
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. IX, SUPPLEMENTUM

SECTIO EEE

2001

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Łodzi

EWA SKAŁA, HALINA WYSOKIŃSKA

**Mikrorozmnażanie *Salvia sclarea* L.
i *Salvia splendens* Ker.-Gawl.**

Micropropagation of *Salvia sclarea* L. and *Salvia splendens* Ker.-Gawl.

Szałwia muskatołowa (*Salvia sclarea* L.) i szalwia błyszcząca (*Salvia splendens* Ker.-Gawl.) to rośliny zielne należące do rodzaju *Salvia* (Lamiaceae), obejmującego około 500 gatunków. Są to rośliny lecznicze, stosowane w medycynie oficjalnej i ludowej. Ze względu na obecność m. in. olejku eterycznego, goryczy, diterpenów, seskwiterpenów i garbników mają działanie przeciwpalne, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (Ryu i in., 1997). Zawarte w korzeniu *S. sclarea* L. diterpeny (sklareol, manol, 2,3-dehydrosalwipison) oraz seskwiterpeny (spatulanol, tlenek kariofylenu) wykazują silną aktywność wobec *Staphylococcus aureus*; ponadto 2,3-dehydrosalwipison jest związkiem o działaniu przeciwgrzybiczym (Ulubelen i in., 1994). Z dotychczasowych badań fitochemicznych wynika, że liście i kwiaty *S. splendens* Ker.-Gawl. zawierają związki diterpenowe: splenolid A, B, C (Hu i in., 1997), salwiarynę (Savona i in., 1978) i splendidynę (Savona i in., 1979). Związki te nie były badane pod względem farmakologicznym.

S. sclarea L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. w Polsce nie występują. Szalwie muskatołową w stanie naturalnym można spotkać w krajach śródziemnomorskich, a szalwia błyszcząca pochodzi z Brazylii.

Aby otrzymać materiał do badań fitochemicznych, podjęto próbę opracowania warunków dla rozmnażania *S. sclarea* L. i *S. splendens*

Ker.-Gawl., metodą *in vitro*, z tkanek merystematycznych (wierzchołki pędów).

MATERIAŁ I METODA

Materiałem wyjściowym były nasiona *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. otrzymane z Ogrodu Roślin Lecznicznych Akademii Medycznej w Łodzi. Nasiona odkażano w 2% podchlorynie sodu przez 10 minut, a następnie płukano je trzykrotnie (po 15 min.) w sterylnej wodzie i umieszczano na agarowym podłożu (0,7%) Murashige i Skooga (MS) (Murashige i Skoog, 1962) bez regulatorów wzrostu (dla *S. sclarea* L.) lub z dodatkiem kwasu giberelinowego-GA3 ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i kinetyny-KIN ($0,02 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (nasiona *S. splendens* Ker.-Gawl.). Z 5 tygodniowych siewek pobierano wierzchołkowe części pędów (długości 0,5 cm) i przenoszono na agarowe (0,7%) podłoże MS.

Dla *S. sclarea* L. zastosowano podłoże MS uzupełnione IAA (kwas indolilo-3-octowy) w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz BAP (6-benzyloaminopuryna) w stężeniu 1 i $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ lub TDZ (tidiazuron) w stężeniu 0,2 i $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Okres hodowli wynosił 5 tygodni. Po tym czasie odcinano szczytowe części pędów i umieszczano ponownie na podłożu MS (warunki, jak wyżej). Określano współczynnik mnożenia (tj. średnią liczbę pąków i pędów utworzonych na 1 eksplantacie podczas 5 tygodniowej hodowli). Jako pąki określano struktury o długości $< 0,5 \text{ cm}$, a za pędy przyjęto struktury długości powyżej 0,5 cm. Określano również długość namnożonych pędów. Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Są one średnią z 20 eksplantatów. Celem ukorzenienia pędy (około 2 cm długości) przenoszono pojedynczo na agarowe podłoże MS bez regulatorów wzrostu. Po 4 tygodniach określono % ukorzenionych pędów oraz długość korzeni.

W przypadku *S. splendens* Ker.-Gawl. pobrane z siewek wierzchołki pędów (0,5 cm długości) umieszczano na agarowym podłożu MS z dodatkiem IAA ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i BAP ($1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W tych warunkach kultury prowadzono przez dwa, 5 tygodniowe pasáže. W następnych pasażach dla namnażania pędów stosowano podłoże Linsmayera i Skooga (LS) (Linsmayer i Skoog, 1965) uzupełnione IAA w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jako cytokininy użyto BAP, TDZ lub KIN, w stężeniach $0,5\text{--}2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (tab. 2). Zbadano wpływ tych cytokin na namnażanie pąków i pędów oraz na długość uzyskanych pędów. Doświadczenie powtarzano 4-krotnie, przy czym każda seria zawierała 7-10 eksplantatów. Po 5 tygodniach, pędy (długości 2 cm) przenoszono na agarowe podłoże LS bez regulatorów wzrostu, w celu ukorzenienia.

