

La micropropagazione a fini conservativi di *Alkanna tinctoria*

Chiara Montagnani¹, Carlo Mascarello^{2*}, Manuela Pamato², Barbara Ruffoni²

¹ Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio (DISAT), Università di Milano Bicocca

² CREA, Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo (IM)

Micropropagation targeted at conservation of *Alkanna tinctoria*

Abstract. *Alkanna tinctoria* (Boraginaceae) is native to the Mediterranean basin and several countries of the Central Europe. It lives in grasslands and shrublands, on sea dunes, but also in rocky habitats and more ruderal places. A natural red pigment is extracted from its rhizome and it is used in vegetal oils, wines, paints and cosmetics. From ancient times, its antibacterial, antibiotic, astringent and antioxidant properties are well known. *A. tinctoria* is threatened in several sites due to uncontrolled gathering and disappearance of suitable environments. To prevent its local extinction, an *ex situ* conservation protocol by micropropagation has been established. Seedlings were grown *in vitro* from seeds collected in wild populations. Among seedlings those showing a good sprouting capacity were selected and placed in jars at five different medium conditions. Benzyladenine at different concentrations (0; 0.3; 0.6; 0.9; 1.2 mg/L) has been added to Murashige & Skoog medium with sucrose (30 g/L), agar (8 g/L) and a pH at 5.7. Eight explants per jar for line, were placed, for each treatment. Moreover, the effect on growth of activated charcoal, at two concentrations (1 and 2 g/L), has been compared to that obtained onto Murashige & Skoog medium with or without BA 0.6 mg/L. After 30 days, following traits have been assessed: height (cm), multiplication rate (number of sprouts/explant/month), weight (g), range of quality of explants (1-bad, 2-sufficient, 3-good, 4- excellent) and leaf area (mm²) calculated with "Skyleaf" software. Successively, the addition of auxins (indole-3-butyric acid or α -naphthalene acetic acid or indole acetic acid), at concentration of 2 mg/L, has been tested to assess the rooting and the following *in vivo* acclimatization in a nursery greenhouse. Subsequently, plants were transferred in the greenhouse on commercial soil and perlite mixture (30:70 v/v) under mist system. After 30 days the number of survived plants was

recorded. Data were statistically analyzed by mean and standard error. Seeds showed a moderate germinability (27%) and plants had a good development. During the multiplication phase, BA at concentration of 0,6 mg/L gave the best results on analyzing assessed traits. The addition of activated charcoal decreased the multiplication rate and the weight of plants, and do not increase the explant quality. IBA was resulted the best auxin to induce *in vitro* rooting; the same effect was obtained in acclimatization phase showing a correlation between *in vitro* explants quality and *in vivo* survival percentage. In conclusion, the tested protocol of micropropagation will operatively contribute to conservation of *A. tinctoria* in sites where it is threatened.

Key words: germination, BA, multiplication, quality, IBA, acclimatization.

Introduzione

Alkanna tinctoria Tausch (Boraginaceae) è una pianta perenne endemica di un'area che si estende dal bacino mediterraneo ad alcuni stati dei Balcani (Bulgaria, Romania, Serbia) e all'Europa Centrale (Ungheria, Slovacchia) (Valdés, 2011). Vive in praterie e arbusteti della regione mediterranea, su dune marittime, così come in habitat più rupestri, ma anche in ambienti ruderali (Chadburn, 2014). La pianta si presenta come una erbacea cespugliosa con fusto legnoso alla base tendenzialmente prostrato; tutte le parti epigee della pianta sono ricoperte da peli bianchi setolosi. I fiori, blu intenso, sono portati in infiorescenze terminali e appaiono da marzo a maggio. Pianta dalle molteplici qualità è coltivata in diversi Stati, anche al di fuori del suo areale naturale (es. India; Khare, 2007). Dal rizoma si estrae un colorante naturale, rosso, usato nella tintura di tessuti, oli vegetali, vini e vernici, così come pigmento in cosmesi (Ozer *et al.*, 2010; Chaitanya Lakshmi, 2014). Da tempi antichi sono altresì ben note le sue proprietà antibatteriche, antibiotiche, astringenti, antiossidanti

* carlo.mascarello@crea.gov.it

(Gerardi *et al.*, 1998; Quattrocchi, 2012) e recentemente sono stati altresì individuati una serie di composti antitumorali (Huu Tung *et al.*, 2013).

