

## Profilo aromatico degli oli essenziali estratti da piante di *Salvia dolomitica* allevate *in vitro*

Laura Bassolino<sup>1\*</sup>, Emanuela Giacomelli<sup>1</sup>, Silvia Giovannelli<sup>2</sup>, Luisa Pistelli<sup>2</sup>, A. Cassetti<sup>1</sup> e Barbara Ruffoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro per l'ortoflorovivai-smo (CREA-OF) e Centro per la genomica e la bioinformatica (CREA-GB)

<sup>2</sup> Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

### Aromatic profile of essential oil in *Salvia dolomitica* plants cultured *in vitro*

**Abstract.** Plant extracts secreted from glandular trichomes of *Lamiaceae* are a valuable source of biologically active volatile compounds. In this study, we developed micropropagation, callus and cell culture protocols of *Salvia dolomitica*, a particularly fragrant sage. For the first time secretory structures from *S. dolomitica* leaves developed *in vitro* were described showing morphological similarity to *in vivo* glands. Phytochemical analysis of essential oils (EO) and volatile compounds showed quali-quantitative differences between *S. dolomitica in vitro* derived plantlets and the open field grown plants. Both the essential oil composition and SPME analysis showed the same trend: the percentage of total sesquiterpenes decreased strongly *in vitro*, on the contrary the total monoterpenes are more abundant. We also investigate the effect of high light treatments on aromatic profile demonstrating that this stress can slightly affect the essential oils concentration. This species is a suitable model for *in vitro* manipulation in order to produce biomass and derived essential oils. The yield of EO obtained from stressed *in vitro* plants was higher than in the other samples. In addition, light radiation can be exploited by researchers to address the accumulation of valuable amount of essential oil.

**Key words:** micropropagation, monoterpenes, sesquiterpenes, glandular trichomes, VOCs.

### Introduzione

La *Salvia* L. è il genere più grande appartenente alle *Lamiaceae* con quasi 1.000 specie (Marchev *et al.*

2014) ca. di cui 26 sono native dell'Africa meridionale come la *S. dolomitica* Codd, un arbusto aromatico perenne che si trova originario della provincia nord-est di Transvaal (Foster 2005). Il nome scientifico "dolomitica" fa riferimento al suo habitat frequentemente caratterizzato da terreni pesanti ricchi di roccia dolomitica. Questa specie risulta essere resistente alla siccità (Caser *et al.* 2012) ed estremamente profumata tant'è che viene commercializzata per lo più a scopo ornamentale. Sin dai tempi antichi, le specie di salvia, grazie alla presenza di composti bio-attivi, sono state utilizzate nella medicina tradizionale per curare varie condizioni patologiche (Watt *et al.* 1962; Shoemaker *et al.* 2005; Kamatou *et al.* 2008). Alcune specie sono usate, inoltre, come erbe da cucina, per preparazioni cosmetiche e profumi, aromaterapia ed insetticidi. I componenti fitochimici del genere *Salvia* sono spesso oli essenziali immagazzinati a livello di ghiandole specializzate, i tricomi (Araujo *et al.* 2003; Kamatou *et al.* 2007), la cui morfologia, abbondanza e funzioni possono variare tra le diverse specie della famiglia delle *Lamiaceae* (Kamatou *et al.* 2007). L'odore delle piante aromatiche è causato dai composti volatili delle foglie verdi, soprattutto terpeni, un sottoinsieme di composti organici volatili (VOC). Il profilo degli oli essenziali nonché la loro composizione in sostanze volatili variano in ciascuna specie, a seconda del genotipo/chemotipo e delle condizioni stagionali/ambientali quali temperatura, fotoperiodo ed intensità luminosa (Burbott *et al.* 1967). Fisher *et al.* (2005) e Kamatou e colleghi (2007) hanno riportato la caratterizzazione fitochimica dell'olio essenziale estratto dalla parte aerea di *S. dolomitica* Codd coltivata in pieno campo in Sudafrica. I principali costituenti dell'estratto sono il geraniolo e linalolo, solitamente rari in salvia.

L'olio essenziale di *S. dolomitica* così estratto presenta buone attività antiplasmodiche ed anti-infiam-

\*laura.bassolino@crea.gov.it

matorie (Kamatou *et al.* 2010). Sono state inoltre descritte da Fisher *et al.* (2005) un'attività antimicrobica limitata ai batteri Gram-positivi ed antimicobatterica, mentre proprietà inibitorie della proliferazione di cellule cancerogene sono state riportate da Kamatou *et al.* nel 2008. In virtù delle caratteristiche sopra descritte, questa specie è un candidato ideale per la produzione di metaboliti vegetali ad elevato valore biologico che potrebbero essere impiegati dalle industrie farmaceutiche per lo sviluppo di nuovi farmaci nonché di formulazioni innovative. L'utilizzo di specie di salvia per l'ottenimento di estratti bioattivi aumenta enormemente la pressione sulle popolazioni selvatiche, che vengono sovrautilizzate con il rischio di vedere distrutta la biodiversità locale che rappresenta la fonte principale per l'ottenimento dei composti d'interesse. Come riportato da Ruffoni *et al.* (2010) e Marchev *et al.* (2014), le colture *in vitro* rappresentano una valida strategia alternativa per la produzione di metaboliti secondari sia a scopo farmaceutico che per l'industria cosmetica.