Hodowle *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. prowadzono w fitotronie w temperaturze $26 \pm 2^\circ\text{C}$, przy wilgotności 80-90% i stałym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi o natężeniu 2500 lux.

Ukorzenione pędy przenoszono do doniczek zawierających wysterylizowaną mieszaninę piasku, torfu i ziemi ogrodowej (3:3:4). Doniczki umieszczano w fitotronie w temperaturze $26 \pm 2^\circ\text{C}$, przy ciągłym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi.

WYNIKI

Namnażanie i wzrost pędów. Dla proliferacji pędów *S. sclarea* L. najlepsze okazało się podłoże MS wzbogacone IAA w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz BAP w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. W tych warunkach około 80% eksplantatów rozkrzewiało się i wytwarzało pędy boczne (tab. 1). Po 5 tygodniach z 1 wierzchołka pędu otrzymano średnio prawie 4 pędy. Zwiększenie stężenia BAP (do $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) nie wpływało na % eksplantatów zdolnych do wytwarzania pędów bocznych, obniżało natomiast nieznacznie współczynnik mnożenia, który w tych warunkach wynosił 3. Podobne wartości współczynników mnożenia uzyskano po zastosowaniu TDZ w stężeniu $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. W obecności tej cytokininy 83% eksplantatów różnicowało średnio 3,4 pędy z 1 pędu wyjściowego. Nowe pędy tworzyły się również na kalusie u podstawy pędu wyjściowego. W ten sposób otrzymano dodatkowo 2-3 pędy przybyszowe na 70-80% eksplantatów. Podłoże MS zawierające BAP lub TDZ było odpowiednie również dla wzrostu pędów. Średnia ich długość wahała się od 1 cm (w obecności $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP) do prawie 2 cm (TDZ $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ lub $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (tab. 1). Jednak TDZ w obu zastosowanych stężeniach powodował często zjawisko szklistości (pędy miały zdeformowane, duże, grube, kruche liście).

Biorąc pod uwagę, zarówno, liczbę namnożonych pędów, jak i ich morfologię można stwierdzić, że lepsze dla namnażania pędów *S. sclarea* L. są podłoża zawierające jako cytokininę BAP.

Tab. 1. Wpływ BAP i TDZ na namnażanie i wzrost pędów *S. sclarea* L.Pożywka MS z IAA w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Okres wzrostu: 5 tygodniEffect of BAP and TDZ on shoot proliferation and shoot development of *S. sclarea* L.MS medium supplemented with IAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Time of culture: 5 weeks

Cytokinina ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Liczba eksplantatów	% eksplantatów różnicujących pąki i pędy boczne	Współczynnik mnożenia*	Średnia długość pędu (cm)
Cytokinin ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Number of explants	% of explants developing buds and shoots	Multiplication rate	Average length of shoots (cm)
BAP 1,0	20	80,0	3,6	1,3
BAP 2,0	20	79,0	3,0	1,0
TDZ 0,2	20	81,5	2,1	1,9
TDZ 0,5	20	83,2	3,4	1,8

* współczynnik mnożenia (średnia liczba pąków i pędów zregenerowanych na jednym eksplantacie podczas 5 tygodniowej hodowli)

multiplication rate (average number of buds and shoots per explant after 5 weeks of culture)

Namnażanie pędów *S. splendens* Ker.-Gawl. próbowano prowadzić na dwóch podłożach MS i LS. Jednak proliferację pędów uzyskano jedynie na pożywce LS. Z trzech zastosowanych cytokinin (BAP, TDZ i KIN) najbardziej efektywną dla rozkrzewiania pędów okazała się BAP. Po zastosowaniu tej cytokininy w stężeniach 0,5-1,5 mg·dm⁻³ współczynnik mnożenia wynosił ok. 4, a średnia długość uzyskanych pędów 2-2,5 cm (tab. 2). Zwiększenie stężenia BAP do 2 mg·dm⁻³ obniżało nieznacznie % eksplantatów tworzących pąki i pędy oraz długość uzyskanych pędów. Pędy *S. splendens* Ker.-Gawl. hodowane w obecności TDZ wykazywały również, podobnie jak w przypadku *S. sclarea* L., zjawisko szklistości. Cytokina ta obniżała również współczynnik mnożenia (tab. 2). Doświadczenia przeprowadzone z kinetyną wykazały, że cytokina ta powoduje głównie elongację pędu wyjściowego z jednoczesną jego ryzogenezą. Po 5 tygodniach długość pędu przekraczała nawet 4 cm (tab. 2).

