



Mikrorozmnażanie *Salvia officinalis* L. z wierzchołków pędów

Izabela Grzegorzcyk, Halina Wysokińska

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytet Medyczny, Łódź

Micropropagation of *Salvia officinalis* L. by shoot tips

Summary

In this study, optimum conditions for the micropropagation of *Salvia officinalis* by shoot tips were determined. Shoot tips from five-week-old shoots grown in *in vitro* culture were used as explants. The explants were incubated on MS agar medium supplemented with 0.57 $\mu\text{mol/l}$ IAA and various concentrations of cytokinins (BAP, zeatin, TDZ or kinetin). The best results were obtained when BAP at the concentration of 2 $\mu\text{mol/l}$ was used as cytokinin. Under these conditions after 5 weeks more than 90% shoot tips formed axillary buds or shoots and almost 3 shoots per one explant were obtained. An average length of shoots was 2.5 cm. For root induction the most suitable was $\frac{1}{2}$ MS agar medium without growth regulators.

Key words:

Salvia officinalis L., micropropagation, shoot tips, cytokinins, auxins.

1. Wstęp

Szałwia lekarska (*Salvia officinalis* L.), bylina pochodząca z obszaru Morza Śródziemnego, tak jak wiele innych gatunków rodzaju *Salvia* (*Lamiaceae*), ma szerokie zastosowanie w medycynie oficjalnej i ludowej. Jako roślina lecznicza i przyprawowa była uprawiana już w starożytnej Grecji. Wyciąg z liści szalwii lekarskiej wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwpotne, żółciopędne, hipoglikemizujące (1-4). Hamuje wzrost wielu szczepów drobnoustrojów chorobotwórczych; dotyczy to przede wszystkim bakterii gramdodatnich (5,6), grzybów (7) i wirusów (8).

Adres do korespondencji

Halina Wysokińska,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź.

Redukuje nadmierną fermentację jelitową (9), laktację (10), zmniejsza przekrwienie błon śluzowych i skóry, działa rozkurczająco (11). Ekstrakt z liści szalwii wykazuje także silną aktywność antyoksydacyjną (12,13). Istnieją dowody na przeciwnowotworowe i przeciwmutagenne działanie metabolitów wtórnych występujących w tym gatunku (14,15).

Szałwia lekarska jest zamieszczona w *Farmakopei Polskiej V*, a także farmakopeach wielu innych krajów europejskich: Austrii, Niemiec, Czech, Holandii, Portugalii, Rumunii, Rosji, Szwajcarii, Jugosławii, Węgier (16). Liście tej rośliny mają zastosowanie nie tylko w medycynie, ale także w kosmetologii i w przemyśle spożywczym. Z badań fitochemicznych i biologicznych wynika, że za działanie farmakologiczne surowca odpowiedzialne są głównie: olejek eteryczny, di- i triterpeny, flawonoidy, fenolokwasy (di- i oligomery kwasu kawowego), garbniki (1).

Celem naszej pracy było opracowanie metody mikrorozmnażania szalwii lekarskiej. Zastosowano technikę mikropropagacji opartą na kulturach merystemów wierzchołkowych. Doświadczenia obejmowały określenie wpływu różnych cytokinin (6-benzylaminopuryny, zeatyny, kinetyny i tidiazuronu) na namnażanie pędów oraz auksyn (kwasu indolilo-3-octowego, kwasu indolilo-3-masłowego, kwasu naftylo-1-octowego) na ukorzenianie pędów *S. officinalis*. Dotychczas opublikowano dwa doniesienia na temat mikrorozmnażania tego gatunku (17,18). Eksplantatami w tych doświadczeniach były fragmenty pędów obejmujące pojedynczy węzeł z aseptycznie wyhodowanych 6-tygodniowych siewek (17) lub pąki szczytowe i boczne pobrane z roślin rosnących w gruncie (18). W pracy eksplantatami wyjściowymi były wierzchołki pędów uzyskane z 3-tygodniowych otrzymanych *in vitro* siewek.

Otrzymane kultury pędów oraz zregenerowane *in vitro* rośliny będą wykorzystywane dla pozyskiwania związków o działaniu antyoksydacyjnym: diterpenów (karnozolu, kwasu karnozolowego) oraz kwasu rozmarynowego (depsydu kwasu kawowego i kwasu α -hydroksydihydrokawowego).

