

ALEKSANDRA LUWAŃSKA¹**KAROLINA WIELGUS**¹**MARLENA SZALATA**²**DANIEL LIPIŃSKI**²**JOANNA ZEYLAND**²**RYSZARD SŁOMSKI**²¹ Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Zakład Biotechnologii, Poznań² Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Poznań

Optymalizacja warunków regeneracji *in vitro* szalwii lekarskiej*

Optimisation of the conditions for *in vitro* regeneration of sage

Szałwia lekarska (*Salvia officinalis* L.) jest użyteczną rośliną zielarską wykazującą działanie antyseptyczne na szerokie spektrum bakterii, działanie przeciwzapalne, obniżające poziom cukru we krwi, leczące dolegliwości żołądkowe, a nawet mającą działanie antyoksydacyjne. Możliwość zastosowania licznych związków chemicznych zawartych w olejku eterycznym szalwii zwiększa zainteresowanie uprawą tego gatunku z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. Opracowanie wydajnych metod regeneracji roślin ważnych z leczniczego punktu widzenia, takich jak szalwia lekarska, otwiera szereg możliwości poczynając od rozpoznania szlaków metabolicznych i zwiększonej produkcji metabolitów wtórnych, po mikropropagację jednorodnych genotypów, aż wreszcie do transformacji genetycznej czy produkcji biofarmaceutyków. Celem niniejszej pracy było opracowanie wydajnej metody regeneracji szalwii lekarskiej w kulturach *in vitro* na drodze organogenezy bezpośredniej i pośredniej. Organogeneza bezpośrednia była indukowana na pożywce Murashige Skoog (MS) oraz dwukrotnym rozcieńczeniu pożywki MS (1/2 MS) zawierających różne kombinacje i stężenia roślinnych regulatorów wzrostu: BA, mT, NAA oraz IAA. Proces indukcji tkanki kalusowej i próby regeneracji roślin metodą organogenezy pośredniej prowadzone były w trzech różnych doświadczeniach składających się z zestawu odmiennych pożywek. Doświadczenia te obejmowały różne eksplantaty wyjściowe. Najlepsze wyniki dla procesu regeneracji szalwii na drodze organogenezy bezpośredniej uzyskano przy użyciu pożywek MS z dodatkiem 0,3 mg/l BA lub 0,3 mg/l mT. Współczynnik rozmnażania podczas cyklicznej kultury mieścił się w zakresie 3,08–3,82 dla pożywek zawierających BA oraz 2,44–3,41 dla pożywek z mT. W badaniach nad organogenezą pośrednią na wszystkich zastosowanych podłożach otrzymano indukcję kalusa, jednak wzbudzenie właściwości morfogennych tkanki wymaga dalszego dopracowania.

* Powyższe badania wykonane były w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Słowa kluczowe: indukcja kalusa, mikropropagacja, regeneracja *in vitro*, roślinne regulatory wzrostu, szalwia lekarska, współczynnik rozmnażania

Sage (*Salvia officinalis* L.) is a useful medicinal plant showing antiseptic activity towards a broad spectrum of bacteria, anti-inflammatory activity, lowering blood sugar, treating stomach ailments, and even having an antioxidant effect. The applicability of a number of chemicals present in the essential oil of sage increases the interest in cultivation this species using biotechnological methods. The development of efficient methods for plant regeneration is important for a medicinal plant, such as sage. It opens up a number of possibilities ranging from unravelling of metabolic pathways and increasing the production of secondary metabolites, the micropropagation of homogeneous genotypes, and finally to genetic transformation and production of biopharmaceuticals. The aim of this study was to develop efficient methods for regeneration of sage in *in vitro* cultures through direct and indirect organogenesis. Direct organogenesis was induced on Murashige Skoog medium (MS) and the half-strength MS medium (1/2 MS) containing different combinations and concentrations of plant growth regulators: BA, mT, NAA and IAA. The callus induction and plant regeneration trials by indirect organogenesis were conducted in three different experiments, consisting of a set of different media. This experiment included various output explants. As a result of the studies efficient regeneration of sage was developed through direct organogenesis using MS media containing 0.3 mg / l BA and 0.3 mg / l mT. Multiplication rate during cyclic culture was in the range of 3.08 - 3.82 for the media containing BA and 2.44–3.41 for the media with mT. In studies on indirect organogenesis we also obtained induction of callus on all the substrates, while the induction of morphogenetic properties of the tissue requires further development.