Ukorzenianie i aklimatyzacja roślin. Uzyskane pędy *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. można wykorzystać do dalszego namnażania lub ukorzeniania na agarowych podłożach bez regulatorów wzrostu. Dla *S. sclarea* L. do ukorzeniania wykorzystano podłoże MS. W tych warunkach po 4 tygo-

Tab. 2. Wpływ cytokinin na namnażanie i wzrost pędów *S. splendens* Ker.-Gawl.

Pożywka LS z IAA w stężeniu 0,1 mg·dm⁻³. Okres wzrostu: 5 tygodni

Effect of cytokinins on shoot proliferation and shoot development of *S. splendens* Ker.-Gawl.. LS medium supplemented with IAA (0.1 mg·dm⁻³). Time of culture: 5 weeks

Cytokina	Liczba	% eksplantatów	Współczynnik	Średnia długość
(mg·dm ⁻³)	eksplantatów	tworzących	mnożenia	pędu (cm)
Cytokinin	Number	% of explants developing	Multiplication	Average length
(mg·dm ⁻³)	of explants	buds and shoots	rate	of shoots (cm)
BAP 0,5	28	91,5	4,3	2,5
BAP 1,0	28	91,0	4,0	2,0
BAP 1,5	33	93,0	4,2	2,6
BAP 2,0	36	86,5	3,8	1,8
TDZ 0,5	29	72,4	2,2	1,6
TDZ 1,0	26	77,0	3,1	1,7
TDZ 1,5	28	88,5	2,2	1,7
TDZ 2,0	32	68,8	2,0	1,4
KIN 0,5	29	31,0	1,6	4,3
KIN 1,0	33	54,5	1,6	3,5
KIN 1,5	29	65,5	2,1	3,0
KIN 2,0	31	72,4	1,8	2,5

dniach ukorzeniło się około 90% pędów. Średnia długość korzeni wynosiła około 4 cm. Dla ukorzeniania pędów *S. splendens* Ker.-Gawl. zastosowano pożywkę LS. Na tym podłożu w ciągu 4 tygodni 72% pędów wytwarzało korzenie długości około 3,5 cm. Ukorzenione pędy przenoszono do doniczek. Uzyskane metodą *in vitro* rośliny dobrze się aklimatyzowały. W przypadku *S. splendens* Ker.-Gawl. (roślina jednoroczna) rośliny doprowadzono do kwitnienia; po 6 tygodniach przebywania w glebie zakwitło 80% roślin.

DYSKUSJA

W dostępnym piśmiennictwie brak informacji dotyczących mikrorozmnażania *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl.. Rozmnażanie techniką *in vitro* przeprowadzono dotychczas dla trzech gatunków *Salvia* (*S. miltiorrhiza* Bunge, *S. officinalis* L. i *S. canariensis* L.) (Morimoto i in., 1994; Olszowska i Furmanowa, 1990; Mederos i Luis, 1997).

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. można namnażać z wierzchołków pędów. Liczba uzyskanych pędów zależała od rodzaju pożywki i od dodanej do podłoża cytokininy. Dla *S. sclarea* L. najlepsze wyniki uzyskano stosując podłoże MS. Pożywka ta była odpowiednia również dla namnażania pędów niektórych innych gatunków *Salvia*: *S. canariensis* L. (Mederos i Luis, 1997) i *S. miltiorrhiza* Bunge (Morimoto i in., 1994). W przypadku *S. canariensis* L., aby osiągnąć wysoki współczynnik mnożenia, w pożywce MS obniżano zawartość NH_4NO_3 do $825 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Mederos i Luis, 1997). Dla *S. splendens* Ker.-Gawl. podłoże MS okazało się nieodpowiednie. Większość wierzchołków pędów umieszczonych na tej pożywce ciemniało i obumierało, dlatego w tym przypadku namnażanie pędów prowadzono na podłożu LS. Pożywkę uzupełniano IAA ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i cytokinina.

Najwyższe współczynniki mnożenia 3,6 (dla *S. sclarea* L.) i 4,3 (dla *S. splendens* Ker.-Gawl.) osiągnięto w obecności BAP. Uzyskane pędy nie były zmienione morfologicznie, miały długość około 2 cm i normalnie wykształcone liście. Jednak uzyskane przez nas wartości współczynników mnożenia były znacznie niższe od tych otrzymanych dla *S. canariensis* L., która była również hodowana w obecności BAP ($0,02 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W tym przypadku współczynnik mnożenia wynosił 25 (Mederos i Luis, 1997).

