



**Università
di Genova**

DIPARTIMENTO DI FARMACIA (DIFAR)

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIE
FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

Fitochimica e Attività Biologica di *Salvia somalensis*

Relatore:

Prof. Angela Bisio

Laureando:

Dario Emanuele Mazzarello

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

INDICE

Lista delle abbreviazioni.....	pag. 4
Ringraziamenti.....	pag. 5
Sintesi.....	pag. 6
Introduzione.....	pag. 8
Capitolo 1 Presentazione e Caratterizzazione botanica.....	pag. 13
1.1 Genere <i>Salvia</i>	pag. 14
1.1.1 <i>Salvia somalensis</i> Vatke.....	pag. 14
1.2 Obiettivi della ricerca.....	pag. 16
Capitolo 2 Materiali e Metodi.....	pag. 18
2.1 Materiale vegetale.....	pag. 19
2.2 Reagenti.....	pag. 19
2.3 Procedure sperimentali generali.....	pag. 20
2.4 Analisi LC-MS.....	pag. 21
2.5 Colture di callo e micropropagazione.....	pag. 21
2.6 Indagine fitochimica dell'estratto di piante micropropagate.....	pag. 24
2.7 Analisi quantitativa HPLC.....	pag. 25
2.8 Attività antifungina.....	pag. 26
2.9 Analisi statistica.....	pag. 29
Capitolo 3 Risultati.....	pag. 30
3.1 Istituzione di colture di callo e micropropagazione.....	pag. 31
3.2 Profilo LC-MS degli estratti metanolici provenienti da diverse fonti di <i>Salvia somalensis</i> : biomassa <i>in vivo</i> , biomassa di piante micropropagate, colture di callo e colture di callo trattate con elicitore.....	pag. 32

3.3 Analisi fitochimica dell'estratto della pianta micropropagata.....	pag. 45
3.4 Determinazione del contenuto di acido carnosico.....	pag. 46
3.5 Screening antifungino.....	pag. 46
Capitolo 4 Discussione.....	pag. 54
Capitolo 5 Conclusioni.....	pag. 61
Bibliografia.....	pag. 63

Lista delle abbreviazioni

Abbreviazione	Forma completa
LC	cromatografia liquida
MS	spettrometria di massa
TLC	cromatografia su strato sottile
MPLC	cromatografia liquida a media pressione
HPLC	cromatografia liquida ad alte prestazioni
NMR	risonanza magnetica nucleare
PDA rivelatore	rivelatore a serie di fotodiodi
CAD	rivelatore a aerosol carico
ESI	ionizzazione elettrospray
DMSO	dimetilsofossido

RINGRAZIAMENTI

Un immenso grazie alla Professoressa Angela Bisio che ha reso concreto quello che ho appreso nel corso del quinquennio appena trascorso, dandomi l'opportunità di mettere in pratica le nozioni acquisite e offrendomi possibilità di studio e ricerca che mai avrei immaginato.

Prima fra tutte l'esperienza al CeRSAA sotto la supervisione della Dottoressa Anna Lanteri che ringrazio insieme a tutti i suoi collaboratori con i quali ho trascorso un periodo davvero intenso e fattivo dal punto di vista della ricerca fitopatologica.

Un sincero ringraziamento alla Dottoressa Poonam Devi con la quale ho mosso i primi passi in laboratorio, che mi ha aiutato con i suoi consigli, la sua esperienza e nella revisione della tesi.

Un grazie di cuore a tutti i miei amici dell'università per i bei momenti passati insieme, tra risate e preoccupazioni, lezioni infinite ed esami complicati, che mi hanno sempre ascoltato e sostenuto. In particolare, a Giulia per la sua gentilezza e pazienza, le sue informazioni sempre puntuali, anche se solo un grazie non basterebbe per farmi perdonare tutte le volte che mi ha aspettato in stazione, a Linda per la sua tenerezza e fiducia nelle mie capacità, con cui ho condiviso due viaggi stupendi insieme a Matteo, che ringrazio per la sua leggerezza e simpatia, con cui mi sento libero di poter parlare di tutto, a Ranjana per la sua schiettezza e sincerità, a Shi per la sua solarità e capacità di ascolto.

Un grazie alla mia famiglia che mi ha supportato e sopportato in questo lungo quinquennio e mi ha sempre spronato a dare il massimo, a mia sorella Beatrice che ringrazio per l'aiuto prestatomi per migliorare la veste grafica dei miei elaborati.

SINTESI

Salvia somalensis Vatke è una fonte di metaboliti specializzati con potenziali applicazioni biologiche e agrochimiche. Studi precedenti sull'estratto diclorometanico della superficie della pianta hanno dimostrato una forte attività antifungina associata a diterpenoidi di tipo abietano. Sulla base di questi risultati, il presente studio ha avuto l'obiettivo di caratterizzare l'estratto metanolico di *S. somalensis* e di valutarne il potenziale antifungino nei confronti di importanti funghi fitopatogeni, con il più ampio scopo di esplorare l'estratto come fonte sostenibile di metaboliti antifungini per la protezione delle colture. L'analisi LC-MS dell'estratto metanolico ha evidenziato un profilo fitochimico diversificato, comprendente acidi fenolici, tra cui acido caffeico, acido ferulico e acido rosmarinico, nonché diterpenoidi di tipo abietano, quali carnosolo, rosmanolo e acido carnosico. L'analisi quantitativa ha mostrato che l'acido carnosico era presente soltanto a basse concentrazioni, pari allo 0,09% *p/p* della biomassa fresca.

L'estratto ha manifestato attività antifungina nei confronti di *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A una concentrazione di 1000 µg/mL è stata osservata un'inibizione superiore all'80% della crescita miceliale di *B. cinerea* e *C. coccodes*. Inoltre, poiché la coltivazione *in vitro* di questa specie non era stata precedentemente studiata, sono state ottenute piante micropropagate ed è stata avviata una coltura di callo. Il profilo fitochimico ha evidenziato composizioni chimiche distintive nella biomassa ottenuta *in vitro*. Gli estratti ottenuti dalle piante micropropagate hanno inibito la crescita miceliale dei fitopatogeni testati del 60–70% alla concentrazione di 1000 µg/mL, ad eccezione di *F. oxysporum*, che alla stessa concentrazione ha mostrato un'inibizione pari al 35,29%. Nel complesso, questi risultati evidenziano *S. somalensis* come fonte di metaboliti bioattivi dotati di potenziale attività antifungina.

ABSTRACT

Salvia somalensis Vatke is a source of specialized metabolites with potential biological and agrochemical applications. Previous studies on the dichloromethane plant surface extract demonstrated strong antifungal activity associated with abietane diterpenoids. Building on these findings, the present study aimed to characterize the methanolic extract of *S. somalensis* and evaluate its antifungal potential against major phytopathogenic fungi, with the broader goal of exploring the extract as a sustainable source of antifungal metabolites for crop protection. LC-MS analysis of the methanolic extract revealed a diverse phytochemical profile comprising phenolic acids, including caffeic acid, ferulic acid, and rosmarinic acid, as well as abietane-type diterpenoids such as carnosol, rosmanol, and carnosic acid. Quantitative analysis showed that carnosic acid was present only at low levels (0.09% w/w of fresh biomass). The extract exhibited antifungal activity against *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotinia sclerotiorum*. More than 80% inhibition of mycelial growth was observed against *B. cinerea* and *C. coccodes* at 1000 µg/mL. In addition, as *in vitro* cultivation of this species has not previously been explored, micropropagated plants and callus culture were established. Phytochemical profiling revealed distinct chemical compositions in the *in vitro* biomass. Extracts obtained from micropropagated plants inhibited mycelial growth of the tested phytopathogens by 60–70% at 1000 µg/mL, except for *F. oxysporum*, which showed 35.29% inhibition at the same concentration. Collectively, these findings highlight *S. somalensis* as a source of bioactive metabolites with antifungal potential.

INTRODUZIONE

Il genere *Salvia* (Lamiaceae) comprende specie perenni erbacee e legnose, note per le loro proprietà aromatiche e per l'ampia gamma di metaboliti secondari con potenziale farmaceutico [1, 2]. Tradizionalmente, diverse specie di *Salvia* sono state utilizzate per i loro effetti antibatterici, antiossidanti, antifungini, antitumorali ed antidiabetici, inoltre, rappresentano una fonte ricca di diterpeni bioattivi con potenziale attività biopesticida per il controllo delle malattie delle piante [3, 4].

In particolare, *Salvia somalensis*, originaria della Somalia, è stata introdotta recentemente come specie ornamentale in Liguria (Italia) per la facilità di crescita nel clima ligure, la fragranza e il colore dei fiori. La specie prospera in terreni caldi e ben drenati e può essere propagata per talea o divisione dei cespi [5]: si tratta di metodi che permettono una propagazione vegetativa della pianta, ossia senza semi, e permettono di conservare intatte le caratteristiche della pianta originale (colore dei fiori, vigore, ecc.). La *talea* si ottiene tagliando una parte della pianta, di solito un ramo, una foglia o anche una radice, capace a sua volta di emettere nuove radici e portare alla formazione di una nuova pianta identica alla progenitrice. Solitamente questa parte viene inserita in acqua o in terra finché non radica ottenendo un "clone". Invece, nella *divisione per cespi*, la pianta ben sviluppata viene separata in più parti ognuna con il suo apparato radicale. Ciascuna porzione viene ripiantata e darà origine a più piante uguali alla pianta madre. In genere, la specie viene coltivata in pieno campo anche se risulta meglio adattata alla coltivazione in vaso con diametro superiore a 16 cm.

Precedenti analisi fitochimiche dell'estratto superficiale in diclorometano di *S. somalensis* ligure hanno rivelato nuovi diterpeni, tra cui il 4 α ,9 α -epossi-2H-dibenzo[a,d]ciclopten-7(5H)-one e alti livelli di acido carnosico (113,90 μ g/mg di estratto secco), un diterpenoide abietanico sempre più riconosciuto per le sue proprietà antibatteriche e antifungine, ed è descritto come uno dei principali costituenti noti nelle specie di *Salvia* [4].

Il presente studio si è concentrato sulla caratterizzazione dell'estratto metanolico delle parti aeree di *S. somalensis* e sulla sua attività antifungina contro funghi fitopatogeni.

Il controllo delle malattie delle piante rappresenta una sfida enorme nelle pratiche agricole, considerando le perdite annuali di colture a livello mondiale. I fitopatogeni rappresentano un importante ostacolo alla produttività agricola, riducendo in modo significativo la resa e la qualità delle colture e causando ingenti perdite economiche [6].

Tra questi, i funghi causano danni economici maggiori rispetto a qualsiasi altro gruppo di microrganismi. Tra questi fitopatogeni figurano *Colletotrichum coccodes*, una specie coinvolta nelle malattie da antracnosi delle Solanacee, *Fusarium oxysporum*, responsabile dell'appassimento vascolare in diversi scenari colturali, *Sclerotinia sclerotiorum*, che causa marciumi basali e del fusto o muffa bianca in un'ampia gamma di ospiti, *Rhizoctonia solani*, un patogeno tellurico che porta al damping-off e al marciume basale in molte colture, e *Botrytis cinerea*, l'agente causale della muffa grigia e uno dei patogeni vegetali più importanti di interesse mondiale.

I danni causati da questi funghi si estendono a cereali, leguminose, ortaggi, colture da frutto e da bacca, piante ornamentali e altre colture, con un impatto massiccio sull'agricoltura globale [4].

Sebbene le strategie di controllo dell'agricoltura convenzionale basate su prodotti sintetici siano ancora ampiamente utilizzate per gestire le malattie delle piante, il loro impiego estensivo solleva significative preoccupazioni ambientali, con conseguente contaminazione degli ecosistemi terrestri e acquatici, e pone rischi per la salute umana legati all'accumulo di residui nei prodotti alimentari e agli effetti negativi sugli organismi non bersaglio [7].

Di conseguenza, si è posta crescente attenzione a strumenti e strategie agronomiche, a prodotti di origine vegetale come alternativa più sicura e sostenibile per la gestione delle malattie fungine e batteriche delle colture [8].

Tra questi, i diterpenoidi della specie *Salvia* hanno mostrato un promettente potenziale antifungino [9]. In particolare, è stato riportato che l'acido carnosico inibisce alcuni funghi patogeni responsabili di significative perdite post-raccolta, tra cui *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus tubingensis* e *Penicillium digitatum*. È interessante notare che, dopo trattamento con acido carnosico a 500 µg/mL, è stata osservata un'inibizione completa della crescita miceliale di *C. coccodes*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* [4].

In questo studio è stato impiegato l'estratto totale delle parti aeree di *S. somalensis*. L'uso dell'estratto totale può offrire un approccio più pratico e accessibile rispetto all'isolamento di composti puri come l'acido carnosico, che richiede ulteriori fasi di estrazione, purificazione, tempo e costi. Inoltre, la miscela complessa di metaboliti specializzati presente nell'estratto metanolico può agire in modo sinergico, contribuendo all'attività biologica osservata e sostenendone il potenziale impiego come alternativa sostenibile nella gestione delle malattie delle piante [10].

Per esplorare ulteriormente le differenze nella composizione chimica e nella produzione di metaboliti specializzati, sono state inoltre stabilite piante micropropagate e colture di callo di *S. somalensis*, ossia metodi di coltura *in vitro*. Queste tecniche forniscono un ambiente controllato per la produzione stabile e continua di biomassa vegetale e metaboliti bioattivi durante tutto l'anno, minimizzando così gli effetti delle variazioni stagionali e ambientali [11]. Inoltre, questi approcci possono essere utili per produrre metaboliti di valore in situazioni in cui l'agricoltura convenzionale può essere limitata da stress ambientali quali salinità, siccità, cambiamenti climatici e scarsità d'acqua [12].