2. Materiał i metody

Materiałem wyjściowym były nasiona *Salvia officinalis* L. otrzymane z Ogrodu Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Nasiona odkażano przez 15 minut w roztworze ACE (preparat handlowy) rozcieńczonym wodą destylowaną 1:4 v/v. Następnie płukano je trzykrotnie sterylną wodą (po 15 minut) i umieszczano na agarowym (0,7%) podłożu Murashige i Skooga (MS) (19) z kinetyną (0,1 $\mu\text{mol/l}$) i kwasem giberelinowym (2,9 $\mu\text{mol/l}$).

Wierzchołkowe części pędów (długości około 0,5 cm) z 3-tygodniowych siewek przenoszono na agarowe (0,7%) podłożo MS uzupełnione 0,57 $\mu\text{mol/l}$ kwasu indolilo-3-octowego (IAA) i 2 $\mu\text{mol/l}$ 6-benzylaminopuryny (BAP). Po pięciu tygodniach hodowli odcinano szczytowe części pędów i przenoszono je na świeże podłożo o tym samym składzie. Hodowla pędów była tak prowadzona przez 3 kolejne 5-ty-

godniowe pasaże w celu uzyskania odpowiedniej do rozpoczęcia badań liczbę eksplantatów. W pasażu czwartym wierzchołki pędów przeniesiono na podłoża MS zawierające 0,57 $\mu\text{mol/l}$ IAA i jedną z czterech cytokinin: BAP, TDZ (tidiazuron), zeatynę lub kinetynę w stężeniach: 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol/l}$. Po 5 tygodniach określano procent eksplantatów różnicujących pąki lub pędy boczne, średnią liczbę pąków i pędów bocznych utworzonych na jednym eksplantacie (współczynnik mnożenia) oraz długość namnożonych pędów i ich morfologię. Jako pąki określano struktury o długości $<0,5$ cm, a jako pędy – struktury o długości $\geq 0,5$ cm. Doświadczenie powtarzano trzykrotnie, a każda seria obejmowała 10-20 eksplantatów. Wyniki są średnią \pm błąd standardowy. Wyniki analizowano za pomocą programu komputerowego STATISTICA. Istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnimi określano za pomocą testu U Manna-Whitneya ($p \leq 0,05$)

W celu ukorzenia pędy przenoszono na agarowe podłoże MS bez regulatorów wzrostu, podłoże MS zawierające IAA (kwas indolilo-3-octowy), IBA (kwas indolilo-3-masłowy) lub NAA (kwas naftylo-1-octowy) oraz podłoże MS bez regulatorów z obniżoną do połowy zawartością makro- i mikroelementów ($\frac{1}{2}$ MS). Auksyny użyto w stężeniu 0,57 $\mu\text{mol/l}$. Po 4 tygodniach określano procent ukorzenionych pędów oraz liczbę i długość wytworzonych korzeni. Doświadczenia powtarzano dwukrotnie. Każda seria obejmowała 15-20 eksplantatów. Wyniki są średnią \pm błąd standardowy.

Wszystkie hodowle były prowadzone w fitotronie w temperaturze $26 \pm 2^\circ\text{C}$, przy wilgotności 80-90% i ciągłym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi o natężeniu $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ukorzenione pędy przenoszono do doniczek zawierających wysterylizowaną mieszaninę piasku, torfu i ziemi ogrodniczej (3:3:4 v/v/v). Doniczki umieszczano w pokoju wzrostowym w temp. $26 \pm 2^\circ\text{C}$, przy naturalnym oświetleniu.

3. Wyniki i dyskusja

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że procent eksplantatów (wierzchołków pędów) wytwarzających pędy oraz liczba pędów uzyskanych z jednego eksplantatu zależą od rodzaju i stężenia cytokininy. Najlepszym podłożem do namnażania pędów *S. officinalis* okazało się podłoże MS uzupełnione IAA w stężeniu 0,57 $\mu\text{mol/l}$ oraz BAP w stężeniu 2 $\mu\text{mol/l}$. W tych warunkach po pięciodniowym okresie wzrostu prawie 93% eksplantatów wytworzyło pąki lub pędy boczne (tab. 1), a z jednego wierzchołka otrzymano średnio prawie 3 pędy boczne o średniej długości 2,5 cm (z 3-4 węzłami). BAP okazał się także najlepszą cytokininą przy namnażaniu pędów innych gatunków szalwii, tj. *S. canariensis* L. (20), *S. sclarea* (21,22) oraz *S. splendens* (22). Uzyskany w naszej pracy współczynnik mnożenia był znacznie wyższy w porównaniu ze współczynnikami uzyskanymi przez Olszowską i Furmanową dla mikrorozmnażania szalwii lekarskiej (18). Autorki stosując pożywkę Nitscha i Nitscha z IAA: 0,1 lub 1 mg/l (0,57 lub 5,7 $\mu\text{mol/l}$) i kinetyną: 0-1,2 mg/l (0-5,5 $\mu\text{mol/l}$)