Inne przebadane przez nas cytokininy okazały się mniej efektywne dla mikrorozmnażania. TDZ powodowało niekorzystne zmiany w morfologii pę-

dów obu badanych gatunków szalwi. Otrzymane w tych warunkach pędy charakteryzowały się szklistością, miały zdeformowane liście, co dyskwalifikowało je jako materiał do dalszego namnażania. Natomiast kinetyna powodowała zazwyczaj elongację pędu wyjściowego. Z badań innych autorów wynika, że cytokinina ta była również niekorzystna dla proliferacji pędów *S. officinalis* L. (Olszowska i Furmanowa, 1990) i *S. canariensis* L. (Mederos i Luis, 1997). Z drugiej strony, dobre wyniki uzyskano przy zastosowaniu KIN dla namnażania *S. miltiorrhiza* Bunge (współczynnik mnożenia wynosił 8,8) (Morimoto i in., 1994).

Jak wykazały nasze badania pędy *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. były zdolne do ukorzeniania na podłożach bez regulatorów wzrostu.

Opisana procedura umożliwia uzyskanie roślin *S. sclarea* L. i *S. splendens* Ker.-Gawl. z tkanek merystematycznych, co pozwala na uniknięcie zmienności somaklonalnej, która często występuje przy regeneracji roślin z kalusa.

WNIOSKI

1. Dla namnażania pędów *S. sclarea* L. odpowiednią pożywką jest pożywka MS; natomiast proliferację pędów *S. splendens* Ker.-Gawl. uzyskano stosując podłoże LS. Oba podłoża uzupełniano IAA w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

2. Liczba uzyskanych pędów zależała od rodzaju cytokininy w podłożu. Najlepsze współczynniki mnożenia (3,6 dla *S. sclarea* L. i 4,3 dla *S. splendens* Ker.-Gawl.) uzyskano w obecności BAP ($0,5\text{--}2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

3. Uzyskane pędy wykazywały zdolność do ukorzeniania na podłożach bez regulatorów wzrostu, a otrzymane rośliny łatwo aklimatyzowały się po przeniesieniu do gleby.

PIŚMIENICTWO

- Hu D.-P., Kawazoe K., Takaishi Y., 1997. Diterpenoids from *Salvia splendens*. Phytochemistry, 46: 781-784.
- Linsmayer E. M., Skoog F., 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18: 100-127.
- Mederos M. S., Luis J. G., 1997. *In vitro* mass propagation of *Salvia canariensis* by axillary shoots. Acta Soc. Bot. Polon., 66: 351-354.
- Morimoto S., Goto Y., Shoyama Y., 1994. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. J. Nat. Prod., 57: 817-823.

- Murashige J., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Olszowska O., Furmanowa M., 1990. Micropropagation of *Salvia officinalis* by shoot buds. *Planta Med.*, 56: 637.
- Ryu S. Y., No Z., Kim S. H., Ahn J. W., 1997. Two novel abietane diterpenes from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, 63: 44-46.
- Savona G., Paternostro M. P., Piozzi F., 1978. Salviarin, a new diterpenoid from *Salvia splendens*. *J. C. S. Perkin I*: 643-646.
- Savona G., Paternostro M. P., Piozzi F., 1979. Splendidin, a new trans-clerodane from *Salvia splendens*. *J. C. S. Perkin I*: 533-535.
- Ulubelen A., Topcu G., Eris C., Sönmez U., Kartal M., Kurucu S., Bozok-Johansson C., 1994. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, 36: 971-974.

SUMMARY

In vitro propagation of *S. sclarea* L. and *S. splendens* Ker.-Gawl. from shoot tips was developed. Maximum number of *S. sclarea* L. shoots per explant (3.6) was achieved on Murashige and Skoog agar medium supplemented with IAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and BAP ($1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). For shoot proliferation of *S. splendens* Ker.-Gawl., the most suitable was Linsmayer and Skoog agar medium containing IAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and BAP ($0.5\text{-}1.5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). In this case, the multiplication rate after 5 weeks in culture was 4. Shoots of *S. sclarea* L. and *S. splendens* Ker.-Gawl. rooted at a frequency of 90% and 72%, respectively, when they were cultivated for 4 weeks on hormone-free MS or LS agar medium.

MATERIAL I METODA

Nasiona zostały zebrane w latach 1995-1997 ze stanowisk uprawnych w regionie południowego i wschodniego w okresie 1977-1990 na Polu Doświadczalnym Uniwersytetu Łódzkiego. Skład pochodził material do badań. Materiał uprawian był w warunkach szklarni (szklarnia), zieleń gotowała się w wodzie w ciągu 4 godzin. Materiał uprawian był w warunkach szklarni. Wzrost roślin w szklarni był w warunkach