Questo lavoro ha avuto come obiettivo primario la messa a punto di protocolli di manipolazione *in vitro* di piante di *S. dolomitica* selezionate per la loro rapida propagazione, la produzione di biomassa in condizioni controllate e come supporto per il miglioramento genetico. Il secondo obiettivo è stato la caratterizzazione fitochimica dell'olio essenziale derivante da piante cresciute *in vitro*, nonché dei suoi componenti volatili. È stato inoltre valutato l'effetto di un elicitore fisico, quale l'intensità luminosa, nel determinare una modulazione nella resa in oli essenziali e nel loro contenuto.

## Materiali e metodi

### *Allestimento della coltura in vitro e dei protocolli di micropropagazione*

La pianta madre di *S. dolomitica* Codd è stata selezionata per la sua intensa fragranza e cresciuta in serra non riscaldata presso il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura sede di Sanremo (Italia) (CREA OF) alla latitudine 43° 49' 05" N e longitudine 07° 45' 30" E (fig. 1). Espianti apicali e nodali sono stati prelevati dalla pianta madre e trattati come segue: (I) lavati con acqua corrente, (II) immersi in etanolo al 70% per 30 s, (III) sterilizzati in una soluzione contenente 1,25% di ipoclorito di sodio per 15 m, (IV) lavati due volte con acqua sterile per 10 m ciascuno. Successivamente gli espianti sono stati trasferiti su terreno di crescita standard, come riportato da Murashige e Skoog (1962), in presenza di BA (1,33  $\mu$ M), come riportato Mascarello *et al.* (2006). Il mate-



Fig. 1 - Pianta in vaso di *Salvia dolomitica* (A) e particolare del fiore (B).

Fig. 1 - Picture of a potted *Salvia dolomitica* plant grown outside (A) and a flower in detail (B).

riale è stato quindi allevato in camere di crescita in condizioni controllate di fotoperiodo e temperatura ( $23 \pm 1$  °C, 16h di luce a  $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La propagazione massiva del materiale vegetale è stata quindi ottenuta attraverso subcolture ogni 28 giorni, con trasferimenti nel medesimo terreno di coltura e alle stesse condizioni di crescita.

### *Propagazione vegetativa mediante taleggio*

Come materiale migliore per l'ottenimento di una buona radicazione sono state identificate le porzioni giovani di punta con almeno due nodi, lunghe 10 cm circa. Le talee sono state allestite nel mese di giugno e disposte, senza alcun trattamento ormonale, in contenitori alveolari con 60 fori riempiti con una miscela di terriccio commerciale per semina (Klasmann®) e perlite (Agrilit®) 30:70 v/v e messi in serra per un periodo di 15-20 giorni. Durante questo periodo le piante sono state mantenute in ambiente umido ottenuto dalla nebulizzazione. Sono state preparate 60 talee mantenute in serra per 20 giorni ad un intervallo di temperatura tra 20,4 °C e 35,2 °C (T°C media 19,6°C). Dopo 20 giorni si è accertata una radicazione del 70% (fig. 3); le talee mostravano un apparato radicale completo e ben sviluppato. Le piante sono state trasferite in vaso da 14 cm con terriccio commerciale organico con pomice e posizionate all'esterno della serra in ambiente soleggiato. Da queste piante, dopo 90 giorni, sono stati raccolti 600 g di materiale vegetale fresco. Le parti aree del materiale così ottenuto sono state quindi raccolte e sottoposte a distillazione per l'ottenimento degli oli essenziali.

### *Elicitazione fisica con alta intensità luminosa*

L'esperimento è stato organizzato secondo un disegno sperimentale completamente randomizzato: 30 vasi di coltura contenenti ciascuno 8 espianti di *S.*

*dolomitica* allevati nel terreno di coltura sopra descritto sono stati esposti ad un'intensità luminosa di  $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  alla temperatura  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  ed in presenza di 16h di fotoperiodo. In parallelo, sono stati allestiti in ugual numero dei vasi di controllo in cui le piante sono state allevate nelle stesse condizioni di temperatura e fotoperiodo ma alla normale intensità luminosa di  $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La prova ha avuto durata di 3 settimane. Al termine, il materiale è stato sottoposto a distillazione per l'ottenimento degli oli essenziali.

#### *Isolamento degli oli essenziali*

Il materiale vegetale fresco derivante dalle tre tesi oggetto di studio (600 g del campione di piante allevate *in vivo*; 58 g del campione di piante allevate *in vitro*; 84 g del campione di piante allevate *in vitro* ed elicitate) sono state sottoposte ad idrodistillazione (tre diverse procedure per ciascuna tesi) usando un apparato di tipo Clevenger per due 2 ore. Gli oli essenziali così ottenuti sono stati quindi seccati in presenza di magnesio solfato e stoccati a  $-20^\circ\text{C}$  fino al momento delle analisi.

#### *Microestrazione a fase solida dello spazio di testa (HS-SPME)*

I composti volatili emessi dai diversi campioni sono stati analizzati usando il sistema Supelco di SPME rivestito con polidimetilsilossano (PDMS,  $100 \mu\text{m}$ ) al fine di campionare lo spazio di testa di ciascun campione vegetale (2 g, campione di piante allevate *in vivo*; 1,9 g, di piante micropropagate; 2,8 g, di piante micropropagate ed elicitate). L'analisi dello spazio di testa è stata condotta direttamente nel vaso di vetro utilizzato per la coltura nel caso dei campioni derivanti da *in vitro* mentre, per il campione derivante da materiale coltivato, 5 g della porzione area sono stati introdotti in un tubo di vetro di forma conica 50 mL e lasciato equilibrare per 30 min. Al termine, la fibra è stata allo spazio di testa di ciascun campione per 30 min a temperatura ambiente, separatamente. Una volta concluso il campionamento la fibra è stata ritirata nell'ago e introdotta nell'iniettore dei sistemi GC e GC-MS. L'analisi è stata condotta in triplicato per ciascun campione.