Key words: induction of callus, micropropagation, *in vitro* regeneration, plant growth regulators, sage, multiplication rate

WSTĘP

Lecznicza użyteczność szalwii w przeciwdziałaniu stanom zapalnym gardła, jamy ustnej, przewodu pokarmowego oraz krwawieniom i kolkom jelitowym jest znana od wieków. Obecnie wiadomo również, że szalwia lekarska wykazuje aktywność antyseptyczną na szerokie spektrum bakterii (Stanojević i in., 2010), ale również obniża poziom cukru we krwi (Christensen i in., 2010), a nawet hamuje rozwój komórek rakowych (El Hadri i in., 2010). W olejku eterycznym szalwii lekarskiej stwierdzono zawartość 37 różnych związków chemicznych, które mogą odgrywać znaczącą rolę w fitoterapii (Chalchat i in., 1998). Wiele prac z literatury przedmiotu poświęconych jest możliwości wykorzystania poszczególnych składników aktywnych w leczeniu różnych chorób. Przykładem są antyoksydanty, tj. karnozol, epirozmanol i karnozan metylu, izolowane z szalwii, które mogą mieć zastosowanie w profilaktyce chorób cywilizacyjnych, jak: miażdżyca, zaćma, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera (Akhondzadeh i in., 2003; Lima i in., 2005).

Możliwość produkcji i zastosowania licznych związków chemicznych zawartych w szalwii lekarskiej zwiększa zainteresowanie uprawą tego gatunku z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. Znaczenie komercyjne technologii klonalnego rozmnażania roślin, a przemysł *in vitro* obejmuje już wiele ważnych gospodarczo roślin (Malepszy, 2009). Zastosowanie kultury *in vitro* u szalwii może mieć duże znaczenie przede wszystkim w analizowaniu składu olejku eterycznego (Santos-Gomes i in., 2002). Jednak w badaniach na kulturami tkankowymi szalwii najistotniejsza wydaje się możliwość masowego

rozmnażania wyselekcjonowanych roślin o najlepszych parametrach leczniczych. Zaletą kultur są kontrolowane warunki wpływające korzystnie na akumulację i stabilność składników olejku (Avato i in., 2005). Konwencjonalne metody pozyskiwania materiału, jak wysiew nasion, nie dają takich możliwości. Wydajność rozmnażania *in vitro* *S. officinalis* może być udoskonalana na pożywkach z zastosowaniem różnych hormonów, zarówno z grupy cytokinin jak i auksyn (Gostin, 2008). Znaczącym jest również fakt, że olejki eteryczne pochodzące z roślin uzyskanych drogą mikropropagacji mogą posiadać niejednokrotnie wyższe stężenia niektórych składników w porównaniu z tradycyjną uprawą. Wynikać to może ze zmienności somaklonalnej roślin namnażanych w kulturach *in vitro* (Avato i in., 2005). Możliwość produkcji roślinnych metabolitów wtórnych nie ogranicza się jednak tylko do procesu mikropropagacji. W przypadku *S. officinalis* coraz częściej wykorzystuje się inne metody kultur tkankowych jak kultury zawiesinowe czy organów roślinnych (Santos-Gomes i in., 2003; Grzegorzczak i in., 2007; Ruffoni i in., 2009). Efektywność tego typu kultur *in vitro* i produkcji metabolitów może być zwiększona poprzez zabiegi technologiczne tj. elicytacja (Szpitter i Królicka, 2005). Badania nad kulturami tkankowymi szalwii otwierają również drogę do transgenezy tego gatunku. Istnieją już pierwsze doniesienia związane z wytworzeniem transformowanych korzeni *S. officinalis* wykorzystanych do zwiększenia produkcji kwasu rozmarynowego, związku o działaniu przeciwutleniającym, przeciwzapalnym i antywirusowym (Wysokińska i Chmiel, 2006).