Gli elicitori vengono impiegati per stimolare la biosintesi dei metaboliti secondari attraverso l'attivazione delle risposte difensive della pianta contro malattie, parassiti e altri stress, migliorando in modo significativo la proliferazione dei germogli e la resa di metaboliti negli espianti di *Salvia* [13]. Un elicitore può essere un agente biotico (per

esempio prodotto da funghi, batteri, insetti) o abiotico (sostanza chimica o molecola naturale come chitosano, acido salicilico, estratti vegetali) che agisce come segnale di pericolo: si lega a specifici recettori sulle cellule vegetali e attiva la trascrizione di geni di difesa, portando alla produzione di fitoalessine e altre molecole protettive.

Diverse specie di *Salvia* sono state coltivate con successo *in vitro* per produrre metaboliti di valore per i settori farmaceutico, cosmetico, alimentare e della protezione delle colture [14, 15]. Tuttavia, non sono stati documentati studi sull'istituzione di colture *in vitro* o sui profili di produzione di metaboliti secondari della biomassa *in vitro* di *S. somalensis*.

Questo studio si propone di:

- (i) caratterizzare i profili chimici degli estratti metanolici di *S. somalensis* e degli estratti *in vitro*;
- (ii) stabilire plantule micropropagate e colture di callo di *S. somalensis* con e senza trattamenti con elicitori;
- (iii) quantificare la produzione di acido carnosico negli estratti;
- (iv) valutare il potenziale antifungino degli estratti *in vivo* e *in vitro* contro funghi fitopatogeni, contribuendo così allo sviluppo di approcci sostenibili ed ecocompatibili per la produzione di composti bioattivi antifungini.

CAPITOLO 1

Presentazione e caratterizzazione botanica

1.1 Genere *Salvia*

Regno	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Streptophyta</i>
Classe	<i>Equisetopsida</i>
Sottoclasse	<i>Magnoliidae</i>
Ordine	<i>Lamiales</i>
Genere	<i>Salvia</i>
Famiglia	<i>Lamiaceae</i>



1.1.1 *Salvia somalensis* Vatke Linnaea 43:93 (1881)

Distribuzione: Somalia

Clima e posizione: cresce in ambienti semi-aridi o a ridotta umidità, ai margini di foreste rade o boscaglie aperte, spesso su pendii ben drenati. Preferisce temperature miti e piogge scarse distribuite in modo irregolare durante l'anno. Tollera periodi di siccità e oscillazioni



di temperatura moderate, ma non sopporta gelate prolungate.

Suolo ed irrigazione: cresce spontaneamente in terreni ben drenati, di lieve o medio impasto, spesso sabbiosi o rocciosi, tipici delle aree semi-aride degli altopiani della Somalia.

In termini di pH preferisce suoli neutri o alcalini e non tollera ristagni idrici.

S. somalensis è adatta a climi caratterizzati da precipitazioni irregolari e a lunghi periodi di siccità. Se coltivata richiede irrigazione moderata e distanziata, sufficiente da assicurare l'attecchimento della pianta, evitando eccessi d'acqua.

Potatura: non richiede potature intensive. È sufficiente eliminare i rami secchi o danneggiati e accorciare leggermente i rami dopo la fioritura per stimolare la formazione di nuovi germogli e mantenere un portamento di crescita compatto.

Una potatura regolare e moderata promuove anche la produzione di giovani foglie che sono più ricche di composti aromatici e oli essenziali.

Fertilizzazione: essendo adatta a suoli aridi e poveri di nutrienti, richiede un apporto di nutrienti modesto. L'eccesso di concime, in particolare di azoto, può ridurre il contenuto di oli essenziali e compromettere l'aroma delle foglie.

Durante la coltivazione, è sufficiente una concimazione lieve e bilanciata all'inizio della stagione vegetativa, preferibilmente con ammendanti organici o compost, per migliorare la struttura del suolo senza alterarne le caratteristiche originali naturali.

Propagazione: si propaga principalmente per talea semi-legnosa, prelevata tra la fine della primavera e l'inizio dell'estate, utilizzando substrati leggeri e ben drenati.

Le radici, in genere, si formano entro poche settimane, in particolare in condizioni calde e umide.

È possibile anche la propagazione attraverso semi anche se meno comune perché la germinazione è lenta e irregolare.

Densità d'impianto: si consiglia una densità di 3-4 piante per metro quadro che corrisponde ad una distanza di circa 40-60 cm tra le piante e di 60-70 cm tra le file. Questa disposizione garantisce un'adeguata circolazione dell'aria, facilita le lavorazioni e riduce il rischio di contrarre malattie fungine.

In condizioni aride o su terreni poveri è preferibile aumentare leggermente la distanza per favorire lo sviluppo radicale e ridurre la competizione per le risorse.

Parassiti e malattie: in condizioni di eccessiva umidità o di ridotta ventilazione, può essere soggetta a marciumi radicali e attacchi fungini (ad esempio *Botrytis*, *Rhizoctonia*).

Raramente compaiono afidi o acari.

1.2 Obiettivi della ricerca

S. somalensis Vatke è una specie aromatica originaria delle regioni aride del nord della Somalia. Pur non essendo tra le salvie annoverate per scopi ornamentali e medicinali, negli ultimi anni ha riscosso



sempre più interesse nella ricerca fitochimica grazie alla ricchezza e unicità dei metaboliti secondari che produce.

Come molte altre specie del genere *Salvia*, *S. somalensis* è in grado di sintetizzare una miscela complessa di metaboliti terpenici, in particolare diterpeni con scheletro abietanico come l'acido carnosico, carnosolo, acido rosmarinico e derivati ossigenati. Questi composti, accumulati nelle ghiandole secretorie della pianta, sono riconosciuti per le loro proprietà antiossidanti, antifungine e antibatteriche. In particolare, l'acido carnosico è stato annoverato come un componente con potenziale potere antimicrobico di parecchie specie di *Salvia*.

L'obiettivo generale di questo progetto è di investigare in maniera più approfondita il ruolo dei metaboliti secondari di *S. somalensis* nella risposta della pianta a funghi fitopatogeni, ma anche andare a valutare come differenti metodi di estrazione e coltivazione possano influenzare la loro produzione e attività biologica.

Per perseguire l'obiettivo di questo progetto, il lavoro è stato diviso in due fasi distinte ma strettamente correlate.

Nella prima fase, l'analisi si è incentrata sullo studio dell'attività biologica dell'estratto superficiale fogliare di *S. somalensis*, già caratterizzato per il suo profilo chimico [4].

Test antifungini hanno delineato una chiara attività inibitoria, direzionando l'attenzione verso l'acido carnosico, precedentemente isolato e identificato come il principale candidato responsabile dell'attività osservata.

Sulla base dei risultati, la seconda parte di questo studio si è prefissata l'obiettivo di esplorare l'attività del materiale vegetale ottenuto tramite un sistema di coltura *in vitro*.

A causa di vincoli ambientali e di coltivazione, spesso risulta difficile ottenere la qualità e la quantità appropriata di metaboliti secondari nelle piante aromatiche e medicinali che vengono coltivate con metodi tradizionali. Dall'altro lato, i sistemi *in vitro* permettono la generazione non vincolata di materie prime per l'estrazione dei metaboliti secondari.

In questo contesto, diversi studi hanno riportato la propagazione *in vitro* di specie di *Salvia*. Tuttavia, precedentemente non sono stati condotti studi *in vitro* su *S. somalensis*.

Pertanto, il presente studio si prefigge lo scopo di trovare un metodo effettivo per la rigenerazione della pianta e di usare risorse alternative per la produzione di composti bioattivi. In questa fase, sono state usate colture di piante micropropagate e di callo, mantenute in presenza o assenza di elicitori.

Tutti gli estratti metanolici ottenuti sono stati caratterizzati attraverso LC-MS e analizzati in modalità non mirata per la valutazione dei profili metabolici, e in modalità mirata per eseguire una quantificazione accurata dell'acido carnosico.

Il confronto dei dati ottenuti nelle due fasi ha evidenziato differenze qualitative e quantitative nella produzione di acido carnosico e variazioni nella produzione di altri metaboliti e nell'attività antifungina associata ai diversi tipi di estratto.

Complessivamente, il lavoro propone un approccio integrato allo studio dei metaboliti secondari di *S. somalensis*, combinando analisi chimiche e biologiche in sistemi naturali e *in vitro*, per chiarire le relazioni tra biosintesi, accumulo e attività antifungina.

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

2.1 Materiale vegetale

Il Centro Regionale di Sperimentazione ed Assistenza Agricola (CeRSAA), situato ad Albenga (SV), Italia, ha fornito il materiale fresco delle parti aeree di piante di *S. somalensis*.

L'identificazione del materiale vegetale è stata effettuata da G.L.C. Bramley e un campione di riferimento è stato depositato presso l'Erbario di Kew (K) nell'ambito del progetto INTERREG III ALCOTRA, Progetto n° 074 "Sviluppo a Scopi Commerciali delle Potenzialità del Genere *Salvia* L."

L'estrazione è stata eseguita immergendo il materiale aereo fresco (149,8 g) in metanolo per 24 ore, seguita poi da filtrazione (l'estrazione è stata ripetuta tre volte).

Il filtrato è stato quindi evaporato fino a secchezza sotto pressione ridotta, per garantire la completa rimozione del solvente, ottenendo 7,6 g di estratto.

2.2 Reagenti

I solventi per l'estrazione e la purificazione sono stati acquistati da VWR International S.r.l. (Milano, Italia).

Acetonitrile, acqua, metanolo e acido formico ultra-puri per le analisi LC-MS sono stati acquistati da Romil Ltd., Pure Chemistry (Cambridge, Regno Unito).

Ossido di deuterio (D_2O , 99,90% D), CD_3OD (99,95% D) e il sale sodico dell'acido 3-(trimetilsilil)propionico-2,2,3,3- d_4 (TSP) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich Chemical Company (Milano, Italia).

L'acido carnosico (Product n° 89171, CAS n° 3650-09-7) è stato acquistato da PhytoLab GmbH & Co. (KG, Vestenbergsgreuth, Germania).

I fungicidi commerciali Ortiva® (azoxystrobin 23%) e Switch® (cyprodinil 37% + fludioxonil 25%) sono stati acquistati da Syngenta (Milano, Italia).

2.3 Procedure sperimentali generali

La cromatografia su strato sottile (TLC), la cromatografia liquida a media pressione (MPLC) e la HPLC semipreparativa sono state così eseguite [16].

Per la TLC sono state utilizzate piastre pre-rivestite con gel di silice 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germania).

Come fase mobile è stata impiegata la miscela CHCl_3 – CH_3OH – HCOOH (10:0,5:0,1) e le macchie sono state rivelate spruzzando H_2SO_4 al 50%, seguito da riscaldamento.

La cromatografia MPLC è stata condotta su un sistema Spot Liquid Chromatography (Armen Instrument, Saint Ave, Francia) con cartucce Normal Phase Si60 Supervarioflash e LiChroprep RP-18 (40–63 μm) (Merck, Darmstadt, Germania).

Le cartucce Normal Phase Si60 Supervarioflash (Merck, Darmstadt, Germania) sono state utilizzate per la MPLC con un gradiente lineare, usando n-esano/ CHCl_3 / CH_3OH in proporzioni variabili da 100:0:0 a 0:0:100 come miscela eluente.

La HPLC semipreparativa è stata eseguita con una pompa Waters W600 dotata di iniettore Rheodyne Delta 600, rivelatore a indice di rifrazione 2414 e rivelatore a matrice di diodi 2998 (tutti Waters Corporation, Milford, MA, USA). Per la HPLC semipreparativa è stata utilizzata una colonna C18 SymmetryPrep, 7,8 $\times$ 300 mm ID, particelle da 7 μm (Waters), a temperatura ambiente, con una portata di 1,03 mL/min e un volume di iniezione di 100 μL .

I dati di risonanza magnetica nucleare (NMR) sono stati registrati su uno spettrometro Bruker Avance III che opera a 500,13 MHz per i nuclei di ^1H e a 125,77 MHz per quelli di ^{13}C .

Gli spettri ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e NOESY sono stati registrati in CD_3OD (ARMAR isotopes, 99,8 atom% D) o DMSO-d_6 (ARMAR isotopes, 99,9 atom% D) a 23 °C, usando una sonda BBO da 5 mm con gradiente lungo l'asse Z.

2.4 Analisi LC-MS

Le analisi HPLC-PDA-CAD-ESIMS o APCIMS sono state condotte su un sistema cromatografico LC-MS 8030 (Shimadzu, Kyoto, Giappone) composto da degasatore, auto-sampler, pompa quaternaria (LC-20AD), forno colonna (CTO-20AC), rivelatore PDA (SPD-M20A), spettrometro di massa a triplo quadrupolo e rivelatore CAD Dionex Corona Veo RS (Thermo-Fisher Scientific, Germering, Germania).

È stato, inoltre, utilizzato un sistema Ultimate300 UHPLC (Thermo-Fisher Scientific, Milano, Italia) interfacciato tramite sorgente ESI ad un analizzatore di massa ad alta risoluzione [Orbitrap Q-Exactive Classic Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Milano, Italia)], operante in entrambe le polarità, in modalità ione negativo e positivo. I dati di spettrometria di massa sono stati acquisiti in modalità full-mass e data-dependent scan; sono stati eseguiti esperimenti di spettrometria di massa tandem per identificare i metaboliti specializzati. È stata utilizzata una colonna C18 (Luna C18, Phenomenex, 150 × 2,0 mm, 3 μm) e una fase mobile binaria composta da eluente A (H₂O ultra-pura – HCOOH 0,1% v/v) ed eluente B (CH₃CN ultra-puro – HCOOH 0,1% v/v). Le condizioni di separazione prevedevano inizialmente un'eluizione isocratica al 5% di B per 2 minuti, seguita da un gradiente fino al 50% in 8 minuti e infine fino al 100% in 30 minuti. La portata era di 0,20 mL/min e il volume di iniezione di 10,0 μL.

2.5 Colture di callo e micropropagazione

In genere, quando si parla di callo, si fa riferimento ad una massa di cellule vegetali indifferenziate o poco differenziate che cresce in modo disorganizzato, si forma spesso in risposta ad una ferita della pianta oppure può essere prodotto in laboratorio.

