



## Skład olejków eterycznych w pędach *Elsholtzia cristata* Willd. uzyskanych metodą *in vitro*

Monika Sienkiewicz-Chwist<sup>1</sup>, Danuta Kalemba<sup>2</sup>, Halina Wysokińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny Łódź

<sup>2</sup>Instytut Podstaw Chemii Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź

### Composition of essential oil from *Elsholtzia cristata* Willd. shoots cultured *in vitro*

#### Summary

In this work, we studied the composition of essential oil from *Elsholtzia cristata* shoot proliferating cultures grown on agar-solidified Murashige and Skoog medium supplemented with indole-3-acetic acid (0,1 mg/l) and 6-benzylaminopurine (0,5 mg/l) for 4 weeks. The essential oils from shoots *E. cristata* and flowers of regenerated *in vitro* plants grown in the soil were also studied. The essential oil was obtained by hydrodistillation and analysed by GC-MS method. It was found that the essential oils from the shoot cultures, shoots and flowers of plants were at 0,1, 0,2 and 0,67% (v/w), respectively. The main component of essential oils isolated from these materials was estragol (80-90%) in contrast to intact plants and callus tissue with were reported in the literature to contain mainly elsholtzia ketones.

#### Key words:

*Elsholtzia cristata* Willd., shoot cultures, essential oil, estragol.

#### Adres do korespondencji

Monika  
Sienkiewicz-Chwist,  
Zakład Biologii i Botaniki  
Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Muszyńskiego 1,  
90-151 Łódź.

## 1. Wstęp

Rodzaj *Elsholtzia* – marzymięta (*Lamiaceae*) jest reprezentowany przez około 20 gatunków występujących w Azji, Afryce i Europie. Liczne gatunki z tego rodzaju są wykorzystywane w medycynie ludowej, szczególnie w Chinach. W literaturze donosi się o działaniu przeciwrzybowym (1), przeciwwirusowym

(np. w zakażeniach wirusem *Cytomegalovirus hominis*) (2) oraz o właściwościach przeciwbakteryjnych (np. w zwalczaniu zakażeń przecinkowcem cholery) (3), diuretycznych i ściągających (4) wyciągów z ziela marzymięty. Ziele tej rośliny stosowane jest również jako środek przeciwprzeziębieniowy i przeciwbiegunkowy (5).

Za działanie lecznicze surowca odpowiedzialne są głównie olejki eteryczne, a także kwasy fenolowe i sterole (6). W ziele badanego przez nas gatunku *E. cristata* Willd. (syn. *E. ciliata* (Thunb.) Hyl., *E. patrini* Garcke) – marzymięta grzebieniasta (syn. elszolcja orzęsiona) stwierdzono obecność kwasów tłuszczowych: palmitynowego, linolowego, linolenowego oraz kwasu ursolowego i steroli m.in.  $\beta$ -sitosterolu (7). Surowiec ten zawiera również szereg związków flawonoidowych (8), grupę związków pochodnych furanu określaną jako, elsholtzia ketony (9,10) oraz olejek eteryczny (11).

Celem pracy było określenie zawartości i składu olejku eterycznego w pędach *E. cristata* namnożonych metodą *in vitro* i w zregenerowanych roślinach hodowanych w glebie.