Niewątpliwie biotechnologia otwiera nowe możliwości zwłaszcza w uprawie roślin o dużym znaczeniu farmaceutycznym. Opracowanie wydajnego systemu regeneracji szalwii w kulturach tkankowych jest pierwszym i niezbędnym etapem prac nad korzystaniem z metod biotechnologicznych i staje się integralną częścią wielokierunkowych programów hodowli *S. officinalis*. Celem niniejszej pracy było opracowanie wydajnej regeneracji i rozmnażania szalwii lekarskiej w kulturach *in vitro* na drodze organogenezy bezpośredniej i pośredniej. W przypadku organogenezy bezpośredniej użycie różnych roślinnych regulatorów wzrostu, zwłaszcza cytokinin, miało na celu opracowanie efektywnej mikropropagacji. Założeniem badań nad organogenezą pośrednią było rozeznanie możliwości regeneracyjnych szalwii z różnych eksplantatów wyjściowych oraz poszerzenie wiedzy w zakresie indukcji tkanki kalusowej.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem wyjściowym do badań były nasiona szalwii lekarskiej, odmiany Bona. Do odkażania nasion użyto dwóch procedur z zastosowaniem 15% roztworu podchlorynu sodu lub 20% roztworu preparatu handlowego ACE. Metodykę prowadzonych doświadczeń wraz z użytymi na danych etapach materiałami przedstawiono w tabeli 1. Skala doświadczenia obejmowała po 70 nasion w trzech próbach, a obserwacje kultur wykonywane były po 5, 7 i 16 dniach od wyłożenia nasion. Sterylne siewki posłużyły jako źródło eksplantatów do zakładania kultur i badań nad regeneracją szalwii. Organogeneza bezpośrednia była indukowana na pożywce Murashige Skoog (MS) oraz dwukrotnym rozcieńczeniu pożywki MS (1/2 MS) zawierających różne kombinacje i stężenia roślinnych

regulatorów wzrostu tj. 6-benzyloaminopuryna (BA), meta-topolina (mT), kwas naftylo-1-octowy (NAA) oraz kwas indolilo-3-octowy (IAA) (tab. 1). Obserwacje wykonywane były przed pasażem eksplantatów na świeże medium i prowadzone w odstępach dwutygodniowych. Podczas obserwacji określano m. in. współczynnik rozmnażania określający liczbę pąków przybyszowych powstałych z jednego eksplantatu. Cykl rozmnożeniowy obejmował 5 subkultur na danej pożywce. Wyjściowe kultury szalwii na różnych pożywkach obejmowały po 100 roślin (20 kolbek \times 5 eksplantatów). Proces indukcji tkanki kalusowej i próby regeneracji roślin metodą organogenezy pośredniej prowadzone były w trzech różnych doświadczeniach składających się z zestawu odmiennych pożywek (tab. 1). W dwóch pierwszych doświadczeniach (1 i 2) bazowano na pożywce MS z regulatorami wzrostu: BA, NAA oraz kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D). Natomiast w przypadku trzeciego doświadczenia (3) użyto pożywki Daria z różnym zestawem regulatorów wzrostu mającym doprowadzić do regeneracji roślin (wg. Wielgus i in., 2008). W każdym doświadczeniu kultura obejmowała subkultury trwające po 4 tyg., a przed pasażem wykonywana była obserwacja. Kalus kwalifikowany był do trzech grup: mały – pojawienie się niewielkich grudek; średni – tkanka ulegająca proliferacji; duży – znaczne namnażanie się tkanki.

Tabela 1

Schemat etapów doświadczeń wraz z użytymi materiałami
Scheme of experiment stages and applied materials

Etap Stage	Eksplantat Explant	Procedura i zastosowana pożywka Procedure and applied medium
Odkazanie Decontamination	nasiona seeds	— 20% ACE przez 15 min. + 3 x płukanie sterylną H ₂ O — 70% etanol przez 1 min. + 15% podchloryn sodu przez 20 min. + 3 x płukanie sterylną H ₂ O — MS: 1 mg/l GA ₃ + 0,04 mg/l KIN
Organogeneza bezpośrednia Direct organogenesis	pąki wierzchołkowe i boczne apical and axillary buds	— MS: BA lub mT (0,3 mg/l) — ½ MS: 0,3 mg/l BA — MS: 0,5 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA
Organogeneza pośrednia Indirect organogenesis	liścienie, fragmenty liści, ogonki liściowe, merystemy, i fragmenty łodyg cotyledons, leaf fragments, petioles, meristems and stem fragments	— (1) MS: 2 mg/l BA + 2 mg/l NAA + 1 mg/l chlorek adeniny — (2) MS: I 0,05 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA; II bez regulatorów wzrostu — (3) Daria ind+ (1mg/l KIN + 0,05mg/l NAA) i Daria pro+ (0,2 mg/l BA and 0,03 mg/l NAA)
Ukorzenianie Rooting	zregenerowane pędy regenerated shoots	— ½ MS: IAA 0,3 mg/l lub IBA 0,05 mg/l — Daria root+ (2 mg/l IAA)