#### *Analisi GC e GC/MS*

L'analisi del GC è stata realizzata con uno strumento HP-5890 Series II equipaggiato con colonne capillari HP-Wax e HP-5 (entrambi  $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$ , spessore  $0,25\text{ mm}$ ), lavorando con il seguente programma di temperatura:  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  per 10 min, a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  a  $220 \text{ }^\circ\text{C}$ . Le temperature dell'iniettore e del rivelatore sono state mantenute a  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Gas di

trasporto, azoto ( $2\text{ mL}/\text{min}$ ); Rilevatore, doppio FID; Rapporto split 1:30. Il volume iniettato era  $0,5 \mu\text{L}$ . Le proporzioni relative dei costituenti dell'olio erano percentuali ottenute dalla normalizzazione della zona di picco della FID senza l'uso di un fattore di risposta. Le analisi GC-MS sono state eseguite con un cromatografo Varian CP3800 dotato di una colonna capillare DB-5 ( $30\text{ m} \times 0,25$ , spessore di rivestimento,  $0,25 \mu\text{m}$ ) e un rivelatore di massa di trappola ionica Varian Saturn 2000. Le condizioni analitiche sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore e della linea di trasferimento,  $220$  e  $240 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  rispettivamente; Temperatura del forno, programmata da  $60$  a  $240^\circ\text{C}$  a  $3 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Gas di trasporto, elio a  $1\text{ mL}/\text{min}$ ; Iniezione,  $0,2\text{ L}$  (soluzione al 10% di esano); Split ratio, 1:30.

#### *Identificazione dei composti*

L'identificazione dei componenti è stata basata sul confronto del tempo di ritenzione con quelli di campioni standard, confrontando i loro indici lineari rispetto ad una serie di  $n$  idrocarburi e sulla corrispondenza dei computer rispetto a quelli commerciali (NIST 98 e ADAMS) e resi possibili anche dall'utilizzo di una biblioteca fatta in casa di spettri di massa costruiti da sostanze pure e componenti di oli noti. Inoltre, i pesi molecolari di tutte le sostanze identificate sono stati confermati da GC-CIMS, utilizzando metanolo come gas ionizzante CI.

## **Risultati e discussione**

#### *Propagazione in vitro ed in vivo di S. dolomitica*

Le piante di *S. dolomitica* sono state propagate sia per via vegetativa (fig. 2) come riportato da Cervelli *et al.* (2013) che attraverso propagazione *in vitro* (fig. 3) come riportato da Mascarello *et al.* (2006), utilizzando come substrato di crescita un terreno MSO arricchito con  $1,33 \mu\text{M}$  di BA. È stato inoltre allestito un protocollo per lo sviluppo di calli a partire da espunti fogliari e successivamente, una volta ottenuti i calli, è stato possibile ottenere delle sospensioni cellulari. Le colture cellulari di *S. dolomitica* possono rappresentare uno strumento biotecnologico utile per la produzione su larga scala di metaboliti d'interesse fitochimico.

#### *Analisi fitochimica*

Dopo aver valutato tramite analisi istologica e di microscopia che non sussistono differenze nella morfologia e/o distribuzione delle ghiandole secretorie tra piante micropropagate e piante propagate per via vegetativa, è stato quindi analizzato il profilo fito-





Fig. 2 - Propagazione in vivo di *S. dolomitica* tramite taleggio e conseguente ottenimento di piante radicate

Fig. 2 - In vivo production of *S. dolomitica* biomass. Cutting preparation and en plein air *S. dolomitica* plants after 20 days of cultivation.

chimico dei diversi estratti mediante spazio di testa (head-space solid-phase microextraction, SPME) e la composizione degli oli essenziali, estratti mediante un processo d'idrodissillazione in corrente continua di vapore, mediante GC-MS. In questo modo è stato possibile comparare il profilo aromatico degli oli essenziali estratti da piante di *S. dolomitica* allevate in tre diverse condizioni: mediante propagazione vegetativa per taleggio; mediante micropropagazione; mediante micropropagazione e successivo trattamento di elicitazione ad alta intensità luminosa.

#### Composizione degli oli essenziali nei diversi campioni di *S. dolomitica*

Un primo dato interessante è fornito dalla resa in EO. Sorprendentemente, la resa risulta maggiore negli estratti derivanti da piante propagate in vitro, infatti è di 0,10 % w/v per quelle da vivo, 0,17 % w/v per le piante micropropagate, e 0,48 % w/v, per i campioni propagati in vitro ed elicitati. Questo dato evidenzia che le tecniche di propagazione in vitro possono determinare aumenti nella resa di olio essenziale in *S. dolomitica* e che l'intensità luminosa incrementa ulteriormente tale resa. Come osservato in *Ocinum gratissimum* questi valori non sono attribuibili ad alterazioni morfologiche dei tricomi (Fernandes *et al.* 2013).