po 5 tygodniach hodowli uzyskiwały z 1 węzła pojedynczy pęd długości 1 cm z 3-4 węzłami. Nasze wyniki są zbliżone do rezultatów uzyskanych przez Santos-Gomes i wsp. (17,23), którzy z fragmentu pędu *Salvia officinalis* obejmującego pojedynczy węzeł uzyskali ponad 3 nowe pędy na podłożu MS zawierającym 0,05 mg/l (0,23 $\mu\text{mol/l}$) 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) i 1,5 mg/l (6,5 $\mu\text{mol/l}$) BAP. Z naszych doświadczeń wynika jednak, że zwiększenie stężenia BAP (już do 4 $\mu\text{mol/l}$) obniżało zarówno procent eksplantatów dających odpowiedź jak i współczynnik mnożenia oraz hamowało wydłużanie pędów (różnica istotna statystycznie przy $p < 0,05$). Zaobserwowano również, że wzrost stężenia BAP zwiększył intensywność tworzenia się tkanki kalusowej u podstawy eksplantatu, chociaż kalus w tym miejscu powstawał także w obecności innych kombinacji regulatorów wzrostu. Prece i wsp. (24) utrzymują, że wytwarzanie kalusa u podstawy eksplantatów występuje szczególnie często w obecności auksyn u gatunków z silną dominacją wierzchołkową. Mark i Simpson (25) sugerują, że proces ten może mieć związek z akumulacją w tym miejscu auksyn, które silnie stymulują proliferację komórek, zwłaszcza w obecności wysokich stężeń cytokinin. Stwierdzono, że kalus *S. officinalis* powstały na podłożach z wyższymi stężeniami BAP wykazywał zdolność do organogenezy i tworzenia pąków przybyszowych; przy stężeniu BAP 16 $\mu\text{mol/l}$ ponad 40% eksplantatów tworzyło kalus regenerujący pąki przybyszowe w liczbie ponad 3 na kalus. Jednak otrzymane pąki w większości (ponad 95%) były bardzo drobne, szkliste i nie można ich było wykorzystać do dalszego namnażania ani ukorzeniania. W dalszych badaniach zamierzamy dla elongacji uzyskanych pąków przybyszowych wprowadzać do podłoża kwas giberelinowy (GA_3), który zgodnie z badaniami Olszowskiej i Furmanowej (18) powodował zwiększenie długości pędów *S. officinalis*, kiedy został użyty w stężeniu 0,005 mg/l (0,014 $\mu\text{mol/l}$).

Inne cytokininy (kinetyna, zeatyna, TDZ) okazały się mniej efektywne dla namnażania pędów bocznych *S. officinalis* (tab. 1). W obecności kinetyny użytej w optymalnym stężeniu 16 $\mu\text{mol/l}$ 75% eksplantatów tworzyło pąki lub pędy boczne, a ich średnia liczba na eksplantat wynosiła 1,7. Jeszcze niższy współczynnik proliferacji uzyskano w przypadku zastosowania zeatyny. W tych warunkach maksymalnie 23% eksplantatów rozwijało 1-2 pędów bocznych. Pędy osiągały długość do 2,5 cm i miały średnio 3, 4 węzły.

Tabela 1

Wpływ cytokinin na namnażanie i wzrost pędów *S. officinalis* L.