Ogół badań obejmował różne eksplantaty, przy czym w procesie organogenezy bezpośredniej użyto pąków wierzchołkowych i bocznych pobranych z 3 tygodniowych roślin, a w organogenezie pośredniej liścieni, fragmentów liści, ogonków liściowych, merystemów i fragmentów łodyg pobranych z 2 tygodniowych roślin (tab. 1). Każde doświadczenie zarówno dla organogenezy bezpośredniej i pośredniej obejmowało 50 do 70 eksplantatów i wykonano je w 3 powtórzeniach. Zregenerowane w kulturach *in vitro* pędy poddawane były ukorzenianiu na pożywce MS zawierającej różne stężenia auksyn IAA lub kwasu β -indolomasłowego (IBA) zamieszczone w tabeli 1. Obserwacje kultur

zawierających IAA przeprowadzono w 7 i 14 dniu, natomiast dla IBA obserwacje przebiegały w 10 i 27 dniu od założenia kultury. W obu doświadczeniach skala obejmowała 75 eksplantatów, a każde doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Wszystkie pożywki posiadały pH równe 5,8, a przed zakładaniem kultur były autoklawowane w temperaturze 121°C przez 20 min. Kultury *in vitro* szalwii prowadzone były w fitotronie przy natężeniu światła 4000 LUX, w temperaturze 25± 1°C i przy fotoperiodzie 16/8.

WYNIKI

Odkazanie

Użycie do odkazania nasion 15% roztworu podchlorynu sodu przez 20 min. okazało się zbyt inwazyjne i całkowicie uniemożliwiło skielkowanie nasion. Taki rezultat skłonił do użycia mniej inwazyjnego środka sterylizującego zawierającego 5% podchlorynu sodu oraz skrócenie czasu ekspozycji nasion. Zastosowanie 20% roztworu komercyjnego preparatu ACE przez 15 min. pozwoliło na uzyskanie wysokiego odsetka nasion czystych (91,76%) przy jednoczesnym wysokim procencie nasion skielkowanych (47,84%). Dla doświadczeń z użyciem ACE zastosowano test porównań wielokrotnych (NIR - najmniejszej istotnej różnicy), co umożliwiło przydzielenie poszczególnych zbiorów średnich do grup jednorodnych (tab. 2). Odkazanie nasion z użyciem ACE dało satysfakcjonujące wyniki, dzięki czemu możliwe było uzyskanie odpowiedniej ilości sterylnych siewek do dalszych etapów badań.

Tabela 2

Efektywność procesu odkazania nasion szalwii przy zastosowaniu ACE
Efficiency of sage seeds decontamination using ACE

Cecha Variate		Nasiona Seeds		
		skielkowane germinated	czyste uncontaminated	zakażone contaminated
Próba	1	16,80b	49,4a	1,60b
Trial	2	18,60b	49,2a	1,80b
	3	24,40a	46,8a	4,20a
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}		2,222	6,69	0,872

Organogeneza bezpośrednia

W badaniach nad procesem organogenezy bezpośredniej założono kultury *in vitro* pąków wierzchołkowych i bocznych, pobranych z 3-tygodniowych siewek i umieszczonych na pożywkach z różnym rodzajem i stężeniem roślinnych regulatorów wzrostu. Tabela 3 prezentuje statystyczne porównanie wyników obserwacji dla różnych pożywek poprzez test NIR wraz z grupami jednorodnymi. Najlepsze rezultaty w procesie regeneracji szalwii z pąków wierzchołkowych i bocznych uzyskano przy użyciu pożywek MS zawierających 0,3 mg/l BA lub mT. Kultura na tych pożywkach odznaczała się nie tylko wysokim współczynnikiem rozmnażania, ale i dobrą kondycją eksplantatów podczas cyklicznej mikropropagacji. W przypadku pozostałych pożywek z odmiennym zestawem

regulatorów wzrostu, kultury odznaczały się niższym współczynnikiem rozmnażania, bądź gorszym stanem fizjologicznym eksplantatów (tab. 3).