Quindi, si può ottenere in due modi, o in maniera *naturale* come tessuto di cicatrizzazione, dove le cellule vicine alla lesione proliferano per chiudere e proteggere la zona danneggiata, o *artificiale*, dove si parte dall'espianto (fusto, foglia, radice) che

viene coltivato su apposito terreno con ormoni vegetali, auxine e citochine, che spingono la cellula a perdere la sua specializzazione e a moltiplicarsi formando il callo.

Il callo di *S. somalensis* è stato ottenuto utilizzando giovani foglie prelevate dal terzo e quarto nodo sotto la gemma apicale di piante coltivate in vaso nell'orto botanico dell'Università di Urbino Carlo Bo, Urbino (PU), Italia.

Le foglie sono state lavate accuratamente sotto acqua corrente, quindi asciugate su carta assorbente. Per la sterilizzazione superficiale sono state trattate con etanolo al 50% per 1 minuto, seguito da una soluzione di cloruro di mercurio (HgCl_2) allo 0,1% per 10 minuti [17].

Dopo cinque risciacqui con acqua distillata sterile e asciugatura con carta da filtro sterile, le foglie sono state sezionate trasversalmente in condizioni asettiche utilizzando un bisturi sterile.

Per indurre la formazione del callo, è stato usato il terreno di coltura Murashige e Skoog (MS) composto da macroelementi (come nitrato di ammonio, nitrato di potassio, fosfato di potassio, solfato di magnesio, cloruro di calcio), microelementi (ad esempio boro, manganese, zinco, rame, cobalto, molibdato, ioduro), ferro chelato (di solito come solfato ferroso complessato con Na_2EDTA), vitamine (tiamina, niacina, piridossina, mio-inositolo), amminoacidi (glicina), saccarosio (circa 20 g/L) come fonte di carbonio e agar come agente gelificante [18].

Questo terreno è stato integrato con 1,13 μM di acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e 30 g/L di saccarosio.

Il pH del terreno è stato regolato a 5,8 prima dell'aggiunta di agar (0,8%), quindi il terreno è stato autoclavato a 120 °C e 104 kPa per 20 minuti e distribuito in piastre di Petri da 90 mm (30 mL per piastra).

Sette espianti fogliari sterili sono stati posizionati in ciascuna piastra e le colture sono state mantenute in una cella climatica a 25 °C con fotoperiodo di 16 ore, ottenuto con lampade fluorescenti a intensità luminosa di $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dopo trenta giorni, le piccole porzioni di callo sviluppatesi sulla superficie di taglio degli espianti sono state asportate e trasferite su nuovo terreno di coltura.

Le subcolture sono state eseguite usando terreno MS preparato in modo analogo a quanto descritto sopra.

Le successive subcolture sono state effettuate ad intervalli di 30 giorni per promuovere la proliferazione del callo. È stato ottenuto con successo un callo friabile bianco e verde.

Dopo la terza subcoltura, la biomassa di callo (277,5 g) è stata conservata a -20 °C e sottoposta a liofilizzazione (9,25 g). Il materiale liofilizzato è stato quindi estratto con metanolo (1,14 g).

Oltre alla coltura standard di callo, i calli di *S. somalensis* sono stati anche sottoposti a elicizione con acido salicilico.

Per l'elicizione, l'induzione del callo è stata effettuata su terreno MS integrato con 50,0 μM di acido salicilico. Il callo elicitato (254,9 g) è stato poi liofilizzato (8,53 g) e sottoposto a estrazione metanolica (1,0 g).

La micropropagazione è una tecnica di coltura *in vitro* di tessuti vegetali in condizioni sterili (su terreno artificiale, in provetta o in barattolo) per ottenere molti cloni identici alla pianta madre partendo da un piccolo frammento di tessuto vegetale, l'espianto. Questo viene applicato sul terreno di coltura con zuccheri e ormoni vegetali, e da lì si ottengono prima germogli, poi radici e infine piccole piantine complete.

Per la micropropagazione *in vitro* di *S. somalensis*, segmenti nodali di circa 5 mm di lunghezza sono stati prelevati dal terzo e quarto nodo delle piante.

La sterilizzazione superficiale è stata eseguita come descritto sopra per il callo.

Gli espianti sterilizzati sono stati quindi coltivati su terreno MS privo di regolatori di crescita e su terreno contenente due regolatori di crescita, 0,5 mg/L di 6-benzilaminopurina (BA) e 0,1 mg/L di acido α -naftalenacetico (NAA) [19].

Entrambi i terreni contenevano il 3% di saccarosio e lo 0,8% di agar.

Quindici espianti nodali sono stati posti in barattoli di vetro contenenti terreno MS (diametro 10 cm $\times$ altezza 11 cm). I contenitori sono stati collocati in una cella climatica a 22 ± 2 °C, fotoperiodo 16/8, intensità luminosa di $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dopo 5 settimane, i germogli ottenuti da alcuni espianti sono stati asportati e subcoltivati in nuovo terreno con le stesse condizioni per mantenere la micropropagazione. Dopo un periodo di crescita di dieci settimane, la biomassa micropropagata (410,0 g) è stata raccolta dai contenitori di coltura, congelata e liofilizzata prima dell'estrazione.

2.6 Indagine fitochimica dell'estratto di piante micropropagate

La biomassa micropropagata liofilizzata (23,4 g) è stata estratta in modo esaustivo con metanolo, seguendo il metodo precedentemente riportato [20].

Dopo la filtrazione, il solvente di estrazione è stato rimosso sotto pressione ridotta.

L'estratto (8,5 g pari al 2,07% *p/p* della pianta fresca) è stato separato tramite cromatografia in aliquote da 1,0 g mediante MPLC su gel di silice, eluendo con n-esano/ CHCl_3 / CH_3OH in proporzioni variabili da 100:0:0 a 0:0:100.

Le frazioni eluite (20 mL ciascuna) sono state raggruppate in base ai loro profili TLC, ottenendo 28 frazioni (I1–I28) (gruppo I).

La purificazione HPLC eseguita con un gradiente lineare da 60% CH_3CN in H_2O a 100% CH_3CN in 30 minuti, seguito da eluizione con 100% CH_3CN fino a 50 minuti della frazione I9 (26,0 mg) ha fornito i composti 1 (2,4 mg), 2 (1,5 mg) e 3 (2 mg).

La frazione I17 (59,8 mg) ha fornito i composti 1 (2 mg) e 2 (2,7 mg).

La frazione I21 (54,2 mg) ha fornito il composto 3 (3,4 mg).

Il frazionamento della frazione I25 (495,1 mg) ha fornito 10 frazioni (II1–II10) (gruppo II).

La frazione II4 (150,0 mg) è stata purificata mediante HPLC semipreparativa con gradiente lineare da 60% CH₃OH in H₂O a 100% CH₃OH in 61 minuti, seguito da eluizione con 100% CH₃OH fino a 90 minuti.

La purificazione HPLC della frazione II4 ha fornito i composti 1 (4 mg), 2 (5,2 mg), 3 (1 mg), 4 (1,4 mg), 5 (3,4 mg), 6 (7,6 mg).

La separazione della frazione I26 (502,2 mg) ha fornito 10 frazioni (III1–III10) (gruppo III).

La purificazione HPLC, eseguita con gradiente lineare da 60% CH₃CN in H₂O a 100% CH₃CN in 30 minuti, seguito da eluizione con 100% CH₃CN fino a 50 minuti della frazione III5 (173,4 mg), ha fornito i composti 1 (18,5 mg) e 2 (13,8 mg).

Il frazionamento della frazione I27 (900,1 mg) ha fornito 13 frazioni (IV1–IV13) (gruppo IV).

La frazione IV5 (220,0 mg), purificata mediante HPLC semipreparativa con gradiente lineare da 60% CH₃OH in H₂O a 100% CH₃OH in 61 minuti, seguito da eluizione con 100% CH₃OH fino a 90 minuti, ha fornito i composti 1 (0,8 mg), 2 (1 mg), 3 (1 mg), 4 (0,9 mg), 5 (1,1 mg), 6 (2,2 mg) e 7 (1,0 mg).

2.7 Analisi quantitativa HPLC

La quantificazione dell'acido carnosico (1) è stata eseguita tramite HPLC analitica (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) equipaggiata con colonna Symmetry C18 (1 mm × 150 mm, particelle da 3,5 µm, Waters S.p.A., Sesto San Giovanni, Italia), a temperatura ambiente, seguendo il metodo precedentemente validato descritto da Paloukopoulos et al. [21], applicato senza modifiche.

La cromatografia in gradiente è stata condotta usando un sistema di solventi binari con eluente A (H₂O) ed eluente B (CH₃CN).

Il gradiente iniziava con una fase isocratica al 50% di B da 0 a 10 minuti, seguita da un incremento lineare al 58% di B (10–20 minuti). Questa miscela è stata mantenuta per ulteriori 10 minuti (20–30 minuti).

Successivamente, il gradiente è stato aumentato fino al 100% di B nei 10 minuti successivi (30–40 minuti), e questa composizione finale è stata mantenuta per altri 20 minuti, seguita dalla riequilibrio della colonna al 50% di B.

La portata era di 0,400 mL/min e il volume di iniezione di 20 µL.

La rivelazione UV è stata monitorata a 280 nm.

La curva di calibrazione per l'acido carnosico è stata ottenuta nell'intervallo di concentrazioni da 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL.

La linearità della risposta strumentale nell'intervallo di concentrazione analizzato è stata confermata dai seguenti parametri della curva di adattamento: $y = 111,27 x + 7,2932$; $R^2 = 0,9956$.

Il limite di rivelazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono stati determinati tramite diluizioni seriali dell'acido carnosico fino a raggiungere un rapporto segnale/rumore (S/N) pari a 3 per il LOD e 10 per il LOQ.

I valori ottenuti di LOD e LOQ sono stati rispettivamente 0,27 mg/mL e 0,08 mg/mL.

2.8 Attività antifungina

Ceppi fitopatogeni di *C. coccodes*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *B. cinerea* sono stati isolati da piante sintomatiche di *Solanum lycopersicum*, *Cyclamen persicum*, *Lactuca sativa*, *Ocimum basilicum* e *Fragaria × ananassa*, rispettivamente, presso il CeRSAA (Albenga, Savona, Italia).

Per quanto riguarda l'isolamento, porzioni di materiale vegetale infetto sono state lavate con acqua e tagliate in piccoli pezzi per essere trasferite in piastre di Petri, contenenti circa 30 mL di Potato Dextrose Agar (VWR Life Science, Milano, Italia) integrato con 5 mg/L di solfato di streptomicina (VWR Life Science, Milano, Italia) per prevenire la contaminazione batterica.

Le piastre di Petri sono state incubate per 7 giorni a 27 ± 2 °C al buio; sono state esaminate giorno per giorno per osservare la crescita del micelio. Le colonie pure dei ceppi fungini sono state poi isolate e incubate per 7 giorni a 27 ± 2 °C, al buio.

I funghi sono stati, infine, identificati utilizzando analisi morfologiche e microscopiche e caratterizzati mediante sequenziamento molecolare della regione ITS, seguendo il metodo riportato da White et al. [22].

La patogenicità dei ceppi è stata confermata *in vivo* (conferma dei Postulati di Koch) [23, 24].

Le proprietà antifungine di *S. somalensis* sono state testate mediante il metodo del “food poisoning” [25, 26].

Sono stati preparati estratti metanolici, in particolare due concentrazioni, rispettivamente 500 e 1000 µg/mL da piante *in vivo*, piante micropropagate, colture di callo e colture di callo trattate con elicitori e tre concentrazioni, rispettivamente 100, 250 e 750 µg/mL da piante *in vivo* e micropropagate.

L'efficacia degli estratti è stata valutata contro la crescita miceliale dei funghi fitopatogeni selezionati.

L'agar destrosio di patata (PDA) è stato preparato autoclavando 39 g di terreno disciolti in 1 L di acqua distillata a 121 °C per 15 minuti. Una volta raffreddato a circa 50 °C, l'estratto disciolto in dimetilsolfossido (DMSO) allo 0,75% v/v è stato incorporato nel terreno a concentrazioni di 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

È stata aggiunto solfato di streptomicina (5 µg/mL) per controllare la proliferazione batterica, poi il terreno è stato versato in piastre di Petri da 90 mm divise in tre settori. Come trattamenti di riferimento sono stati inclusi fungicidi commerciali: Ortiva® (azoxystrobin 23%) a concentrazione di 250 µg/mL e Switch® (cyprodinil 37% + fludioxonil 25%) a concentrazione di 375 µg/mL e 250 µg/mL.

Un disco di agar (2×2 mm) inoculato con colture fungine in attiva crescita è stato posto al centro di ogni piastra e incubato al buio a 25 °C.

Tutti i trattamenti sono stati condotti in triplice copia in parallelo con controlli contenenti terreno con 0,75% v/v di DMSO e PDA non trattato.

La crescita fungina è stata misurata tramite il diametro delle colonie e l'inibizione è stata calcolata con la seguente formula: percentuale di inibizione (%) = $[(NT - T)/NT] \times 100$, dove NT è il diametro medio della colonia nei campioni non trattati e T è il diametro medio in quelli trattati.

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti indipendentemente tre volte e i risultati sono stati coerenti in tutti i test.

L'analisi dose–risposta è stata eseguita utilizzando cinque concentrazioni (100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL), ciascuna testata in triplice copia.

L'effetto inibitorio è stato espresso come percentuale di inibizione, calcolata usando la formula di Abbott.

Le curve dose–risposta sono state adattate mediante un modello di regressione logistica a quattro parametri (4PL) secondo l'equazione: $y = \min + (\max - \min) / [1 + (x/IC50)^{Hill\ slope}]$ per *C. coccodes*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e con un modello di saturazione esponenziale secondo l'equazione: $y = \min + (\max - \min) (1 - e^{-kx})$ per *B. cinerea*.

L'analisi dei dati e l'adattamento delle curve sono stati eseguiti con MATLAB R2026a (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, USA).

2.9 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software MINITAB® (Versione 19.2020.1, 64-bit; LLC, State College, PA, USA).