In totale sono stati identificati 83, 88, 90 composti nei campioni derivanti dalle piante in vivo, dalle piante micropropagate e da quelle micropropagate ed elicitate, rispettivamente. In generale, dall'analisi dei componenti evidenziata in tabella 1 si evince che le condizioni artificiali di crescita in vitro influenzano qualitativamente e quantitativamente la composizione in OE della *S. dolomitica* micropropagata rispetto alla pianta madre allevata in vivo. Infatti, guardando i principali composti per ciascuna condizione di crescita, si nota che la percentuale dei sesquiterpeni, siano essi idroge-



Fig. 3 - Propagazione in vitro di *S. dolomitica*. Espianti nodali sono stati coltivati su terreno MSO addizionato con BA.

Fig. 3 - In vitro production of *S. dolomitica* biomass. A Nodal explants grown on MSO supplemented with BA.

nati o ossigenati, diminuisce drasticamente passando dal campione in vivo (85,18%) al campione micropropagato (39,92 %) e al campione da piante elicitate in vitro (29,73 %). Viceversa, il contenuto dei monoterpeni totali aumenta passando dalle piante cresciute in vivo (12,17%) a quelle micropropagate (59,97%), ed è ancor più elevato nelle piante sottoposte a stress da alta intensità luminosa (69,91%), suggerendo come la luce sia in grado di modulare selettivamente il profilo degli OE in vitro. E' rimarcabile, inoltre, la presenza in elevate quantità di particolari composti, quali  $\alpha$ -pinene, borneolo e  $\beta$ -phellandrene, nelle piante micropropagate suggerendo come la manipolazione in vitro della *S. dolomitica* possa essere uno strumento biotecnologico per l'ottenimento o l'incremento dei composti selezionati. Le differenze in termini di composizione tra i campioni derivanti da vivo e da propagazione in vitro possono essere attribuiti al diverso stadio ontologico delle piante. Infatti, è noto che le piante in vitro possono essere considerate plantule in fase giovanile aventi, quindi, un profilo fisiologico e metabolico diverso da quello delle piante madri, che hanno invece sviluppato in toto l'apparato biosintetico per la sintesi dei sesquiterpeni (Azam *et al.* 2013). E' inoltre interessante ai fini industriali osservare come nessuno dei campioni analizzati contenga canfora, rendendo quindi questa specie sfruttabile anche nell'industria alimentare ad esempio come additivo.

#### Analisi SPME

La analisi GC e GC-MS dello spazio di testa dei tre estratti (piante da vivo, propagate in vitro, ed elicitate in vitro) hanno identificato 66, 37 e 35 costituenti, rispettivamente. Tutti e tre i campioni mostrano delle differenze quali-quantitative rispetto all'analisi degli OE e che sono riportate in tabella 2. In particolare, gli idrocarburi monoterpenici, e non i sesquiter-

Tab. 1 - Profilo degli oli essenziali e loro composizione nei diversi estratti di piante di *S. dolomitica*. L.R.I indica gli indici lineari di ritenzione; i dati sono riportati come media di tre repliche  $\pm$  SE. tr: tracce (<0.05 %)

Tab. 1 - Aromatic profile of essential oils in diverse extracts of *S. dolomitica* plants. L.R.I indicates the Linear Retention Indices; data are reported as mean of three replicate  $\pm$  SE. tr: trace (<0.05 %).

Compounds	L.R.I.	In vivo plants	Micropropagated plants	HL treated plants
$\alpha$ -Thujene	932	tr	0,17 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01
Tricyclene	938	0,72 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01
$\alpha$ -Pinene	940		7,24 $\pm$ 0,25	8,36 $\pm$ 0,21
Camphene	955	0,47 $\pm$ 0,01	3,83 $\pm$ 0,06	4,91 $\pm$ 0,13
Verbenene	967		tr	tr
Sabinene	978	tr	0,51 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,01
$\beta$ -Pinene	981	0,58 $\pm$ 0,02	3,59 $\pm$ 0,07	4,43 $\pm$ 0,03
<i>cis-meta</i> -Mentha-2,8-diene	986		tr	
3-Octanone	987	tr	tr	tr
Myrcene	993	0,59 $\pm$ 0,01	2,33 $\pm$ 0,01	2,64 $\pm$ 0,03
$\delta$ -2-Carene	1001	tr	tr	tr
$\alpha$ -Phellandrene	1006		0,52 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01
$\delta$ -3-Carene	1012	1,70 $\pm$ 0,01	4,94 $\pm$ 0,06	4,91 $\pm$ 0,02
$\alpha$ -Terpinene	1019	tr	0,51 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01
<i>o</i> -Cymene	1026	tr	tr	tr
<i>p</i> -Cymene	1028	0,72 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,01
Limonene	1032	3,30 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,02
$\beta$ -Phellandrene	1033	tr	6,50 $\pm$ 0,45	7,66 $\pm$ 0,13
1,8-Cineole	1036	1,87 $\pm$ 0,06	13,28 $\pm$ 0,57	16,62 $\pm$ 0,10
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimene	1042	0,91 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	1053	0,13 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,00
$\gamma$ -Terpinene	1062	0,13 $\pm$ 0,00	0,98 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,05
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1072	tr	0,63 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,01
<i>para</i> -Mentha-2,4(8)-diene	1088	0,11 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,01
Terpinolene	1090	0,11 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,00
Linalool	1102	tr	0,50 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01
<i>endo</i> -Fenchol	1117		tr	tr
$\beta$ -Thujone	1120	tr		
<i>cis-para</i> -Menth-2-en-1-ol	1126	tr	tr	0,10 $\pm$ 0,00
<i>trans</i> -Sabinol	1140	tr	0,18 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01
Camphor	1148	tr		
<i>cis</i> -Verbenol	1141		tr	tr
Camphene hydrate	1153		tr	tr
<i>unknown</i>		0,11 $\pm$ 0,00	tr	
<i>para</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1164	tr		
Borneol	1169	0,82 $\pm$ 0,02	10,45 $\pm$ 0,11	11,73 $\pm$ 0,14
4-Terpineol	1180	tr	0,59 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,00
<i>meta</i> -Cymen-8-ol	1181	tr		
<i>para</i> -Cymen-8-ol	1187	tr		
$\alpha$ -Terpineol	1192	tr	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00
<i>cis</i> -Piperitol	1197	tr	tr	tr
$\gamma$ -Terpineol	1207	tr		
<i>trans</i> -Piperitol	1210		tr	tr
<i>cis</i> -Sabinene hydrate acetate	1223		tr	tr
<i>unknown</i>		0,12 $\pm$ 0,00		
Neral	1242		tr	tr
Methyl carvacrol	1237	tr		
Geranial	1276		tr	
$\alpha$ -Cubebene	1351	0,73 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	tr