Tabela 3

Organogeneza bezpośrednia pąków wierzchołkowych i bocznych z zastosowaniem różnych roślinnych regulatorów wzrostu

Direct organogenesis of apical and axillary buds with the use of different plant growth regulators

Cecha Variate	Współczynnik rozmnażania Multiplication rate	Eksplantaty Explants (%)				
		wytwarzające pąki creating buds	żywotne growing	zwitryfikowane vitrificated	obumarłe necrosed	
MS 0,3 BA	2,952a	91,1a	77,5a	5,5c	3,19bc	
MS 0,3 mT	2,732a	98,6a	93,9a	4,8c	1,14c	
Pożywka Medium	MS BA+IAA	2,550a	96,3a	86,8a	12,4bc	1,69c
	MS BA+NAA	1,847b	59,8c	36,7b	24,8b	38,48a
	½ MS 0,3 BA	3,095a	83,2b	33,7b	54,8a	11,58b
NIR _{0,05} —LSD _{0,05}		0,6843	15,28	22,14	14,83	8,564

Organogeneza pośrednia

W rezultacie badań nad organogenezą pośrednią indukcję tkanki kalusowej z liścieni, fragmentów liści, ogonków liściowych, merystemów i fragmentów łodyg otrzymano na wszystkich zastosowanych podłożach. Najlepsze rezultaty uzyskano w doświadczeniu (1) na pożywce MS zawierającej 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA oraz 1 mg/l chlorku adeniny (tab. 4).

Tabela 4

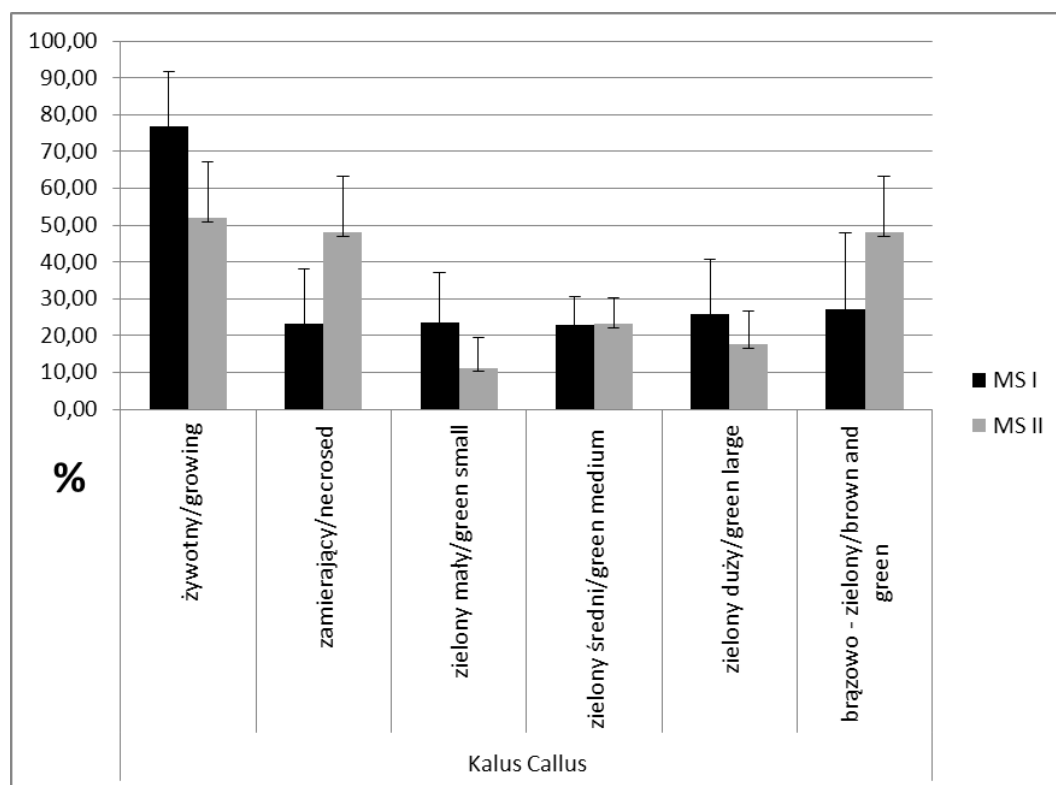
Indukcja tkanki kalusowej z różnych fragmentów roślin
Induction of callus tissue from different parts of plants