Benché le informazioni sul suo stato di conservazione siano frammentarie, a livello europeo la specie non è considerata a rischio d'estinzione (Chadburn, 2014). Tuttavia, in diverse zone del suo areale la specie è rara e in declino a causa della raccolta indiscriminata e della scomparsa degli habitat idonei o del peggioramento del loro stato di conservazione. Per tale ragione in determinate aree la specie è protetta (es. in Liguria).

Per questo motivo, presso il CREA di Sanremo, si è condotta una sperimentazione volta a identificare un protocollo di micropropagazione efficiente per avviare una produzione di plantule da reintrodurre in natura per rafforzare le popolazioni esistenti. La costituzione di collezioni di materiale vegetale *ex situ* rappresenta un'efficace misura di conservazione delle specie.

Materiali e metodi

Per la coltura aseptica si è partiti da seme non sterilizzato posto a germinare in capsule Petri sterili contenenti un doppio strato di carta filtro sterile mantenuto umido con acqua distillata sterile, alla temperatura di 18°C costanti, in condizioni di buio. Le plantule germinate sono state poste *in vitro* e tre di queste sono state selezionate per l'elevata attitudine alla micropropagazione.

Al fine di valutare lo sviluppo e la qualità degli espianti in fase di moltiplicazione, sono stati messi a confronto 5 mezzi di coltura contenenti sali e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) addizionati con diverse concentrazioni di BA (0; 0,3; 0,6; 0,9; e 1,2 mg/L) e saccarosio (30 g/L), pH 5.7 e agar 8 g/L. Ogni contenitore di coltura conteneva 8 espianti e sono stati utilizzati 3 contenitori per trattamento.

Successivamente è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di carbone attivo a due livelli (1 e 2 g/L) nei mezzi di coltura con sali MS addizionati o meno con

BA a 0,6 mg/L. Dopo 30 giorni sono stati valutati altezza (cm), tasso di moltiplicazione (n.germogli/espianto/mese), peso (g), indice di qualità dell'espianto (1, pessima, 2-sufficiente, 3-buona, 4- eccellente) e area fogliare (mm²) tramite software "Skyleaf" collegato a scanner per l'acquisizione dell'immagine.

Per valutare l'attitudine alla radicazione è stato utilizzato un substrato MS addizionato di auxine (IBA o NAA o IAA) alla concentrazione di 2 mg/L. Dopo 30 giorni, il materiale è stato valutato per le variabili già descritte e successivamente trasferito in serra per l'ambientamento in un substrato contenente terriccio commerciale e perlite (30:70 v/v) sotto impianto mist con interventi di spruzzatura di 10 secondi ogni 30 minuti. Anche in questo caso, dopo 30 giorni è stato effettuato il rilievo di sopravvivenza del materiale. Tutti i dati ottenuti sono stati elaborati ottenendo le medie accompagnate dall'errore standard della media.

Risultati

I semi hanno mostrato una germinabilità media del 27% e, in ambiente sterile, hanno prodotto plantule con buon sviluppo vegetativo.

Nonostante il maggior tasso di moltiplicazione sia stato ottenuto in presenza di BA alla concentrazione di 0,9 mg/L (5,4 espianti/mese), la miglior qualità del materiale, determinata da un maggiore allungamento dell'espianto, un maggior peso e una maggiore valutazione complessiva, è stata raggiunta con IBA 0,6 mg/L, (tab. 1). Il tasso di moltiplicazione, comunque, non era significativamente inferiore a quello osservato in presenza di 0,9 mg/L di BA. Il materiale ottenuto da questa prova appariva esile e iperidrico.

L'aggiunta di carbone attivo al mezzo, invece, ha ridotto il tasso di moltiplicazione medio ed il peso degli espianti sia nel mezzo con soltanto i sali MS sia con l'aggiunta di BA ed inoltre non ha migliorato la qualità degli espianti (tab. 2).