Segue

## Qualità nella micropropagazione ed estrazione di metaboliti secondari

Compounds	L.R.I.	In vivo plants	Micropropagated plants	HL treated plants
Cyclosativene	1371	tr		
Isoledene	1375	0,63 ± 0,02	0,15 ± 0,01	tr
$\alpha$ -Copaene	1376	2,72 ± 0,10	0,51 ± 0,01	0,33 ± 0,01
$\beta$ -Bourbonene	1383	tr		
$\beta$ -Cubebene	1390	0,26 ± 0,02	0,10 ± 0,00	tr
$\beta$ -Elemene	1392	0,24 ± 0,01	tr	tr
(Z)-Jasmone	1397	tr	tr	tr
Longifolene	1404	tr		
$\alpha$ -Gurjunene	1410	1,47 ± 0,04	0,32 ± 0,01	0,19 ± 0,01
$\beta$ -Caryophyllene	1418	25,58 ± 0,59	14,58 ± 0,17	10,75 ± 0,09
$\beta$ -Copaene	1429	1,39 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,23 ± 0,01
<i>unknown</i>		0,38 ± 0,03	tr	tr
$\beta$ -Gurjunene	1432	1,17 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,19 ± 0,01
$\alpha$ -Guaiene	1440	8,93 ± 0,10	2,39 ± 0,03	1,48 ± 0,03
Aromadendrene	1445	0,93 ± 0,12	0,33 ± 0,01	0,20 ± 0,01
<i>cis</i> -Muurolo-3,5-diene	1448	tr	tr	tr
<i>trans</i> -Muurolo-3,5-diene	1454	tr	tr	tr
$\alpha$ -Humulene	1455	2,93 ± 0,04	1,52 ± 0,03	1,17 ± 0,02
<i>allo</i> -Aromadendrene	1461	1,03 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,17 ± 0,01
<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1463	0,51 ± 0,06	0,12 ± 0,01	tr
<i>unknown</i>		0,35 ± 0,03	tr	tr
<i>trans</i> -Cadina-1(6),14-diene	1470	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,00	0,14 ± 0,01
g-Muuroloene	1477	1,02 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Germacrene D	1481	0,58 ± 0,03	0,12 ± 0,00	tr
$\beta$ -Selinene	1485	0,23 ± 0,03	0,16 ± 0,00	0,10 ± 0,01
<i>cis</i> - $\beta$ -Guaiene	1489	0,59 ± 0,02	tr	tr
<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1492	0,52 ± 0,02	0,12 ± 0,00	tr
Valencene	1491	5,27 ± 0,14	2,36 ± 0,01	1,53 ± 0,02
Viridiflorene	1495	tr	0,74 ± 0,03	0,51 ± 0,01
$\alpha$ -Muuroloene	1499	2,15 ± 0,05	tr	tr
$\alpha$ -Bulnesene	1505	tr	tr	tr
<i>trans</i> - $\gamma$ -Cadinene	1513	4,89 ± 0,11	2,13 ± 0,03	1,48 ± 0,01
$\delta$ -Cadinene	1523	7,49 ± 0,14	2,12 ± 0,04	1,52 ± 0,00
10- <i>epi</i> -Cubebol	1535	tr	tr	tr
<i>trans</i> -Cadina-1(2),4-diene (= Cubebene)	1535	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,15 ± 0,01
$\alpha$ -Cadinene	1537	0,36 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
$\alpha$ -Calacorene	1542		tr	tr
<i>trans</i> -Cadinene ether	1559	0,33 ± 0,01		
Germacrene B	1561	0,27 ± 0,01		
Selina-3,7(11)-diene	1547		0,11 ± 0,00	tr
<i>trans</i> -Longipinanol	1569	0,45 ± 0,01	0,13 ± 0,01	tr
Germacrene D-4-ol	1576	0,48 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,36 ± 0,01
Spathulenol	1578	0,42 ± 0,02	tr	tr
<i>trans</i> -Sesquisabinene hydrate	1579		0,18 ± 0,00	0,14 ± 0,00
Caryophyllene oxide	1582	6,16 ± 0,06	3,78 ± 0,18	4,24 ± 0,35
Globulol	1585	0,13 ± 0,01	tr	tr
5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Eudesmol	1606	0,67 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Humulene epoxide II	1607	0,31 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,01
1,10- <i>di-epi</i> -Cubebol	1614	0,18 ± 0,01	tr	tr
<i>unknown</i>		0,12 ± 0,01		
1- <i>epi</i> -Cubebol	1630	0,36 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,04
g-Eudesmol	1634	tr	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,03