Cecha Variate	Eksplantaty Explants (%)		Kalus Callus (%)					
	żywotne growing	zamierające necrosed	zielony — green			brązowo- zielony brown and green	brązowy brown	
			mały small	średni medium	duży large			
liść leaf	15,9b	84,1a	15,9a	0,0c	0,00a	62,7a	0,0	
Eksplantat Explant	ogonki liściowe petiole	63,3a	36,7b	12,2a	51,1a	0,00a	36,3b	0,0
	merystem meristem	45,4a	54,6b	17,7a	27,3b	0,38a	50,0ab	0,0
NIR _{0,05} —LSD _{0,05}		21,16	21,16	11,22	15,88	0,662	25,20	—
Subkultura Subculture	n-1	52,0a	48,0b	20,4a	31,6a	0,0a	36,0b	0,0
	n-2	25,6b	74,4a	4,8b	20,4a	0,40a	74,4a	0,0
NIR _{0,05} —LSD _{0,05}		19,31	19,31	8,85	16,66	0,56	20,07	—

Spośród analizowanych na tej pożywce eksplantatów indukcja kalusa zachodziła najlepiej na ogonkach liściowych, następnie na merystemach, a najslabiej na fragmentach liści. Zainicjowany kalus odznaczał się zieloną barwą oraz miał luźną, grudkowatą strukturę. Jednak próba wzbudzenia powstawania organów przybyszowych poprzez

przepasażowanie jej na świeżą pożywkę spowodowało zmniejszenie żywotności tkanki kalusowej (tab. 4).

Doświadczenie (2) nad kulturami liścieni prowadzonymi w układzie dwóch pożywek MS I z dodatkiem 0,05 mg/l 2,4-D oraz 0,1 mg/l BA, a następnie MS II niezawierającej regulatorów wzrostu skutkowało wysoką indukcją tkanki kalusowej, ale słabym wzrostem tej tkanki bez wykazywania właściwości morfogennych (rys. 1).



Rys. 1. Kultury liścieni w układzie dwóch pożywek
Fig. 1. Cotyledon cultures in a set of two media

Prowadzone doświadczenie (3) nad kulturami liścieni, fragmentów łodyg i korzeni na pożywce Daria nie przyniosło satysfakcjonujących wyników. Jedynie dla fragmentów łodyg uzyskano indukcję tkanki kalusowej z niewielką regeneracją pędów (tab. 5). Jednak w prowadzonych kulturach zarówno kalus jak i powstałe pędy charakteryzowały się złą kondycją fizjologiczną i nieprawidłową gospodarką wodną (witryfikacja). Próba ukorzeniania takich pędów na pożywce Daria root+ zakończyła się niepowodzeniem.

Kultury fragmentów łodyg na pożywkach Daria
Cultures of stem fragments on Daria media

Eksplantaty Explants (%)	Daria ind+				Daria pro+			
	1 obs.	s.d	2 obs.	s.d	1 obs.	s.d	2 obs.	s.d
Rosnące Growing	86,49	4,59	49,04	5,31	12,02	6,71	0,00	0,00
Zamierające Necrosed	13,51	4,59	50,96	5,31	87,98	6,71	100,00	0,00
Indukcja kalusa Callus induction	60,70	13,77	80,88	19,97	100,00	0,00	100,00	0,00
Pędy przybyszowe Adventitious shoots	10,35	7,57	12,11	10,05	34,65	31,39	62,63	67,48
Korzenie przybyszowe Adventitious roots	5,00	4,08	5,00	4,08	5,00	4,08	5,00	4,08
Zregenerowane rośliny Regenerated plants	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ukorzenianie

Zregenerowane w procesie organogenezy bezpośredniej pędy poddano ukorzenianiu. Najlepsze wyniki w wytwarzaniu przez pędy korzeni otrzymano na pożywce ½ MS z IAA w stężeniu 0,3 mg/l. Po 7 dniach prowadzenia kultur korzenie wykształciło 75% eksplantatów, a po 14 dniach odsetek zwiększył się do 87,5%. Zregenerowane rośliny szałwii charakteryzowały się prawidłowym wzrostem i rozwojem. W przypadku IBA ukorzenione eksplantaty uzyskano dopiero po 10 dniach (20%), a po 27 dniach procent ukorzenienia wynosił 43,28.