I dati ottenuti dal saggio “food poisoning” sono stati analizzati mediante ANOVA a una via per verificare la presenza di differenze significative fra i diversi gruppi di trattamento.

I risultati dell’ANOVA sono stati, quindi, sottoposti al test di Tukey post hoc HSD (Honest Significant Difference) a un livello di confidenza di $p \leq 0,05$.

Per ciascun gruppo di trattamento sono state utilizzate tre repliche indipendenti.

CAPITOLO 3

Risultati

3.1 Istituzione di colture di callo e micropropagazione

Un callo friabile bianco-verde (Figura 1) è stato ottenuto nel mezzo di coltura integrato con un'auxina sintetica, 2,4-D o acido 2,4-diclorofenossiacetico ($1,13 \mu\text{M}$), un regolatore della crescita utilizzato per l'induzione del callo [27, 28], sia in assenza sia in presenza dell'elicitore (acido salicilico $50,0 \mu\text{M}$).

In entrambe le condizioni, il callo non ha mostrato segni di differenziazione o organogenesi. Tuttavia, attraverso subcolture regolari, il callo è rimasto stabile nel tempo senza manifestare sintomi di invecchiamento quali imbrunimento o necrosi.

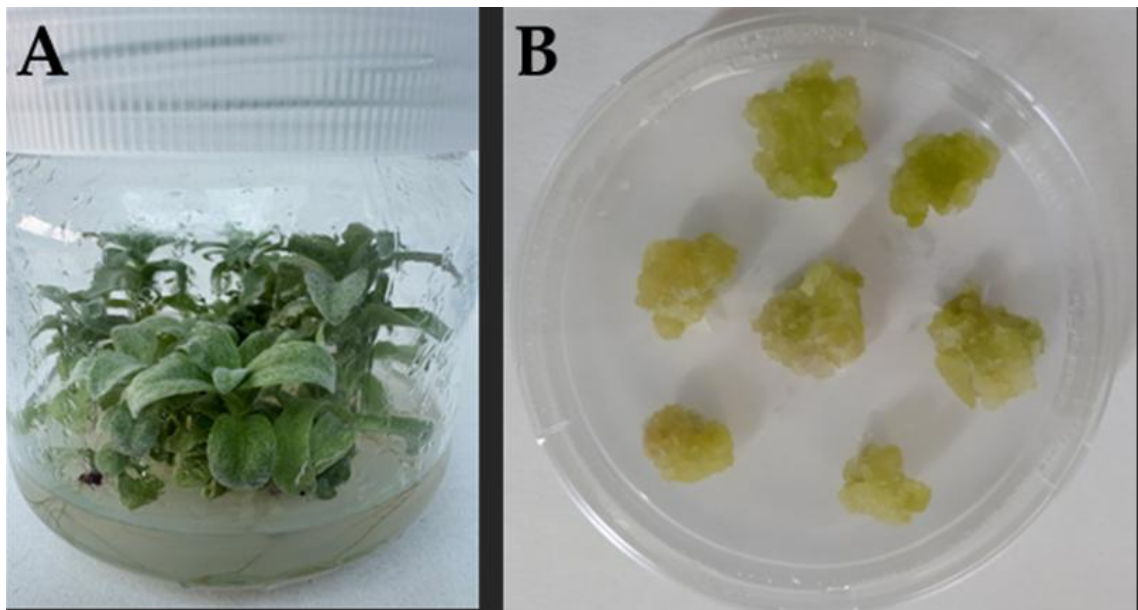


Figura 1. Biomassa *in vitro* di *S. somalensis*
A. Pianta micropropagata; B. Callo

Per la micropropagazione, quando gli espianti nodali di *S. somalensis* sono stati posti in un mezzo privo di regolatori di crescita, non hanno prodotto germogli e sono morti entro una settimana.

Al contrario, gli espianti coltivati su un mezzo integrato con $0,5 \text{ mg/L}$ di BA (6-benzilaminopurina) e $0,1 \text{ NAA}$ (acido α -naftalenacetico) hanno prodotto in media $7,43 \pm 0,84$ germogli per espianto.

Questo mezzo è stato preparato secondo il protocollo sviluppato da Petrova et al. [19] per la propagazione *in vitro* di *Salvia officinalis*.

La 6-benzilaminopurina è comunemente utilizzata insieme a basse concentrazioni di acido α -naftalenacetico per potenziare la morfogenesi, ossia il processo che determina la forma e l'organizzazione strutturale delle piante.

La combinazione di BA e NAA per il nostro studio è stata selezionata in base a protocolli precedentemente sviluppati per la micropropagazione di altre specie di *Salvia* [29-32].

Concentrazioni più elevate di BA possono provocare iperidria, ossia un'alterazione morfologica della pianta caratterizzata dalla formazione di tessuti vegetali anormalmente ricchi di acqua, mentre concentrazioni inferiori hanno mostrato un incremento della proliferazione dei germogli da espianti nodali senza compromettere la qualità delle piante [33-35].

Nel nostro studio, la 6-benzilaminopurina alla concentrazione di 0,5 mg/L ha efficacemente aumentato lo sviluppo dei germogli senza segni visibili di iperidria (Figura 1).

3.2 Profilo LC-MS degli estratti metanolici provenienti da diverse fonti di *S. somalensis*: biomassa *in vivo*, biomassa di piante micropropagate, colture di callo e colture di callo trattate con elicitore

Per caratterizzare in modo esaustivo il profilo chimico di *S. somalensis*, è stata effettuata un'analisi LC-MS su estratti metanolici del materiale vegetale *in vivo*, della pianta micropropagata e delle colture di callo (con e senza elicitore), sia in modalità di ionizzazione positiva sia negativa (Figura 2).

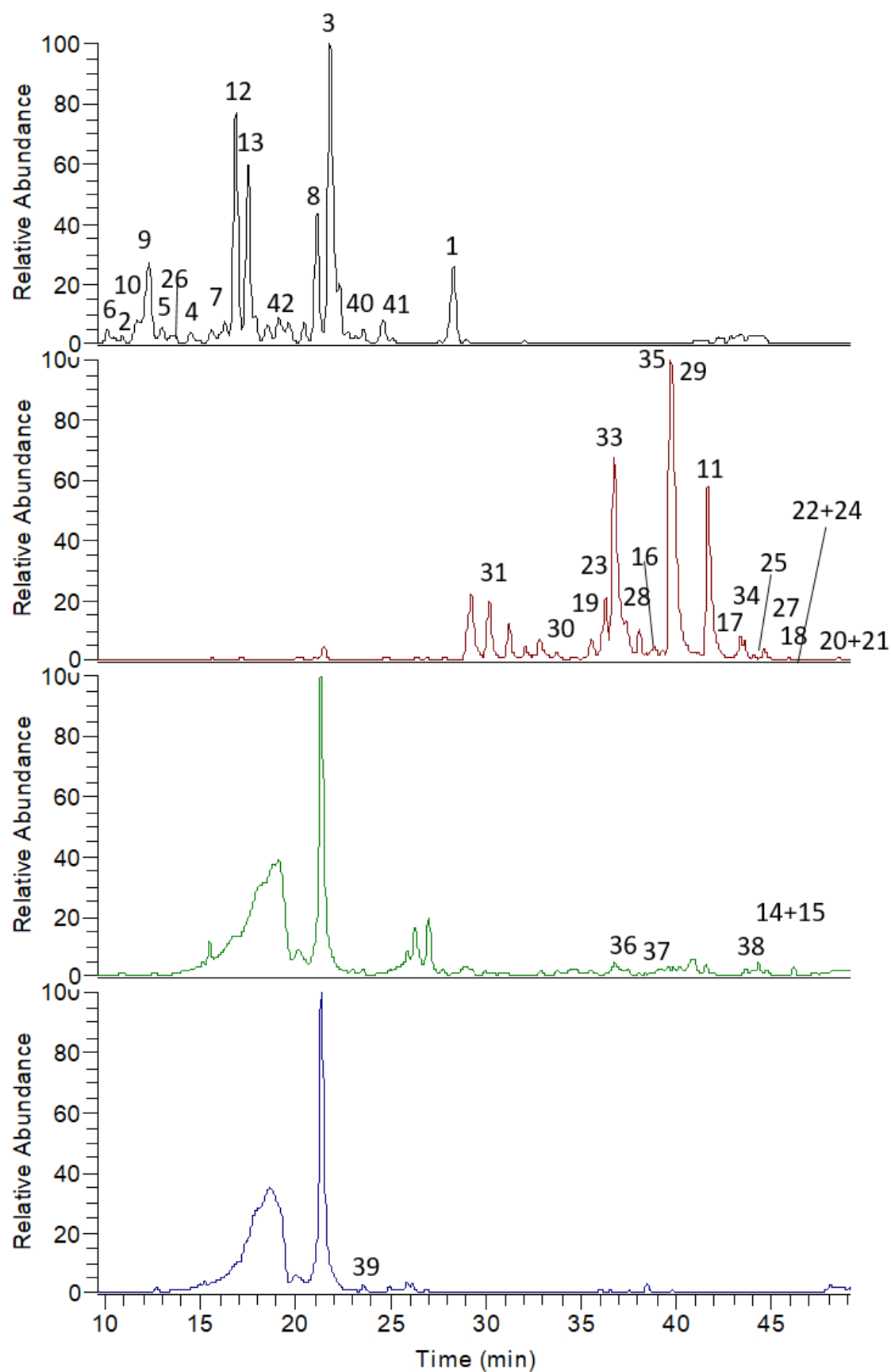


Figura 2. Analisi LC-MS dell'estratto di *S. somalensis*

nero: estratto della pianta *in vivo*; **rosso:** estratto della pianta micropropagata; **verde:** estratto del callo; **blu:** estratto del callo con elicitore.

L'analisi LC-MS ha rivelato che l'estratto metanolico era dominato da terpenoidi e flavonoidi.

I metaboliti sono stati identificati utilizzando standard quando disponibili.

I risultati hanno confermato la presenza di diversi composti precedentemente riportati dall'essudato della superficie fogliare di *S. somalensis* (Tabella 1) [4], insieme a metaboliti aggiuntivi distintivi delle colture *in vitro*.

L'estratto della pianta *in vivo* è stato caratterizzato da una ricca composizione di acidi fenolici e diterpenoidi di tipo abietanico.

Sono stati rilevati ioni principali corrispondenti all'acido carnosico (1) (m/z 331 [M-H]⁻), carnosolo (2) (m/z 329 [M-H]⁻), rosmanolo (4) (m/z 345 [M-H]⁻) e acido rosmarinico (m/z 359 [M-H]⁻), insieme a acido caffeico, acido ferulico ed ermanina.

Negli estratti della pianta micropropagata e del callo, l'analisi LC-MS ha rivelato la presenza di un profilo abbondante di diterpenoidi e triterpenoidi.

Ioni sesquiterpenoidi rilevati in modalità ione negativo a m/z 221,18 sono stati attribuiti a (-)-7-*epi*-isojunenolo, (+)-juneolo e (+)-*ent*-epicubenolo, mentre ioni a m/z 239 in modalità positiva corrispondevano a 1 β ,6 β -diidrossi-4(14)-eudesmene.

Sono stati, inoltre, identificati triterpenoidi quali betulina, uvaolo (m/z 443) e acido betulinico (m/z 457).

Il flavonoide 5-idrossi-7,4'-dimetossiflavone, precedentemente isolato dall'essudato fogliare di *S. somalensis* [4], è stato rilevato a m/z 299.

Composti diterpenoidici, inclusi 7,13-*E*-labdadien-15-olo, pisiferolo, rosmadiale, 12-*O*-metilacetilcarnosato, 14-idrossi-7-*O*-metilrosmanolo, 12-metilcarnosolo, galdosolo, 20-deossocarnosolo, ferruginolo, brussanolo e demetilsalvicanolo, sono stati identificati principalmente nelle piante micropropagate.

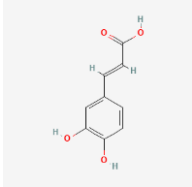
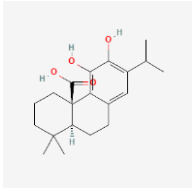
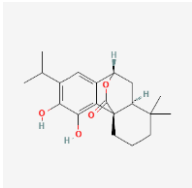
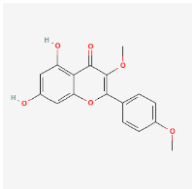
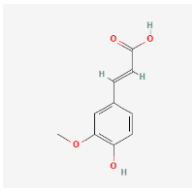
Inoltre, $4\alpha,9\alpha$ -epossi-2H-dibenzo[a,d]ciclopentene-7(5H)-one, precedentemente isolato per la prima volta nell'estratto diclorometanico della superficie delle piante di *S. somalensis* [4], è stato rilevato anche negli estratti di piante micropropagate e di callo.

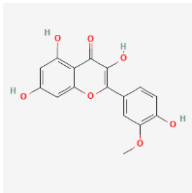
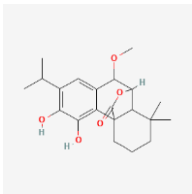
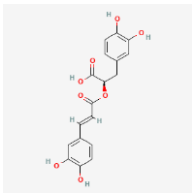
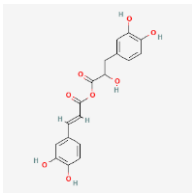
La coltura di callo senza elicitore ha mostrato ioni a m/z 317 corrispondenti a $4\beta,6\beta$ -diidrossi- $1\alpha,5\alpha$ (H)-guai-9-ene e teucladiolo, assenti nelle piante micropropagate.

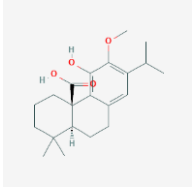
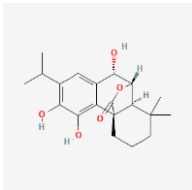
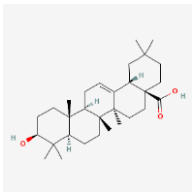
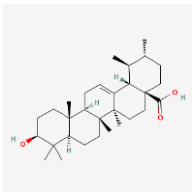
Dopo il trattamento con elicitore, sono comparsi metaboliti aggiuntivi, come 11-idrossi-12-metossiabieta-8,11,13-triene e β -chaenocfalolo, insieme alla presenza di teucladiolo, indicando un'attivazione indotta dall'elicitore della biosintesi dei diterpenoidi.