Compounds	L.R.I.	In vivo plants	Micropropagated plants	HL treated plants
Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5-ol	1636	tr	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,01
t-Cadinol	1642	1,78 ± 0,07	1,00 ± 0,03	0,78 ± 0,07
$\alpha$ -Muurolol	1651	tr	tr	0,10 ± 0,00
$\alpha$ -Eudesmol	1654	tr	0,37 ± 0,02	0,24 ± 0,01
$\alpha$ -Cadinol	1655	2,39 ± 0,60	1,88 ± 0,06	1,47 ± 0,06
Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1655		0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,01
14-hydroxy-9- <i>epi</i> -(E)-Caryophyllene	1672		0,19 ± 0,02	0,25 ± 0,02
5- <i>neo-iso</i> -Cedranol	1674		0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Khusinol	1680		tr	0,11 ± 0,00
<i>epi</i> - $\alpha$ -Bisabolol	1685		tr	tr
5- <i>neo</i> -Cedranol	1685		0,26 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700		0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01
Zerumbone	1734		tr	tr
Isopimara-9-(11),15-diene	1906	0,17 ± 0,02		
<i>unknown</i>		0,13 ± 0,01		
TOTALE		99,43 ± 0,47	99,15 ± 0,09	99,54 ± 0,12

peni come nel caso degli OE, costituiscono la classe principale dei componenti chimici presenti negli estratti. Lo spazio di testa dei costituenti ossigenati (monoterpeni e sesquiterpeni) è presente in tutti e tre i campioni sebbene in concentrazioni inferiori rispetto ai corrispondenti OE. Il materiale derivante da propagazione *in vitro* è caratterizzato dalla presenza di miricene,  $\delta$ -3-Carene, e limonene che costituiscono circa il 50% dell'intera composizione volatile. L'aroma delle piante allevate *in vivo* è dovuto all'eleva-

ta concentrazione di limonene ed in generale dei sesquiterpeni tra cui il  $\beta$ -Caryophyllene ed il Germacrene D che risultano quasi assenti negli estratti derivanti dal materiale *in vitro*. Dato l'accumulo selettivo di alcuni composti (tra cui limonene e micricene) negli estratti delle piante elicitate, è possibile speculare che la luce moduli la composizione degli OE interferendo con l'attività trascrizionale di enzimi chiave del pathway di sintesi quali la monoterpene e la sesquiterpene sintasi.

Tab. 2 - Profilo HS-SPME di piante di *S. dolomitica*. L.R.I indica gli indici lineari di ritenzione; i dati sono riportati come media di tre repliche  $\pm$  SE. tr: trace (<0.05 %)

Tab. 2 - HS-SPME profile of *S. dolomitica* plants. L.R.I indicates the Linear Retention Indices. Data are reported as mean of three replicates  $\pm$  SE. tr: trace (<0.05 %)

Compounds	L.R.I.	<i>in vivo</i> plants	Micropropagated plants	HL treated plants
$\alpha$ -Thujene	932			0,22 ± 0,05
$\alpha$ -Pinene	940	3,13 ± 1,19	5,72 ± 0,21	3,04 ± 1,57
Camphene	955	1,90 ± 0,71	3,19 ± 0,29	1,59 ± 0,91
$\beta$ -pinene	981	1,80 ± 0,03	2,33 ± 0,18	1,55 ± 1,04
6-Methyl-5-hepten-2-one	990		0,90 ± 0,01	
Myrcene	993	12,69 ± 5,57	17,37 ± 3,46	3,41 ± 1,26
$\alpha$ -Phellandrene	1006	0,48 ± 0,02	0,44 ± 0,24	0,63 ± 0,21
$\delta$ -3-Carene	1012	10,49 ± 2,82	9,07 ± 0,01	8,59 ± 3,40
$\alpha$ -Terpinene	1019	1,42 ± 1,98	0,30 ± 0,10	
o-Cymene	1026		0,73 ± 0,09	
Sylvestrene	1012			1,35 ± 0,32
<i>p</i> -Cymene	1028	4,15 ± 0,46	0,73 ± 0,10	
Limonene	1032	24,83 ± 3,84	24,44 ± 0,22	11,93 ± 2,83
(Z)- $\beta$ -Ocimene	1042	0,46 ± 0,05	0,56 ± 0,06	4,05 ± 1,08
(E)- $\beta$ -Ocimene	1053	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,00	0,55 ± 0,34
$\gamma$ -Terpinene	1062	1,55 ± 0,43	1,69 ± 0,13	0,41 ± 0,23
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1072			tr
<i>para</i> -Mentha-2,4(8)-diene	1094			0,31 ± 0,09
Terpinolene	1090			0,51 ± 0,17
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1101			0,10 ± 0,00

