

ALEKSANDRA LUWAŃSKA¹**KAROLINA WIELGUS**¹**MARLENA SZALATA**²**MILENA SZALATA**¹**RYSZARD SŁOMSKI**²¹Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, Zakład Biotechnologii²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biotechnologii

Wpływ wybranych cytokinin na mikropropagację *Salvia officinalis**

The influence of selected cytokinins on micropropagation of *Salvia officinalis*

Szałwia lekarska (*Salvia officinalis*) jest rośliną o bardzo szerokich właściwościach leczniczych, wśród których najistotniejsze to działanie odkażające, przeciwzapalne i przeciwpotne. Wyciągi z szalwii regulują pracę układu pokarmowego, obniżają poziom cukru we krwi, a także są silnym lekiem antyseptycznym unieczyniającym toksyny bakteryjne oraz hamującym rozmnażanie wielu rodzajów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, także odpornych na antybiotyki. Swoje wszechstronne zastosowanie szalwia zawdzięcza olejki eterycznemu o złożonym składzie, zawierającym m.in. tujon, cyneol, kamforę, borneol i pinen. Oprócz tego występują w nim garbniki katechinowe, trójterpeny, flawonoidy, gorycze (karnozol), kwasy organiczne, a także witaminy B1, C, PP oraz karoteny. Techniki *in vitro* umożliwiają masowe namnażanie wyselekcjonowanych roślin o najlepszych parametrach leczniczych lub roślin o nowych cechach uzyskanych na drodze transformacji. Celem badań było określenie wpływu wybranych cytokinin na wydajność mikropropagacji szalwii. Materiał do badań stanowiły eksplantaty wierzchołkowe szalwii, odmiany Bona. Hodowlę prowadzono na pożywkach Murashige Skoog (MS), zawierających różne stężenie kinetyny, BAP oraz zeatyny (2, 5, 10 mg/l). Najlepszy współczynnik namnażania roślin otrzymano przy użyciu cytokininy BAP (3,5–3, w zależności od stężenia), jednak zbyt duży odsetek zwitryfikowanych roślin skłonił do obniżenia poziomu tego fitohormonu. Wydajność i stabilność mikropropagacji przy użyciu BAP w stężeniu 0,3 mg/l sprawdzono podczas długookresowej hodowli (do pokolenia n-6). Praca obejmuje również zastosowanie cytokininy meta-Topolina (mT) jako alternatywy do fitohormonu BAP. Najlepsze rezultaty w mikropropagacji szalwii uzyskano przy zastosowaniu pożywki modyfikowanej 0,3 mg/l BAP. Współczynnik namnażania w tym przypadku oscylował w granicach 2,4–3,4 w kolejnych cyklach namnożeńowych.

Słowa kluczowe: BAP, cytokininy, *in vitro*, mikropropagacja, szalwia

* Niniejsze badania prowadzone były w ramach projektu „Uzyskanie szalwii (*Salvia officinalis*) o właściwościach przeciwpółpróchnicznych” nr rej. 51/2007/GR uzyskanego przez Katedrę Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Common sage (*Salvia officinalis*) is a plant with a very wide range of healing properties, from which the most important are disinfecting, anti-inflammatory and antisudoral effects. Sage extracts regulate the digestive system and increase blood sugar level. They are also a strong antiseptic medicine which inactivates bacterial toxins and inhibits reproduction of many Gram-positive and Gram-negative bacteria, including the antibiotic-resistant ones. Sage owes its versatile properties to its essential oil composition containing among others thujone, cineole, camphor, borneol and pinene. Apart from the above, it also contains catechins, triterpene, flavonoids, carnosol and organic acids, vitamins B1, C, PP and carotene. Use of *in vitro* techniques enables mass propagation of selected plants with the best healing parameters or plants with new features gained through transformation. The aim of the study was the determination of the influence of selected cytokinins on micropropagation efficiency of *S. officinalis*. Materials for research were apical explants of sage cultivar Bona. The cultivation was conducted on the Murashige Skoog (MS) medium, containing different concentration of kinetin, BAP and zeatin (2, 5, 10 mg/ml). The best plant multiplication rate was obtained by using cytokinin BAP (3.5–3, depending on the concentration), however an excessive percentage of vitrified plants limited the use of this phytohormone. Effectiveness and stability of the micropropagation using BAP at concentration 0.3 mg/l was verified during long term cultivation (to n-6 subculture). The work also included use of cytokinin meta-Topolin as alternative for BAP phytohormone. The best results in the sage micropropagation process were obtained by the application of medium with 0.3 mg/l of BAP. In this case multiplication rate varies between 2.4 and 3.4 during the successive propagation cycles.