## 2. Materiał i metody

Materiałem wyjściowym były nasiona *Elsholtzia cristata* otrzymane z Ogrodu Roślin Leczniczych Akademii Medycznej we Wrocławiu. Nasiona sterylizowano w roztworze ACE (preparat handlowy) rozcieńczonym wodą destylowaną 1:1 (v/v) przez 20 minut. Następnie płukano je trzykrotnie w wodzie destylowanej i umieszczano w ciemności, na agarowym podłożu Murashige i Skooga (MS) bez regulatorów wzrostu. Po 2 tygodniach z nasion pozyskano siewki, które stanowiły źródło eksplantatów dla kultury pędów. W tym celu wierzchołki pędów (dł. 0,5 cm) umieszczano na agarowym (0,7%) podłożu MS z regulatorami wzrostu. Podłoże zawierało cytokininę BAP (6-benzylaminopuryna) lub zeatynę w stężeniu 0,5 i 1 mg/l oraz auksynę IAA (kwas indolilo-3-octowy) w stężeniu 0,1 mg/l. Po 4 tygodniach określano liczbę pędów uzyskanych z jednego eksplantatu (współczynnik proliferacji) oraz ich średnią długość. Namnażanie pędów prowadzono przez trzy kolejne 4-tygodniowe pasaże. W celu ukorzenia, pędy po 4-tygodniowym okresie wzrostu, przenoszono pojedynczo na agarowe podłoże MS bez regulatorów wzrostu lub zawierające jedną z następujących auksyn: NAA (kwas  $\alpha$ -naftylo-1-octowy), IBA (kwas indolilo-3-masłowy) lub IAA, w stężeniach 0,1 lub 1 mg/l. Dla każdego wariantu doświadczenia wykorzystano 20 pędów. Po 3 i 4 tygodniu hodowli określano procent ukorzenionych pędów i długość korzeni. Namnażanie i ukorzenie pędów prowadzono w fitotronie w temperaturze ok. 25°C, wilgotności 80-90%, przy ciągłym oświetleniu o natężeniu 40  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Ukorzenione *in vitro* roślinki po 4 tygodniach przenoszono do doniczek wypełnionych mieszaniną: torf, piasek, ziemia ogrodnicza (3:3:4) (v/v/v). Rośliny te hodowano w szklarni przez 6 tygodni. Identyfikacja roślin została przeprowadzona przez Witosławskiego (Instytut Biologii Środowiskowej, Zakład Botani-

ki UŁ). Egzemplarz *E. cristata* zdeponowano w zielniku Zakładu Biologii i Botaniki UM w Łodzi.

W namnożonych *in vitro* pędach oraz w pędach zregenerowanych *in vitro* roślin hodowanych w doniczkach określano zawartość i skład olejku eterycznego. Osobno analizowano część kwiatostanową i część dolną pędów (liście + łodyga). Materiał roślinny suszono na powietrzu. Olejki eteryczne pozyskiwano metodą destylacji z parą wodną z użyciem aparatu Derynga. Składniki olejku były rozdzielane metodą chromatografii gazowej. Do analizy użyto chromatografu gazowego firmy Carlo-Erba HRGC 5300 MEGA, kolumna kapilarna CP Sil 5 CB o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm, grubości filmu 0,25  $\mu\text{m}$ . Programowana temperatura kolumny 60-300°C, przyrost temperatury 4°C/min, temperatura dozownika 320°C, temperatura detektora 310°C, prędkość przepływu gazu (azotu) 0,8 cm<sup>3</sup>/min. Dla analizy składników olejku zastosowano metodę chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią masową. Użyto spektrometru masowego MD 800 sprzężonego z chromatografem gazowym firmy Fisons GC 3000 z kolumną kapilarną CP Sil 5 CB. Gaz nośny: hel, energia jonizacji 70eV, temperatura źródła jonów 250°C. Składniki zidentyfikowano porównując indeksy retencji (RI) i widma MS z wzorcami zgromadzonymi w bibliotece własnej IPCHŻ PŁ i literaturą (12). Obecność estragolu (indeks retencji RI 1196) potwierdzano porównując z substancją wzorcową, głównym składnikiem olejku estragonowego francuskiego *Artemisia dracuncululus* L. oraz analizą <sup>1</sup>H-NMR, 250 MHz,  $\delta$  (ppm): 7,14 i 6,84 (dwa d, J = 8,7 Hz, 4 H), 5,94 (m, 1 H), 5,06 (m, 2 H), 3,79 (s, 3 H), 3,33 (d, J = 6,7 Hz, 2 H); zgodne z (13).