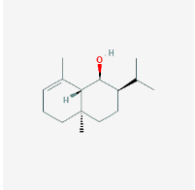
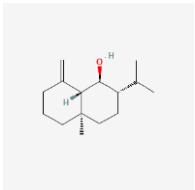
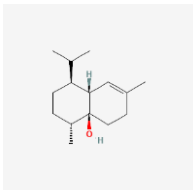
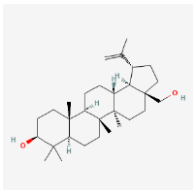
Complessivamente, i risultati LC-MS evidenziano un pattern metabolico distinto tra i sistemi *in vivo* e *in vitro*, con l'estratto *in vivo* arricchito in acidi fenolici e diterpenoidi tipo abietano, mentre l'estratto della pianta micropropagata e il callo elicitato hanno mostrato un profilo più ampio di diterpenoidi e triterpenoidi, suggerendo una diversificazione metabolica nelle condizioni *in vitro* e sotto elicizione.

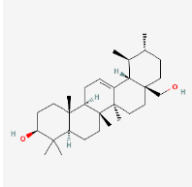
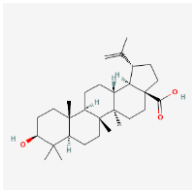
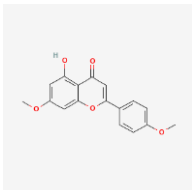
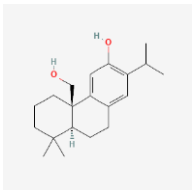
Tabella 1. Analisi LC-MS degli estratti metanolici di *S. somalensis* da pianta *in vivo*, pianta micropropagata, callo e callo elicitato.

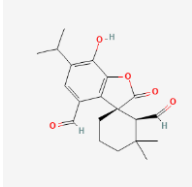
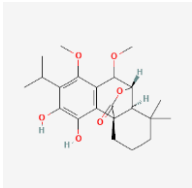
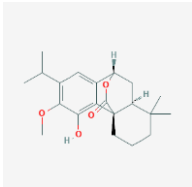
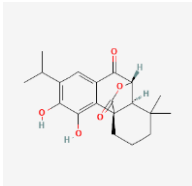
Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
1	acido caffeico	C ₉ H ₈ O ₄			179.0338	135	1	10.44	X	-	-	-
2	acido carnosico	C ₂₀ H ₂₈ O ₄		333.206	331.1903	289; 287	1	28.98	X	X	X	-
3	carnosolo	C ₂₀ H ₂₆ O ₄			329.1747	285	1	22.29	X	X	X	X
4	ermanina	C ₁₇ H ₁₄ O ₆			313.0706	269	1	14.47	X	-	-	-
5	acido ferulico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄			193.05	178;161;134	1	13.01	X	-	-	-

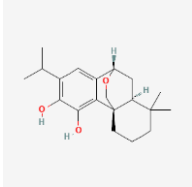
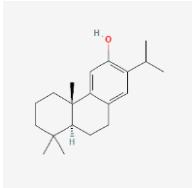
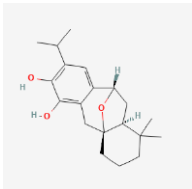
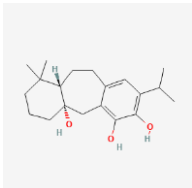
Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
6	idrossijasmonic-O-esoside	C ₁₈ H ₂₈ O ₉			387.167	225;207;163	1	10.13	X	-	-	-
7	isoramnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇			315.085	300	1	16.59	X	-	-	-
8	7-metilrosmanolo	C ₂₁ H ₂₈ O ₅			359.186	329; 301; 283; 257	1	21.11	X	-	-	-
9	acido rosmarinico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈			359.0775	197; 179; 161; 135	1	12.32	X	-	-	-
10	isomero acido rosmarinico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈			359.0775	197; 179; 161; 135	1	11.73	X	-	-	-

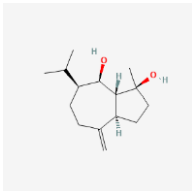
Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
11	acido 12-metilcarnosico	C ₂₁ H ₃₀ O ₄		347.222		301; 286	1	41.66	-	X	X	X
12	rosmanolo	C ₂₀ H ₂₆ O ₅		347.185	345.171	301; 283; 257	1	16.87	X	X	X	X
13	isomero rosmanolo	C ₂₀ H ₂₆ O ₅			345.171	301; 283; 257	1	17.51	X	-	-	-
14	acido oleanolico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃			455.352	437	1	45.48	-	X	X	X
15	acido ursolico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃		457.3676	455.3519	437	1	46.43	-	X	X	X

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
16	(-)-7- <i>epi</i> -isojunenolo	C ₁₅ H ₂₆ O			221.1899	203	1	38.94	-	X	-	X
17	(+)-junenolo	C ₁₅ H ₂₆ O			221.1899	203	1	43.01	-	X	-	X
18	(+)- <i>ent</i> -epicubenolo	C ₁₅ H ₂₆ O			221.1899	203	1	44.91	-	X	-	X
19	1β,6β-didrossi-4(14)-eudesmene	C ₁₅ H ₂₅ O ₂		239.2005		221; 203; 160	1	36.3	-	X	X	-
20	betulina	C ₃₀ H ₅₀ O ₂		443.3883		425	1	48.1	-	X	X	-

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
21	uvaolo	C ₃₀ H ₅₀ O ₂		443.3883		425	1	48.58	-	X	X	-
22	acido betulinico	C ₃₀ H ₅₀ O ₃			457.3676	439	1	47.38	-	X	-	-
23	5-idrossi-7,4'-dimetossiflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₅		299.0914		281; 266; 251	1	37.63	-	X	-	X
24	7,13- <i>E</i> -labdadien-15-olo	C ₂₀ H ₃₄ O		291.2682		273; 255	1	47.82	-	X	-	-
25	pisiferolo	C ₂₀ H ₃₀ O ₂		303.2318		285	1	44.03	-	X	X	X

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
26	rosmadiale	C ₂₀ H ₂₄ O ₅		345.1696	343.1618	299; 197; 179; 145	1	13.09	X	X	X	X
27	12- <i>O</i> -metilacetilcarnosato	C ₂₁ H ₂₈ O ₃		329.2111	327.195	312; 269	1	44.17	-	X	-	-
28	14-idrossi-7- <i>O</i> -metilrosmanolo	C ₂₁ H ₂₈ O ₆		377.1958		359; 344	1	38.82	-	X	-	X
29	12-metilcarnosolo	C ₂₁ H ₂₈ O ₄			343.1903	328	1	40.08	-	X	-	-
30	galdosolo	C ₂₀ H ₂₄ O ₅		345.1696		299; 243	1	36.11	-	X	X	X

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
31	20-deossocarnosolo	C ₂₀ H ₂₈ O ₃		317.2111	315.1954	287; 269	1	33.68	-	X	X	X
32	ferruginolo	C ₂₀ H ₃₀ O		287.2369	285.2212	244; 269	1	39.29	-	X	X	X
33	brussonolo	C ₂₀ H ₂₈ O ₃		317.2111		299	1	38.65	-	X	-	-
34	demetilsalvicanol	C ₂₀ H ₃₀ O ₃		319.2267		301	1	43.36	-	X	X	X
35	4α,9α-epossi-2H-dibenzo[a,d]ciclohepten-7(5H)-one	C ₂₀ H ₂₈ O ₃		317.2111		299	1	39.43	-	X	X	X

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
36	4β,6β-didrossi-1α,5α(H)-guai-9-ene	C ₁₅ H ₂₆ O ₂		239.2005		221; 203	1	38.21	-	-	X	-
37	teucladiolo	C ₁₅ H ₂₆ O ₂		239.2005		221; 203	1	38.82	-	-	-	X
38	11-idrossi-12-metossiabieta-8,11,13-triene	C ₂₁ H ₃₂ O ₂		317.2475		299	1	43.16	-	-	-	X
39	β-chaenocephalolo	C ₁₅ H ₂₆ O ₂		239.2005		221; 203	1	23.35	-	-	-	X
40	Triterpene	C ₃₀ H ₄₈ O ₄			471.3484	453	3	24.83	X	-	-	-

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Struttura chimica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS2	MSI ^a	Rt	Pianta <i>in vivo</i>	Pianta micropropagata	Callo	Callo elicitato
41	Triterpene	C ₃₀ H ₄₈ O ₄			471.3484	453	3	25.09	X	-	-	-
42	Triterpene	C ₃₀ H ₄₈ O ₅			487.3432	469; 443	3	19.26	X	-	-	-

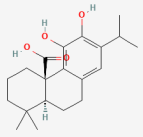
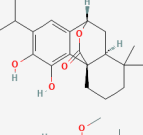
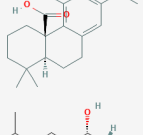
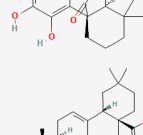
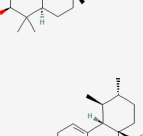
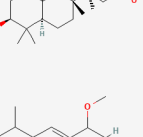
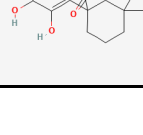
¹Livelli di identificazione MSI in accordo con quanto indicato in Sumner et al. [36]

3.3 Analisi fitochimica dell'estratto della pianta micropropagata

L'indagine chimica sull'estratto metanolico delle piante micropropagate ha fornito diversi composti noti, identificati mediante NMR (1D e 2D) e ESI-HRMS (Electrospray Ionization High-Resolution Mass Spectrometry).

La separazione cromatografica ha permesso di isolare diversi diterpenoidi: acido carnosico (1) [37], carnosolo (2) [37], 12-metilacido carnosico (3) [37, 38], rosmanolo (4) [39, 40]; due triterpenoidi, acido oleanolico (5) e acido ursolico (6) [41]; e 7-metil rosmanolo (7) [42] (Tabella 2).

Tabella 2. Composti trovati nell'estratto di pianta micropropagata di *S. somalensis*.

Codice	Nome del composto	Formula chimica	Peso molecolare	Struttura chimica	Referenza
1	acido carnosico	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.44		[37]
2	carnosolo	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330.42		[37]
3	acido 12-metilcarnosico	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346.47		[37, 38]
4	rosmanolo	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346.42		[39, 40]
5	acido oleanolico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.71		[41]
6	acido ursolico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.71		[41]
7	7-metilrosmanolo	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.45		[42]

3.4 Determinazione del contenuto di acido carnosico

Il contenuto di acido carnosico nei campioni di *S. somalensis* è stato quantificato mediante HPLC-UV, sulla base di una calibrazione con uno standard autentico.

L'acido carnosico è stato rilevato sia negli estratti delle piante *in vivo* sia in quelli delle piante micropropagate, con concentrazioni corrispondenti rispettivamente a 0,09% e 0,07% (*p/p*) della biomassa fresca.

Nei campioni di callo non è stata riscontrata una quantità rilevabile di acido carnosico, indicando livelli al di sotto della soglia di rilevamento.

3.5 Screening antifungino

L'attività antifungina degli estratti metanolici ottenuti da *S. somalensis* è stata valutata contro cinque funghi fitopatogeni: *B. cinerea*, *C. coccodes*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Sono stati testati quattro diversi tipi di estratti metanolici a concentrazione di 500 e 1000 µg/mL (pianta *in vivo*, piante micropropagate, callo e callo trattato con elicitore) e due estratti metanolici per le concentrazioni 100, 250 e 750 µg/mL (pianta *in vivo*, piante micropropagate).

Due fungicidi commerciali, azoxystrobin (250 µg/mL) e cyprodinil + fludioxonil (375 + 250 µg/mL), sono stati usati come standard di riferimento, mentre come controlli negativi sono stati preparati PDA trattato con 0,75% *v/v* in DMSO e PDA non trattato.

I risultati sono riportati nella Tabella 3.

L'estratto della pianta *in vivo* ha mostrato la maggiore attività antifungina contro tutti i funghi testati (Figure 4–7), in particolare ha inibito la crescita miceliale di *C. coccodes* al 1000 µg/mL dell'86,27%, valore leggermente inferiore a quello dell'azoxystrobin (87,3%).

L'estratto ha mostrato, inoltre, una forte inibizione contro *B. cinerea* (84,3%; Figura 3) e ha inibito la crescita miceliale di *F. oxysporum* del 71,6% alla concentrazione più elevata testata.

Cyprodinil + fludioxonil ha controllato l'85,3% della crescita miceliale di *F. oxysporum* e questa percentuale di inibizione è risultata significativamente più elevata rispetto a quella dell'azoxystrobin.

L'inibizione contro *S. sclerotiorum* è stata del 74,5% (1000 µg/mL) e del 66,7% (500 µg/mL), mostrando un'attività antifungina significativamente superiore rispetto al controllo chimico azoxystrobin (57,8%).

Una soppressione della crescita miceliale del 77,5% contro *R. solani* è stata osservata a 1000 µg/mL, valore statisticamente superiore all'effetto dell'azoxystrobin.

L'estratto della pianta micropropagata ha dimostrato anch'esso un'attività antifungina rilevante a 1000 µg/mL, con il 63,7% di controllo della crescita miceliale di *B. cinerea* e il 68,6% di inibizione contro *R. solani*.

L'estratto ha, inoltre, controllato il 62,8% e il 61,8% della crescita miceliale di *C. coccodes* e *S. sclerotiorum*, rispettivamente, a 1000 µg/mL. Tuttavia, l'efficacia è risultata statisticamente inferiore a quella dei fungicidi commerciali. L'attività minore è stata riportata contro *F. oxysporum* (35,3%).

Gli estratti metanolici della coltura di callo e della coltura di callo trattata con elicitore hanno mostrato un'attività antifungina da bassa a nulla, con percentuali di inibizione comprese tra 0% e 24,5%.