Key words: BAP, cytokinins, *in vitro*, micropropagation, sage

WSTĘP

Wzrost zainteresowania olejkami eterycznymi różnych roślin wskazuje na ich wysoki potencjał do zastosowań medycznych, spożywczych, kosmetycznych i farmaceutycznych (Kalemba i Kunicka, 2003). Z uwagi na skomplikowaną budowę wielu metabolitów wtórnych ich chemiczna synteza jest nie tylko trudna, ale i nieopłacalna ekonomicznie, stąd duże zapotrzebowanie na opracowanie metod namnażania roślin będących naturalnym źródłem cennych związków prozdrowotnych (Jasiński i in., 2006). Szałwia lekarska (*Salvia officinalis*) jest rośliną o bardzo szerokich właściwościach leczniczych, wśród których najistotniejsze to działanie odkażające, przeciwzapalne i przeciwpotne. Olejki eteryczne szalwii są silnym lekiem unieczynnającym toksyny bakteryjne oraz hamującym namnażanie wielu rodzajów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, także odpornych na antybiotyki (Viuda-Martos i in., 2008; Stanojevic i in., 2010). Swoje wszechstronne zastosowanie szalwia zawdzięcza złożonemu składowi olejków eterycznych, zawierających przede wszystkim tujon, cyneol, kamforę, a także borneol i pinen (Longaray Delamare i in., 2007; Langer i in., 1996). Oprócz tego występują w nim garbniki katechinowe, trójterpeny, flawonoidy, gorycze (karnozol), kwasy organiczne, jak również witaminy B1, C, PP oraz karoteny (Miura i in., 2001; Radulescu i in., 2004; Lu i Foo, 2000). Związki chemiczne, tj. karnozol, epirozmanol i karnozan metylu, występujące w szalwii posiadają właściwości antyoksydacyjne i odgrywają istotną rolę w profilaktyce wielu chorób cywilizacyjnych, jak: miażdżyca, cukrzyca, zaćma, choroba Parkinsona i choroba Alzheimerza (Grzegorzczak i in., 2007; Santos-Gomes i in., 2002; Szajdek i Borowska, 2004; Akhondzadeh i in., 2003).

Dzięki zastosowaniu technik *in vitro* możliwe jest masowe namnażanie wyselekcjonowanych roślin o najlepszych parametrach leczniczych lub roślin o nowych cechach

uzyskanych na drodze transformacji. Celem niniejszych badań było opracowanie efektywnej procedury mikropropagacji szałwii poprzez określenie wpływu wybranych cytokinin zwartych w pożywce na wydajność namnażania roślin. Kolejnym zadaniem w pracy było wykorzystanie meta-Topoliny (mT) do mikropropagacji szałwii w celu zwiększenia wydajności regeneracji i namnażania roślin drogą morfogenezy bezpośredniej pąków wierzchołkowych. Ta nowa aromatyczna cytokinina stymuluje proliferację pędów oraz wpływa na ukorzenianie roślin podczas aklimatyzacji i może być alternatywą dla szeroko rozpowszechnionej cytokininy BAP.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły eksplantaty wierzchołkowe szałwii, odmiany Bona. Eksplantaty wyjściowe pobrano z sterylnych roślin macierzystych, rosnących na pożywce Murashige Skoog (MS) zawierającej 1 mg/l kwasu giberelinowego i 0,04 mg/l kinetyny. Hodowlę właściwą prowadzono na pożywkach MS, zawierających różne stężenie kinetyny, BAP oraz zeatyny (2, 5, 10 mg/l). Ponadto przeprowadzono doświadczenia nad procesem prowadzącym do regeneracji i namnażania szałwii przy użyciu mniejszych ilości BAP (0,3 mg/l), a wyniki hodowli porównano z kulturą pąków wierzchołkowych hodowanych na pożywce z dodatkiem tej samej ilości mT. Eksperyment prowadzony był przez sześć tygodni i obejmował cotygodniowe obserwacje i pasaż na świeże medium. Każdy wariant doświadczenia obejmował 20 kolbek hodowlanych po 5 eksplantatów, co dawało łącznie skalę 100 eksplantatów na poszczególne doświadczenie. Jednym z najważniejszych parametrów określanym podczas hodowli był współczynnik namnażania określający liczbę pędów powstałych z jednego eksplantatu. Sprawdzone również zdolność namnażanych pędów do ukorzeniania stosując pożywkę ½ MS zawierającą 0,3 mg/l IAA. W ty przypadku skala doświadczenia wynosiła 160 eksplantatów.