### 3. Wyniki i dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że *Elsholtzia cristata* Willd. posiada dużą zdolność do proliferacji pędów bocznych, gdy eksplantatami są szczytowe części pędu hodowane na stałym podłożu MS w obecności auksyny i cytokininy. W tabeli 1 przedstawiono zmiany współczynnika proliferacji pędów podczas 4-tygodniowego okresu hodowli. Stwierdzono, że obie zastosowane cytokininy BAP i zeatyna są odpowiednie dla namnażania pędów *E. cristata*. Po 4 tygodniach z jednego eksplantatu (wierzchołkowa część pędu) otrzymano średnio 14-17 pędów o średniej długości od 1,7 do 2,3 cm. Najwyższy współczynnik proliferacji (17 pędów/eksplantat) uzyskano na podłożu zawierającym BAP w stężeniu 0,5 mg/l (fot. 1). Na podłożach z zeatyną (0,5 lub 1mg/l) uzyskano również wysokie współczynniki proliferacji (ponad 16 pędów z 1 eksplantatu). W obecności tej cytokininy obserwowano najpierw rozwój pędu głównego, który rozwijał się z pąka szczytowego i osiągał długość 5-6 cm. Następnie u podstawy tego pędu tworzyły się nowe, pędy boczne nie przekraczające 2 cm długości. Biorąc pod uwagę względy ekonomiczne (wysoka cena zeatyny) do dalszego namnażania pędów użyto podłoża zawierającego BAP w stężeniu 0,5 mg/l.

Tabela 1

Namnażanie pędów *Elsholtzia cristata* z wierzchołkowych części pędu na podłożu MS z dodatkiem IAA w stężeniu 0,1 mg/l

Cytokina mg/l	Liczba eksplantatów	Średnia liczba pędów uzyskana z jednego eksplantatu			Średnia długość pędu (cm)		
		2	3	4	2	3	4
BAP							
0,5	30	4,2	13,2	17,1	1,3	1,9	1,9
1,0	30	3,1	12,4	14,5	1,6	2,1	2,3
zeatyna							
0,5	30	4,5	16,1	16,2	1,7	2,1	2,1
1,0	30	2,1	10,2	16,5	1,4	1,7	1,7

2, 3, 4 – czas trwania hodowli ( tygodnie).

Otrzymane pędy *E. cristata* ukorzeniano na podłożu MS z auksyną lub bez regulatorów wzrostu. Pędy wytwarzały korzenie w 3-4 tygodniu hodowli. Najczęściej z pędu wyrastały 1 lub 2 korzenie. W tabeli 2 przedstawiono procent ukorzenionych pędów, średnią ich długość oraz długość powstałych korzeni po 3 i 4 tygodniach hodowli. Stwierdzono, że dodatek auksyny w pożywce ma korzystny wpływ na ukorzenianie. Najwięcej ukorzenionych pędów, uzyskano na podłożu MS zawierającym NAA (1 mg/l); po 4 tygodniach hodowli ukorzeniło się 98% pędów. W tym samym czasie na podłożu agarowym nie zawierającym regulatorów wzrostu tylko 40% pędów tworzyło korzenie. Zaobserwowano, że na podłożu bez regulatorów wzrostu korzenie były znacznie dłuższe (średnio do 5 cm) niż na pożywkach z auksyną (średnio 1-1,8 cm). Ukorzenione pędy (fot. 2) dobrze rozwijały się po przeniesieniu do doniczek ze sterylną ziemią (współczynnik przeżywalności 100%). Po 6-tygodniowym okresie hodowli osiągały one wysokość 15-25 cm. Większość roślin zakwitła po trzech tygodniach wzrostu (fot. 3).



Fot. 1. Namnażanie pędów *Elsholtzia cristata*. Kultury prowadzono na podłożu MS z dodatkiem BAP (0,5 mg/l) oraz IAA (0,1 mg/l).

Tabela 2

Ukorzenianie pędów *Elsholtzia cristata* na podłożu MS z dodatkiem auksyny i bez regulatorów wzrostu

Auksyna (mg/l)	Liczba eksplantatów	(% pędów ukorzenionych)		Średnia długość pędu (cm)		Średnia długość korzeni (cm)	
		3	4	3	4	3	4
NAA							
0,1	20	66,7	69,7	2,5	3,9	1,1	1,3
1,0	20	93,3	98,2	3,0	4,2	0,8	1,2
IBA							
0,1	20	69,0	72,3	2,2	3,6	1,2	1,5
1,0	20	86,7	89,3	4,4	4,8	0,9	1,1
IAA							
0,1	20	80,0	83,4	2,2	3,5	1,4	1,8
1,0	20	76,6	80,1	4,1	4,6	0,9	1,2
0	20	36,6	42,0	3,4	3,6	4,2	5,1

3, 4 – czas trwania hodowli (tygodnie).