L'impiego di ormoni risulta sicuramente indispensabile per stimolare la radicazione del materiale in

Tab. 1 - Effetto di diverse concentrazioni di BA sullo sviluppo e la qualità di espianti di *A. tinctoria*.

Tab. 1 - BA concentration effect on growth and explants quality of *A. tinctoria*.

Concentrazione di BA (mg/L)	Altezza (cm)	Tasso moltiplicazione* (n./getti/esp./mese)	Peso (g)	Qualità **
0	3,1±0,1	3,9±0,4	0,40±0,03	3,1±0,1
0,3	3,9±0,1	3,8±0,4	0,60±0,08	3,2±0,2
0,6	3,6±0,2	5,1±1,4	0,80±0,23	3,4±0,1
0,9	3,0±0,1	5,4±0,5	0,70±0,15	3,1±0,1
1,2	3,1±0,2	5,3±1,0	0,70±0,13	3,1±0,1

I dati rappresentano la media con errore standard (ES); * (n./getti/esp./mese): numero di getti per espianto per mese;

** (1-pessima, 2-sufficiente, 3-buona, 4-eccellente)

Tab. 2 - Effetto del carbone attivo sulla crescita di espianti di *A. tinctoria*. in presenza o assenza di BA
 Tab. 2 - Active carchoal concentration effect on *A. tinctoria* explants growth.

BA (mg/L)	Carbone attivo (mg/L)	Altezza (cm)	Tasso moltiplicazione* (n./getti/esp./mese)	Peso (g)	Qualità**	Area fogliare (mm ²)
0	0	2,8±0,2	4,7±0,4	0,30±0,03	2,8±0,1	26,1±3,1
0,6	0	3,1±0,2	4,9±0,4	0,63±0,09	2,9±0,1	39,3±4,9
0	1	2,9±0,2	3,8±0,4	0,27±0,04	2,6±0,1	24,8±3,4
0,6	1	3,1±0,2	3,5±0,3	0,22±0,02	2,6±0,1	25,9±3,1
0	2	2,9±0,1	3,9±0,3	0,20±0,02	2,9±0,1	25,8±2,3
0,6	2	3,5±0,3	4,3±0,3	0,34±0,04	2,8±0,1	25,9±2,3

I dati rappresentano la media con errore standard (ES); * (n./getti/esp./mese): numero di getti per espianto per mese; ** (1-pessima, 2-sufficiente, 3-buona, 4-eccellente)

in vitro (tab. 3); la più alta rizogenesi *in vitro*, correlata con una buona qualità del materiale, è stata osservata impiegando IBA (65,7% di radicazione) anche se non risultava significativamente maggiore rispetto all'aggiunta di NAA (tab.3).

La specie ha manifestato un 44% di sopravvivenza media all'ambientamento, i migliori risultati sono stati ottenuti dal materiale proveniente da mezzo di coltura *in vitro* con IBA (66,7%) (tab. 3) evidenziando quindi una correlazione tra la qualità del materiale ottenuto *in vitro* e la successiva vitalità delle plantule *in vivo*.

Discussione e conclusioni

La propagazione *in vitro* di *Alkanna tinctoria* non ha manifestato particolari problematiche rilevanti in nessuna delle fasi di coltura fornendo risultati soddisfacenti se pur il materiale appariva esile e iperidrico. Nella coltura *in vitro* l'aggiunta di carbone attivo è usato per migliorare la crescita e lo sviluppo del materiale (Dennis Thomas, 2008), ma per *A. tinctoria* non sono stati ottenuti, tali effetti; il materiale qualitativamente migliore si è rilevato quello cresciuto sul mezzo di moltiplicazione con BA a 0,6 mg/L. E' stata osservata una correlazione tra il mezzo di coltura utilizzato *in vitro* e la successiva capacità di sopravvivenza *in vivo*, come già evidenziato da studi su altre specie (Mascarello *et al.*, 2012): maggiore era la qualità e la radicazione *in vitro* e maggiore è stata la sopravvivenza in serra. I risultati ottenuti in questo

lavoro contribuiscono a definire e integrare la strategia di conservazione *ex situ* di *A. tinctoria*, così che la conservazione in banca di germoplasma possa essere efficacemente affiancata dalla costituzione di collezioni di piante *in vivo* provenienti dalla coltura *in vitro*. È auspicabile che le collezioni *in vivo* siano mantenute e incrementate con nuovi individui ottenuti da semi di diverse popolazioni, al fine di migliorare la diversità genetica e rappresentare al meglio la potenziale variabilità presente in natura.