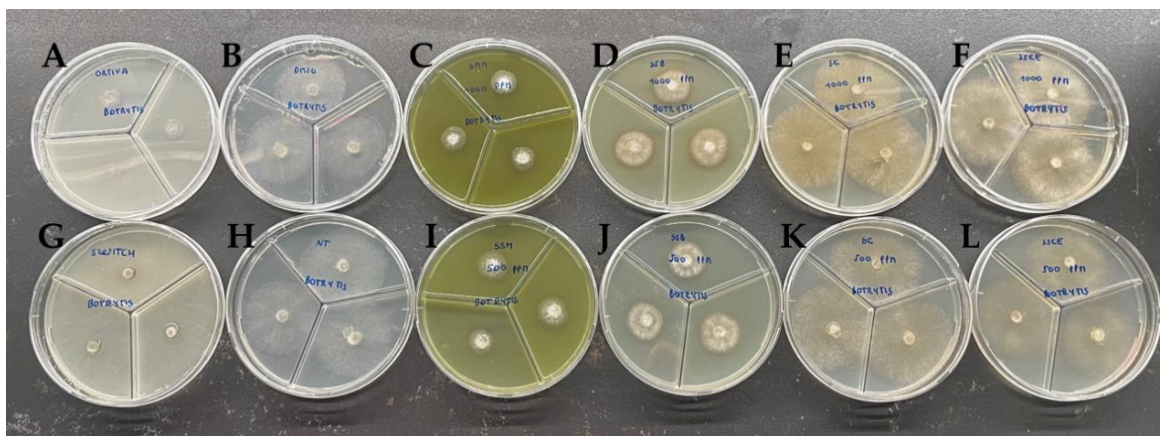


Figura 3. Rappresentazione dell'inibizione della crescita miceliale di *B. cinerea*.

A. Azoxystrobin (250 µg/mL); B. DMSO, C. Pianta *in vivo* 1000 µg/mL; D. Pianta micropropagata 1000 µg/mL; E. Callo 1000 µg/mL; F. Callo elicitato 1000 µg/mL; G. Cyprodinil + Fludioxonil 375 + 250 µg/mL; H. Controllo; I. pianta *in vivo* 500 µg/mL; J. Pianta micropropagata 500 µg/mL; K. Callo 500 µg/mL; L. Callo elicitato 500 µg/mL

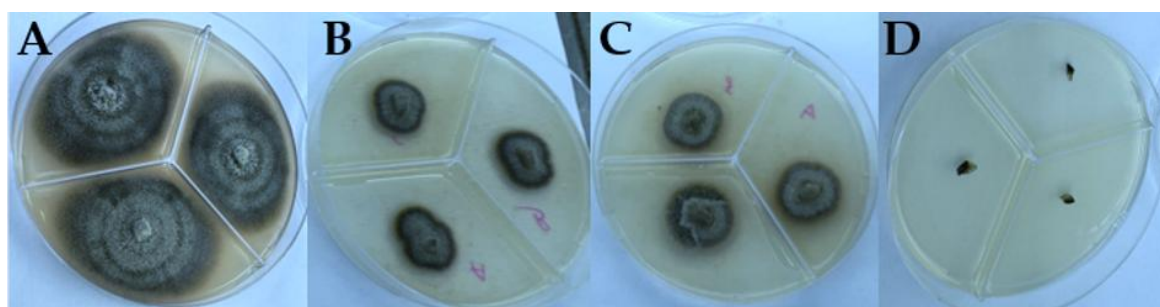


Figura 4. Rappresentazione dell'inibizione della crescita miceliale di *C. coccodes*.

A. Controllo B. Estratto della *in vivo* a 500 µg/mL C. Estratto della pianta *in vivo* a 1000 µg/mL D. Cyprodinil + Fludioxonil (375 + 250 µg/mL)

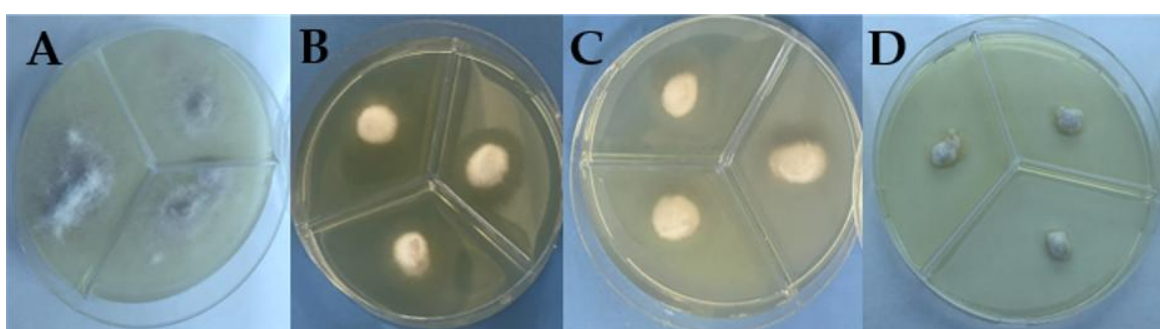


Figura 5. Rappresentazione dell'inibizione della crescita miceliale di *F. oxysporum*.

A. Controllo B. Estratto della pianta *in vivo* a 500 µg/mL C. Estratto della pianta *in vivo* a 1000 µg/mL D. Cyprodinil + Fludioxonil (375 + 250 µg/mL)

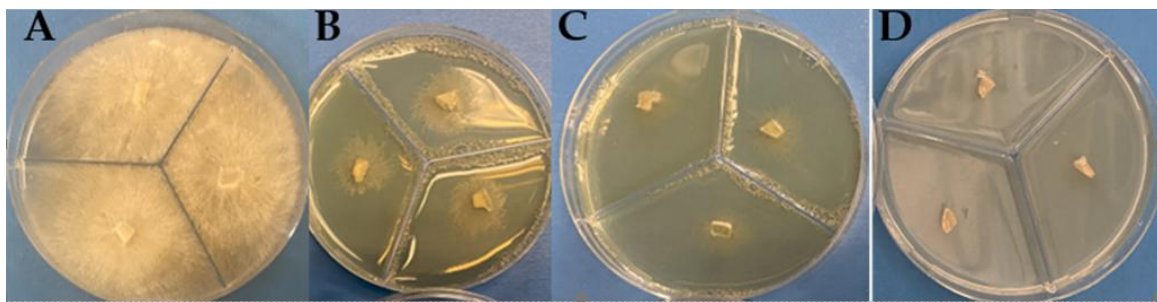


Figura 6. Rappresentazione dell'inibizione della crescita miceliale di *R. solani*.

A. Controllo B. Estratto della pianta *in vivo* a 500 µg/mL C. Estratto della pianta *in vivo* a 1000 µg/mL D. Cyprodinil + Fludioxonil (375 + 250 µg/mL)

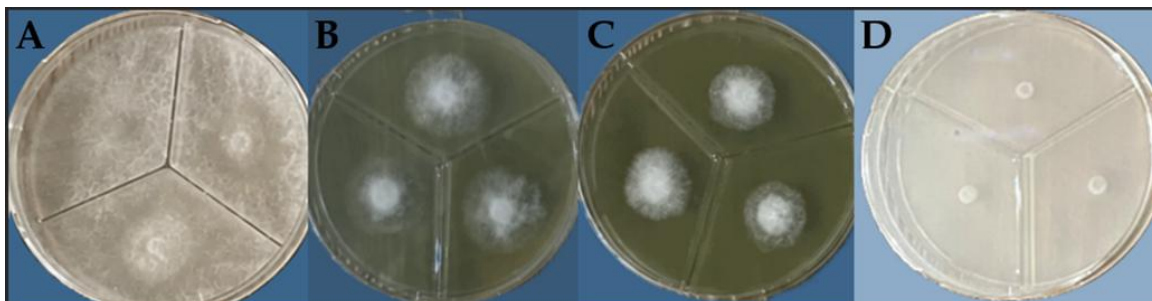


Figura 7. Rappresentazione dell'inibizione della crescita miceliale di *S. sclerotiorum*.

A. Controllo B. Estratto della pianta *in vivo* a 500 µg/mL C. Estratto della pianta *in vivo* a 1000 µg/mL D. Cyprodinil + Fludioxonil (375 + 250 µg/mL)

Tabella 3. Attività antifungina dell'estratto metanolico di pianta *in vivo*, pianta micropropagata, callo e callo elicitato di *S. somalensis* contro funghi fitopatogeni selezionati ^a

Trattamento	Concentrazione	<i>Botrytis cinerea</i> (%) ± SD	<i>Colletotrichum coccodes</i> (%) ± SD	<i>Fusarium oxysporum</i> (%) ± SD	<i>Rhizoctonia solani</i> (%) ± SD	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (%) ± SD
pianta <i>in vivo</i>	500 µg/mL	77.45±0.15 ^d	81.37±0.06 ^d	71.57±0.23 ^b	76.47±0.10 ^c	66.67±0.15 ^c
pianta <i>in vivo</i>	1000 µg/mL	84.31±0.06 ^c	86.27±0.06 ^c	71.57±0.25 ^b	77.45±0.06 ^b	74.51±0.06 ^b
pianta micropropagata	500 µg/mL	62.75±0.12 ^e	52.94±0.26 ^f	19.61±0.29 ^g	64.71±0.10 ^e	52.94±0.10 ^f
pianta micropropagata	1000 µg/mL	63.73±0.15 ^f	62.75±0.21 ^e	35.29±0.17 ^d	68.63±0.15 ^d	61.76±0.10 ^d
callo	500 µg/mL	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ⁱ	17.67±0.49 ^h	19.61±0.06 ⁱ	0.00±0.00 ^g
callo	1000 µg/mL	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ⁱ	19.61±0.15 ^g	24.51±0.12 ^g	0.00±0.00 ^g
callo elicitato	500 µg/mL	0.00±0.00 ^g	22.55±0.12 ^h	22.55±0.25 ^f	18.63±0.06 ^j	0.00±0.00 ^g
callo elicitato	1000 µg/mL	0.00±0.00 ^g	24.51±0.29 ^g	24.51±0.23 ^e	20.59±0.10 ^h	0.00±0.00 ^g
DMSO	7.5 µL/mL	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^g
cyprodinil + fludioxonil	375 + 250 µg/mL	100.00±0.00 ^g	100.00±0.00 ^a	85.29±0.26 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
azoxystrobin	250 µg/mL	88.24±0.00 ^b	87.25±0.06 ^b	47.06±0.30 ^c	51.96±0.12 ^f	57.84±0.06 ^c
controllo	-	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^g

^a I Valori sono espressi come la media ± la deviazione standard dell'inibizione della crescita miceliale (%). Lettere differenti rappresentano differenze significative a $p \leq 0.05$ ottenute con il test Tukey.

In aggiunta alla tabella precedente sono stati effettuati ulteriori studi relativi alle concentrazioni 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL degli estratti metanolici della pianta *in vivo* e micropropagata per una più approfondita valutazione della percentuale di inibizione (Tabella 4 e 5).

Tabella 4. Attività antifungina dell'estratto metanolico di pianta *in vivo*^a

Trattamento	Concentrazione	<i>Botrytis cinerea</i> (%) ± SD	<i>Colletotrichum coccodes</i> (%) ± SD	<i>Fusarium oxysporum</i> (%) ± SD	<i>Rhizoctonia solani</i> (%) ± SD	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (%) ± SD
pianta <i>in vivo</i>	100 µg/mL	59.80±1.70 ^e	10.78±0.97 ^f	6.86±0.47 ^f	5.88±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e
pianta <i>in vivo</i>	250 µg/mL	61.76±2.94 ^e	28.43±1.70 ^e	14.71±1.00 ^e	14.71±0.00 ^d	0.00±0.00 ^e
pianta <i>in vivo</i>	500 µg/mL	77.45±4.49 ^d	81.37±1.70 ^d	21.57±1.70 ^d	76.47±2.94 ^b	66.67±1.65 ^c
pianta <i>in vivo</i>	750 µg/mL	80.39±1.70 ^{cd}	83.33±0.97 ^{cd}	71.57±5.16 ^b	76.47±0.00 ^b	68.63±1.70 ^c
pianta <i>in vivo</i>	1000 µg/mL	84.31±1.70 ^{bc}	86.27±1.70 ^{bc}	71.57±4.43 ^b	77.45±1.70 ^b	74.51±1.70 ^b
DMSO	7.5 µL/mL	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^e
cyprodinil + fludioxonil	375 + 250 µg/mL	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	85.29±0.26 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
azoxystrobin	250 µg/mL	88.24±0.00 ^b	87.25±0.06 ^b	47.06±0.30 ^c	51.96±0.12 ^c	57.84±0.06 ^d
controllo	-	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^e

^a I valori sono espressi come la media ± la deviazione standard dell'inibizione della crescita miceliale (%). Lettere differenti rappresentano differenze significative a $p \leq 0.05$ ottenute con il test Tukey.

Tabella 5. Attività antifungina dell'estratto metanolico di pianta micropropagata^a

Trattamento	Concentrazione	<i>Botrytis cinerea</i> (%) ± SD	<i>Colletotrichum coccodes</i> (%) ± SD	<i>Fusarium oxysporum</i> (%) ± SD	<i>Rhizoctonia solani</i> (%) ± SD	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (%) ± SD
pianta micropropagata	100 µg/mL	45.10±1.70 ^d	5.88±0.00 ^f	0.00±0.00 ^f	0.98±0.97 ^e	0.00±0.00 ^d
pianta micropropagata	250 µg/mL	57.84±1.70 ^c	23.53±0.94 ^e	14.71±0.00 ^e	14.71±2.94 ^d	0.00±0.00 ^d
pianta micropropagata	500 µg/mL	62.75±3.40 ^c	52.61±1.39 ^d	19.63±0.78 ^d	64.71±0.94 ^b	52.94±2.94 ^c
pianta micropropagata	750 µg/mL	63.73±1.70 ^c	61.76±2.94 ^c	33.33±1.70 ^c	65.69±1.94 ^b	60.78±3.40 ^b
pianta micropropagata	1000 µg/mL	63.73±4.49 ^c	62.75±5.17 ^c	35.29±1.91 ^c	68.63±4.49 ^b	61.76±2.94 ^b
DMSO	7.5 µL/mL	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d
cyprodinil + fludioxonil	375 + 250 µg/mL	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	85.29±0.26 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
azoxystrobin	250 µg/mL	88.24±0.00 ^b	87.25±0.06 ^b	47.06±0.30 ^b	51.96±0.12 ^c	57.84±0.06 ^{bc}
controllo	-	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d

^a I Valori sono espressi come la media ± la deviazione standard dell'inibizione della crescita miceliale (%). Lettere differenti rappresentano differenze significative a $p \leq 0.05$ ottenute con il test Tukey.