WYNIKI

W badaniach nad procesem prowadzącym do regeneracji i namnażania szałwii z użyciem wysokich stężeń (2, 5, 10 mg/l) różnych cytokinin najlepszy współczynnik namnażania roślin otrzymano przy zastosowaniu cytokininy BAP (współczynnik namnażania wynosił 3–3,5, w zależności od stężenia). Przy zastosowanej skali doświadczenia pozwalało to uzyskać 300 do 350 roślin ze 100 eksplantatów w przeciągu 2 tygodni. Jednak hodowla z użyciem tak wysokich stężeń BAP prowadziła do powstania zbyt dużego odsetka zwitryfikowanych roślin, co skłoniło do obniżenia poziomu tego fitohormonu. Wyniki obserwacji kultur przedstawiono w tabeli 1.

Wydajność i stabilność mikropropagacji przy użyciu BAP w stężeniu 0,3 mg/l sprawdzona podczas długookresowej hodowli (do pokolenia n-6) okazała się najbardziej satysfakcjonująca. Współczynnik namnażania w tym przypadku oscylował w granicach 2,4–3,4 w kolejnych cyklach namnożeń (tab. 2). Istotnym faktem jest, iż podczas prowadzenia tej kultury odsetek roślin zwitryfikowanych wynosił od 0 do niespełna 16% w zależności od kolejnej prowadzonej subkultury.

Tabela 1

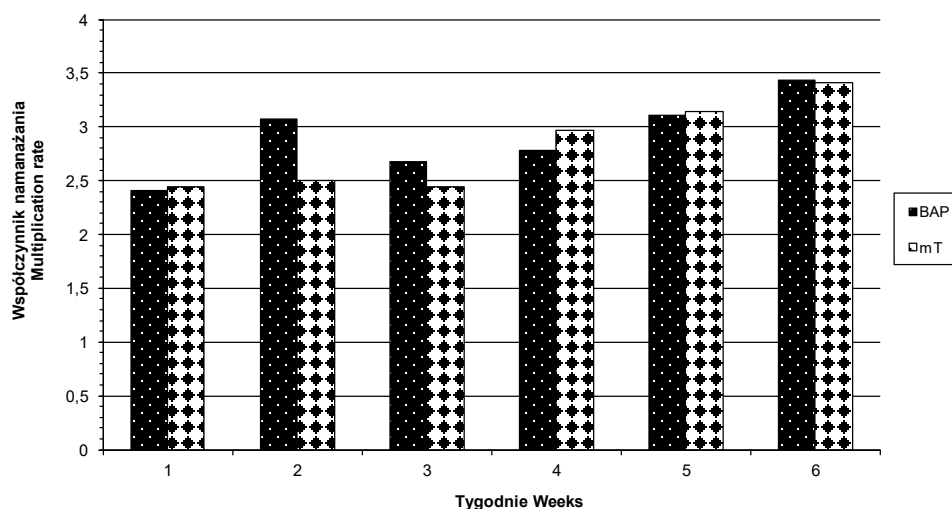
Dwutygodniowa hodowla *in vitro* szalwii na pożywce MS z zastosowaniem różnych cytokinin
Two-weeks-olds *in vitro* culture of sage on MS medium containing different cytokinins