Cytokina (μmol/l)	Liczba eksplantatów	Eksplantaty tworzące pąki lub pędy boczne (%)	Średnia liczba pąków lub pędów bocznych	Średnia długość pędów (cm)	Pędy (pąki boczne szkliste) (%)
BAP					
1	47	68,09	1,9 ± 0,026 ^{adg*}	1,3 ± 0,013 ^{a*}	10
2	55	92,73	2,9 ± 0,035 ^b	2,5 ± 0,017 ^b	0
4	54	74,07	2,0 ± 0,033 ^{ad}	1,3 ± 0,013 ^a	6,02
8	34	73,53	3,0 ± 0,066 ^{bh}	1,1 ± 0,027 ^c	42,67
16	35	60	2,3 ± 0,068 ^{abed}	0,8 ± 0,008 ^c	46,94
kinetyna					
1	35	20	1,3 ± 0,07 ^{dei}	1,8 ± 0,029 ^d	0
2	34	35,29	1,1 ± 0,024 ^{ce}	1,7 ± 0,031 ^{ad}	0
4	35	45,71	1,4 ± 0,039 ^{cef}	2,5 ± 0,038 ^b	4,55
8	35	45,71	1,7 ± 0,055 ^{afei}	2,1 ± 0,027 ^b	0
16	35	74,29	1,7 ± 0,028 ^{aef}	2,2 ± 0,033 ^b	2,27
zeatyna					
1	35	11,43	1,0 ± 0,0 ^{ce}	1,5 ± 0,025 ^a	0
2	35	0	0	1,3 ± 0,019 ^a	0
4	35	11,43	1,0 ± 0,0 ^{ce}	1,8 ± 0,035 ^d	0
8	34	17,65	1,2 ± 0,068 ^{cefg}	2,3 ± 0,04 ^b	0
16	35	22,86	1,3 ± 0,058 ^{cefg}	2,2 ± 0,036 ^d	0
TDZ					
1	34	26,47	1,3 ± 0,056 ^{cdf}	1,9 ± 0,046 ^a	25
2	34	38,24	2,5 ± 0,11 ^{ab}	2,0 ± 0,058 ^a	33,33
4	34	26,47	2,1 ± 0,087 ^{ab}	0,8 ± 0,016 ^c	10,53
08	34	32,35	2,0 ± 0,099 ^{adfh}	1,1 ± 0,029 ^c	50
16	34	29,41	1,4 ± 0,05 ^{afgj}	0,8 ± 0,012 ^c	21,43

Pędy hodowano na agarowym podłożu MS zawierającym IAA (0,57 μmol/l). Okres wzrostu wynosił 5 tygodni.

* Średnie oznaczone tą samą literą (w obrębie poszczególnych kolumn) nie różnią się istotnie wg testu U Manna-Whitneya, przy 5% poziomie istotności.

Niekorzystna okazała się obecność TDZ w podłożu do namnażania *S. officinalis* (tab. 1). Ta pochodna mocznika jest najczęściej stosowana w mikropropagacji drzew liściastych (26), chociaż niektórzy badacze polecają TDZ także do namnażania roślin zielnych (27). W naszym doświadczeniu dodatek tej cytokininy powodował w dużym stopniu (53-83%) powstawanie u podstawy eksplantatu kalusa, który miał zdolność do regeneracji pąków przybyszowych (z jednego kalusa otrzymano 6-11 pąków przybyszowych). Zregenerowane pąki wykazywały duże zmiany w morfologii (szklistość, zrastanie), co dyskwalifikowało je jako materiał do dalszego namnażania.

Uzyskane pędy boczne dalej namnażano lub przeznaczano do ukorzenia. Dla ukorzenia *S. officinalis* stosowano podłoże MS zawierające auksyny (IAA, NAA, IBA) i pozbawione regulatorów wzrostu. Korzenie zaczynały się tworzyć głównie w drugim tygodniu hodowli. Stwierdzono, że auksyna stymuluje tworzenie korzeni (tab. 2). Na podłożu MS zawierającym IAA lub NAA podczas 4-tygodniowej hodowli ukorzeniało się dwukrotnie więcej pędów niż na podłożu bez regulatorów wzrostu. Auksyny obniżały jednak liczbę wytwarzanych korzeni (tab. 2). Ponadto dodatek IBA opóźniał proces indukcji korzeni. Na podłożu z tą auksyną prawie połowa pędów tworzyła korzenie dopiero w czwartym tygodniu hodowli. Najlepsze dla ukorzenia okazało się podłoże MS ze zmniejszoną do połowy zawartością makro- i mikroelementów ($\frac{1}{2}$ MS). W tych warunkach po czterech tygodniach ukorzeniało się około 74% pędów. Z jednego pędu powstało średnio 3,7 korzeni, a ich średnia długość wynosiła 23,1 mm. Z danych literaturowych wynika, że podłoże MS z obniżoną zawartością makro- i mikroelementów było z powodzeniem wykorzystywane dla ukorzenia pędów innych przedstawicieli rodziny *Lamiaceae* np. *Coleus forskohlii* (28), *Lavandula vera* (29) czy *L. latifolia* (30).

Tabela 2

Ukorzenie zregenerowanych *in vitro* pędów *S. officinalis* L.