I parametri stimati delle curve dose–risposta per tutti i trattamenti sono sintetizzati nelle Tabelle 6 e 7. Complessivamente, i modelli hanno mostrato adattamenti da buoni a ottimi ($R^2 = 0,955\text{--}0,998$).

Sulla base del modello logistico a quattro parametri, *C. coccodes* e *R. solani* sono risultate le specie più sensibili, con valori di IC_{50} pari a 304,91 $\mu\text{g/mL}$ (pianta *in vivo*) e 318,54 $\mu\text{g/mL}$ (pianta micropropagata), e 304,44 $\mu\text{g/mL}$ (pianta *in vivo*) e 307,80 $\mu\text{g/mL}$ (pianta micropropagata), rispettivamente.

F. oxysporum è risultato il meno sensibile, mostrando il valore più elevato di IC_{50} (613,60 $\mu\text{g/mL}$).

Per *F. oxysporum* trattato con estratti da piante micropropagate, l' IC_{50} non è stato possibile stimarlo perché il 50% di inibizione non è stato raggiunto alla concentrazione massima testata.

Secondo il modello di saturazione esponenziale, *B. cinerea* è risultata più sensibile agli estratti delle piante micropropagate ($IC_{50} = 52,49 \mu\text{g/mL}$) rispetto agli estratti delle piante *in vivo* ($IC_{50} = 137,89 \mu\text{g/mL}$).

Tabella 6. Parametri dose-risposta ottenuti dal modello logistico a quattro parametri.

Trattamento	Specie fungina	Min	Max	IC ₅₀ (µg/mL)	95% CI (IC ₅₀)	Hill (slope)	R ²	SSE	Errore standard residuo
pianta <i>in vivo</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	10.66	85.12	304.91	289.00–320.81	5.84	0.997429	39.33	1.89
pianta micropropagata	<i>Colletotrichum coccodes</i>	4.46	64.73	318.54	260.72–376.36	3.20	0.970814	233.01	4.60
pianta <i>in vivo</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	10.78	71.57	613.60	571.30–655.89	8.01	0.986979	160.32	3.82
pianta <i>in vivo</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	5.88	76.97	304.44	263.38–345.49	9.92	0.998476	24.48	1.49
pianta micropropagata	<i>Rhizoctonia solani</i>	0.93	67.35	307.80	273.89–341.70	6.44	0.990940	115.34	3.23
pianta <i>in vivo</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-0.22	71.63	395.83	243.30–548.35	11.08	0.994195	103.09	3.06
pianta micropropagata	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-0.12	61.35	420.32	260.55–580.10	10.60	0.995298	58.86	2.31

Tabella 7. Parametri dose-risposta ottenuti dal modello di saturazione esponenziale.

Trattamento	Specie fungina	Min	Max	k	IC ₅₀ (µg/mL)	95% CI (IC ₅₀)	Max slope	R ²	SSE	Errore residuo standard
pianta <i>in vivo</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	30.13	82.43	0.0050	137.89	99.16–191.74	0.26	0.955380	344.77	4.37
pianta micropropagata	<i>Botrytis cinerea</i>	40.69	64.73	0.0132	52.49	38.66–71.26	0.98	0.964984	136.29	2.71

CAPITOLO 4

Discussione

La ricerca sui composti bioattivi di origine vegetale offre soluzioni promettenti e a bassa tossicità per la gestione delle malattie delle piante, il che si allinea bene con gli obiettivi dell'agricoltura sostenibile [43].

Quando utilizzati in modo equilibrato e responsabile, gli estratti vegetali possono supportare la biodiversità e mantenere la salute del suolo a lungo termine, a differenza degli approcci che si basano fortemente su sostanze chimiche sintetiche [44, 45].

Le specie di *Salvia* sono sempre più riconosciute come fonti naturali promettenti di composti antifungini, grazie alla loro ricchezza in terpenoidi bioattivi, fenolici e oli essenziali attivi contro diversi importanti patogeni delle piante [46, 47].

Diversi estratti di *Salvia* spp. hanno mostrato una forte attività contro funghi, tra cui *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* e *C. coccodes* [4, 8].

L'acido carnosico, isolato da *S. somalensis*, ha riportato un'inibizione significativa della crescita miceliale, evidenziando il potenziale di questi estratti come metodo ecologico per il controllo delle malattie delle colture [4].

È importante sottolineare che gli estratti vegetali integrali spesso mantengono una forte attività biologica grazie alle interazioni sinergiche tra i diversi composti fitochimici presenti, che possono migliorare l'efficacia rispetto ai composti isolati, rendendoli particolarmente attraenti per strategie di protezione sostenibile delle colture [48].

Nel presente studio, abbiamo indagato il profilo chimico e l'attività antifungina dell'estratto metanolico di *S. somalensis*.

L'analisi LC-MS ha rivelato che l'estratto metanolico era dominato da terpenoidi e flavonoidi. I test antifungini hanno confermato che *S. somalensis* possedeva una forte bioattività contro diversi funghi fitopatogeni. L'estratto metanolico dalla pianta *in vivo* ha mostrato una forte inibizione contro tutti i funghi testati, in particolare *C. coccodes* e *B. cinerea*.

Le specie di *Colletotrichum* sono note per causare la malattia dell'antracnosi in diverse colture [49] e risultati simili sono stati notati in uno studio precedente utilizzando l'estratto superficiale della pianta di *S. somalensis* in diclorometano [4].

Risultati correlati sono stati riportati per estratti di *Salvia discolor* contro *B. cinerea* (77,1%), inibizione della crescita miceliale a 1000 µg/mL [8], confermando ulteriormente il potenziale antifungino delle specie di *Salvia*.

Una revisione a livello di genere delle specie di *Salvia* evidenzia anche ripetuti resoconti di sostanziale attività *in vitro* contro *Botrytis* e *Colletotrichum* spp., supportando la nostra osservazione che i membri di questo genere sono una fonte affidabile di metaboliti antifungini [50].

L'estratto metanolico di *S. somalensis* ha anche mostrato un'inibizione sostanziale (>70%) contro *F. oxysporum* e *R. solani*, coerente con i risultati per l'estratto superficiale della pianta in diclorometano in studi precedenti condotti da Iobbi et al. [4].

L'attività antifungina osservata potrebbe essere ampiamente attribuita alla presenza combinata di diverse principali classi fitochimiche nell'estratto.

I diterpenoidi abietanici, inclusi carnosolo e derivati del rosmarolo, un gruppo caratteristico nelle specie di *Salvia*, svolgono ruoli critici di difesa e segnalazione ed esibiscono diverse bioattività [51]. Tra questi, l'acido carnosico è ben noto per le sue proprietà antimicrobiche e antiossidanti [4, 16, 52, 53].

È interessante notare che, nonostante il suo contenuto inferiore di acido carnosico, l'estratto metanolico ha mostrato un'attività antifungina paragonabile a quella dell'estratto superficiale della pianta in diclorometano ricco di acido carnosico precedentemente caratterizzato dalla stessa specie [4]. Ad esempio, a 1000 µg/mL, l'estratto metanolico ha inibito *C. coccodes* e *B. cinerea* rispettivamente dell'86,3% e dell'84,3%, valori che rientrano o superano l'intervallo di inibizione del 67–85% riportato precedentemente. Questi risultati suggeriscono che l'acido carnosico non era

l'unico determinante dell'attività antifungina mostrata dall'estratto metanolico e che altri metaboliti possono contribuire sostanzialmente alla sua bioattività.

Sulla base dell'annotazione preliminare dei metaboliti, acidi fenolici come gli acidi rosmarinico e caffeico, insieme a flavonoidi come l'isoramnetina, potrebbero essere coinvolti negli effetti antifungini osservati.

Studi precedenti hanno dimostrato che queste classi di composti possono compromettere la crescita fungina attraverso molteplici meccanismi, inclusa l'interruzione dell'integrità della membrana cellulare e l'inibizione di processi enzimatici chiave [54, 55]. Tuttavia, poiché questi metaboliti non sono stati quantificati nel presente studio, il loro contributo specifico alla bioattività osservata non può essere determinato direttamente e rimane quindi speculativo.

Saranno necessarie ulteriori indagini che coinvolgano il loro isolamento, quantificazione e valutazione in esperimenti mirati per elucidare i loro ruoli individuali.

Sebbene le interazioni sinergiche tra fitochimici siano plausibili e siano state proposte in letteratura, il test diretto della sinergia non è stato eseguito nel presente studio. Pertanto, l'attività osservata è più cautamente attribuita all'azione combinata, potenzialmente additiva o sinergica, di più classi di composti piuttosto che a qualsiasi singolo costituente.

In differenti studi di screening più ampi, diversi estratti metanolici vegetali hanno raggiunto i loro effetti inibitori più elevati a concentrazioni di screening intorno a 500–1000 µg/mL [56]. Inoltre, rapporti su altri estratti vegetali utilizzati in test di avvelenamento “alimentare” (ad esempio, *Larrea tridentata*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*) mostrano profili inibitori comparabili e leggermente inferiori in condizioni simili, indicando ulteriormente che la potenza dell'estratto di *S. somalensis* è coerente con candidati promettenti negli studi di screening fitochimico [57, 58].

Considerando la promettente attività antifungina mostrata dall'estratto metanolico, sono state successivamente stabilite biomasse e colture di callo di *S. somalensis* per valutare il potenziale dei sistemi di coltura *in vitro* come fonti alternative di metaboliti bioattivi.

Le colture *in vitro* di piante sono ampiamente riconosciute come piattaforme di produzione sostenibili, scalabili e riproducibili per metaboliti specializzati, consentendo la generazione di biomassa in condizioni controllate riducendo al minimo l'influenza della variabilità stagionale e ambientale.

Inoltre, recenti progressi nelle strategie di elicizione, metabolomica e ottimizzazione dei bioprocessi hanno migliorato il potenziale di questi sistemi per la produzione di fitochimici di alto valore [59].

Le colture sono state mantenute con successo senza evidenti disturbi fisiologici, inclusa l'iperidria. Questa osservazione è coerente con studi precedenti su *Salvia* sp., dove basse concentrazioni di 6-benzilaminopurina hanno promosso la proliferazione dei germogli senza indurre iperidria [29, 35].

L'estratto della pianta micropropagata ha dimostrato un'attività moderata, indicando che, sebbene il potenziale bioattivo sia mantenuto dopo la micropropagazione, la potenza può diminuire a causa della ridotta produzione di terpenoidi secreti in superficie, in particolare $4\beta,6\beta$ -diidrossi- $1\alpha,5\alpha$ (H)-guai-9-ene, teucladiolo, 11-idrossi-12-metossiabieta-8,11,13-triene e β -chenocefalolo, precedentemente identificati solo negli estratti superficiali della pianta in diclorometano [4].

Questi composti sono probabilmente sintetizzati o accumulati in tessuti ricchi di tricomi e possono richiedere elicizione per una produzione sostenuta *in vitro*; riduzioni simili nei metaboliti localizzati in superficie dopo la micropropagazione sono state notate in diverse specie di Lamiaceae [50, 60].

Gli estratti da colture di callo e colture di callo trattate con elicitore hanno mostrato un'attività antifungina comparativamente bassa, riflettendo probabilmente il ridotto

accumulo di metaboliti specializzati bioattivi comunemente osservato nei tessuti vegetali non differenziati.

Sebbene l'elicizione possa stimolare il metabolismo secondario, il potenziale biosintetico delle colture di callo spesso rimane inferiore a quello dei tessuti differenziati, risultando in un'attività biologica limitata [59].

L'analisi LC-MS ha rivelato che la biomassa micropropagata e le colture di callo producevano alcuni composti isolati dall'estratto superficiale della pianta in diclorometano [4].

Il profilo LC-MS/MS di altre specie di *Salvia* in condizioni *in vitro* ha identificato flavonoidi, terpenoidi e acidi fenolici, evidenziando la plasticità metabolica dei tessuti in coltura [11, 61].

È interessante notare che alcuni sesquiterpenoidi, ovvero (-)-7-*epi*-isojunenolo, (+)-junenolo e (+)-ent-epicubenolo, rilevati sulla superficie fogliare di *S. somalensis*, sono apparsi solo nelle piante micropropagate e nelle colture di callo trattate con acido salicilico come elicitore.

Risultati simili sono stati documentati dove elicitori abiotici come l'acido salicilico e il metil jasmonato hanno migliorato significativamente la biosintesi dei metaboliti secondari nelle piante medicinali attivando percorsi correlati alla difesa [62, 63].

Alcuni metaboliti, tra cui acido betulinico, 7,13-*E*-labdadien-15-olo, 12-*O*-metilacetilcarnosato, 12-metilcarnosolo e brussonolo, sono stati sintetizzati esclusivamente nelle piante micropropagate, suggerendo che i tessuti differenziati possono guidare la loro produzione. Tuttavia, l'acido carnosico (1), 1 β ,6 β -diidrossi-4(14)-eudesmene, betulina e uvaolo erano comuni tra la superficie fogliare [4], la biomassa *in vitro* e le colture di callo non elicitate.

La quantificazione HPLC-UV ha rivelato basse quantità di acido carnosico negli estratti metanolici sia delle colture *in vivo* che *in vitro*. Questo contrasta con i risultati

precedenti che mostravano elevati livelli di acido carnosico (11,39% *p/p* dell'estratto e 0,12% *p/p* della biomassa fresca) nell'estratto superficiale in diclorometano di *S. somalensis* [4].