Cytokininy — Cytokinins	KIN			BAP			ZEATYNA	
Stężenie — Concentration (mg/l)	2	5	10	2	5	10	5	10
Eksplantaty rosnące — Growing explants (%)	95	75	70	80	90	90	80	90
Eksplantaty zeszkłone — Vitrificated explants (%)	45	40	55	70	55	55	80	70
Eksplantaty obumarłe — Necrotic explants (%)	5	25	30	20	10	10	20	10
Współczynnik namnażania — Multiplication rate	2,08	1,96	1,96	3,5	3,36	3,04	2,4	2,12
Kalus — Callus	0	5	0	10	15	5	0	0

Tabela 2

Kultury *in vitro* szalwii na pożywce MS z dodatkiem 0,3 mg/l BAP
***In vitro* culture of sage on MS medium containing 0,3 mg/l BAP**

Subkultura (Tydzień) Subculture (Week)	Eksplantaty — Explants (%)					Współczynnik namnażenia Multiplication rate
	wytwarzające pąki creating buds or shoots	rosnące growing	zeszkłone vitrificated	zamierające necrotic	zanieczyszczone contaminated	
1	81,04	81,04	0	4,9	12,5	2,41
2	79,48	79,48	2,34	5,68	12,5	3,07
3	88,12	28,12	0	1,87	10	2,68
4	94,41	86,84	4,77	0,85	5,59	2,78
5	94,2	77,89	15,93	5,8	5,88	3,11
6	100	100	0	0	6,25	3,44



Rys. 1. Analiza porównawcza hodowli szalwii z użyciem BAP i mT
Fig. 1. Comparative analysis of cultivating sage with BAP and mT

W ramach prowadzonych doświadczeń nad efektywnością namnażania szalwii w kulturach *in vitro* przeprowadzono badania z zastosowaniem meta-Topoliny. Otrzymane

rezultaty hodowli z użyciem mT porównano z wynikami dotyczącymi zastosowania tej samej ilości BAP. Rezultaty analizy przedstawiono graficznie na rysunku 1. Wyniki mikropropagacji szałwii były wyrównane jednak nieco lepsze rezultaty w kondycji roślin podczas hodowli uzyskano przy zastosowaniu pożywki zawierającej 0,3 mg/l BAP.

Ukorzenianie pędów pochodzących z namnożenia na pożywce MS zawierającej 0,3 mg/l BAP wynosiło 75% po tygodniu hodowli oraz 87,5% po 2 tygodniach.

DYSKUSJA

W literaturze przedmiotu szeroko rozpatrywany aspekt wykorzystania olejków eterycznych szałwii coraz częściej znajduje swoje odzwierciedlenie w możliwości zastosowania metod biotechnologicznych do propagacji roślin warunkujących jego uzyskanie. Tym samym mikropropagacja otworzyła drogę do szybkiego pozyskiwania metabolitów wtórnych. Prowadzone były prace nad płynnymi kulturami pędów szałwii w celu namnożenia roślin będących źródłem antyoksydantów (Grzegorzczak i Wysokińska, 2008). Przeprowadzono również bardziej zaawansowane doświadczenia nad możliwością kontrolowanej produkcji przeciwutleniaczy w kulturach zawiesinowych szałwii (Ruffoni i in., 2009). Znaczącym jest również fakt, że olejki eteryczne pochodzące z roślin uzyskanych drogą mikropropagacji mogą posiadać zmieniony skład, niejednokrotnie wyższe stężenia niektórych składników (Avato i in., 2005). Zabiegi technologiczne stosowane podczas prowadzenia hodowli *in vitro* czy dodatek elicytorów może mieć znaczący wpływ na wzrost syntezy metabolitów wtórnych.