Podłoże	Regulatory wzrostu	Liczba pędów	Pędy tworzące korzenie (%)	Średnia liczba korzeni na pęd	Średnia długość korzeni (mm)
MS	–	32	28,13	4,2 ± 0,38	21,8 ± 1,42
MS	IAA*	33	54,55	3,2 ± 0,14	17,7 ± 0,62
MS	NAA*	35	57,14	2,2 ± 0,11	14,6 ± 0,25
MS	IBA*	32	43,75	2,6 ± 0,11	21,7 ± 0,97
1/2MS	–	42	73,81	3,7 ± 0,07	23,1 ± 0,38

* – stężenie auksyny 0,57 $\mu\text{mol/l}$. Okres hodowli 4 tygodnie.

Ukorzone rośliny przenoszono do doniczek z ziemią (zob. rozdz. 2). Rośliny bardzo dobrze się aklimatyzowały. Po dziesięciu tygodniach wzrostu współczynnik przeżywalności wynosił ponad 95%.

Praca finansowana przez UM w Łodzi w ramach działalności statutowej nr 503-312-1.

Literatura

1. Kohlmünzer S., (1998), *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa.
2. Fluck H., (1988), *Medicinal Plants*, W. Foulsham & Co. Ltd., New York.
3. Kędzia B., i wsp., (1990), *Herba Pol.*, 36 (4), 155.

4. Essway G. S., Sobhhy H. M., Banna H. A., (1995), *Veterinary Medical Journal Giza*, 43 (2), 167-172.
5. Farag R. S., Daw Z. Y., Hewedi F. M., El-Baroty G. S. A., (1989), *Journal of Food Protection*, 52 (9), 665-667.
6. Maruzzella J. C., Henry P. A., (1958), *J Am Pharm Assoc Sci*, 47, 294-296.
7. Thompson D. P., Cannon C., (1986), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 527-532.
8. Tada M., Okuno K., Chiba K., Ohnishi E., Yoshii T., (1994), *Phytochemistry*, 35 (2), 539-541.
9. Evans W. C., (1989), *Trease and Evans, Pharmacognosy*, 13th ed., Balliere Tindall, London, Philadelphia.
10. Leung A. Y., (1980), *Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in food, drugs and cosmetics*, 1st ed., John Wiley, New York.
11. Taddei I., Giachetti D., Taddei E., Mantovani P., Bianchi E., (1988), *Fitoterapia*, 59 (6), 463-468.
12. Cuvelier M. E., Berset C., Richard H., (1994), *J. Agric. Food Chem.*, 42, 665-669.
13. Schwarz K., Ternes W., (1992), *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 95-98.
14. Tokuda H., Onigashi H., Koshimizu K., (1986), *Cancer Letters*, 33, 279-285.
15. Simic D., Vukovic-Gacic B., Knezevic-Vukcevic J., Trninic S., Jankov R. M., (1997), *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 16 (4), 293-301.
16. Kintzios S. E., (2000), *Sage: The Genus Salvia*, Ed. Kintzios S.E., Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
17. Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2260-2266.
18. Olszowska M., Furmanowa M., (1990), *Planta Med.*, 56, 637.
19. Murashige T., Skoog F. A., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
20. Molina S. M., Luis J. M. A., Luis J. G., (1997), *Actae Societatis Botanicorum Poloniae*, 66, 351-354.
21. Liu W., Chilcott C. E., Reich R. C., Hellmann G. M., (2000), *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36, 201-206.
22. Skala E., Wysokińska H., (2001), *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Horticultura*, vol. IX, Supplementum, 319-325.
23. Santos-Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M., (2002), *Plant Sci.*, 162, 981-987.
24. Preece J. E., Hutterman C. A., Ashby W. C., Roth P. L., (1991), *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, 116, 142-148.
25. Marks T. R., Simpson S. E., (1994), *J. Hortic. Sci.*, 69, 543-551.
26. Hutteman C. A., McGlew S. P., Hachett G., (1996), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44, 195-204.
27. Hutchinson M. J., Kristinawaj S., Saxena P. K., (1996), *Int. J. Plant Sci.*, 157, 440-443.
28. Sairam Reddy P., Rodrigues R., Rajasekharan R., (2001), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 66, 183-188.
29. Andrade L. B., Echevrigaray S., Fracaro F., Pauletti G. F., Rota L., (1999), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 56, 79-83.
30. Sanchez-Gras M. C., Calvo M. C., (1996), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 45, 259-261.