Questa discrepanza riflette probabilmente la selettività dell'estrazione in diclorometano che recupera metaboliti lipofili localizzati nei tricomi ghiandolari rispetto all'estrazione metanolica totale [64, 65].

Sebbene l'attività antifungina osservata a 1000 µg/mL sia incoraggiante, va notato che questa è una concentrazione relativamente alta per applicazioni pratiche.

Prima di considerare gli estratti di *S. somalensis* come alternativa ai fungicidi sintetici nella protezione delle colture, sono necessari ulteriori studi per determinare le concentrazioni minime inibitorie, valutare l'efficacia *in vivo* in condizioni di campo e valutare strategie di formulazione che potrebbero migliorare la biodisponibilità e ridurre le dosi efficaci.

Questi risultati dovrebbero quindi essere interpretati come scoperte proof-of-concept che giustificano ulteriori indagini, piuttosto che come prove dirette di applicabilità.

Data la crescente incidenza della resistenza ai fungicidi e le preoccupazioni ambientali, i metaboliti derivati da *Salvia* offrono un'opzione promettente per la gestione integrata dei parassiti, allineandosi con le tendenze globali verso un'agricoltura sostenibile [66, 67].

CAPITOLO 5

Conclusioni

La caratterizzazione chimica completa di piante *in vivo*, colture micropropagate, colture di callo e callo trattato con elicitore di *S. somalensis* ha rivelato un'ampia varietà di metaboliti secondari, inclusi sesquiterpenoidi, triterpenoidi, flavonoidi e diterpenoidi.

I test antifungini hanno dimostrato che gli estratti metanolici di *S. somalensis* presentano un'attività ad ampio spettro contro i funghi fitopatogeni testati, con gli estratti *in vivo* che mostrano la maggiore efficacia, seguiti da quelli ottenuti dalla micropropagazione. Questi risultati suggeriscono che la bioattività è strettamente associata alla differenziazione tissutale e alla composizione metabolica, in particolare la presenza di terpenoidi associati alla superficie.

Questi esiti si basano su test di inibizione miceliale *in vitro* e, sebbene le interazioni sinergiche tra fitochimici siano plausibili, devono ancora essere confermate sperimentalmente attraverso bioassay combinatori.

La ricerca futura dovrebbe concentrarsi sul profilo metabolico semi-quantitativo, sull'ottimizzazione delle concentrazioni di elicitore e sulla validazione delle condizioni in campo per valutare appieno il potenziale degli estratti di *S. somalensis* come agenti di protezione sostenibile delle colture.

BIBLIOGRAFIA

1. Will, M. and R. Claßen-Bockhoff, *Time to split Salvia s.l. (Lamiaceae) - New insights from Old World Salvia phylogeny*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2017. **109**: p. 33-58.
2. Lu, Y. and L. Yeap Foo, *Polyphenolics of Salvia—a review*. Phytochemistry, 2002. **59**(2): p. 117-140.
3. Jassbi, A.R., et al., *Bioactive phytochemicals from shoots and roots of Salvia species*. Phytochemistry Reviews, 2016. **15**: p. 829-867.
4. Iobbi, V., et al. *Antifungal potential of carnosic acid from Salvia somalensis against phytopathogenic fungi*. Agronomy, 2024. **14**, 1444.
5. Hedge, I.C., *A revision of Salvia in Africa, including Madagascar and the Canary Islands*. Notes from the Royal Botanical Garden, Edinburgh, 1974. **33**: p. 1-121.
6. Gai, Y. and H. Wang, *Plant disease: A growing threat to global food security*. Agronomy, 2024. **14**(8): p. 1615.
7. Zhou, W., M. Li, and V. Achal, *A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage*. Emerging Contaminants, 2025. **11**(1): p. 100410.
8. Devi, P., et al. *Potential of Salvia discolor extract against common agricultural pathogens*. Agronomy, 2025. **15**, 1268.
9. López-Cabeza, R., et al., *Bio-guided isolation of aromatic abietane diterpenoids from Salvia canariensis as biopesticides in the control of phytopathogenic fungi*. Pest Management Science, 2024. **80**(4): p. 2199-2207.
10. Malik, M.A., N. Ahmad, and M.Y. Bhat, *Harnessing nature: phytoextracts as sustainable remedies for fungal crop diseases*. The Microbe, 2025. **6**: p. 100249.

11. Fazili, M.A., et al., *In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review*. Bulletin of the National Research Centre, 2022. **46**(1): p. 35.
12. Wang, M.-R., et al., *In vitro micrografting of horticultural plants: method development and the use for micropropagation*. Horticulturae, 2022. **8**(7): p. 576.
13. Jain, D., et al., *Effective biotic elicitors for augmentation of secondary metabolite production in medicinal plants*. Agriculture, 2024. **14**(6): p. 796.
14. Dougué Kentsop, R.A., et al. *Salvia species: biotechnological strategies applied to in vitro cultures for the controlled production of bioactive diterpenoids*. Agronomy, 2024. **14**, 835.
15. Bisio, A., et al., *Establishment and analysis of in vitro biomass from Salvia corrugata Vahl. and evaluation of antimicrobial activity*. Phytochemistry, 2016. **122**: p. 276-285.
16. Bisio, A., N. De Tommasi, and G. Romussi, *Diterpenoids from Salvia wagneriana*. Planta Medica, 2004. **70**(5): p. 452-457.
17. Fraternali, D., et al., *In vitro plant regeneration from leaf callus of Grindelia robusta Nutt.* Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 2008. **142**(3): p. 487-490.
18. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiologia plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
19. Petrova, M., et al., *Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of Salvia officinalis L.* Genetics and Plant Physiology, 2015. **5**(1): p. 48–60.
20. Dougué Kentsop, R.A., et al. *Abietane diterpenoids from the hairy roots of Salvia corrugata*. Molecules, 2021. **26**, 5144.

21. Paloukopolou, C. and A. Karioti *A validated method for the determination of carnosic acid and carnosol in the fresh foliage of Salvia rosmarinus and Salvia officinalis from Greece*. Plants, 2022. **11**, 3106.
22. White, T.J., et al., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, M.A. Innis, et al., Editors. 1990, Academic Press: San Diego, CA. p. 315-322.
23. Agrios, G.N., *Plant Pathology*. 5 th. ed. 2005, Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press.
24. Ross, L.N. and J.F. Woodward, *Koch's postulates: An interventionist perspective*. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, 2016. **59**: p. 35-46.
25. Erhonyota, C., G.I. Edo, and F.O. Onoharigho, *Comparison of poison plate and agar well diffusion method determining the antifungal activity of protein fractions*. Acta Ecologica Sinica, 2023. **43**(4): p. 684-689.
26. Gakuubi, M.M., A.W. Maina, and J.M. Wagacha, *Antifungal activity of essential oil of Eucalyptus camaldulensis Dehnh. against selected Fusarium spp*. International Journal of Microbiology, 2017. **2017**(1): p. 8761610.
27. Khoshsokhan, F., et al., *An efficient protocol for production of rosmarinic acid in Salvia nemorosa L. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2023. **59**(3): p. 298-314.
28. Huang, L.D. and J. van Staden, *Salvia chamelaeagnea can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid*. South African Journal of Botany, 2002. **68**(2): p. 177-180.

29. Arikat, N.A., et al., *Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (Salvia fruticosa Mill.)*. Scientia Horticulturae, 2004. **100**(1): p. 193-202.
30. Mascarello, C., E. Mantovani, and B. Ruffoni, *In vitro culture of several ornamental and medicinal Salvia species*. Acta Horticulturae, 2006. **723**: p. 375-380.
31. Yadav, A., et al., *In vitro propagation of chia (Salvia hispanica L.) and assessment of genetic fidelity using random amplified polymorphic DNA and intersimple sequence repeat molecular markers*. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2019. **7**(1): p. 42–47.
32. Skąła, E. and H. Wysokińska, *In vitro regeneration of Salvia nemorosa L. from shoot tips and leaf explants*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2004. **40**(6): p. 596-602.
33. Bayraktar, M., et al., *Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (Olea europaea L.) cultivar 'Gemlik'*. South African Journal of Botany, 2020. **128**: p. 264-273.
34. Martini, A.N., G. Vlachou, and M. Papafotiou *Effect of explant origin and medium plant growth regulators on in vitro shoot proliferation and rooting of Salvia tomentosa, a native sage of the northeastern mediterranean basin*. Agronomy, 2022. **12**, 1889.
35. Papafotiou, M., G. Vlachou, and A.N. Martini *Investigation of the effects of the explant type and different plant growth regulators on micropropagation of five mediterranean Salvia spp. native to Greece*. Horticulturae, 2023. **9**, 96.
36. Sumner, L.W., et al., *Proposed minimum reporting standards for chemical analysis - Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI)*. Metabolomics, 2007. **3**(3): p. 211-221.

37. Pukalskas, A., T.A. van Beek, and P. de Waard, *Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts*. Journal of Chromatography A, 2005. **1074**(1-2): p. 81-88.
38. Oluwatuyi, M., G.W. Kaatz, and S. Gibbons, *Antibacterial and resistance modifying activity of Rosmarinus officinalis*. Phytochemistry, 2004. **65**(24): p. 3249-3254.
39. del Corral, J.M.M., et al., *¹³C NMR Data for abieta-8,11,13-triene diterpenoids*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1994. **32**: p. 774-781.
40. Fraga, B.M., et al., *A revised structure for the diterpene rosmanol*. Phytochemistry, 1985. **24**(8): p. 1853-1854.
41. Seebacher, W., et al., *Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2003. **41**: p. 636–638.
42. Marrero, J.G., L.S. Andrés, and J.G. Luis, *Semisynthesis of rosmanol and its derivatives. Easy access to abietatriene diterpenes isolated from the genus Salvia with biological activities*. Journal of Natural Products, 2002. **65**(7): p. 986-989.
43. Aioub, A.A., et al., *Back to the origins: biopesticides as promising alternatives to conventional agrochemicals*. European Journal of Plant Pathology, 2024. **169**(4): p. 697-713.
44. Ratnadass, A., et al., *Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review*. Agronomy for Sustainable Development, 2012. **32**(1): p. 273-303.
45. Compant, S., et al., *Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production*. Nature Reviews Microbiology, 2025. **23**(1): p. 9-23.

46. Ebani, V.V., et al., *Activity of Salvia dolomitica and Salvia somalensis essential oils against bacteria, molds and yeasts*. Molecules, 2018. **23**(2): p. 396.
47. Najar, B., et al., *Volatiles and antifungal-antibacterial-antiviral activity of South African Salvia spp. essential oils cultivated in uniform conditions*. Molecules, 2021. **26**(9): p. 2826.
48. Godlewska, K., D. Ronga, and I. Michalak, *Plant extracts-importance in sustainable agriculture*. Italian Journal of Agronomy, 2021. **16**(2): p. 1851.
49. Kushaha, T.M., et al., *Botanical extracts control the fungal pathogen Colletotrichum boninense in smallholder production of common bean*. Phytopathology Research, 2024. **6**(1): p. 19.
50. Zaccardelli, M., et al., *Sage species case study on a spontaneous mediterranean plant to control phytopathogenic fungi and bacteria*. Forests, 2020. **11**(6): p. 704.
51. González, M.A., *Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis*. Natural Product Reports, 2015. **32**(5): p. 684-704.
52. Mantzourani, C., P.A. Tarantilis, and M.G. Kokotou, *Carnosic acid and carnosol: analytical methods for their determination in plants, foods and biological samples*. Separations, 2023. **10**(9): p. 481.
53. Birtić, S., et al., *Carnosic acid*. Phytochemistry, 2015. **115**: p. 9-19.
54. Zabka, M. and R. Pavela, *Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi*. Chemosphere, 2013. **93**(6): p. 1051-1056.
55. Wang, L., et al., *Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions*. Microbiome, 2022. **10**(1): p. 233.
56. Maj, W., et al., *Comprehensive antifungal investigation of natural plant extracts against Neosartorya spp. (Aspergillus spp.) of agriculturally significant*

- microbiological contaminants and shaping their metabolic profile*. Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 8399.
57. Rodríguez-Castro, A., et al., *Plant extracts to control Fusarium oxisporum, Fusarium solani and Rhizoctonia solani: a sustainable alternative for agriculture*. Abanico Agroforestal, 2020. **2**: p. 1-13.
 58. Gaber, M.A., et al., *Eco-friendly management of Fusarium wilt in tomato using Salvia officinalis methanolic extract: in vitro, in vivo, and molecular docking approaches*. Journal of Plant Pathology, 2025. **108**: p. 311-324.
 59. Wijerathna-Yapa, A., J. Hiti-Bandaralage, and R. Pathirana, *Harnessing metabolites from plant cell tissue and organ culture for sustainable biotechnology*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2025. **162**(3): p. 55.
 60. Rabilu, S.A., E.D. Agyemang, and B. Farkas, *Antifungal activity of Salvia officinalis subsp. lavandulifolia and Salvia officinalis subsp. major aqueous extracts against Botrytis cinerea*. Journal of Central European Agriculture, 2021. **22**(2): p. 420-428.
 61. Ul Haq, F., et al., *A high-throughput method for dereplication and assessment of metabolite distribution in Salvia species using LC-MS/MS*. Journal of Advanced Research, 2020. **24**: p. 79-90.
 62. Jeyasri, R., et al., *Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2023. **153**(3): p. 447-458.
 63. Razzaq, A., et al., *Elicitor-mediated enhancement of secondary metabolites in plant species: a review*. Frontiers in Plant Science, 2025. **16**: p. 1706600.
 64. Huchelmann, A., M. Boutry, and C. Hachez, *Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest*. Plant Physiology, 2017. **175**(1): p. 6-22.

65. Park, J., et al., *Mass spectral data of primary and secondary metabolites changes in medicinal plants by solvent polarity*. Scientific Data, 2025. **12**(1): p. 893.
66. Cenobio-Galindo, A.D., et al. *Biofungicides based on plant extracts: on the road to organic farming*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**, 6879.
67. Souto, A.L., et al. *Plant-derived pesticides as an alternative to pest management and sustainable agricultural production: Prospects, applications and challenges*. Molecules, 2021. **26**, 4835.