## Qualità nella micropropagazione ed estrazione di metaboliti secondari

Compounds	L.R.I.	in vivo plants	Micropropagated plants	HL treated plants
<i>unknown</i>				0,13 ± 0,03
<i>allo</i> -Ocimene	1133	0,19 ± 0,01		0,73 ± 0,18
<i>trans</i> -Sabinol	1141			tr
Borneol	1169	0,99 ± 0,58	0,95 ± 0,08	0,48 ± 0,29
Menthol	1178	0,30 ± 0,00	1,13 ± 0,32	
4-Terpineol	1180	0,25 ± 0,10	0,35 ± 0,05	tr
$\alpha$ -Terpineol	1192		0,35 ± 0,00	0,14 ± 0,06
<i>unknown</i>		0,19 ± 0,01		
<i>trans</i> -Chrysantenyl acetate	1235			0,16 ± 0,01
<i>unknown</i>				0,12 ± 0,03
Linalool acetate	1260			tr
Bornyl acetate	1285			tr
$\delta$ -Elemene	1340			1,01 ± 0,48
$\alpha$ -Cubebene	1351			0,49 ± 0,05
Cyclosativene	1371			tr
Isolatedene	1375	0,26 ± 0,10		0,93 ± 0,05
$\alpha$ -Copaene	1376	0,84 ± 0,30	0,40 ± 0,08	3,32 ± 0,38
$\beta$ -Bourbonene	1383			1,72 ± 0,45
<i>iso</i> -Longifolene	1385			0,47 ± 0,11
$\beta$ -Elemene	1392	3,15 ± 1,67	1,47 ± 0,22	0,23 ± 0,12
Longifolene	1404			0,22 ± 0,03
$\alpha$ -Gurjunene	1410	0,19 ± 0,04		1,56 ± 0,17
$\beta$ -Caryophyllene	1418	6,32 ± 0,15	4,84 ± 0,19	9,90 ± 0,67
$\beta$ -Copaene	1432			1,97 ± 0,28
$\beta$ -Gurjunene	1423	0,56 ± 0,19	0,43 ± 0,00	0,76 ± 0,12
$\alpha$ - <i>trans</i> -Bergamotene	1437	1,87 ± 1,31	2,67 ± 2,11	
$\alpha$ -Guaiene	1440	1,04 ± 0,01	0,72 ± 0,00	6,87 ± 1,09
Aromadendrene	1445	0,20 ± 0,14	tr	0,75 ± 0,14
<i>cis</i> -Muurolo-3,5-diene	1448	1,59 ± 0,43	1,48 ± 0,37	tr
<i>trans</i> -Muurolo-3,5-diene	1448			0,14 ± 0,02
$\alpha$ -Humulene	1456	1,10 ± 0,18	1,21 ± 0,08	0,84 ± 0,12
<i>allo</i> -Aromadendrene	1461	2,54 ± 0,87	3,99 ± 2,59	0,96 ± 0,20
<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1463	6,54 ± 0,71	2,64 ± 0,37	0,53 ± 0,11
$\beta$ -Acoradiene	1471	0,16 ± 0,08		
$\gamma$ -Gurjunene	1476			0,13 ± 0,03
$\gamma$ -Muuroloene	1477	0,70 ± 0,36	tr	1,24 ± 0,44
Germacrene D	1481	0,64 ± 0,19		10,81 ± 4,71
$\beta$ -Selinene	1485			0,11 ± 0,00
Valencene	1493	0,37 ± 0,08	tr	0,24 ± 0,05
Epizonarene	1498			0,16 ± 0,05
Viridiflorene	1495	0,36 ± 0,04	0,43 ± 0,01	
$\gamma$ -Patchoulene	1502			6,10 ± 2,34
<i>trans</i> - $\beta$ -Guaiene	1500			0,41 ± 0,37
$\delta$ -Amorphene	1505			0,15 ± 0,00
<i>trans</i> - $\gamma$ -Cadinene	1513			2,53 ± 0,47
$\delta$ -Cadinene	1523	2,24 ± 0,52	0,58 ± 0,02	3,46 ± 0,90
10- <i>epi</i> -Cubebol	1535			0,19 ± 0,03
$\alpha$ -Cadinene	1537	3,76 ± 0,81	3,20 ± 0,14	0,18 ± 0,04
<i>trans</i> -Nerolidol	1566			0,12 ± 0,00
Germacrene D-4-ol	1576			0,26 ± 0,07
Spathulenol	1577			0,18 ± 0,03
Caryophyllene oxide	1582			0,35 ± 0,09



Compounds	L.R.I.	in vivo plants	Micropropagated plants	HL treated plants
Viridiflor	1591			0,17 ± 0,02
1,10-di-epi-Cubenol	1614			tr
1-epi-Cubenol	1630			tr
epi- $\alpha$ -Cadinol	1642			0,18 ± 0,04
$\alpha$ -Eudesmol	1654	1,22 ± 1,47	4,73 ± 1,12	0,20 ± 0,08
TOTALE		98,32 ± 1,34	99,76 ± 0,31	99,52 ± 0,43

## Conclusioni

La tecnologia *in vitro* è nota essere una strategia per preservare la biodiversità pur soddisfacendo la crescente domanda sia di composti volatili (ad es. oli essenziali) che metaboliti secondari bioattivi non volatili. Sfruttando la sintesi di metaboliti secondari in risposta a stress abiotici è, inoltre, possibile applicare alla coltura *in vitro* agenti elicitori di natura fisica o chimica in grado di stimolare le piante alla produzione di alte concentrazioni del composto desiderato oppure di un gruppo di composti. La *Salvia dolomitica* può essere facilmente propagata *in vitro* ed è caratterizzata da un intenso aroma sia in condizioni di crescita *in vivo* che *in vitro*. In questo studio abbiamo mostrato, per la prima volta in *S. dolomitica*, come un elicitore fisico quale l'intensità luminosa può essere usato per modulare selettivamente l'accumulo di costituenti specifici degli OE, regolandone quali/quantitativamente la composizione. In futuro, sarà interessante testare l'attività biologica e la tossicità di OE estratti da piante micropropagate nonché saggiare il profilo aromatico di OE derivati da piante di *S. dolomitica* coltivate in diverse stagioni. In ultima analisi, la *S. dolomitica* potrebbe essere usata come modello per studiare l'impatto dei fattori climatici (ad es. temperatura, fotoperiodo) sulle emissioni di VOC da piante aromatiche.

