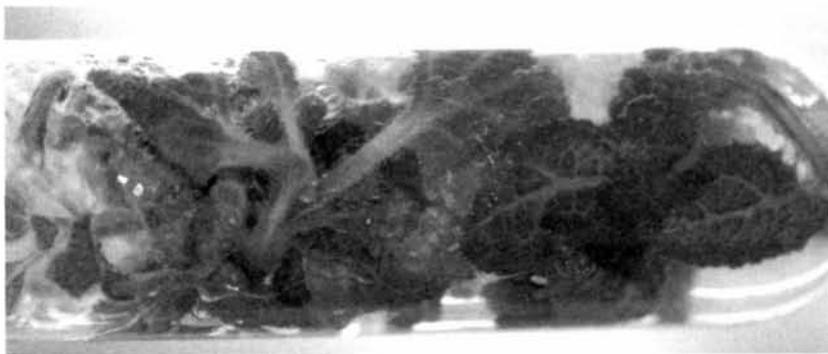


Figura 3. Radicazione.
Figure 3. Rooting.

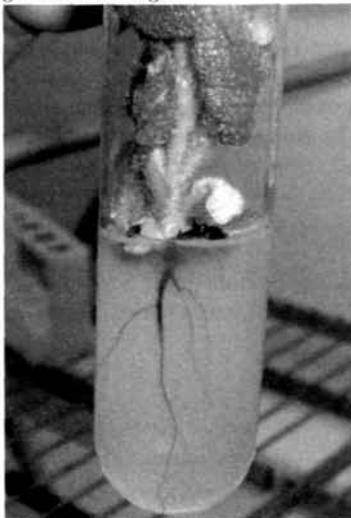


Figura 4. Piantine di *Salvia desoleana* dopo l'adattamento alla coltivazione in vaso.
Figure 4. Plants of *Salvia desoleana* after transplanting.