DYSKUSJA

Pełne wykorzystanie potencjału metod biotechnologicznych u szałwii wymaga dokładnego opracowania protokołów regeneracji roślin w kulturach tkankowych. W pracy własnej prowadzono badania nad optymalizacją warunków kultur *in vitro* zarówno na drodze organogenezy bezpośredniej, jak i pośredniej. W przypadku organogenezy bezpośredniej wybór zarówno pąków wierzchołkowych i bocznych oraz zastosowanie cytokininy BA lub mT w stężeniu 0,3 mg/l pozwoliło nie tylko na skuteczną regenerację roślin, ale również na efektywną mikropropagację. Doniesienia literaturowe potwierdzają użyteczność BA w namnażaniu szałwii. Przy zastosowaniu tej cytokininy uzyskano wysoki współczynnik rozmnażania (7,84) podczas 6-tygodniowej kultury (Gostin, 2008). Ponadto ten sam autor uzyskał wysoki poziom rozmnażania przy zastosowaniu kinetyny (KIN) wraz z auksyną NAA. Inne źródła podają użyteczność BA wraz i innymi roślinnymi regulatorami wzrostu: 2,4-D (Santos-Gomes i in., 2002) lub IAA (Grzegorzczak i Wysokińska, 2008). Aromatyczna cytokinina mT nie była dotychczas stosowana w mikropropagacji szałwii. Badania własne dowodzą, że stymuluje ona wydajnie proliferację pędów i może być alternatywą dla szeroko rozpowszechnionej cytokininy BA. W literaturze przedmiotu można znaleźć również prace na temat mikropropagacji innych gatunków z rodzaju *Salvia* jak *Salvia sclarea* (Liu i in., 2000), *Salvia fruticosa* (Arikat i in., 2004) czy *Salvia guaranitica* (Echeverrigaray i in., 2010). Zasadniczo w kulturach *in*

in vitro różnych roślin odrębny gatunek wymaga dostosowania warunków, głównie rodzaju i stężenia roślinnych regulatorów wzrostu.

W badaniach własnych nad organogenezą pośrednią rozeznano możliwości regeneracyjne szaławii z różnych eksplantatów wyjściowych oraz poszerzono wiedzę w zakresie indukcji tkanki kalusowej. Z literatury wynika, że prowadzone są również prace nad uzyskaniem morfogenego kalusa zdolnego do wydajnej regeneracji roślin (Tawfik i Mohamed, 2007). Niezwykle użyteczne w tym przypadku mogą być badania nad embriogenezą somatyczną szaławii (Kintzios i in., 1999). W pracy własnej bazowano również na wyżej wymienionych badaniach chcąc uzyskać regenerację dla polskiej odmiany szaławii lekarskiej 'Bona'. Zastosowanie zarówno tidiazuronu (TDZ) jak i 2,4-D w badaniach nad organogenezą pośrednią skutkowało inicjacją tkanki kalusowej, choć bez pojawiania się pędów przybyszowych. Komórki niezróżnicowane takie jak kalusa mogą jednak mieć również duży potencjał aplikacyjny w produkcji metabolitów wtórnych dla przemysłu farmaceutycznego czy spożywczego. W literaturze przedmiotu można znaleźć doniesienia, w których wykorzystywano kultury kalusa i kultury zawieszinowe szaławii w doświadczeniach nad możliwością kontrolowanej produkcji przeciwutleniaczy (Santos-Gomes i in., 2003; Ruffoni i in., 2009).

PODSUMOWANIE

W ramach doświadczeń opracowano skuteczną metodę sterylizacji nasion szaławii przy zastosowaniu 20% roztworu preparatu ACE przez 15 min. Procedura ta pozwoliła na uzyskanie zdrowych roślin macierzystych wymaganych do dalszych etapów pracy.

Opracowano procedurę efektywnego i cyklicznego rozmnażania roślin na drodze organogenezy bezpośredniej przy użyciu pożywki MS zawierającej BA lub mT w stężeniu 0,3 mg/l.