## Riassunto

Estratti vegetali secreti dai tricomi ghiandolari di specie della famiglia delle *Lamiaceae* rappresentano una fonte di composti volatili biologicamente attivi. Sono stati sviluppati protocolli per la coltura *in vitro* di germogli e calli di una specie estremamente odorosa, *Salvia dolomitica*. Piante *in vitro* sono state coltivate ad alta intensità luminosa e il profilo degli oli essenziali analizzato. La resa in oli essenziali è risultata maggiore nelle piante stressate ad elevata intensità luminosa verso quelle non elicitate. La coltura *in vitro* modula il profilo aromatico: *in vitro* la percentuale di sesquiterpeni diminuisce ed aumentano i monoterpeni.

**Parole chiave:** micropropagazione, monoterpeni, sesquiterpeni, tricomi ghiandolari, VOCs.

## Ringraziamenti

L.B. è stata supportata dal progetto BIOAROMA della Regione Liguria POR FSO, E.G. è stata supportata dalla

Fondazione CARIGE. Gli autori ringraziano Pietro Guglielmi per l'assistenza tecnica nell'estrazione degli OE, Pasquale Casella e Sergio Ariano per la cura e la gestione delle piante.

## Bibliografia

- AZAM A., QIAN J., ZHANG B., XU C., CHEN K., 2013. *Citrus leaf Volatiles as affected by developmental stage and genetic type*. Int J Mol Sci v.14(9).
- BURBOTT A.J., LOOMIS W.D., 1967. *Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint*. Plant Physiol 42: 20-28.
- CASER M., RUFFONI B., SCARIOT V., 2012. *Screening for drought tolerance in Salvia spp. and Helichrysum petiolare: a way to select low maintenance ornamental plants*. Act Hort 953:240-246.
- CERVELLI C., CAPPONI A., MASCARELLO B., RUFFONI B., DEL GAUDIO C., 2013. *New Species and Cultivars of Salvia as Ornamental Pot Plants*. Acta Hort 1000:35-41.
- FERNANDES VF., DE ALMEIDA LB., DA S. FEIJÓ EVR., DA C. SILVA D., DE OLIVEIRA RA., MIELKE MS., DO B COSTA LC., 2013. *Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of Ocimum gratissimum*. Rev Bras Farmacogn 23(3): 419-424.
- FISHER VL., 2005. *Indigenous Salvia species-an investigation of the antimicrobial activity, antioxidant activity and chemical composition of leaf extracts*. MSc thesis.
- KAMATOU GPP., VILJOEN AM., GONO-BWALYA AB., VAN ZYL RL., VAN VUUREN SF., LOURENS ACU., BASER KHC., DEMIRCI B., 2005. *The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African Salvia species*. J Ethnopharmacol 102: 382-390.
- KAMATOU GPP., VILJOEN AM., FIGUEIREDO AC., TILNEY PM., VAN ZYL RL., BARROSO JG., PEDRO LG., VAN VUUREN SF., 2007a. *Trichomes, essential oil composition and biological activities of Salvia albicaulis Benth. and S. dolomitica Codd, two species from the Cape region of South Africa*. S Afr J Bot 73: 102-108.
- KAMATOU GPP., VAN ZYL RL., DAVIDS H., VAN HEERDEN FR., LOURENS ACU., VILJOEN AM., 2008. *Antimalarial and anticancer activities of selected South African Salvia species and isolated compounds from S. radula*. S Afr J Bot 74: 238-243.
- KAMATOU GPP., VILJOEN AM., STEENKAMP P., 2010. *Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African Salvia species*. Food Chemistry 119: 684-688.
- MARCHEV A., HAAS C., SCHULZ S., GEORGIEV V., STEINGROEWER J., BLEY T., PAVLOV A., 2014. *Sage In vitro culture: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances*. Biotechnol Lett 36:211-221.
- MASCARELLO C., MANTOVANI E., RUFFONI B., 2006. *In vitro culture of several ornamental and medicinal Salvia species*. Acta Hort 723: 375-380.
- RUFFONI B., RAFFI D., RIZZO A., OLESZEK W., GIARDI MT., BERTOLI A., PISTELLI L., 2009. *Establishment of in vitro Salvia cell biomass for the controlled production of antioxidant metabolites*. Acta Hort 829: 423-427.
- RUFFONI B., PISTELLI L., BERTOLI A., PISTELLI L., 2010. *Plant cell cultures: Bioreactors for industrial production* Adv Exp Med Biol 698:203-218.
- SHOEMAKER M., HAMILTON B., DAIRKEE SH., COHEN I., CAMPBELL MJ., 2005. *In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs*. Phytotherapy Research 19 (7): 649-651.
- WATT JM., BREYER-BRANDWIJK MG., 1962. *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*. Livingstone, Edinburgh.