Riassunto

Alkanna tinctoria è una specie minacciata in diversi siti del suo areale di distribuzione a causa della raccolta indiscriminata e della scomparsa degli habitat idonei. Per prevenire la sua estinzione, ove è più minacciata, è stato sperimentato un protocollo di conservazione *ex situ* tramite micropropagazione di plantule riprodotte da semi raccolti in natura, da utilizzare in azioni di rafforzamento delle popolazioni naturali. I risultati hanno evidenziato una discreta germinabilità dei semi (27%) e in fase di moltiplicazione, la risposta migliore si è ottenuta con benzil-adenina a 0,6 mg/L. L'aggiunta di carbone attivo non ha migliorato la qualità degli espianti. La miglior rizogenesi si è ottenuta utilizzando acido indol-butirrico (2 mg/L) che ha garantito anche la più alta percentuale di ambientamento del materiale *in vivo* (65,7%).

Tab. 3 – Effetto dell'impiego di diverse auxine (IBA, NAA, IAA) sulla radicazione e la qualità degli espianti *in vitro* ed il seguente ambientamento.

Tab. 3 – Auxin effect on rooting and explants quality of *A. tinctoria*.

Mezzo di coltura	Radicazione (%)	Radici (n.)	Lunghezza radici (cm)	Qualità*	Ambientamento (%)
MS	8,5±4,2	0,1±0,1	2,1±1,3	2,4±0,2	26,4±9,2
MS+IBA 2 mg/L	65,7±11,2	2,4±0,5	2,1±0,3	3,3±0,2	66,7±15,4
MS+NAA 2 mg/L	59,1±4,5	2,5±0,5	1,4±0,3	3,1±0,2	45,8±18,7
MS+IAA 2 mg/L	26,1±1,1	0,4±0,2	2,0±0,5	3,0±0,1	33,3±12,4

I dati rappresentano la media con errore standard (ES); * (1-pessima, 2-sufficiente, 3-buona, 4-eccellente)

Parole chiave: conservazione, germinabilità, BA, carbone attivo, IBA

Bibliografia

- CHADBURN H. 2014. *Alkanna tinctoria*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T202920A2758021. Downloaded on 10 February 2017.
- CHAITANYA LAKSHMI G. (2014). *Food coloring: the natural way*. *Res J Chem Sci*, 2231(8), 606X.
- DENNIS THOMAS T., 2008. *The role of activated charcoal in plant tissue culture*. *Biotechnology advances*, 26: 618-631.
- GERARDI C., MIRTA G., GRILLO E., GIOVINAZZO G., MICELI A., DE LEO P., 1998. *Alkanna tinctoria T. (Alkanets): in vitro culture and the production of alkannin and other secondary metabolites*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 41: 14-27.
- HUU TUNG N., DU G. J., WANG C. Z., YUAN C. S. & SHOYAMA Y. 2013. *Naphthoquinone components from Alkanna tinctoria (L.) Tausch show significant antiproliferative effects on human colorectal cancer cells*. *Phytotherapy Research*, 27(1), 66-70.
- KHARE C.P., 2007. *Indian medicinal plants: an illustrated dictionary*. Springer Science & Business Media.
- MASCARELLO C., SACCO E., ROH M., RUFFONI B., 2012. *Micropropagazione di Corylopsis*. *Acta Italus Hortus*, 6: 60-63.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- OZER M.S., SARIKURKCU C., TEPE B. CAN S., 2010. *Essential oil composition and antioxidant activities of alkanet (Alkanna tinctoria subsp. tinctoria)*. *Food Science and Biotechnology*, 19(5), 1177-1183.
- QUATTROCCHI U., 2012. *CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology (5 Volume Set)*. CRC Press.
- VALDÉS B., 2011. *Boraginaceae*. In: Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the Internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [10.02.2017]