Ukorzenianie otrzymanych pędów i pełną regenerację roślin otrzymano przez zastosowanie pożywki ½ MS zawierającej IAA w stężeniu 0,3 mg/l. Zastosowanie IBA okazało się mniej efektywne.

Otrzymano również skuteczną indukcję tkanki kalusowej z eksplantatów szaławii hodowanych na pożywce MS zawierającej 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA oraz 1 mg/l chlorku adeniny. Podobne rezultaty uzyskano dla kultury liścieni prowadzonej w układzie dwóch pożywek MS I z dodatkiem 0,05 mg/l 2,4-D oraz 0,1 mg/l BA, a następnie MS II niezawierającej regulatorów wzrostu. Jednak namnażanie tkanki oraz wzbudzenie w niej właściwości morfogennych w obu przypadkach wymaga dalszego dopracowania warunków kultury. Zastosowanie pożywki Daria okazało się nieskuteczne do prawidłowej regeneracji szaławii na drodze organogenezy pośredniej.

LITERATURA

- Akhondzadeh S., Noroozian M., Mohammadi M., Ohadinia S., Jamshidi A. H., Khani M. 2003. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 28: 53 — 59.

- Arikat N. A., Jawad F. M., Karama N. S., Shibli R. A. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae* 100: 193 — 202.
- Avato P., Fortunato I. M., Ruta C., D'Elia R. 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science* 169: 29 — 36.
- Chalchat J. C., Michet A., Pasquier B. 1998. Study of Clones of *Salvia officinalis* L. Yields and Chemical Composition of Essential Oil. *Flavour And Fragrance Journal* 13: 68 — 70.
- Christensen K. B., Jørgensen M., Kotowska D., Petersen R. K., Kristiansen K., Christensen L. P. 2010. Activation of the nuclear receptor PPAR γ by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.) *Journal of Ethnopharmacology* 132, 1: 127 — 133.
- Echeverrigaray S., Postinger Carrer R., Bavaresco Andrade L. 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. *Brazilian Archives Of Biology And Technology* Vol. 53, n. 4: 883 — 888.
- El Hadri A., Gómez del Río M. Á., Sanz J., González-Coloma A., Idaomar M., Ribas-Ozonas B., Benedí González J., Sánchez-Reus M. I. 2010. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 76 (3): 343 — 356.
- Gostin I. 2008. Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated *in vitro*. *International Journal of Botany* 4 (4): 430 — 436.
- Grzegorzczak I., Wysokińska H. 2008. Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds; effect of triacntanol. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* Vol. 77, No. 2: 99 — 104.
- Grzegorzczak I., Matkowski A., Wysokińska H. 2007. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* 104: 536 — 541.
- Kintzios S., Nikolaou A., Skoula M. 1999. Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports* 18: 462 — 466.
- Lima C. F., Andrade P. B., Seabra R. M., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. 2005. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 383 — 389.
- Liu W., Chilcott C. E., Reich R. C., Hellmann G. M. 2000. Regeneration of *Salvia Sclarea* via organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36: 201–206.
- Malepszy S. 2009. *Biotechnologia roślin*. Wydaw. PWN, Warszawa.
- Ruffoni B., Raffi D., Rizzo A., Oleszek W., Giardi M. T., Bertoli A., Pistelli L. 2009. Establishment of *in vitro* *Salvia* cell biomass for the controlled production of antioxidant metabolites. *Acta Horticulturae* No. 829: 423 — 427.
- Santos-Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 1025 — 1032.
- Santos-Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 162: 981 — 987.
- Stanojević D., Čomić L., Stefanović O. 2010. Synergy between *Salvia officinalis* L. and some preservatives. *Cent. Eur. J. Biol.* 5 (4): 491 — 495.
- Szpitter A., Królicka A. 2005. Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia* 4 (71): 82 — 108.
- Tawfik A. A., Mohamed M. F. 2007. Regeneration of *Salvia* (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43: 21 — 27.
- Wielgus K., Luwańska A., Lassocinski W., Kaczmarek Z. 2008. Estimation of *Cannabis sativa* L. Tissue Culture Conditions Essential for Callus Induction and Plant Regeneration. *Journal of Natural Fibers* Volume: 5 Issue: 3 Pages: 199 — 207.
- Wysokińska H., Chmiel A. 2006. Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia* 4 (75): 124 — 135.