Fot. 2. Ukorzeniony pęd *Elsholtzia cristata* po 4 tygodniach hodowli na podłożu MS z dodatkiem IAA (0,1 mg/l).



Fot. 3. *Elsholtzia cristata* zregenerowana *in vitro* po 4 tygodniach wzrostu w glebie.

W pędach *E. cristata* hodowanych na podłożu MS zawierającym IAA w stężeniu 0,1 mg/l oraz BAP w stężeniu 0,5 mg/l i w wyhodowanych *in vitro* roślinach określano zawartość olejku eterycznego. Stwierdzono, że pędy z kultury *in vitro* zawierały 0,1% olejku. Ta ilość była dwukrotnie niższa niż w pędach całych roślin. Największą zawartość olejku eterycznego (0,67%) stwierdzono w kwiatostanach zregenerowanych *in vitro* roślin rosnących w doniczkach przez 6 tygodni. W przeprowadzonej analizie GC-MS wykazano, że w oleju dominującym składnikiem był estragol. W pędach namnożonych *in vitro* i w pędach roślin hodowanych w doniczkach stanowił on ok. 80% olejku eterycznego. Natomiast olejek eteryczny wyizolowany z kwiatostanów zawierał aż 97% estragolu. Z danych literaturowych wynika, że estragol jest składnikiem olejku eterycznego ziela *E. flava* (40,5%) (14). Nie wykryto go natomiast w oleju eterycznym pochodzącym z innych gatunków *Elsholtzia*. W badaniach składu olejku eterycznego ziela *E. cristata* wykazano, że dominującym składnikiem jest elsholtzia keton (11). Skład olejku eterycznego był analizowany również w kalusach marzymięty grzebieniastej (15). Olejek ten nie zawierał estragolu, a głównym jego składnikiem były pochodne furanu (elsholtzia ketony). Na podstawie naszych badań można przyjąć, że zregenerowane *in vitro* rośliny mogą stanowić nowy chemotyp w obrębie gatunku *E. cristata*. Z uwagi na dużą ilość estragolu olejek eteryczny tych roślin może być wykorzystywany jako źródło tego związku.

Obecnie prowadzone są badania zawartości i składu olejku eterycznego w roślinach *E. cristata* wyhodowanych metodą konwencjonalną (z nasion), rosnących w gruncie.

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

## Literatura

1. Zheng S., Limao C., Dai R., Kang S., Ren P., Shen X., (2001), Xibe i Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 37, 37-40.
2. Lynn Y., Hudson J. B., Towers G. H. N., (1995), Planta Med. Letters, 61, 187-188.
3. Bestmann H. J., Rauscher J., Vostrowsky O., (1992), J. Ess. Oil Res., 4, 121-124.
4. Mathela C. S., Melkani A. B., Bisht J. C., Pant A. K., Bestmann H. J., Erler J., Kobold U., Rauscher J., Vostrowsky O., (1992), Planta Med., 58, 376-379.
5. Zheng S., Kang S., Shen Y., Sun L., (1999), Planta Med. Letters, 65, 173-175.
6. Takahiko I., (1992), Nippan Kagaku Kaishi, 4, 423-425.
7. Zheng S., (1990), Zhiwu Xuebao, 32, 215-219.
8. Zheng S., (1989), Xuexiao Xuaxue Xuebao, 10, 866-868.
9. Kharina T. G., Kalinkina, (1995), Rastit. Resur., 31, 58-64.
10. Dembitskii A. D., Kalinkina, (1993), Khim. Prir. Soedin., 6, 823-824.
11. Kobold U., Vostrowsky O., Bestmann H. J., Bisht J. C., Pant A. K., Melkani A. B., Mathela C., S., (1987), Planta Med., 24, 268-271.
12. Adams R. P., (1989), *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*, Academic Press, Inc., San Diego.
13. Kohno H., Iwakuma T., Yamada K., (1989), Synth. Commun., 28, 1935-1945.
14. Bestman H. J., (1997), Planta Med., 63, 88-89.
15. Chi H. J., Shin S. H., Chang J. I., (1992), Saengyak Hakhoechi, 23, 77-80.