Mikropropagacja szałwii w warunkach *in vitro* uzależniona jest głównie od zastosowanej pożywki hodowlanej wraz z zawartością roślinnych hormonów wzrostu. W pracy własnej skupiono się na określeniu wpływu wybranych cytokinin — hormonów warunkujących znoszenie dominacji wierzchołkowej i umożliwiających rozwój pąków bocznych, a tym samym szybką propagację roślin. W innych doniesieniach określano wpływ różnych hormonów, zarówno z grupy cytokinin jak i auksyn, na hodowle *in vitro* *Salvia officinalis* (Gostin, 2008). 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 vitro* różnych roślin odrębny gatunek wymaga dostosowania warunków hodowli, głównie rodzaju i stężenia fitohormonów.

Możliwość szerokiego zastosowania substancji uzyskanych z szałwii lekarskiej powoduje wzrost zainteresowania perspektywą udoskonalania roślin za pomocą transformacji genetycznej. Transformowane korzenie *S. officinalis* wykorzystano do produkcji kwasu rozmarynowego, związku o działaniu przeciwutleniającym, przeciwzapalnym i antywirusowym (Wysokińska i Chmiel, 2006). Jednak w celu uzyskania roślin transgenicznych szałwii niezbędnym jest opracowanie protokołu regeneracji na drodze morfogenezy pośredniej. Prowadzone są prace nad uzyskaniem morfogenego kalusa zdolnego do wydajnej regeneracji roślin (Tawfik i Mohamed, 2007). Niezwykle użyteczne w tym przypadku mogą być również badania nad embriogenezą somatyczną szałwii

(Kintzios i in., 1999). Rozwój prac nad regeneracją i transformacją szalwii jest ściśle skorelowany z potrzebą jej namnażania metodą mikropropagacji.

WNIOSKI

1. Najlepsze rezultaty w mikropropagacji szalwii uzyskano przy zastosowaniu pożywki zawierającej 0,3 mg/l BAP. Współczynnik namnażania na tej pożywce, w kolejnych cyklach namnożeń, oscylował w granicach 2,4–3,4, a warunki hodowli gwarantowały prawidłowy rozwój roślin.
2. Cytokiny o wysokim stężeniu (2, 5, 10 mg/l kinetyny, BAP lub zeatyny) silnie indukowały rozwój pąków bocznych szalwii, prowadząc do szybkiego jej namnożenia, jednak u dużego odsetka powstałych roślin tkanki były zeszkolne.
3. Nie zaobserwowano znaczących różnic wpływu cytokinin BAP i mT na wydajność procesu mikropropagacji szalwii.

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 Sci.* 169: 29 — 36.
- Echeverrigaray S., Carrer R. P., Andrade L. B. 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol. 53, 4: 883 — 888.
- Gostin I. 2008. Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated in vitro. *Intern. J. Botany* 4 (4): 430 — 436.
- Grzegorzczak I., Matkowski A., Wysokińska H. 2007. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* 104: 536 — 541.
- Grzegorzczak I., Wysokińska H. 2008. Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds; effect of triacontanol. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* Vol. 77, No. 2: 99 — 104.
- Jasiński M., Banasiak J., Frankowska M., Figlerowicz M. 2006. Rośliny jako reaktory do produkcji biofarmaceutyków. *Biotechnologia* 3 (74): 56 — 66.
- Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813 — 829.
- 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.
- Langer R., Mechtler Ch., Jurenitsch J. 1996. Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: A Comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. *Phytochemical Analysis* Vol. 7: 289 — 293.
- 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.
- Longaray Delamare A. P., Moschen-Pistorello I. T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. *Food Chemistry* 100: 603 — 608.
- Lu Y., Foo L. Y. 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 55: 263 — 267.

- Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N. 2001. Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 58 1171 — 1175.
- Radulescu V., Chiliment S., Oprea E. 2004. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1027: 121 — 126.
- 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. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.) *Plant Sci.* 162: 981 — 987.
- Stanojevic D., Comic Lj., Stefanovic O., Solujic-Sukdolac S. 2010. In vitro synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives. *Archives of Biological Sciences*, ISSN 0354-4664 No. 62 (1): 167 — 173.
- Szajdek A., Borowska J. 2004. Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (41): 5 — 28.
- 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.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J. A. 2008. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 526 — 531.
- Wysokińska H., Chmiel A. 2006. Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia* 4 (75): 124 — 135.